

ヒキガエル毒がヒト乳がん細胞に及ぼす影響

久留戸涼子、向島幸平¹⁾、片岡紗也佳²⁾、大浦 健³⁾

The effects of toad venom on breast cancer cells

Ryoko KURUTO, Kohei MUKOJIMA,
Sayaka KATAOKA, Takeshi OHURA

2019年11月8日受理

抄 録

生物毒には様々なものがあるが、病気の治療薬などの有効利用も考えられてきた。本研究では、実際に捕獲したヒキガエルから毒素を採取し、ヒト乳がん細胞 MCF-7 に対する影響を、細胞増殖試験、遺伝子発現解析により調べた。この際、エストロジェン (E_2) や benz[a]anthracene (BaA) との複合曝露も行った。増殖試験では、ヒキガエル毒の濃度依存的に、MCF-7 細胞の増殖能が低下し、高濃度では細胞死が起こった。 E_2 や BaA 存在下でも、これらによって高められた増殖能を毒が低下させた。pS2 の発現レベルについては、毒自体は影響を与えなかったが、 E_2 や BaA 存在下では、高められた pS2 の発現量が毒の濃度依存的に低下した。また、CYP1A1 と IL-6 では発現レベルは異なるが、BaA と同様に毒でも発現量が増加し、両者の存在下では互いの効果をさらに高める傾向にあった。一方、 E_2 はヒキガエル毒による CYP1A1 や IL-6 の上昇効果を抑制した。ヒキガエル毒と E_2 や BaA は、相互に影響を与え、作用することが考えられた。

キーワード：ヒキガエル毒、ヒト乳がん細胞、pS2、CYP1A1、IL-6

1. 研究の背景

生物毒は、動物、植物、微生物などで広く生産され、様々なものが知られているが、抗がん、抗菌、抗炎症などの作用のあるも報告され、治療薬としての開発も進んでいる (1)。本実験では、日本に広く分布し、捕獲可能なニホンヒキガエル *Bufo japonicas* に注目し、実際に毒素を採取することにした (Fig. 1)。

ニホンヒキガエルは、山地のみならず住宅地でも見られることが多いが、毒素を持つカエルであることは一般的には知られていない。ヒキガエル類は後頭部にある耳腺

¹⁾ 島田市立六合小学校 ²⁾ 富士市立岩松北小学校 ³⁾ 名城大学農学部

と呼ばれる大きな膨らみや皮膚、背中の隆起から白色の毒素を分泌する (Fig. 1)。これらの毒素はプフォトキシンと呼ばれ、ステロイド系の毒素である (2)。漢方ではこれらを乾燥させたものを蟾酥 (せんそ) と呼び、強心剤として用いている。



Fig. 1 ニホンヒキガエル

また、筆者らはこれまで、日本人女性の罹患率がトップである乳がん注目し、ヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いて、様々な化学物質の影響を調べてきた (3-7)。MCF-7 細胞は、エストロゲン受容体 (ER) を発現しており、女性ホルモンであるエストロゲン (estrogen、以下 E_2) の存在下で、細胞増殖能が増すことが知られている (8)。また、環境汚染物質である多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) の中でもベンズアントラセン (benz[a]anthracene, BaA) を初めとして、MCF-7 細胞の増殖能を高め、エストロゲン様作用を示すものが存在した (6, 9)。一方、植物葉では、BaA の作用を抑えるようなものもあり、環境汚染物質の作用を抑制することも考えられた (10)。

そこで、本研究では、実際に捕獲したヒキガエルから毒素を採取し、毒を調製し、ヒト乳がん細胞 MCF-7 に曝露し、どのような影響を及ぼすか、 E_2 や BaA との共存下でどのような作用を示すか検証することにした。

2. 研究の目的

本研究では、生物毒の中で実際に捕獲可能なヒキガエルの生産する毒に注目し、調製したヒキガエル毒を用いて、細胞にどのような影響を及ぼすか調べることにした。ヒト乳がん細胞 MCF-7 は、女性ホルモンである E_2 や、PAHs の BaA で細胞増殖能が高まることが知られ、これらについてはエストロゲン応答遺伝子である pS2、芳香族炭化水素受容体 (AhR) 標的遺伝子である CYP1A1、炎症マーカーである IL-6 の遺伝子発現レベルの変化を明らかにしてきた (5, 6, 9)。本研究では、ヒキガエル毒が MCF-7 細胞にどのような影響を及ぼすか、 E_2 や BaA との共存下ではどのように作用するか、細胞増殖能、pS2、CYP1A1、IL-6 の遺伝子発現解析を中心に調べることにした。

3. 方法

3-1. ヒキガエル毒の採取と調製

ヒキガエル毒は、実際に捕獲、飼育した 2 匹のニホンヒキガエルから以下の 2 通りの方法で採取し、調製した。

3-1-1. 自発的分泌による毒の採取

ヒキガエルは危険から身を守るために毒素を分泌する。強制給餌などで自発的に毒

素を分泌した際に、ピペットマンで毒を採取した。

3-1-2. 解剖による毒の採取

死亡し冷凍保存したヒキガエルを、前日に冷蔵庫に移し解凍した。常温になった個体を解剖皿に仰向けに置いた。腹部の表皮中央にはさみを入れ、縦に開き、胸部を避けるよう V 字に切り込みを入れた後、皮を避けて腹部も同様に切り開いた。

