

食品中内分泌かく乱物質等の卵巣発がん修飾作用に関する研究

分担研究者 田中 卓二 金沢医科大学教授

研究要旨 エストロゲン様作用を持つノニルフェノール (nonylphenol)、ゲニスタインの 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)誘発ラット卵巣発がんに対する影響を検討する目的で動物実験を開始した。また、これらの物質とオクチルフェノールについて培養がん細胞 (MCF-7、CACO-2) を使用したがん細胞の増殖や細胞周期に及ぼす影響を検討した。動物実験は総計 145 匹の雄性 F344 ラットを使用し、以下の 8 群に分けた。第 1 群 (20 匹): DMBA (0.5%の濃度でオリーブ油に懸濁し、左卵巣内に 0.01 ml 注入) →250 ppm ノニルフェノール、第 2 群 (20 匹): DMBA→25 ppm ノニルフェノール、第 3 群 (20 匹): DMBA→250 ppm ゲニスタイン、第 4 群 (20 匹): DMBA→25 ppm ゲニスタイン、第 5 群 (20 匹): DMBA、第 6 群 (15 匹): 250 ppm ノニルフェノール、第 7 群 (15 匹): 250 ppm ゲニスタイン、第 8 群 (15 匹): 無処置対照群。被験物質は DMBA の最終投与の 1 週間から 50 週間、混餌投与し、その発がんに及ぼす影響をみる。現在、実験開始後約 26 週を経過し、実験は順調に経過している。一方、両物質のヒト乳がん細胞株 MCF-7 とヒト大腸がん細胞株 CACO-2 の増殖に対する影響を検討したところ、ノニルフェノールは 10^{-6} mol の濃度に、ゲニスタインは 10^{-7} mol の濃度に MCF-7 増殖活性のピークがあった。MCF-7 の細胞周期に対して、ノニルフェノールは影響を与えなかったが、ゲニスタインは 10^{-4} mol の濃度で G2/M arrest を惹起した。また、ノニルフェノール、ゲニスタインは CACO-2 細胞の増殖を濃度依存性に抑制し、ゲニスタインは $10^{-4} \sim 10^{-6}$ mol の濃度で G2/M arrest を惹起した。

A. 研究目的

界面活性剤、油溶性フェノール樹脂、エチルセルロースの安定剤、洗剤等として使用されているノニルフェノール (nonylphenol) にはエストロゲン様作用が報告され、生体への影響が懸念されている。一方、ゲニスタインは食用植物由来のエストロゲン様作用物質で、乳腺・大腸での発がん修飾作用が報告されている。これまで、ノニルフェノールの発がん修飾効果をみた報告はない。

そこでノニルフェノール、ゲニスタインの 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)誘発ラット卵巣発がんに対する影響を検討する目的で動物実験を行った。また、これらの物質とオクチルフェノールについて培養がん細胞 (MCF-7、CACO-2) を使用したがん細胞の増殖や細胞周期に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

(1) 動物実験

動物実験は総計145匹の雄性 F344 ラットを使用し、8群に分けた。実験群は第1群(20匹): DMBA →250 ppm ノニルフェノール、第2群(20匹): DMBA → 25 ppm オクチルフェノール、第3群(20匹): DMBA →250 ppm ゲニスタイン、第4群(20匹): DMBA →25 ppm ゲニスタイン、第5群(20匹): DMBA、第6群(15匹): 250 ppm ノニルフェノール、第7群(15匹): 250 ppm ゲニスタイン、第8群(15匹): 無処置対照群の計8群である。卵巣がんは DMBA (0.5%の濃度でオリーブ油に懸濁し、左卵巣内に 0.01 ml 注入) して誘発し、被験物質は DMBA の最終投与の1週間後から50週間、混餌投与し、その発がんおよび影響をみるものである。

(2) 培養がん細胞を用いた実験

ノニルフェノール、ゲニスタインのエストロゲン様作用を探るため、ヒト乳がん由来培養細胞株 MCF-7 (ER+, PgR+) を使用して、増殖試験を行った。ダルベッコ MBM 培地からフェノールレッドを除いた培地とその培地に E2 (10^{-9} mol) を加えた培地で増殖試験を行った (E-Screening Assay)。また、MCF-7 及びヒト大腸がん由来培養細胞株 CACO-2FCM を使用して、通常の培養系で細胞周期に及ぼす影響をみた。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては当大学動物実験委員会に許可を得、実験動物取り扱い規則を遵守しながら実験を遂行している。

C. 研究結果

(1) 動物実験

現在、実験開始後約26週を経過している。各

群の体重増加に変化はなく実験は順調に経過している。実験途中で DMBA 投与群の数匹を犠牲死させ、卵巣の状態を観察する予定である。また、実験期間は51週を予定している。

