

天然食品添加物のヒト乳がん由来 MCF-7 細胞の増殖に与える影響

藤田 博*, 小縣 昭夫*, 上村 尚*

Effect of Natural Food Additives on Proliferation of Human Breast Cancer MCF-7 Cell

Hiroshi FUJITA*, Akio OGATA* and Hisashi KAMIMURA*

Keywords : 天然添加物 natural food additives, 内分泌かく乱物質 endocrine disrupter, エストロジェン estrogen, ラック色素 lac color, MCF-7

はじめに

環境中の化学物質が動物の内分泌系をかく乱する可能性が指摘されたことから環境省は可能性の高い 67 化合物を提示した。これらの化合物については、そのかく乱作用が集中的に検討され評価されつつある。しかし、我々を取り巻く環境中には内分泌かく乱作用を示す化合物が他にも存在すると考えられることから可能性が推定される化合物を検出することが必要である。内分泌かく乱作用を検討するためにエストロジェン様作用を検出する試験系が開発されているが、そのひとつにヒト乳がん由来 MCF-7 細胞の増殖試験¹⁾ が用いられている。自然界にはマメ科植物中にゲニステインをはじめとしてエストロジェン様作用を有する化合物が含まれている²⁾ ことはよく知られている。そこで植物由来の多い天然食品添加物について MCF-7 細胞の増殖に対する影響を検討した。増殖に対する影響としてはエストロジェン様作用、すなわちアゴニスト活性として細胞の増殖を促進する作用及び抗エストロジェン作用、すなわちアンタゴニスト活性としてエストロジェンの増殖効果を抑制する作用の検討をあわせて行った。

実験方法

1. 試料及び試薬

1) 試料 表 1 に検討を行った 21 品目の天然食品添加物を示した。これらは、全て日本食品添加物協会より入手した。各試料の表示成分及び分析結果については既報^{3, 4)} に掲載されているので省略する。

2) 試薬 17 β -estradiol, tamoxifen はシグマ製を用いた。その他 ICI 182,780 (TOCRIS), 2-hydroxyflutamide (LKT Labs) を用いた。培地は、通常継代用として Earle's MEM (GIBCO) に FBS (GIBCO) を 10% に添加したもの (以下継代用培地と略す) を用い、7 日間で継代した。増殖試験には、フェノールレッド不含の DMEM (GIBCO) に dextran coated charcoal (シグマ) で 5% 4°C 16 時間処理した FBS を 5% 添加したもの (以下増殖試験用培地と略す) を用いた。試料及び試薬は DMSO (和光純薬, 生化学用) に溶解し、

細胞培養液での DMSO 最終濃度 0.1% で用いた。増殖した細胞数の計数にはテトラゾリウム塩 (WST-8) の還元による発色を利用した⁵⁾ Cell Counting Kit-8 (和光純薬) を用いた。

2. 培養細胞

ヒト乳がん由来細胞 MCF-7 は、ATCC より購入した。

3. 増殖試験

基本的には Soto ら¹⁾ の方法を用いているが異なる点もあるので具体的に記載する。25 cm² 培養フラスコ (CORNING) に継代用培地で継代している細胞を Dulbecco's PBS で洗い trypsin-EDTA (シグマ) で分離した。細胞を継代用培地に懸濁し、2×10⁴/well で 24well プレート (FALCON) に播取した。24 時間後に Dulbecco's PBS で洗い増殖試験用培地に交換、さらに試料及び試薬の DMSO 溶液を加えた増殖試験用培地を添加した。6 日後に細胞数を計数するため、増殖試験用培地を取り除き、細胞を Dulbecco's PBS で洗い trypsin-EDTA で分離、継代用培地に細胞を浮遊させ、100 μ L を 96well プレート (FALCON) に移した後、KIT-8 溶液を 10 μ L 添加。3 時間後に 450 nm で吸光度を測定することにより細胞数を求めた。一方、アンタゴニスト活性を検出する試験は、17 β -estradiol の 10⁻¹⁰ M を添加した時の増殖促進に対する抑制効果として検討した。天然食品添加物の試験濃度は、最高濃度 100 μ g/mL で 10 倍希釈し、5 濃度段階で行った。本文中の結果は、各濃度 4well で求める実験を 3 回繰り返した値の平均値及び標準偏差で示し、有意差検定は *t*-検定を用いた。

