

# 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

### ヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 を用いた

### エストロゲン様活性物質のスクリーニング

分担研究者 森友忠昭 日本大学生物資源科学部 講師

研究要旨: 分担研究者の井上らが組換え酵母系を用いた測定でエストロゲン様活性が認められた Dienestrol、Estrinol、NPH(混合物)等の3種類の物質について、MCF-7細胞系を用いて再検討した。MCF-7細胞系と組換え酵母系は、Dienestrol および NPH(混合物)では同程度の検出感度であった。しかし、Estrinol は、MCF-7細胞系では酵母系と比べ、100倍低い濃度でも活性が認められ、両測定系で明らかな感度の違いが認められた。

#### 1. 目的

ヒト乳癌由来細胞株、MCF-7はエストロゲンレセプターを多く有し、エストロゲン依存的に増殖する。この性質を利用し、本細胞株はエストロゲン様活性を示す物質の評価に広く用いられている。

内分泌攪乱物質のスクリーニングには、MCF-7細胞の他、組換え酵母を用いる方法が知られており、これら2つの方法は、スクリーニングを確実にする目的で、同時に行う必要があるとされている。そこで、本研究では昨年度本研究の組換え酵母によるスクリーニングで活性の認められた、Dienestrol, Estrinol, NPH混合物等の化合物をMCF-7細胞を用いて比較し

た。

#### 2. 方法

##### 2.3. MCF細胞の継代・維持

MCF細胞の継代維持には、維持培地として10%ウシ胎仔血清加 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM)を用い、1週間に2度、0.1%トリプシン加0.02% EDTA-PBS(-)を用いて細胞を分散し、新しいフラスコに継代した。

MCF-7細胞は東海大学医学部、坂部博士より分与された。

##### 2.4. アッセイ用培地の作製

通常のMEM中にはエストロゲン様活性を示すフェノールレッドが含まれており、また、ウシ胎仔中にも天然エストロゲンが存在する。そのため、アッセイ用培地にはフェノールレッドフリーのMEMを用い、ウシ胎仔血清は常法に従い、チャコール-デキスロランT-70で処理し、内因性のホルモンを除去したもの(CD-FCS)を使用した。

## 2.5. 被検物質の調整

内分泌攪乱物質の溶媒として、DMSO、エタノールなどが用いられる。まず、DMSOを用いて検討したところ、0.1%以下の濃度でMCF-7細胞の増殖を促進させることがわかった。一方、エタノールは0.1%以下の濃度で細胞の増殖に影響を与えないことが分かった。そこで、本実験では被検物質(Estradiol-17 $\beta$ , Dienestrol, Estriol, NPH混合物)をエタノール中に溶解した原液(2.5mM)を調整し、最終濃度で被検物質が $10^{-6}$ ~ $10^{-13}$ Mになるように、さらにエタノール濃度は0.1%以下になるように、被検物質を培地中に添加した。

## 2.6. アッセイ法

維持培地中で単層に増殖した、MCF-7細胞をトリプシン処理にて剥離させた後、5% FCS加MEM中に浮遊させ、24穴マイクロプレート1穴あたり $10^4$ 個づつ蒔き、36時間

培養した。その後、種々の濃度の被検物質を含むアッセイ用培地に交換し、5~6日間培養後、細胞数をカウントした。また、同時に、被検物質を含まないアッセイ用培地をnegative controlとして同様に培養後、細胞数を計数した。

## 3. 結果

### 3.1 エストラジオール 17 $\beta$ を用いた MCF-7 細胞系と組換え酵母系との比較

種々の濃度のエストラジオール 17 $\beta$  存在下で MCF-7 を培養したところ、図 1 のように、 $10^{-11}$ ~ $10^{-9}$ M の範囲で濃度依存性に MCF-7 が増殖し、 $10^{-8}$ M 以上の濃度において Negative control の約 4 倍の細胞増殖が認められた。このことは前年度井上らが報告した酵母系における感度とほぼ同程度であった(表1)。

