

ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞を用いた食品添加物等の内分泌かく乱作用の検索と BHA, OPP を中心とした機構の解析

大久保智子,* 加納 いつ

Studies on Estrogenic Activities of Food Additives with Human Breast Cancer MCF-7 Cells and Mechanism of Estrogenicity by BHA and OPP

Tomoko OKUBO* and Itsu KANO

Department of Environmental Health, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health,
3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

(Received December 9, 2002; Accepted March 9, 2003)

Estrogenic activities of more than 90 chemicals including food additives, foodstuffs of plant origin, and some chemicals, which could be orally ingested, were examined by assaying estrogen receptor (ER)-dependent proliferation of MCF-7 cells. Among 66 food additives, 17 compounds stimulated the proliferation, but their concentrations giving maximal cell yield were higher than that of 17β -estradiol and their estrogenic activities were weak. Flavonoids had relatively strong estrogenic activities. In the assay of ER competitive binding to human ER α and ER β *in vitro*, the antioxidant *t*-butylhydroxyanisole (BHA) had the capacity to compete with 17β -estradiol, while the capacity of *o*-phenyl phenol (OPP) was too small to calculate. Both BHA and OPP induced a decrease in gene expression of ER α and an increase in that of progesterone receptor in a time-dependent manner. These effects were similar to that of 17β -estradiol, a though much higher concentrations were required for these compounds than 17β -estradiol. These results may suggest that we should be careful not to ingest excessive food additives.

Key words—estrogen; food-additive; BHA; OPP; MCF-7; estrogen receptor

はじめに

内分泌かく乱化学物質は動物の生体内に取り込まれた場合、本来生体で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える。環境中に存在するいくつかの化学物質が生殖機能の障害、悪性腫瘍の発生などにかかわる可能性が指摘されている。¹⁾ 日常生活において、我々は様々な化学物質に接触している。特に食品中には動植物由来の食品本来の成分の他に、保存性を高める、見栄えを良くするなどの目的で食品添加物が加えられていることが多く、それらを意識せずに摂取している。食品中に存在する化学物質は、体内へ取り込まれ、吸収される可能性がある。内分泌かく乱化学物質は最近注目されており、わが国でも環境省で「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」が作成され、内分泌かく乱作用が疑われる物質、65物質が挙げられている。食品に含まれる成分の中で

はフラボノイド類の内分泌かく乱作用について、数多く研究されている。²⁻¹⁰⁾ しかし他の食品成分や化合物、特に食品添加物による内分泌かく乱作用については yeast two-hybrid assay を用いて核内受容体に働きかけホルモン作用を示す化合物をスクリーニングした報告³⁾ などがあるものの、他の報告はあまり多くない。食品添加物は、毒性学的に安全性が確認されている濃度に基づき使用量が規制されている。しかしこれは発がん性、催奇形性などから求めた安全性である。これらの物質について内分泌かく乱作用の検討も必要であると思われる。以前、我々は保存料として繁用されるパラベン類にエストロゲン作用のあることを報告した。¹¹⁾ 本報では食品添加物として用いられる化合物だけでなく、摂取する可能性のある植物成分などについてもヒト乳がん由来 MCF-7 細胞を用いたエストロゲン作用のスクリーニングを行い、さらにいくつかの化合物についてエストロゲン受容体結合競合試験及び細胞の受容体遺伝子の発現を調べた。

実験方法

試薬 17 β - エストラジオール, ジエチルstilベストロール (DES), タモキシフェン (TAM), 4- ヒドロキシタモキシフェン (4OH-TAM) は Sigma から購入した. *t*- ブチルヒドロキシアニソール (BHA) は Fluka から, *o*- フェニルフェノール (OPP) は東京化成から購入した. ICI 182,780 は Tocris Cookson Ltd. から購入した. MCF-7 細胞は Dr. Soto, Dr. Sonnenschein (Tufts 大学, Boston) より供与された.

方法

1. MCF-7 細胞増殖試験 MCF-7 細胞は 5% 牛胎児血清 (FBS) 添加ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用い, 37°C, CO₂ 6% の条件下で継代培養を行った. MCF-7 細胞は 96 ウェルプレートに 5% FBS 含有 DMEM を用いて 4000 個/ウェルを播種した. 24 時間培養し, 播種用培地を除去後, エタノール (終濃度 0.1%, vehicle) で溶解した化合物を, 5% CDHuS (チャーコール, デキストラン処理ヒト血清) 含有フェノールレッド不含 DMEM (実験用培地) で希釈し, 各ウェルに加え 6 日間培養した. 処理後プレートの培地を除去し, 24 時間以上冷凍保存した後, CyQUANT 細胞増殖測定キット (Molecular Probes, Inc.) を用いて蛍光強度から細胞数を測定した. Vehicle のみの対照群を 100% として増殖の程度を算出した.

化合物の MCF-7 細胞増殖作用に対するエストロゲン拮抗剤 ICI 182,780 の影響については, 被験化合物単独で最大の細胞増殖を示す濃度で, 10⁻⁸ M ICI 182,780 共存下 6 日間培養し, 細胞増殖の程度を測定した.

2. ヒトエストロゲン受容体結合競合試験 ヒトエストロゲン受容体 (ER) 結合競合試験は Ligand Screening System—Estrogen Receptor α 及び β (TOYOBO Co., Ltd.) を用いて, プロトコールに従い, ER タンパクと HRP 標識エストラジオールを用いて測定を行った. 化合物による受容体の阻害率は陽性対照 3 \times 10⁻⁷ M DES 存在下での吸光度を 100%, DES が存在しない時の吸光度を 0% として, 化合物を反応させた時の吸光度から求めた.