解剖を終えた個体の体と皮との間に指を入れ進め、筋がついてきた場合は解剖ばさみで切ることで皮を剥いだ。四肢は肘や膝を支点にして服を脱がせるように力を入れて引っ張ることで、指先まで一度に皮を剥いだ。頭は吻の皮が剥ぎ辛く、力を入れすぎると圧迫された耳腺から毒素が溢れて体液と混ざってしまうため、頭部は慎重に皮を剥いだ。剥いだ皮の耳腺や隆起を観察し、耳腺を圧迫して毒素を抽出し、採取した。

3-1-3. ヒキガエル毒の調製

採取した毒を遠心エバポレーターで乾燥させ、それぞれ滅菌水に溶解した。1時間ほど放置し、4°C、16000g で 15 分遠心し、上澄みを -20°C で凍結保存した。

3-2. 細胞培養

MCF-7 細胞 (H. Hagenmaier, University of Tuebingen, Germany より分与) を、10% 牛血清 (ICN Biomedicals) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (日水製薬) で、5%CO₂、37°C 下で培養した。

3-3. 細胞増殖試験

- ① 活性炭処理をした 10% 牛血清 (Hyclone) を含む phenol red-free DMEM (Gibco) に、細胞を 5×10^4 個/mL となるように懸濁し、96 穴プレートに、 5×10^3 個/well となるように 100 μ L ずつ播種した。
- ② 4 時間後に、目的の濃度となるように検査試料を加え、さらに 3 日間培養した。コントロールには、BaA の溶媒である dimethylsulfoxide (DMSO) を加えた。
- ③ 3 日後、細胞増殖試験用試薬である cell counting kit-8 (Dojin) (11, 12) を各ウェルに加えミキシングし、2 時間呈色反応を行った。
- ④ マイクロプレートリーダー EL808 (BioTek) を用い、450 nm (参照波長 630 nm) の吸光度を測定した。

3-4. 遺伝子発現レベルの解析

- ① 3-3. の①と同様に細胞を DMEM に懸濁し、10 cm シャーレに、 7.4×10^5 個/dish となるように播種した。
- ② 24 時間後に、培地を phenol red-free DMEM に交換した。
- ③ さらに 24 時間後に、目的の濃度となるように検査試料を加えた。コントロールには、試料の溶媒である DMSO を加えた。

- ④ RNAの抽出：試料添加24時間後に、RNeasy Mini Kit 及び RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて、RNA抽出を行った。
- ⑤ cDNAへの変換：Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) により、RNAをcDNAに変換した。
- ⑥ Real-time PCR：QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) を使用して、⑤で作成したcDNAを鋳型として、リアルタイムPCRシステムMx3000P (ストラタジーン社) を用いて、real-time PCRを行った。標的遺伝子は、pS2、CYP1A1、IL-6とした(9)。内部標準遺伝子としてGAPDHを用いた。

4. 結果

4-1. ヒキガエル毒の採取と調製

4-1-1. 自発的分泌による毒の採取

2017年5月30日に、富士市西船津にてヒキガエルを捕獲した。2017年7月25日、給餌中に毒素を分泌したことを確認した (Fig. 2A)。捕獲してから日が浅く、自発的に食餌を行うことがほとんど無いため、プラスチックカードを用いた強制給餌を定期的に行っていた。毒素を分泌したのはその強制給餌中であり、左手で顔以外を覆うようにし、人差し指と親指で顔を固定して、カードを口に差し込み無理矢理口を開けていた。耳腺には直接触れていない状況のため、直接圧迫ではなく自発的に毒素を分泌したことが確認できた。

2017年7月31日に、25日と同様に強制給餌を行ったところ、毒素を分泌した (Fig. 2B)。この時も耳腺には直接触れていない状態から毒を出しているため、直接圧迫ではなく自発的に毒素を分泌したことが確認でき、これを採取し毒Aとした。

(A)

(B)



Fig. 2 毒素を分泌している様子 (A：7月25日 B：7月31日)

4-1-2. 解剖による毒の採取

2017年4月9日に、静岡県賀茂郡西伊豆町にてヒキガエルを捕獲したが、2017年6月6日に死亡が確認された。これを冷凍保存し、2017年9月26日に解剖を行った。

前日に冷蔵庫に移動していたヒキガエルを取り出すと、解凍時間が少なかったようでまだ霜が残っていたため、水に浸けて日光に当てて自然解凍を行った。耳腺から毒は出ていないようだった。解剖の手順通りに胸部の皮を剥いでから内臓を取り出した (Fig. 3)。次に、ヒキガエルの背中をまるごと残すように皮を剥ぎ取った (Fig. 4A)。皮の裏側から全体を観察すると、耳腺を中心にして桃色の腺が体の側面に沿うように広がっていた。