(2) 培養がん細胞を用いた実験

ノニルフェノールは 10^{-6} mol の濃度に、ゲニスタインは 10^{-7} mol の濃度に MCF-7 増殖活性のピークがあった。現在、一方、MCF-7 の細胞周期に対して、ノニルフェノールは影響を与えなかったが、ゲニスタインは 10^{-4} mol の濃度で G2/M arrest を惹起した。また、ノニルフェノール、ゲニスタインは CACO-2 細胞の増殖を濃度依存性に抑制し、ゲニスタインは 10^{-4} ~ 10^{-6} mol の濃度で G2/M arrest を惹起した。ゲニスタインには MCF-7、CACO-2 細胞にアポトーシスを誘発する可能性があると考えられた。

D. 考察

MCF-7 細胞を用いた実験では、増殖活性の程度はゲニスタイン > ノニルフェノールという結果であった。現在、受容体分子競合結合試験とレポーター試験を行い、データを蓄積中である。ノニルフェノールは MCF-7 と CACO-2 の細胞周期に影響を及ぼさなかったが、ゲニスタインは MCF-7 と CACO-2 に G2/M arrest を惹起し、アポトーシス誘導能が予想された。

E. 結論

動物実験は進行中であるが、in vitro の実験結果からはノニルフェノール、ゲニスタインに卵巣発がんを修飾(抑制)する作用があることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

該当なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

BW (g)