3. 受容体遺伝子発現 実験方法は既報に従った.¹¹⁾ 簡略に述べると MCF-7 細胞を被検物質で 24,

48 時間処理後, 細胞を回収し, RNA を Ultraspec RNA Isolation System (Biotech Laboratories, TX, USA) を用いて抽出した. ER α , プロゲステロン受容体 (PR) のプライマーを用いて, RT-PCR 反応を行った. PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動により分離し, SYBR Green (Molecular Probes, Inc.) で染色後, 島津製作所デンストメータ CS-9300PC を用いて, PCR 産物の定量を行った. ER α 及び PR の発現量は各々 β - アクチンで補正した.

結果

1. MCF-7 細胞増殖試験 MCF-7 細胞増殖作用のある化合物の濃度を変化させたグラフを Fig. 1 に, また最大細胞増殖を示す濃度 (C_{max}) 及び作用の強さ (C_{max} を与える濃度の 17 β - エストラジオールと化合物の%) (RPP), 17 β - エストラジオールと比した最大増殖程度の割合 (RPE) を Table 1 に示す. 10⁻³ M または 1000 μ g/ml まで高濃度にしても細胞増殖を示さない化合物を Table 2 に示す.

1-1. 合成ホルモン様化合物 陽性対照として合成ホルモン様化合物の作用を調べた. MCF-7 細胞は, 17 β - エストラジオールで 6 日間処理を行ったところ, 10⁻¹² M 付近から増殖作用を示し, 濃度依存的に上昇し, 3 \times 10⁻¹¹ M で対照の 4 倍 (400%) を超える最大増殖を示した (Fig. 1A). DES 及び TAM の RPP はそれぞれ 0.003%, 0.0003% であったが, いずれも増殖の程度 RPE は 17 β - エストラジオールとほぼ等しいレベルまで促進した (Table 1). 4OH-TAM の RPP は 0.3% であるが, 増殖作用は TAM に比べて小さく, RPE 36.5% であった. Fang ら³²⁾ の報告では, E-SCREEN assay で 17 β - エストラジオールの増殖の程度 (RPE) を 100% とすると 4OH-TAM はそれより低く RPE 22% であった. Andersen ら³³⁾ の報告によると, MCF-7 細胞増殖試験を用いた場合, 17 β - エストラジオールで処理した細胞はコントロールに比べ約 7 倍, TAM で約 5.5 倍に増加し, recombinant yeast estrogen screen ではコントロールに比べ 17 β - エストラジオールは 2.6 倍, TAM は 2.2 倍に増加した. 今回の実験における TAM 及び 4OH-TAM の増殖作用は比較的高いが, 基本的にこれらの報告に類似していると考えられる.

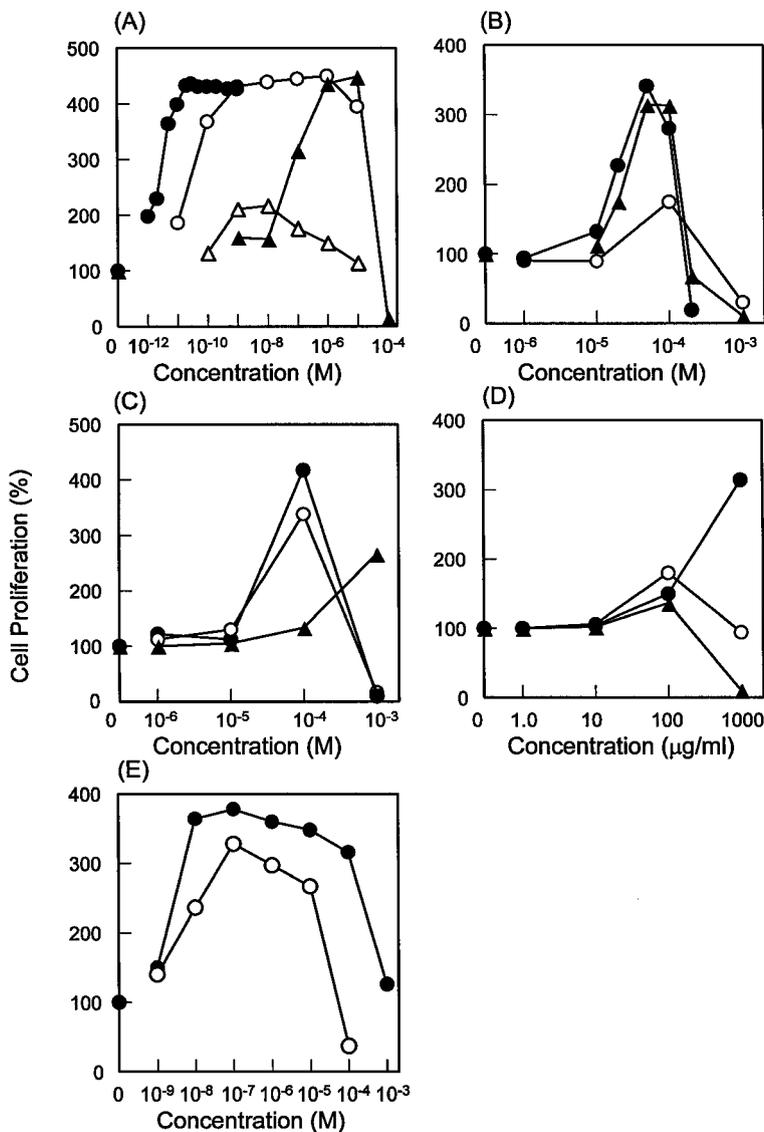


Fig. 1. Proliferation of MCF-7 Cells

Cell number after treatment of cells for 6 days with the indicated concentrations of chemicals is expressed as percentages relative to that of cells treated with vehicle (0.1% ethanol) alone (100%). Each point is the mean of eight determinations and SD values were less than 5%. A ●: 17 β -estradiol, ○: DES, ▲: TAM, △: 4OH-TAM; B ▲: BHA, ●: OPP, ○: piperonyl butoxide; C ●: morin, ○: hesperetin, ▲: ferulic acid; D ●: carthamus yellow, ○: cochineal color, ▲: monascus color; E ●: coumestrol, ○: genistein.