Fig. 3 解剖中の様子

耳腺に直径 1.5 cm ほどの白い球体がたくさん詰まっているのが透けて見えた。これが、毒が詰まった毒腺であることが分かった。また、耳腺だけでなく背中全体に毒腺が散らばっていることが分かった (Fig. 4B)。この場所を皮の表からみると、背中の隆起になっていた為、ヒキガエルは背中のイボに毒が点在していることが分かった。これを採取し毒 B とした。

(A)

(B)

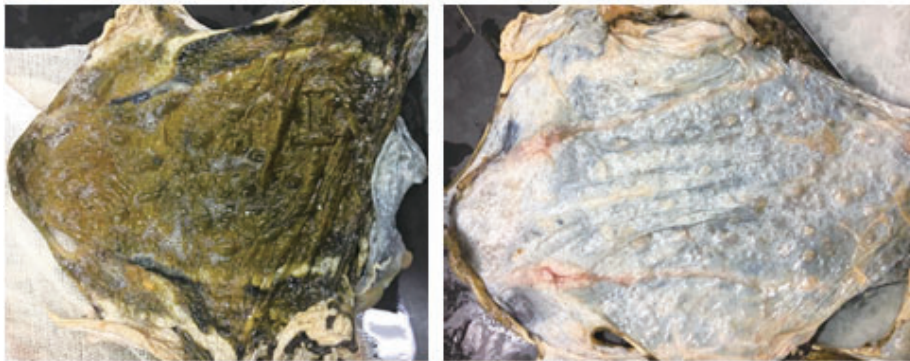


Fig. 4 ヒキガエルの皮 (A:表面 B:裏面)

4-1-3. ヒキガエル毒の調製

Table 1 のように、質量を測定し、質量が変わらなくなった時点で乾燥終了とした。それぞれ 0.38 mL の滅菌水で溶解し、A : 10 mg/mL、B : 20 mg/mL となるようにした。

Table 1 ヒキガエル毒の質量

乾燥時間	A / mg	B / mg
0 時間 (乾燥前)	8.1	51.9
1 時間	3.9	14.9
2 時間	3.8	7.7
2 時間 45 分		7.6

4-2. 細胞増殖試験

4-2-1. ヒキガエル毒と E₂ の複合効果

調製したヒキガエル毒 A、B を様々な濃度に変化させて、細胞増殖に対する影響を調べた。また、MCF-7 細胞の増殖能を高める 10⁻¹⁰ M E₂ を加えた場合も行った。

まず、ヒキガエル毒を 0.1、1、10、100 μg/mL と濃度を変化させて曝露した (Fig. 6A)。E₂ 非存在下では、0.1 μg/mL から濃度依存的に増殖能が低下し、その効果は

毒 A の方が強かった。E₂ 存在下では、0.1 μg/mL で毒 A では増殖能が顕著に低下したが、毒 B ではコントロールより増殖能が高まった。より高濃度では、毒 A、毒 B とも増殖能が低下した。10 μg/mL や 100 μg/mL では、強い細胞毒性が表れ、死んでいる細胞もあった (Fig. 5B)。次の実験では濃度を 10 倍低く設定することにした。

そこで、次に、0.01、0.1、1、10 μg/mL と濃度を変化させて曝露した (Fig. 6B)。0.01 μg/mL では全ての場合で、コントロールよりも増殖能が若干高まった。0.1、1 μg/mL では、濃度が高まるにつれて増殖能が低くなったが、0.1 μg/mL の毒 B では、前回と同様 E₂ 存在下でコントロールよりも増殖能が高くなる傾向が見られた。10 μg/mL では、細胞死が起きている。

さらに、0.05、0.1、0.5、1 μg/mL と濃度を変化させて曝露した (Fig. 6C)。0.05 μg/mL では、増殖能が高まる傾向が見られたが、毒 A の E₂ 非存在下で、増殖能が低下した。0.1、0.5、1 μg/mL では、濃度依存的に増殖能が低くなる傾向が見られたが、0.1 μg/mL の毒 B では、これまでと同様に E₂ 存在下でコントロールよりも増殖能が高まる傾向が見られた。

以後の実験では、増殖抑制効果が高かった毒 A を用いることにした。

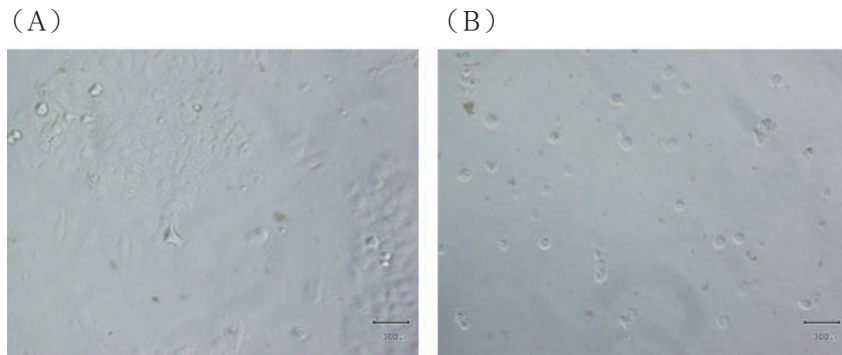


Fig. 5 培養 3 日後の MCF-7 細胞 (A : control B : 毒 A, 100 μg/mL)