图 1 体重变化

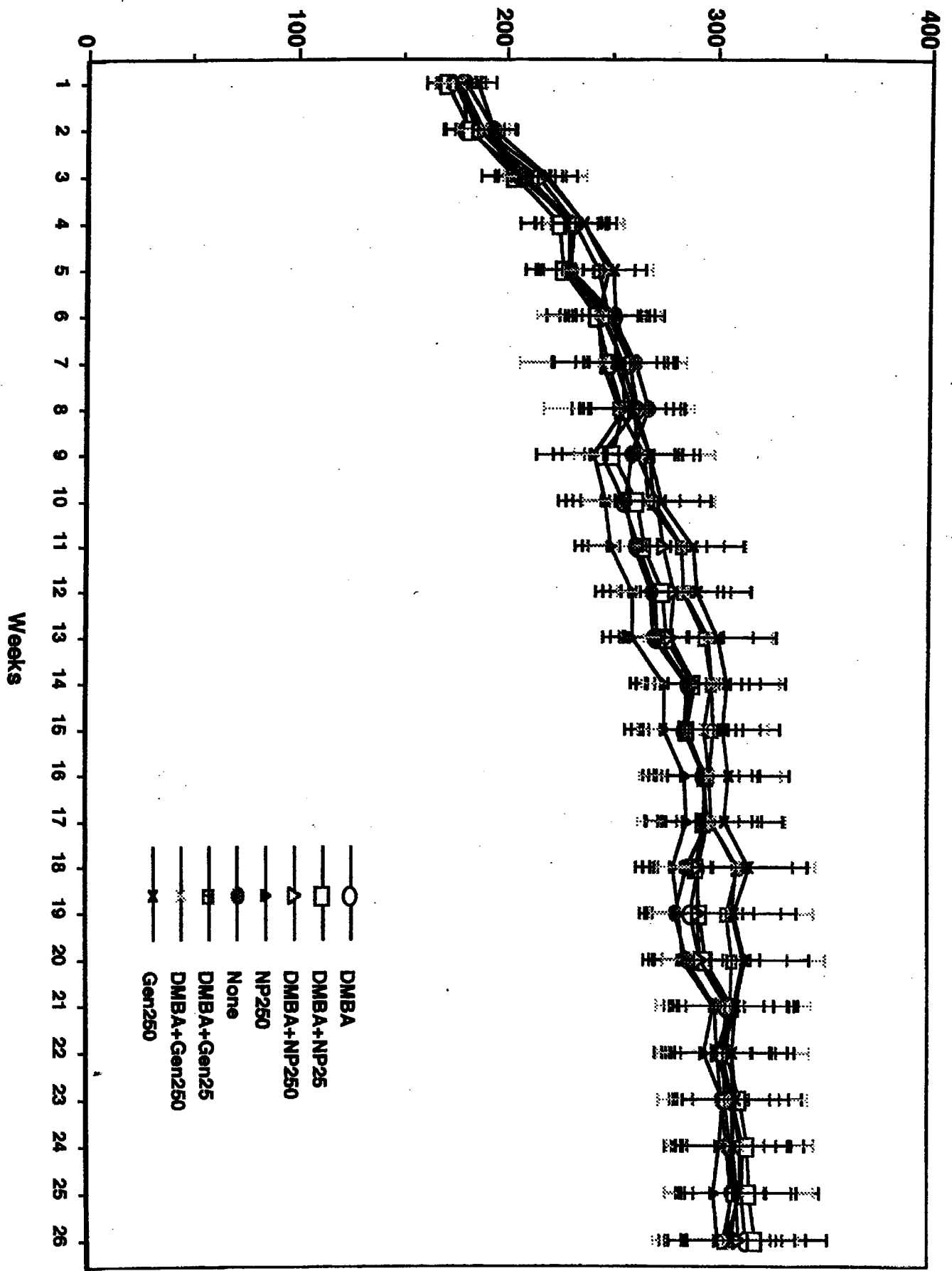
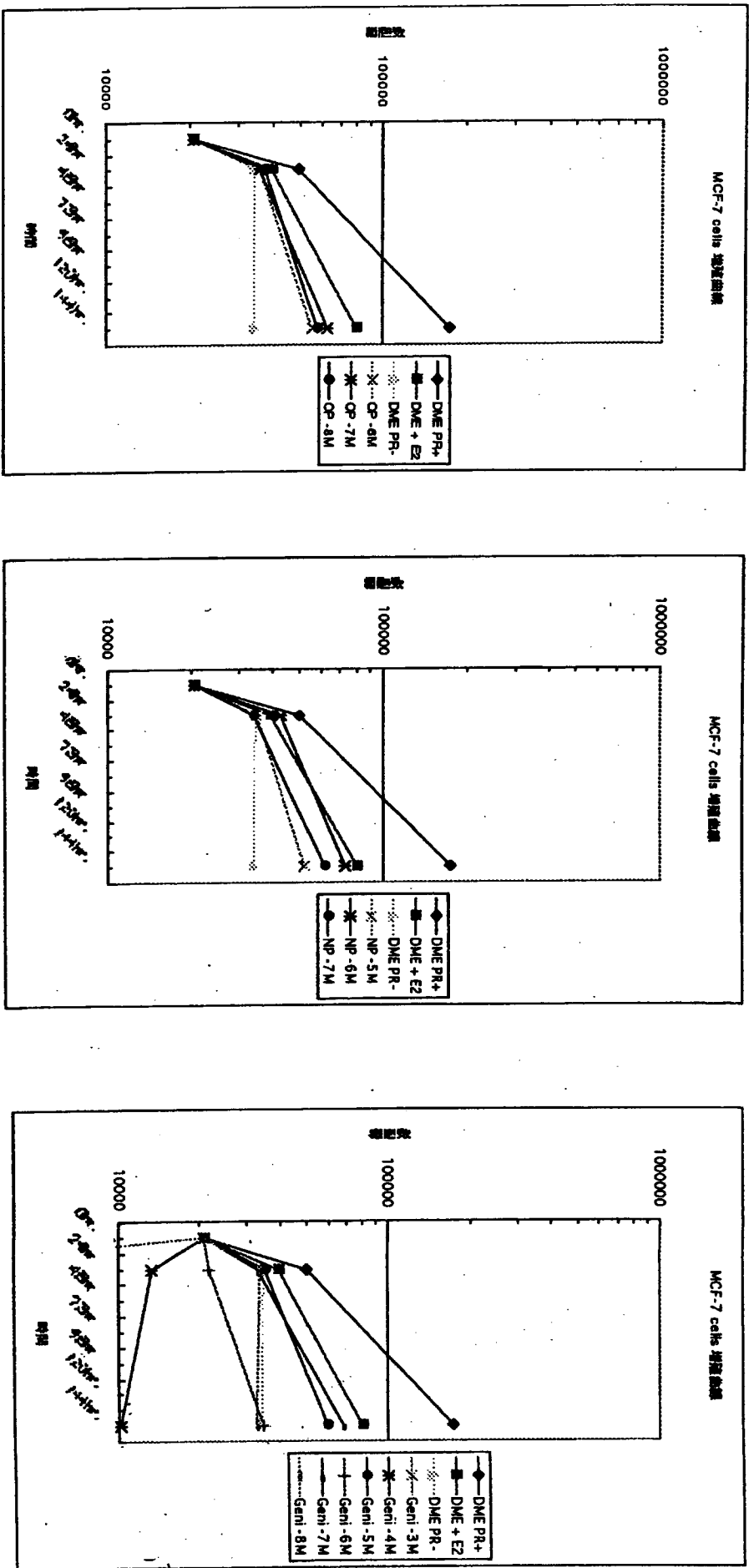