1-2. 食品添加物

① 酸化防止剤 酸化防止剤には多くの合成物、天然由来化合物が用いられている。酸化防止剤として幅広く用いられている BHA には MCF-7 細胞増殖作用が認められ、 C_{max} 5×10^{-5} M, RPP 0.00006% であった (Fig. 1B)。Soto *et al.*¹²⁾ も BHA にはエストロゲン作用があり、 C_{max} , RPP とも我々の結果と等しい値を報告している。また BHA の代謝物で、アメリカや中国などでは酸化防止剤として食品に使用されている TBHQ 及びその代謝物 TBQ には細胞増殖作用は認められなかった。

BHA と同様に幅広く用いられている BHT には、増殖作用が見られなかった。フラボノイド構造を持つモリンは酸化防止剤の中で最も高い増殖程度を示し、 10^{-4} M の時に RPE 99.2% であった。またヘスペレチンにも強い細胞増殖作用が見られた (Fig. 1C)。Breinholt and Larsen²⁾ は、recombinant yeast screen 及び MCF-7 細胞増殖試験によりモリン、ヘスペレチンのエストロゲン作用を報告している。ルチンはフラボノイド構造を持つケルセチンの配糖体であり、増殖作用を有するがケルセチン自身にはエストロゲン作用は認められなかった。その他にはノ

Table 1. Proliferative Effect of Chemicals

Chemical	C_{\max}^a	RPP (%) ^b	RPE (%) ^c
17 β -Estradiol	3×10^{-11} M	100	100
Synthetic Steroids			
Diethylstilbestrol (DES)	1×10^{-6} M	0.003	106
Tamoxifen (TAM)	1×10^{-5} M	0.0003	105
4-Hydroxytamoxifen (4OH-TAM)	1×10^{-8} M	0.3	36.5
Food Additives			
<u>Antioxidants</u>			
<i>t</i> -Butylhydroxyanisole (BHA)	5×10^{-5} M	0.00006	66.8
Morin	1×10^{-4} M	0.00003	99.2
Hesperetin	1×10^{-4} M	0.00003	73.9
Ferulic acid	1×10^{-3} M	0.000003	68.7
Nordihydroguaiaretic acid	1×10^{-5} M	0.0003	29.2
Propyl gallate	1×10^{-4} M	0.00003	13.8
Ellagic acid	1×10^{-5} M	0.0003	10.6
Rutin	1×10^{-3} M	0.000003	40.5
Guaiac gum	10 μ g/ml	—	47.3
Clove oil	100 μ g/ml	—	21.2
<u>Fungicides</u>			
<i>o</i> -Phenylphenol (OPP)	5×10^{-5} M	0.00006	80.1
<i>o</i> -Phenylphenol Na (OPP-Na)	5×10^{-5} M	0.00006	51.7
<u>Coloring Agents</u>			
Carthamus yellow	1000 μ g/ml	—	66.8
Cochineal color	100 μ g/ml	—	25.1
Monascus color	100 μ g/ml	—	11.4
<u>Insecticides</u>			
Piperonyl butoxide	1×10^{-4} M	0.00003	10.6
<u>Bitters</u>			
Naringin	1×10^{-3} M	0.000003	66.0
Substances Naturally Present in Plants			
Coumestrol	1×10^{-7} M	0.03	86.5
Genistein	1×10^{-7} M	0.03	71.0
Genistin	1×10^{-3} M	0.000003	134
Daidzein	1×10^{-6} M	0.003	115
Daidzin	1×10^{-3} M	0.000003	58.8
Resveratrol	1×10^{-4} M	0.00003	59.9
Naringenin	1×10^{-5} M	0.0003	90.6
Biochanin A	1×10^{-6} M	0.003	90.4
Puerarin	1×10^{-3} M	0.000003	82.6
Chrysin	1×10^{-4} M	0.00003	45.0
Apigenin	1×10^{-6} M	0.003	60.8
Chemical Substances			
Bisphenol A	1×10^{-6} M	0.003	101
4- <i>n</i> -Nonylphenol	1×10^{-6} M	0.003	74.3

a) C_{\max} is the concentration of the compound giving maximal proliferation. *b*) RPP (Relative proliferative potency) is the ratio between 17 β -estradiol and xenoestrogen doses needed to produce maximal cell yields $\times 100$. *c*) RPE (relative proliferative effect) is the ratio of maximal cell yield of the test compound to that of 17 β -estradiol, expressed as a percentage.