結果及び考察

21 品目の天然添加物のヒト乳がん由来細胞 MCF-7 の増殖に対する影響を検討した結果について表 1 にまとめた。MCF-7 細胞の増殖の促進作用であるアゴニスト活性を示したのはラック色素のみであった。また、17 β -estradiol による MCF-7 細胞の増殖促進に対する抑制効果であるアンタゴニスト活性を示した化合物はなかった。

ラック色素の MCF-7 細胞に対する増殖効果を図 1 に示

* 東京都健康安全研究センター環境保健部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

表 1. 天然食品添加物のMCF-7細胞の増殖に対する影響.

添加物名	アゴニスト活性	アンタゴニスト活性 ¹⁾
色素		
カカオ色素	—	—
スピルリナ色素	—	—
タマリンド色素	—	—
ベニコウジ色素	—	—
ベニバナ黄色素	—	—
ムラサキ	—	—
トウモロコシ色素	—	—
ラック色素	+	—
保存料		
しらこたん白	—	—
ツヤプリシン	—	—
ペクチン分解物	—	—
ε-ポリリジン	—	—
製造用剤		
オリゴ		
ガラクトキロン酸	—	—
カラシ抽出物	—	—
くん液	—	—
コウジ酸	—	—
セイヨウワサビ抽出物	—	—
タンニン抽出物	—	—
チャ抽出物	—	—
モウソウチク乾留物	—	—
モウソウチク抽出物	—	—
ユッカフォーム抽出物	—	—

1): 17β-エストラジオール 10⁻¹⁰ Mによる増殖促進に対する効果.

した. 10 μg/mL から有意に増加し, 100 μg/mL では 1.8 倍の増加であり, 高濃度ではあるがエストロゲン様作用は陽性と判断した. 今回のラック色素試料は, ラッカイン酸 A, B, C および E の混合物であり⁶⁾, 作用を有する化合物は, 特定できてはいない. ラッカイン酸は, 構造的には Nishihara ら²⁾の酵母を用いた分析により推定されたエストロゲン様活性を示す化合物に見られる基本構造であるベンゼン環に水酸基と大きな側鎖が結合した構造の範疇に入る化合物であると考えられる. 試料は混合物であることから, 含まれるラッカイン酸の平均分子量を 500 と仮定する

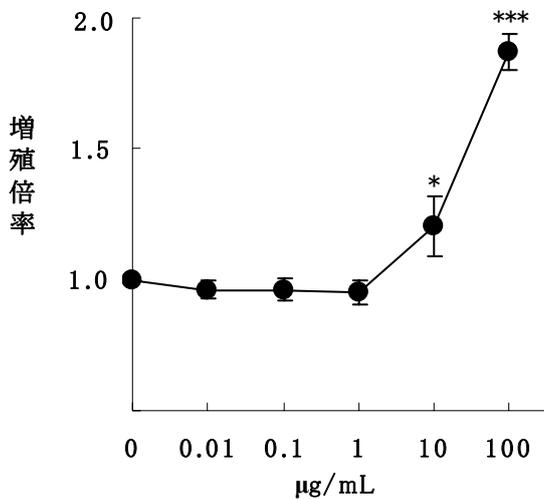


図1. ラック色素のMCF-7細胞の増殖に対する影響.

*: コントロールと5%で有意, ***: 0.1%で有意.