4-2-2. ヒキガエル毒と BaA の複合効果

本実験では、ヒキガエル毒 A について、BaA の濃度を 10^{-8} ~ 10^{-5} M に変化させて、細胞増殖に対する影響を調べた。また、MCF-7 細胞への応答性を確認するため、エストロジェンを 10^{-12} ~ 10^{-9} M と濃度を変化させて曝露した。

まず、毒 A を 0.1、1 μg/mL の濃度にして曝露した (Fig. 7A)。E₂ 単独では 10^{-10} M、BaA 単独では 10^{-5} M をピークに、濃度依存的に細胞増殖能が高まった。BaA とヒキガエル毒 A を複合曝露させたものでは、BaA 単独と比べて 0.1 μg/mL では、細胞増殖能が低下する傾向が見られ、1 μg/mL では細胞死が起こった。

次に、毒 A を 0.01、0.1 μg/mL の濃度にして曝露した (Fig. 7B)。0.01 μg/mL の毒 A を添加しても、ほとんど影響は認められなかったが、0.1 μg/mL では、BaA の増殖能を高める作用を低下させる傾向が見られた。

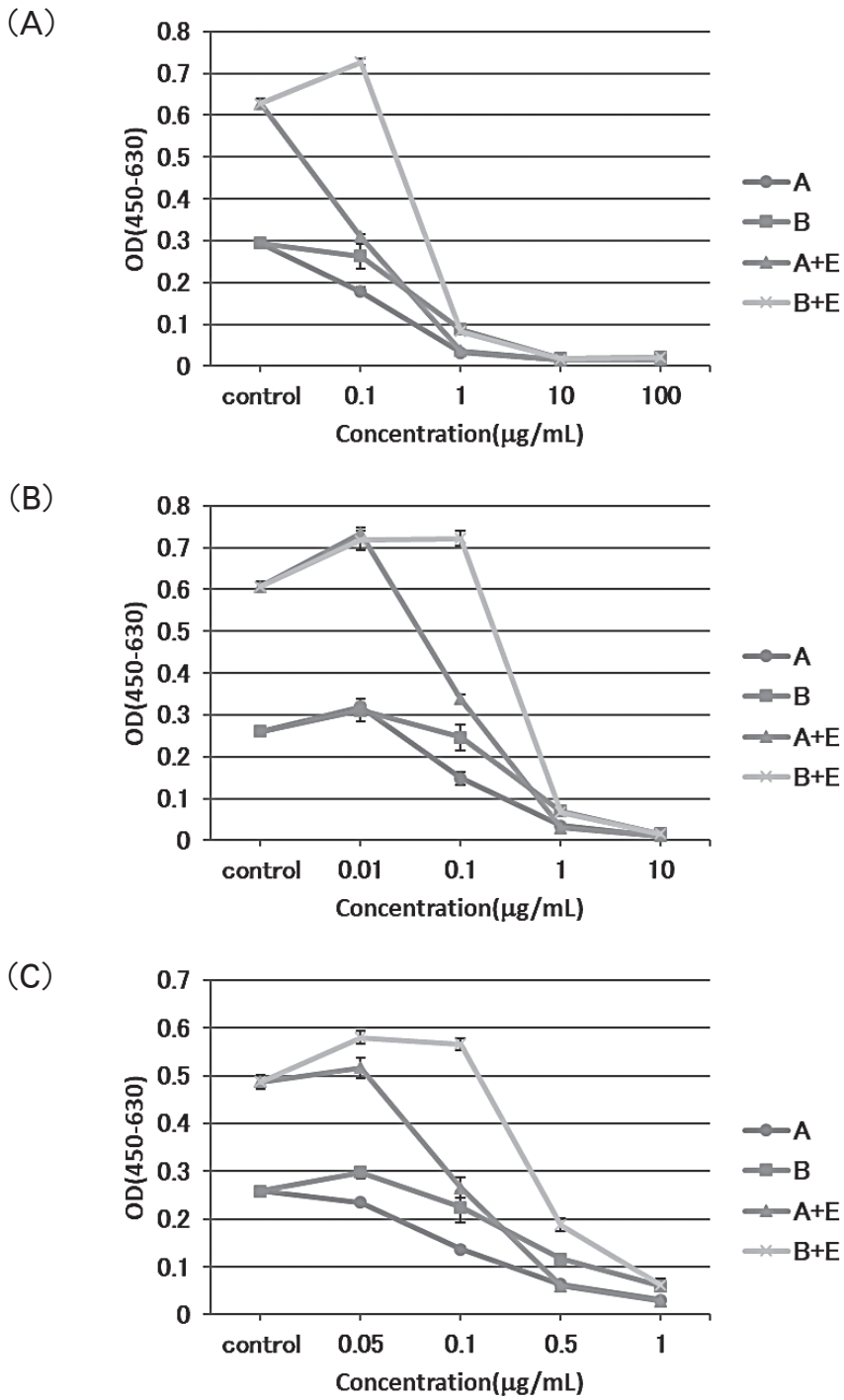


Fig. 6 MCF-7 細胞の増殖に及ぼすヒキガエル毒の影響
 A: 毒 A B: 毒 B E: 10^{-10} M E_2

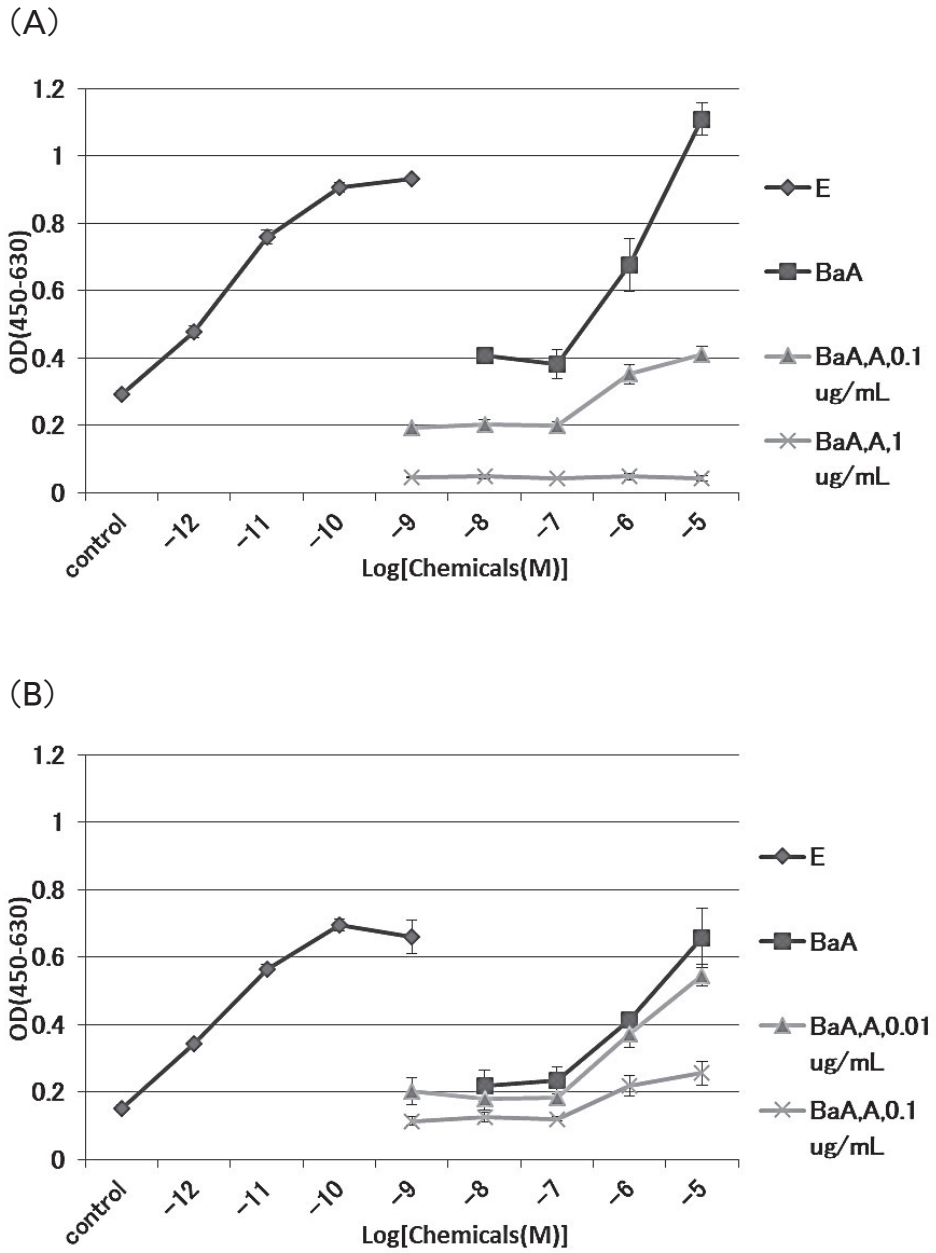


Fig. 7 MCF-7 細胞の増殖に及ぼすヒキガエル毒と BaA の影響
E : E₂ A : 毒 A

4-3. 遺伝子発現レベルの解析

4-2. 細胞増殖試験における、ヒキガエル毒 A と E₂ 及び BaA のいくつかの組み合わせで、MCF-7 細胞に曝露し、遺伝子発現レベルの変化を調べた。E₂ 及び BaA の濃度は、細胞増殖試験でピークを示した濃度とし、それぞれ 10⁻¹⁰ M 及び 10⁻⁵ M とした。標的遺伝子は pS2、CYP1A1、IL-6 の 3 つとし、コントロールの値を 1 として、内部標準遺伝子として用いた GAPDH で補正し、発現量を相対的に表した。