Table 2. Nonestrogenic Chemicals

Food Additives		
<u>Antioxidants</u>	<u>Preservatives</u>	<u>Coloring Agents</u>
L-Ascorbic acid	Hinokitiol	Amaranth (Red No. 2)
L-Ascorbyl palmitate	Propionic acid	Erythrosine (Red No. 3)
L-Ascorbyl stearate	Sorbic acid	Allura red (Red No. 40)
Butylhydroxytoluene (BHT)	Sodium benzoate	New coccine (Red No. 102)
Catechin		Phloxine B (Red No. 104)
Citric acid isopropyl	<u>Sweeteners</u>	Rose bengal (Red No. 105)
Gallic acid	L-Arabinose	Acid red (Red No. 106)
Gentisic acid	Aspartame	Red cabbage color
γ -Oryzanol	Saccharin	Annatto red
Quercetin	Saccharin Na	Beet red
Sesamol	D-Sorbitol	Tartrazine (Yellow No. 4)
Sodium isoascorbate	Xylitol	Sunset yellow FCF (Yellow No. 5)
<i>d</i> - α -Tocopherol		Gardenia yellow
<i>t</i> -Butylhydroquinone (TBHQ) ^{a)}	<u>Others</u>	Curcumin
<i>t</i> -Butylquinone (TBQ) ^{b)}	Hesperidin	Riboflavin
	Phytic acid	Fast green FCF (Green No. 3)
<u>Fungicides</u>		Sodium copper-chlorophyllin
Biphenyl		Brilliant blue FCF (Blue No. 1)
Imazalil		Indigo carmine (Blue No. 2)
Thiabendazole		Gardenia blue
		Cacao color
Substances Naturally Present in Plants		
Berberine	Luteolin	
Epicatechin gallate	Myricetin	
Epigallocatechin	Procyanidin B1	
Epigallocatechin gallate	Procyanidin B2	
Glycyrrhizic acid	Wogonin	

Interpretation of nonestrogenicity was based on no cell proliferative activity in the range of concentration up to 10^{-3} M or 1000 μ g/ml. *a)* TBHQ is a major metabolite of BHA and it is a food additive as an antioxidant in some countries, but not in Japan. *b)* TBQ is the metabolite of TBHQ.

ルジヒドログアヤレチック酸, フェルラ酸, 没食子酸プロピル, エラグ酸, グアヤク脂, クロブ油にも細胞増殖作用が認められた. クロブ油の主成分オイゲノール, アセチルオイゲノールには増殖作用は見られなかった. カテキンには MCF-7 細胞でエストロゲン作用が報告されている²⁾が, 我々の実験ではエストロゲン作用は認められなかった.

② 防カビ剤 防カビ剤の中では, OPP の RPP は 0.00006% であった (Table 1, Fig. 1B). OPP は水に溶けにくい, 水溶性の高い OPP-Na も食品添加物として使用される. 両者を 2×10^{-4} M の濃度まで培地に溶解させても pH に違いはなく, また MCF-7 細胞増殖の結果に大差はないことから, 以下の実験では OPP を用いた結果を示す. OPP は生体内で代謝され PHQ が生成し, さ

らに酸化されると PBQ になるが, これらの代謝物にはエストロゲン作用はなかった. ビフェニル, チアベンダゾール, イマザリルには増殖作用はなかった.

③ 保存料 保存料として使用されている物質の中でパラオキシ安息香酸エステル (パラベン類) にはエストロゲン作用があることを報告したが,¹¹⁾ 今回調べた安息香酸ナトリウム, ソルビン酸, プロピオン酸, ヒノキチオールにはエストロゲン作用はなかった.

④ 甘味料 最近, 砂糖より甘く, 低カロリーであるアスパルテームやその他の人工甘味料が多く使用されているが, 今回調べた天然及び人工の甘味料の中でエストロゲン作用を有する化合物はなかった.

⑤ 色素 現在, 数多くの色素が使用されている。今回の実験では, ベニバナ黄 (Carthamus yellow), コチニール色素, モナスカス色素の天然色素に MCF-7 細胞増殖作用が認められた (Fig. 1D)。ベニバナ黄は 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で溶解度を超えているが, 高い RPE (66.8%) を示した。コチニール, モナスカス色素は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で最大増殖を示したが, その増殖程度 RPE は比較的小さかった。エストロゲン作用が認められた天然色素は多種多様な成分で構成されているため, いかなる構造の成分が作用を持つかについては今回の実験では検討していない。これら以外の色素には増殖作用は認められなかった。

⑥ 防虫剤 ピペロニルブトキシドのエストロゲン作用について, これまで報告はなかったが, 今回の実験で, わずかではあるが再現性良く細胞増殖作用があり, 弱いエストロゲン作用が示唆された (Fig. 1B)。

⑦ その他 苦味剤ナリンギンはグレープフルーツなどに含まれる成分であり, フラボノイド構造を持つナリンゲニンの配糖体である。ナリンギンには, ナリンゲニン ($C_{\text{max}} 1 \times 10^{-5} \text{ M}$) より弱いものの細胞増殖作用が認められた。ヘスペリジンはヘスペレチンの配糖体であるが, エストロゲン作用のある酸化防止剤ヘスペレチンとは異なり, エストロゲン作用はなかった。

1-3. 植物に存在する成分 食品として摂取する可能性のある植物由来の化合物について MCF-7 細胞増殖試験を行った。これまでにクメストロール,⁴⁾ ゲニステイン,^{2,5)} ゲニスチン,⁶⁾ ダイゼイン,^{2,4)} ダイジン,³⁾ レスベラトロール,^{7,8)} ナリンゲニン,^{2,9)} ピオカニン A,^{2,4)} クリシン,^{2,10)} アピゲニン²⁾などに, 植物エストロゲンとしての報告があるが, 今回の実験でもこれらの化合物に細胞増殖作用が見られた。クメストロール, ゲニステインによる細胞増殖曲線を Fig. 1E に示した。ともに $C_{\text{max}} 10^{-7} \text{ M}$ で強い増殖作用を示した。

プエラリンは大豆に含まれるフラボノイドの配糖体で, ダイジンとは glycoside の結合位置を異にする物質であるが, ダイジンと同様 RPE は小さいがエストロゲン作用が認められた。ゲニスチン, ダイジン, ナリンギン, ヘスペリジンは配糖体の構造を持ちそれぞれゲニステイン, ダイゼイン, ナリンゲニン, ヘスペレチンなどのアグリコンに比しエスト