### 3.2 Dienestrol, Estriol, NPH(混合物)の活性測定と組換え酵母系との比較

エストラジオール-17 $\beta$  と同様の方法で、Dienestrol および NPH(混合物)の MCF-7 細胞の増殖に及ぼす影響を測定したところ、図 2 の様に Dienestrol では、 $10^{-11}$ ~ $10^{-9}$ M で濃度依存性が、また、NPH(混合物)では、 $10^{-9}$ ~ $10^{-6}$ M で濃度依存性が認められ、これら 2 種類の化合物に関しては、酵母系と同程度の検出感度であった。一方、Estriol では組換え酵母

系の場合、 $10^{-9}$ ～ $10^{-7}$ Mで濃度依存性が認められるのに対して、MCF-7細胞系では、 $10^{-11}$ ～ $10^{-9}$ Mの範囲で濃度依存性が認められ、MCF-7細胞系は、酵母系に比べ100倍低い濃度でも活性が認められた。

#### 4. 考察

両測定系で異なった結果が出ることはすでにいくつかの化合物で知られている(文献1.)。今回行った3種類の化合物の内、EstriolにおいてMCF-7細胞系と組換え酵母系の結果に明らかな差が認められ、Estriolが両測定系で異なる挙動を示す物質の一つであることが明らかになった。これらのことから、日常生活用品中の化学物質のスクリーニングにおいても両測定系を組み合わせる必要があると考えられた。

#### 5. 文献

1. 坂部 貢:ヒト乳癌培養細胞株(MCF-7)を用いた内分泌攪乱物質の評価. In vitro 発生毒性研究会要旨集(XVIII)、1998年.

表 1. MCF-7 細胞系と組替酵母系の検出限界比較

被検物質	MCF-7細胞系	組替酵母系
Estradiol	$\sim 10^{-10} \text{M}$	$\sim 10^{-11} \text{M}$
Estriol	$\sim 10^{-10} \text{M}$	$\sim 10^{-8} \text{M}$
Dienestrol	$\sim 10^{-10} \text{M}$	$\sim 10^{-10} \text{M}$
hexestrol	$\sim 10^{-10} \text{M}$	$\sim 10^{-9} \text{M}$
NPH(mixture)	$\sim 10^{-6} \text{M}$	$\sim 10^{-7} \text{M}$