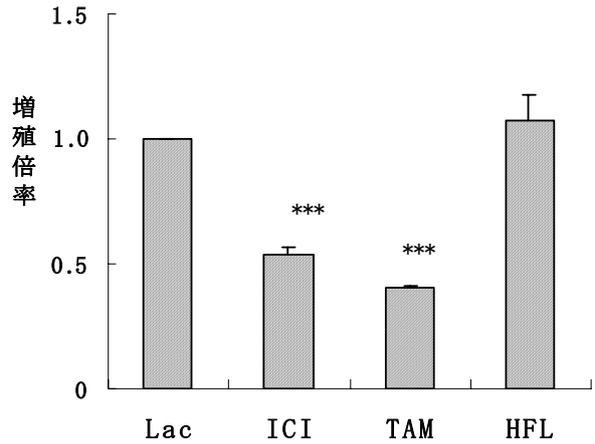


図 2. MCF-7細胞のラック色素による増殖促進に対するアンタゴニストの影響.

Lac : ラック色素 100 μg/mL, ICI : Lac+ICI 182,780 10⁻⁹ M, TAM : Lac+tamoxifen 10⁻⁶ M, HFL : Lac+2-hydroxyflutamide 10⁻⁵ M, *** : controlと0.1%有意.

と, 作用が見られた 100 μg/mL は, 2×10⁻⁴ M となり 17β-estradiol の 10⁻¹⁰ M に比べるとかなり高濃度である. しかし, ラック色素は, 溶媒として用いた DMSO にはよく溶解するが, 培地には溶けにくく培地中では析出してしまいうため, 実際に作用している濃度はかなり低いことも考えられる.

ラック色素により MCF-7 細胞の増殖が促進されたことからエストロゲン様作用が認められ, エストロゲンレセプター (以下 ER と略す) を介した反応であると考えられるが, 確認のために ER アンタゴニストである ICI 182,780 及び tamoxifen, さらに比較のためにアンドロゲンレセプターに対するアンタゴニストである hydroxyflutamide によるラック色素の増殖促進効果に対する影響を検討した

(図 2). その結果エストロゲンアンタゴニストを添加した場合のみ増殖促進が抑制されたことから, ラック色素による増殖促進は, ER を介した作用でありエストロゲン様作用が確認できた.

大久保ら⁷⁾は食品添加物の MCF-7 細胞に対するエストロゲン様作用の検討を行い, 公定書記載の食品添加物にも MCF-7 細胞の増殖に対する促進効果を示す化合物を見いだしている. また天然添加物中ではコチニール色素が陽性であり, これは今回のラック色素同様カイガラムシ類の色素であった. 植物成分中からのエストロゲン様作用を示す化合物に加えて意外な生物がホルモン様作用を示す化合物を生産していることが明らかとなったことから, ヒトが合成した化合物だけでなく天然化合物についてもエストロゲン様作用の検討が必要であろう. 特に既存天然添加物は, 多数登録されていること, 混合物が多いことからエストロゲン様作用を検出する試験をさらに実施することが望ましいと考えられる.

ま と め

21 種類の天然食品添加物についてヒト乳ガン由来細胞 MCF-7 の増殖に対する試験を行い、ラック色素が細胞増殖を促進したことからエストロゲン様作用を有することが明らかになった。

謝辞 天然添加物の入手にご協力戴いた日本食品添加物協会の石井健二氏及び試料を提供して戴いた添加物製造各社に感謝いたします。

文 献

- 1) Soto, A. M., Sonneschein, C., Chung, K. L., *et al.* : *Environmental Health Perspectives*, **103** (Suppl 7), 113-122, 1995.
- 2) Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., *et al.*: *J. Health Science*, **46**, 282-298, 2000.
- 3) 藤田博, 広門雅子, 平田恵子 他: 東京衛研年報, **47**, 309-313, 1996.
- 4) 藤田博, 植松洋子, 平田恵子 他: 東京衛研年報, **49**, 291-296, 1998.
- 5) Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., *et al.* : *Talanta*, **44**, 1299-1301, 1997.
- 6) 平田恵子, 植松洋子, 鈴木公美 他: 食品衛生学雑誌, **42**, 109-113, 2001.
- 7) 大久保智子, 加納いつ: 薬学雑誌, **123**, 443-452, 2003.