4-3-1. pS2

pS2 は、エストロゲン応答遺伝子で、E₂ によりその発現レベルが高まることが知られており、10⁻¹⁰ M E₂ で pS2 の発現量を高めることが確認された (Fig. 8A)。一方、ヒキガエル毒では、0.01、0.1、1 µg/mL のいずれの濃度でも発現量に影響は認められなかった。ヒキガエル毒と E₂ を複合曝露した場合には、毒の濃度依存的に発現量が低くなる傾向が見られた (Fig. 8A)。10⁻⁵ M BaA 単独でも、pS2 の発現量を高めたが、E₂ よりは低いレベルだった (Fig. 8B)。また、ヒキガエル毒と BaA を複合曝露させた場合でも、ヒキガエル毒と E₂ を複合曝露した場合と同様に、毒の濃度依存的に pS2 の発現量が低下した (Fig. 8B)。

4-3-2. CYP1A1

CYP1A1 は、AhR 標的遺伝子で、PAHs で発現量が高まることが知られている。PAHs の一つである BaA を曝露した実験では、CYP1A1 の発現のレベルが高いため、Fig. 9B に BaA 曝露の結果を除いたグラフを小さく示した。

10⁻¹⁰ M E₂ 単独では、発現量が低くなる傾向が見られた (Fig. 9A)。ヒキガエル毒単独では、毒の濃度が 0.1、1 µg/mL のときに発現量が高まった。ヒキガエル毒と E₂ を複合曝露させた場合では、ヒキガエル毒単独に比べて、発現量が低下した (Fig. 9A)。また、BaA 単独では、発現レベルが非常に高まった (Fig. 9B)。ヒキガエル毒と BaA を複合曝露させた場合では、毒の濃度が 0.01、0.1 µg/mL では、CYP1A1 の発現量をさらに高めた。しかし、1 µg/mL では低下した (Fig. 9B)。

4-3-3. IL-6

IL-6 は炎症マーカーであるが、E₂ 単独では、発現量を低める場合もあった (Fig. 10A)。ヒキガエル毒単独では、1 µg/mL をピークに濃度依存的に発現量を高める傾向が見られた。ヒキガエル毒と E₂ を複合曝露させた場合では、ヒキガエル毒による上昇効果を抑制する傾向が認められた (Fig. 10A)。また、BaA 単独では、発現量を高める傾向が見られ、ヒキガエル毒と BaA を複合曝露させた場合では、1 µg/mL をピークに濃度依存的にさらに発現量を高める傾向が見られた (Fig. 10B)。