ロゲン作用は著しく弱く, 特に, ヘスペリジンにはエストロゲン作用は認められなかった (described above)。一方, 酸化防止剤の 1 つケルセチンにはエストロゲン作用はないが, その配糖体であるルチンには弱いエストロゲン作用が認められた。ミリセチン, ルテオリンにエストロゲン作用の報告²⁾があるが, 今回の実験では作用は認められなかった。酸化防止剤として用いられているカテキン以外の茶の成分, エピカテキンガレート, エピガロカテキン, エピガロカテキンガレート, 及び茶抽出物ポリフェノン 100 (data not shown) にもエストロゲン作用は認められず, 主な茶成分の中で作用を示すものはなかった。リンゴ由来のプロシアニジン B₁, B₂ にも作用は認められなかった。豆科の植物, 甘草は甘味料としても用いられるが, この成分の 1 つ, グリチルリチン酸に作用は認められなかった。

1-4. その他 エポキシ樹脂, ポリカーボネート製品などの食器から溶出する可能性のある, ビスフェノール A は, MCF-7 細胞を用いて 10^{-5} M の濃度 (Table 1) で 17β - エストラジオールと同程度の増殖を示し, これまでの報告^{13,14)}と同様の結果が得られた。食器の洗浄に使われる洗剤中のノニルフェノールにおいても, これまでの報告^{12,15)}に対応する高いエストロゲン作用が認められた。

1-5. ICI 182,780 による細胞増殖抑制試験 食品添加物などの中で比較的高い RPE を示した, 化学合成品である BHA, OPP, 植物成分であるモリン, ヘスペレチン, クメストロール, ゲニステインの細胞増殖作用についてエストロゲン拮抗剤 ICI 182,780 の影響を調べた。ICI 182,780 自身に細胞増殖作用はなかった。化合物は最大増殖を示す濃度とし, ICI 182,780 の濃度を変化させると, 濃度依存的に細胞増殖の抑制が見られ (data not shown), 10^{-8} M の ICI 182,780 添加時に, いずれもほぼ完全に増殖が抑制された (Fig. 2)。このことから, これらの化合物による MCF-7 細胞増殖は ER を介したエストロゲン作用であることを示唆している。

2. ER 結合競合試験 食品添加物などの中で比較的高い RPE を示した BHA, OPP, モリン, ヘスペレチン, クメストロール, ゲニステインについて ER 結合競合試験を行った。ヒト ER α , ER β 各々について半阻害濃度 (IC₅₀), 及び DES の IC₅₀ 値を 100 としたときの, 化合物の相対的結合親和性

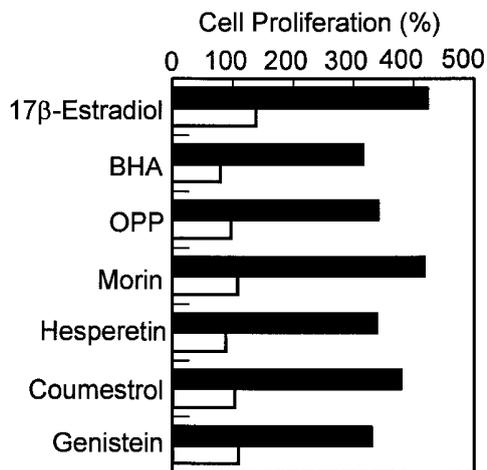


Fig. 2. Inhibitory Effect of ICI 182,780 on Cell Proliferation by Chemicals

The concentrations of 17 β -estradiol and chemicals were those giving maximal cell yield (Fig. 1 and Table 1). Cell proliferation was examined in the absence (at 0 M, black bar) and presence (at 10^{-8} M, white bar) of ICI 182,780. Each point is the mean of eight determinations and SD values were less than 5%.

Table 3. Relative Binding Affinity of Chemicals for ER α and ER β

Chemicals	ER α		ER β	
	IC ₅₀ ^{a)}	RBA ^{b)}	IC ₅₀ ^{a)}	RBA ^{b)}
DES	3.0×10^{-8} M	100	2.6×10^{-8} M	100
TAM	3.8×10^{-7} M	7.89	5.3×10^{-7} M	4.91
4OH-TAM	7.9×10^{-8} M	37.97	5.7×10^{-8} M	45.61
BHA	2.0×10^{-4} M	0.015	9.0×10^{-4} M	0.003
OPP	$>1.0 \times 10^{-3}$ M	—	$>1.0 \times 10^{-3}$ M	—
Morin	3.2×10^{-5} M	0.094	1.5×10^{-5} M	0.173
Hesperetin	3.8×10^{-5} M	0.079	2.8×10^{-5} M	0.093
Genistein	1.3×10^{-6} M	2.31	9.4×10^{-8} M	27.66
Coumestrol	1.9×10^{-6} M	1.58	3.7×10^{-7} M	7.03

Each value was the mean of a representative duplicate determination in more than four experiments.

a) IC₅₀ is the concentration of the compound that inhibits binding of 17 β -estradiol to ER by 50%. b) RBA was calculated by the equation: (IC₅₀ of DES/IC₅₀ of competitor) \times 100.