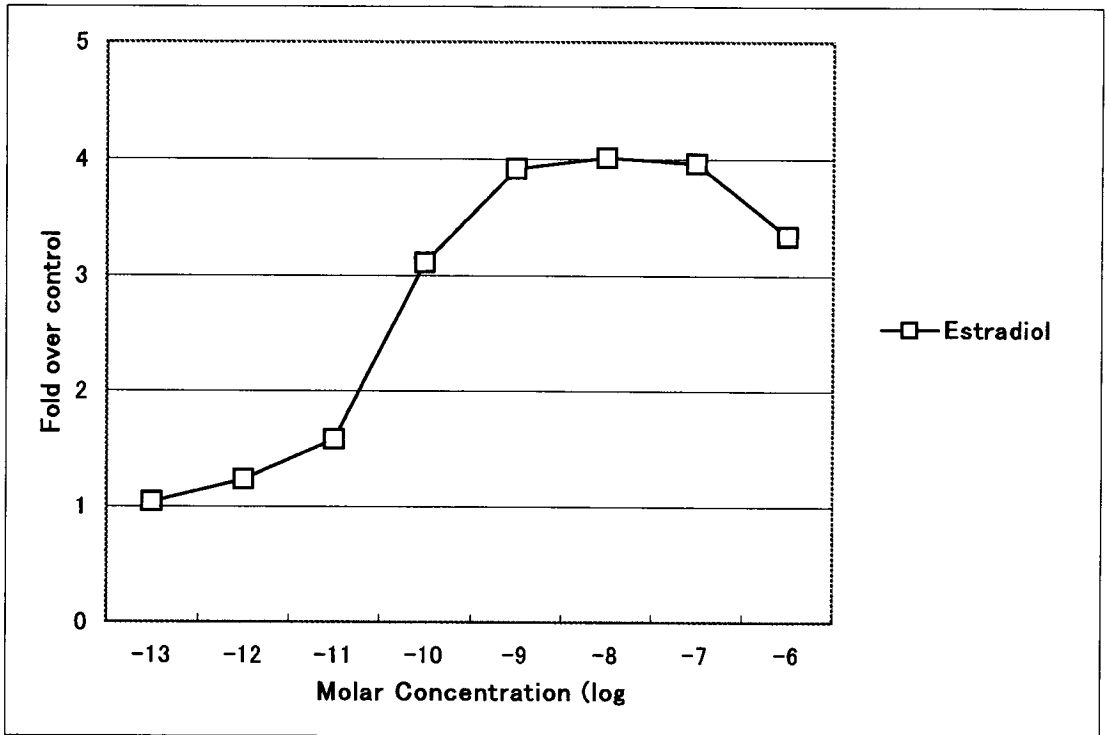


図 1: エストラジオール 17β 存在下での MCF-7 細胞の増殖

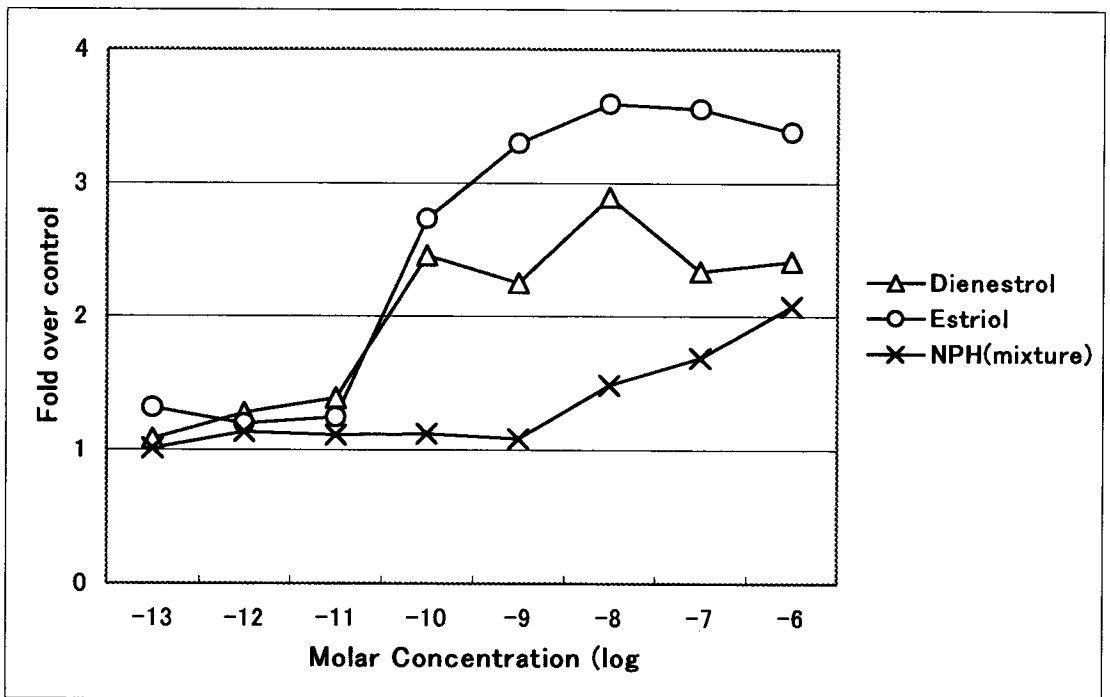


図 2: 各種被検物質存在下での MCF-7 細胞の増殖