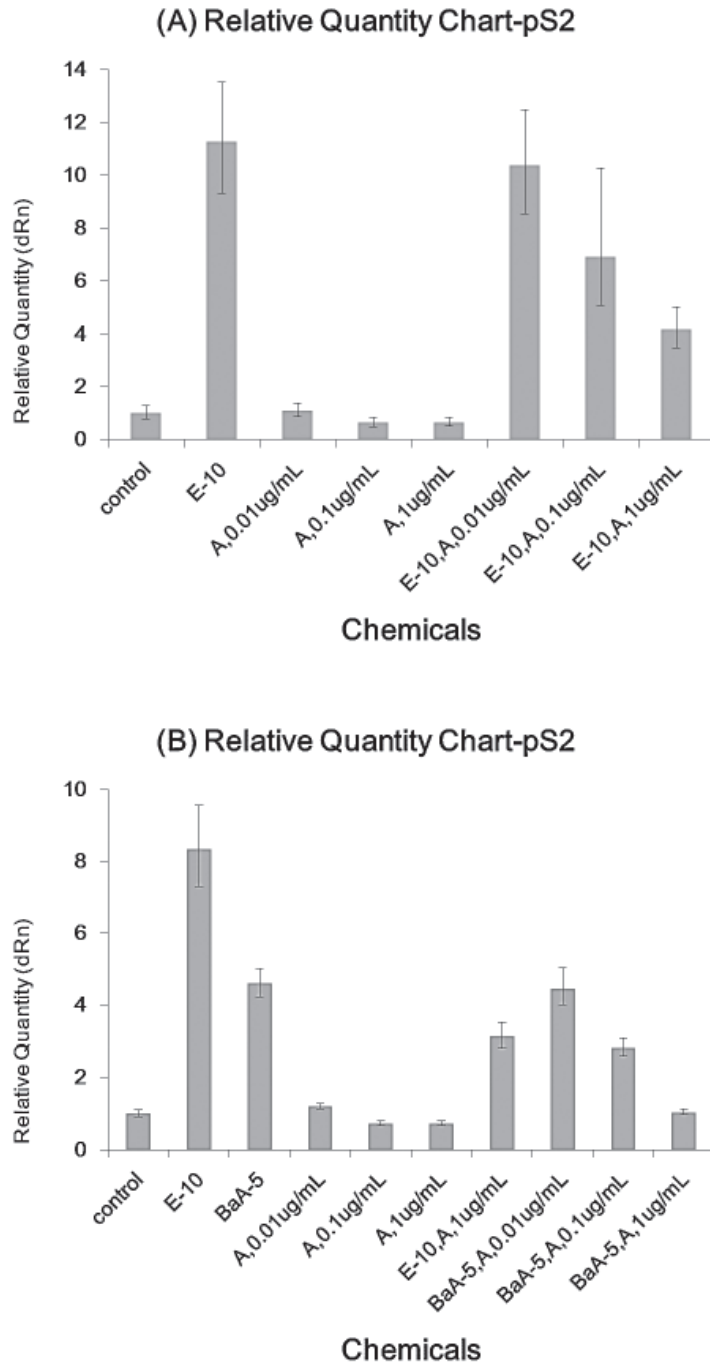


Fig. 8 MCF-7 細胞における pS2 の発現
 E-10 : 10^{-10} M E_2 BaA-5 : 10^{-5} M BaA A : 毒 A

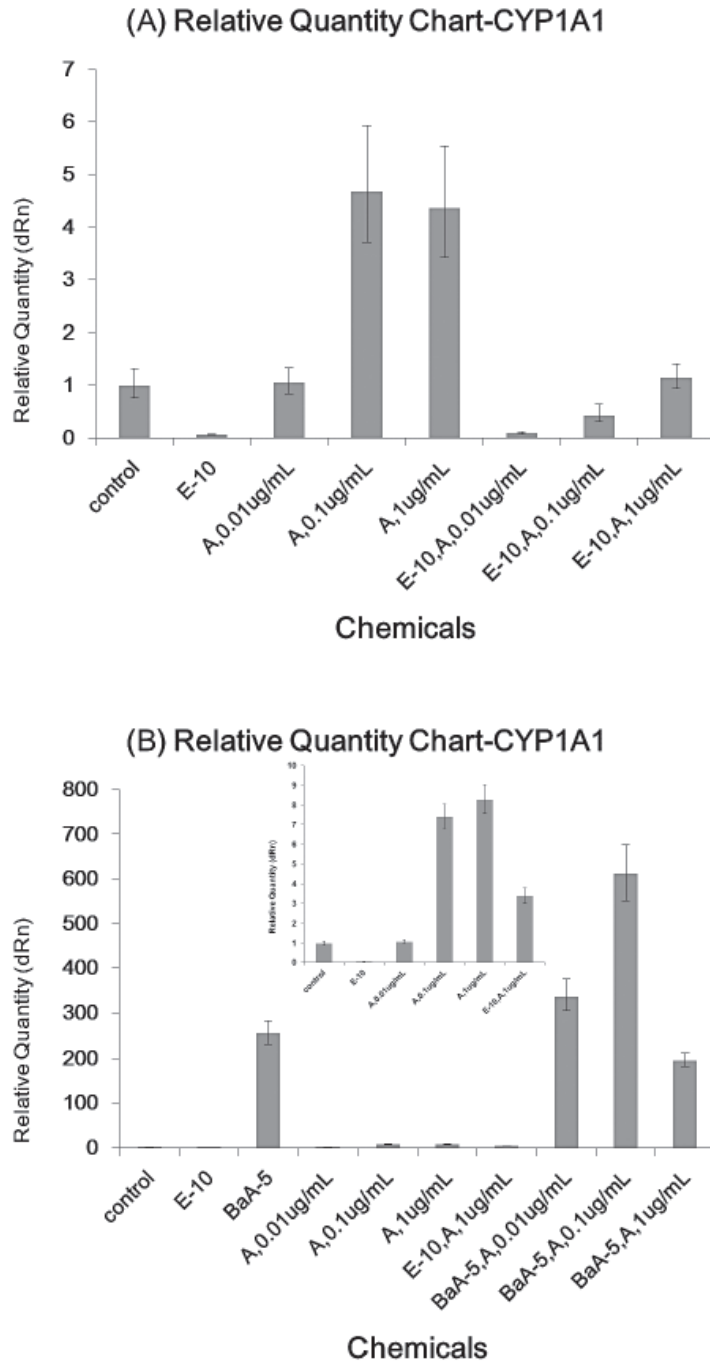


Fig. 9 MCF-7 細胞における CYP1A1 の発現
 E-10 : 10^{-10} M E_2 BaA-5 : 10^{-5} M BaA A : 毒 A