圖 2 MCF-7細胞增殖活性

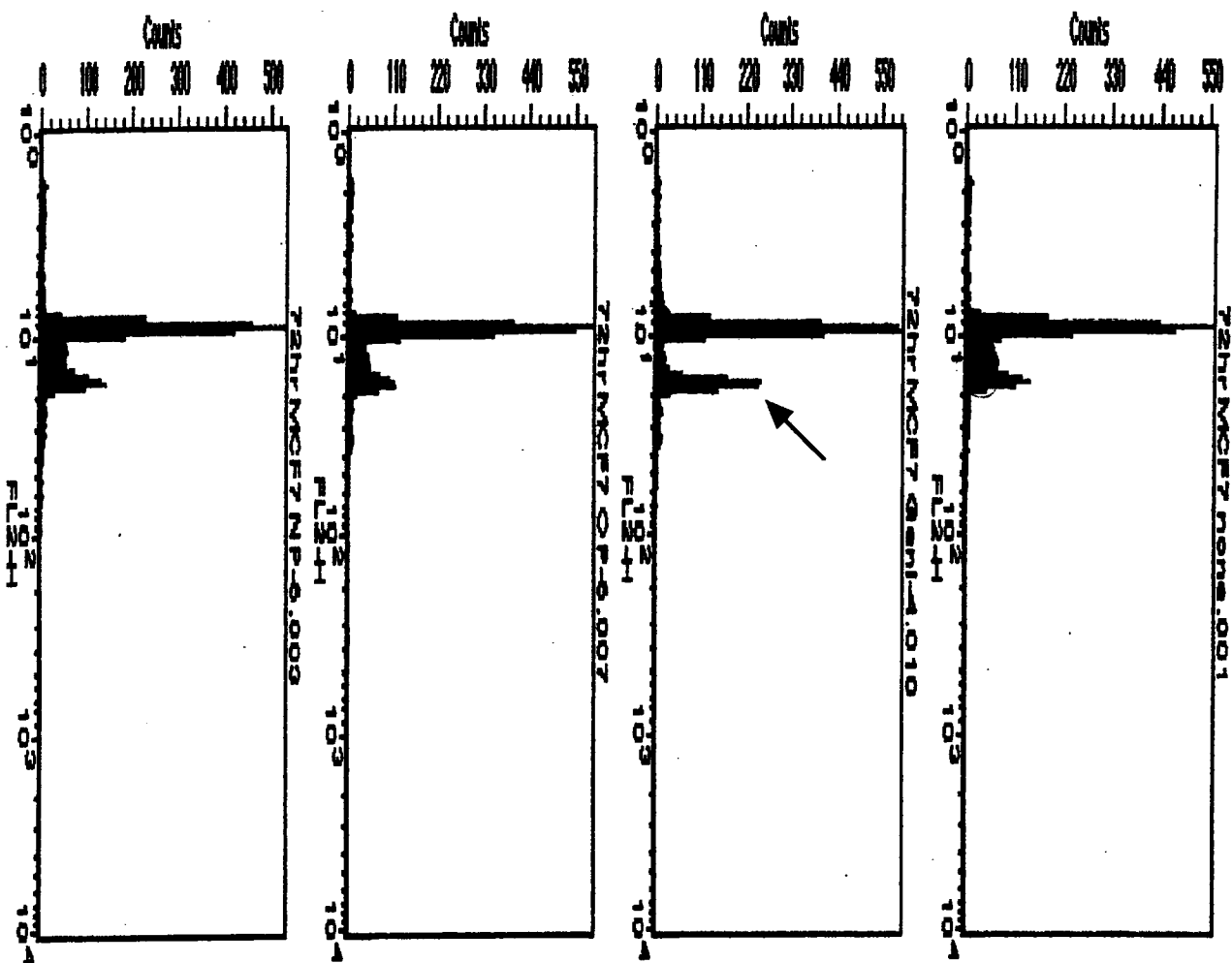
E-Screening Assay



Cell line : Human breast cancer estrogen-sensitive MCF-7 cells, DME PR+ : DME (Phenol red +) + 10%FBS
 DME + E2 : DME (Phenol red -) + 10% CD(charcoal-dextran stripped)-FBS + 10^{-9} M β -estradiol
 DME PR- : DME (Phenol red -) + 10% CD(charcoal-dextran stripped)-FBS
 OP : 4-Octylphenol, NP : 4-Nonylphenol, Geni : Genistein

図 3 MCF-7細胞周期への影響

Effects of Genistein, 4-Octylphenol and 4-Nonylphenol on MCF-7 cells (DNA histograms)



+ none

+ Genistein 10^{-4} M, 72hr.

+ 4-Octylphenol 10^{-6} M, 72hr.

+ 4-Nonylphenol 10^{-6} M, 72hr.

Cell line : Human breast cancer MCF-7 cells

図4 CACO-2細胞周期への影響

Effects of Genistein on CACO-2 cells