(RBA) を求めた (Table 3). 4OH-TAM は比較的 RBA が大きく, TAM より強い親和性を示した. BHA の RBA 値が小さく, 受容体に対する親和性が比較的弱いことは, Jobling *et al.*¹⁶⁾ の報告と同様である. OPP もわずかに結合はあるもののその程度は弱く IC₅₀ 値を求めることはできなかった. ラット ER を用いた結合競合試験¹⁷⁾でも, OPP の IC₅₀ は大きく我々の結果と同様, 算出不可能であった. モリン, ヘスペレチンは DES と比べて非常

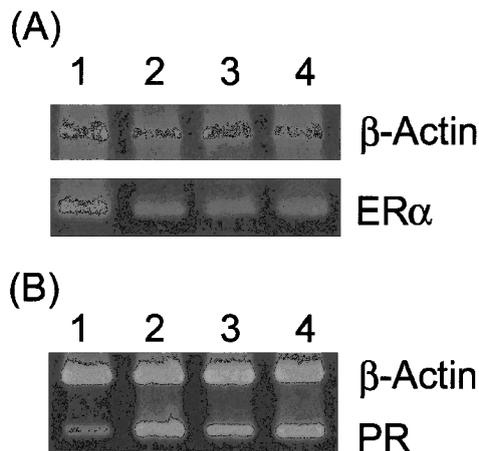


Fig. 3. Gene Expression of ER α and PR Detected by RT-PCR Following Treatment of Cells with BHA and OPP for 48 h, with Expression of β -Actin mRNA as Reference

Electrophoresis of PCR-products was carried out on 2% agarose gel. (A) The bands of ER α (314 bp) and those of β -actin (838 bp) are shown. (B) The bands of PR (533 bp) in the upper panel and those of β -actin are shown. 1: none, 2: 10^{-10} M 17 β -estradiol, 3: 5×10^{-5} M BHA, 4: 5×10^{-5} M OPP. A typical result of five experiments is shown.

に弱い結合競合を示した. ゲニステイン, クメストロールは ER に対し比較的親和性は高く, 特に ER β に結合しやすかった. Kuiper *et al.*¹⁸⁾ も, ヒト受容体を用いて, 両化合物が ER α より ER β に親和性が高いことを報告している. BHA, OPP, モリン, ヘスペレチンにおいては ER α , ER β の差は顕著ではないと思われる.

3. 受容体遺伝子発現 MCF-7 細胞増殖作用があり, 繁用される食品添加物 BHA, OPP が, 細胞中の ER α 及び PR の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した. 細胞を BHA, OPP (いずれも 5×10^{-5} M) で処理後, 細胞から RNA を抽出し, RT-PCR を行った. 無処理及び化合物処理 48 時間後の PCR 産物の電気泳動像を Fig. 3 に示す. Figure 4 には化合物による各時間の遺伝子発現量を 0 time を 1 として表した. MCF-7 細胞を 10^{-10} M 17 β -エストロジオールで処理すると, ER α は経時的に減少した. BHA, OPP で処理した MCF-7 細胞でも 17 β -エストロジオールよりやや弱い, ER α の減少が認められた (Fig. 4A). PR の発現は 17 β -エストロジオールにより経時的に増加し, BHA, OPP で処理すると 17 β -エストロジオールと同様に PR の発現は経時的に増加した (Fig. 4B). 17 β -エストロジオール処理により MCF-7 細胞の ER 遺伝子の転写が抑制されること (Saceda *et al.*),³⁰⁾ 及び

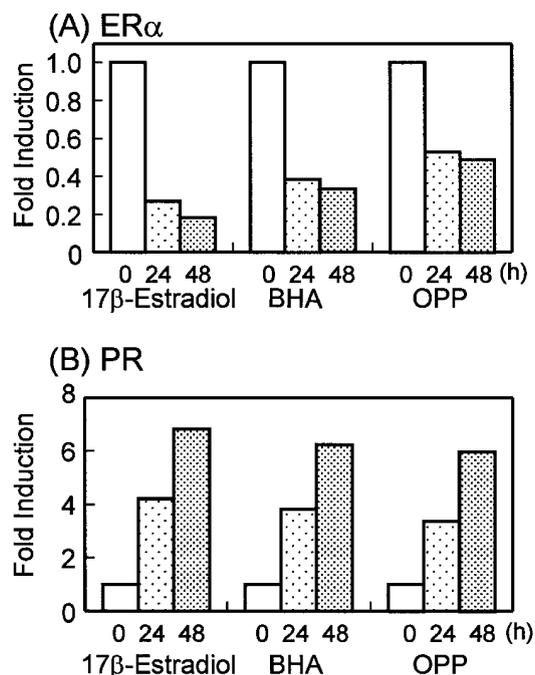


Fig. 4. Gene Expression of ER α and PR Detected by RT-PCR Following Treatment of Cells with BHA and OPP with Expression of β -Actin mRNA as Reference

Expression of ER α (A) and PR (B) at different time points, 0, 24 and 48 h, was determined by densitometry of electrophoretic bands, taking the value of sample/ β -actin at zero time as 1. Induction is calculated with the level of control cells, treated with vehicle alone, as a reference at each time-point. Values were the mean of duplicate determinations and SD values were less than 5%.

PRの合成が促進されることが (Nardulli *et al.*)³¹⁾ 報告されている。今回の実験でもこれらの報告と一致した17 β -エストラジオールによる遺伝子発現量の変化を示した。このことから、BHA、OPPのMCF-7細胞に対するエストロゲン作用を確認することができた。両化合物とも濃度は高いものの17 β -エストラジオールと同傾向の結果を示し、女性ホルモンと類似の細胞内情報伝達に関与することが示唆された。

考 察

食品成分を含む食品添加物など90以上の化合物についてヒト乳がん由来MCF-7細胞増殖試験によるエストロゲン作用を調べた。その結果、食品添加物として使用されている66化合物中、作用の弱いものを含めMCF-7細胞の増殖促進作用を有する化合物が17あることが明らかになった。

これまで、乳がん細胞を用いたBHA^{12,16,19)}、及びOPP¹⁹⁾による増殖試験と、BHA、OPP両者につ

いて調べた recombinant yeast screen assay,²⁰⁾ ER結合競合試験^{16,17)}の結果からエストロゲン作用が報告されている。今回の実験でBHAとOPPがMCF-7細胞増殖作用を有すること、エストロゲン拮抗剤ICI 182,780を用いた実験によりこれらの細胞増殖作用が完全に抑制されたことは、これらの報告に対応するものである。しかし、ER、PRの遺伝子発現に及ぼす影響を検討した報告はなく、今回初めてRT-PCRにより細胞中のER α 、PRの発現量の変化から、BHA、OPPの濃度は20000倍高いものの、17 β -エストラジオールと類似の作用のあることを確認した。

BHAは酸化防止剤として食品や化粧品などに幅広く使用されているが、ラット^{21,22)}やハムスター²³⁾の前胃にガンや乳頭腫を誘発することが報告されている。BHAの1日許容摂取量(ADI)は0.5 mg/kg/dayであるが、Ishiwata *et al.*²⁴⁾によると、日本においてBHAの1日平均摂取量は0.105 mg/dayであり、これは体重50 kgの人でADIの約0.4%である。このことから、毒性学的に見て影響ないと考えられる。しかし、成人に比べ子供は感受性が高い上、特定の食品の偏った大量摂取により体重に比べ大量のBHAを摂る可能性があるため配慮が必要であろう。

OPPはかんきつ類などの防カビ剤としてよく使われているが、2%の濃度で投与するとラットに膀胱ガンを誘発するなどの報告がある。²⁵⁾ またOPPのADI値は0.2 mg/kg/dayであるが、1日平均摂取量は11.5 μ g/dayであり、成人のADI 10 mg/dayの約0.12%である。²⁶⁾ この量に比べると、OPPのMCF-7細胞増殖のC_{max}は5 \times 10⁻⁵ Mと比較的高濃度である。しかし実験動物のガンは高濃度で見られており、生体影響の解釈は*in vitro*の実験結果だけでなく*in vivo*のホルモン作用の検討に待たねばならない。

OPPとベンゼン環に結合するOH基の位置が異なる化合物に*m*-フェニルフェノールと合成樹脂原料、ゴム加工剤として使われる*p*-フェニルフェノールがある。これらは食品添加物ではないがOPPの異性体であることから、異性体が食品添加物のOPPに夾雑物として混入する可能性を考え、エストロゲン作用を調べた。その結果、C_{max}はともに10⁻⁵ M、RPEはそれぞれ40.8%、82.4% (data

not shown in the Table) で, *p*-フェニルフェノールは OPP よりエストロゲン作用が強いことが分かった. Routledge and Sumpter²⁰⁾によると, recombinant yeast screen により側鎖が *p*->*m*->*o*- の順でエストロゲン作用が強いこと, Blair *et al.*¹⁷⁾ がフェニルフェノールのヒト ER への結合能力も 4- (IC_{50} 9.80×10^{-5} M) > 3- (2.45×10^{-4} M) > 2- (> 1.00×10^{-4} M) の順で強いことを報告している. *p*-フェニルフェノールは平成 11 年度環境庁の調査²⁷⁾によると, 水質 (0.007—0.009 ppb), 底質 (0.002 ppm), 魚類 (0.01 ppm) から, 頻度・濃度とも低いが検出されている. 魚類の 0.01 ppm は約 5.9×10^{-8} mol/l で, かなり低濃度ではあるが, 環境中で検出されたことから, 食物連鎖により生体に取り込まれる生物濃縮が起こる可能性もある. さらに *p*-フェニルフェノールは RPE が 82.4% で比較的高いことから, 生体に入った場合の影響は無視すべきではないと考えられる.

今回エストロゲン作用を示した化合物で作用が比較的強かったのは, 食品添加物及びそれ以外の化合物ともフラボノイド類であった. しかし大豆由来のゲニステインやダイゼインを始め, かんきつ類に含まれるフラボノイド類には乳がんなどのがんの発生抑制作用²⁸⁾や血中コレステロールを正常値に近づける²⁹⁾などの生体に有用な働きも知られており, 有用・有害作用について議論のあるところである.

培養細胞を長期間培養する際, 薬物代謝酵素による化合物の代謝物への変換に配慮する必要があるかもしれない. しかし, 例えばゲニステイン, ダイゼインなどのフラボノイド類は比較的低濃度で細胞増殖作用を示すのに対し, ゲニステイン, ダイゼインのようにフラボノイド類の配糖体では, アグリコンに比べ増殖作用は弱く異なった結果を示した. 配糖体は培養細胞に作用させても分解が結果に及ぼす影響は小さいものと考えられる. また, TAM はその代謝物 4OH-TAM とは異なる増殖作用を示したこと, BHA と TBHQ とは異なる作用を示したことなどから, 細胞中の薬物代謝酵素などの結果への寄与は大きくはないと考えられる.

食品添加物及び食品に含まれる成分などについてエストロゲン作用を調べた. その結果, BHA や OPP などいくつかの物質にエストロゲン作用のあることが確認できた. エストロゲン作用を示した化

合物はすべて 17 β - エストラジオールより高濃度で作用を示したことから作用の程度は弱いと解釈された. しかし, 大量にあるいは複合的に摂取した時のリスクも否定できない.

謝辞 MCF-7 細胞を供与された Tufts 大学の Dr. A. Soto と Dr. C. Sonnenschein に深謝する.

REFERENCES

- 1) Turusov V., Rakitsky V., Tomatis L., *Environ. Health Perspect.*, **110**, 125–128 (2002).
- 2) Breinholt V., Larsen J. C., *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 622–629 (1998).
- 3) Nishihara T., Nishikawa J., Kanayama T., Dakeyama F., Saito K., Imagawa M., Takatori S., Kitagawa Y., Hori S., Utsumi H., *J. Health Sci.*, **46**, 282–298 (2000).
- 4) Coldham N. G., Dave M., Sivapathasundaram S., McDonnell D. P., Connor C., Sauer M. J., *Environ. Health Perspect.*, **105**, 734–742 (1997).
- 5) Hsieh C.-Y., Santell R. C., Haslam S. Z., Helferich W. G., *Cancer Res.*, **58**, 3833–3838 (1998).
- 6) Morito K., Hirose T., Masamune Y., Kinjo J., Okawa M., Nohara T., Ogawa S., Inoue S., Muramatsu M., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 351–356 (2001).
- 7) Gehm B. D., McAndrews J. M., Chien P.-Y., Jameson J. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 14138–14143 (1997).
- 8) Ashby J., Tinwell H., Pennie W., Brooks A. N., Lefevre P. A., Beresford N., Sumpter J. P., *J. Appl. Toxicol.*, **19**, 39–45 (1999).
- 9) Ruh M. F., Zacharewski T., Connor K., Howell J., Chen I., Safe S., *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 1485–1493 (1995).
- 10) Le Bail J. C., Varnat F., Nicolas J. C., Habrioux G., *Cancer Res.*, **130**, 209–216 (1998).
- 11) Okubo T., Yokoyama Y., Kano K., Kano I., *Fd. Chem. Toxicol.*, **39**, 1225–1232 (2001).
- 12) Soto A., Sonnenschein C., Chung K. L., Fernandez M. F., Olea N., Serrano F. O., *Environ. Health Perspect.*, **103** (Suppl. 7), 113–122 (1995).
- 13) Perez P., Pulgar R., Olea-Serrano F., Villalo-

- bos M., Rivas A., Metzler M., Pedraza V., Olea N., *Environ. Health Perspect.*, **106**, 167–174 (1998).
- 14) Schafer T. E., Lapp C. A., Hanes C. M., Lewis J. B., Wataha J. C., Schuster G. S., *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 192–197 (1999).
- 15) White R., Jobling S., Hoare S. A., Sumpter J. P., Parker M. G., *Endocrinology*, **135**, 175–182 (1994).
- 16) Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M. G., Sumpter J. P., *Environ. Health Perspect.*, **103**, 582–587 (1995).
- 17) Blair R. M., Fang H., Branham W. S., Hass B. S., Dial S. L., Moland C. L., Perkins R., Sheehan D. M., *Toxicol. Sci.*, **11**, 138–153 (2000).
- 18) Kuiper G. G. J. M., Lemmen J. G., Carlsson B., Corton J. C., Safe S. H., van der Saag P. T., van der Burg B., Gustafsson J.-Å., *Endocrinology*, **139**, 4252–4263 (1998).
- 19) Sonnenschein C., Soto A., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **65**, 143–150 (1998).
- 20) Routledge E. J., Sumpter J. P., *J. Biol. Chem.*, **272**, 3280–3288 (1997).
- 21) Ito N., Fukushima S., Hagiwara A., Shibata M., Ogiso T., *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 343–352 (1983).
- 22) Altmann H.-J., Wester P. W., Matthiaschek G., Grunow W., van der Heijden C. A., *Fd. Chem. Toxicol.*, **23**, 723–731 (1985).
- 23) Hirose M., Masuda A., Kurata Y., Ikawa E., Mera Y., Ito N., *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 143–149 (1986).
- 24) Ishiwata H., Fukushima A., Abe Y., Yamada T., Nishijima M., Fukasawa Y., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **41**, 86–93 (2000).
- 25) Hiraga K., Fujii T., *Fd. Chem. Toxicol.*, **22**, 865–870 (1984).
- 26) Ishiwata H., Abe Y., Kubota H., Kawasaki Y., Takeda Y., Maitani T., Nishijima M., Fukasawa Y., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **43**, 49–56 (2002).
- 27) Ministry of the Environment, “Chemicals in the Environment,” in 2000.
- 28) Lamartiniere C. A., *Am. J. Clin. Nutr.*, **71** (Suppl), 1705S–1707S (2000).
- 29) Anderson J. M., Johnstone B. M., Cook-Newell M. E., *N. Engl. J. Med.*, **333**, 276–282 (1995).
- 30) Saceda M., Lippman M. E., Chambon P., Lindsey R. L., Ponglikitmongkol M., Martin M. B., *Mol. Endocrinol.*, **2**, 1157–1162 (1988).
- 31) Nardulli A. M., Greene G. L., O’Malley B. W., Katzenellenbogen B. S., *Endocrinology*, **122**, 935–944 (1988).
- 32) Fang H., Tong W., Perkins R., Soto A. M., Prechtel N. V., Sheehan D. M., *Environ. Health Perspect.* **108**, 723–729, (2000).
- 33) Andersen H. R., Andersson A.-M., Arnold S. F., Autrup H., Barfoed M., Beresford N. A., Bjerregaard P., Christiansen L. B., Gissel B., Hummel R., Jorgensen E. B., Korsgaard B., Guevel R. L., Leffers H., McLachlan J., Moller A., Nielsen J. B., Olea N., Oles-Karasko A., Pakdel F., Pedersen K., Perez P., Skakkebaek N. E., Sonnenschein C., Soto A. M., Sumpter J. P., Thorpe S. M., Grandjean P., *Environ. Health Perspect.*, **107** (Suppl 1), 89–108 (1999).