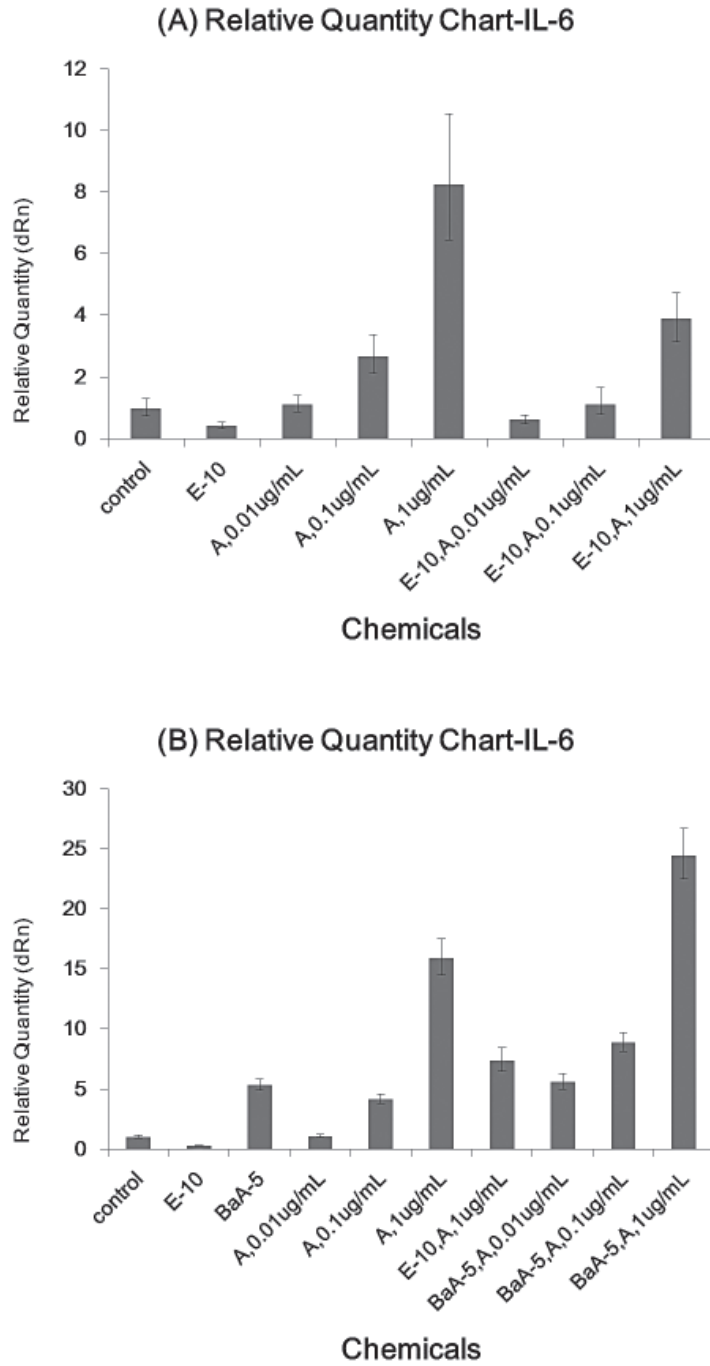


Fig. 10 MCF-7 細胞における IL-6 の発現
 E-10 : 10^{-10} M E_2 BaA-5 : 10^{-5} M BaA A : 毒 A

5. 考察

生物毒は、様々な生物で生産され、他の生物に影響を与え、自身の環境適応や生存競争に有用なものであるが、人間の病気の治療薬としての利用も考えられてきた (1)。中でもヒキガエル毒は、伝統的な漢方薬として、幅広い生物学的効果があるとされ、心不全、腫瘍、ただれ、痛みの緩和の治療にも長く用いられてきた (13, 14)。近年、ブファリンなどを中心に、様々な種類のヒトのがんで抗がん作用を発揮することが報告されてきた (2, 15 – 18)。本研究では、実際に捕獲し飼育したヒキガエルから毒素を採取し、ヒト乳がん細胞 MCF-7 に対する影響を、 E_2 や BaA との複合曝露も含めて、細胞増殖試験、pS2、CYP1A1、IL-6 の遺伝子発現解析により調べた。

細胞増殖試験では、 E_2 非存在下、存在下共に、ヒキガエル毒の濃度依存的に、MCF-7 細胞の増殖能が低下し、高濃度では細胞死が起こった。一方、低濃度では、MCF-7 細胞の増殖能がコントロールより高まっている場合もあった。したがって、濃度が高いときは細胞死を起こすような成分の効果が現れ、濃度が低いとその効果が弱まり、増殖能を高める効果が現れた可能性もあった。また、毒 A の方が毒 B よりも増殖能の抑制効果が高かった。毒 A は生きているヒキガエルから採取したが、毒 B は死亡し、凍結保存した個体を解剖して採取したため、毒の活性が低下したり、不純物が混入したりした可能性も考えられた。Gao らは、新鮮なヒキガエル毒とそうでないものでは、含まれるタンパク質に違いがあり、新鮮なものの方が、毒性が高いと報告した (19) また、BaA 存在下でも、ヒキガエル毒が、濃度依存的に増殖能を低下させることが分かった。したがって、ヒキガエル毒では、細胞増殖能を低下させる効果も認められ、 E_2 や BaA で高められた増殖能を低下させ、抗がん剤としての利用の可能性も考えられた。

次に、遺伝子発現レベルの解析では、毒 A、 E_2 や BaA との複合曝露において調べた。pS2 遺伝子は、エストロゲン応答遺伝子で、MCF-7 細胞では E_2 の作用により発現レベルが高まることが知られている (3, 9, 10)。したがって、pS2 遺伝子の発現量を調べることで、添加した物質がエストロゲン様物質であるのかを判断することができる。本実験でも、 E_2 と同様に BaA についても、pS2 の発現量が高まり、エストロゲン様作用があることを確認できた。ヒキガエル毒については、本実験の全ての濃度で、コントロールと差が認められなかったため、ヒキガエル毒自体は、pS2 の発現レベルに影響がなく、エストロゲン様作用はないと考えられた。一方、ヒキガエル毒と E_2 や BaA を複合曝露した場合には、毒の濃度依存的に発現量が低下したことから、ヒキガエル毒には E_2 や BaA で高められた pS2 の発現レベルを抑制する作用があることが考えられ、エストロゲン作用に対して抑制的な働きがあると考えられた。

CYP1A1 遺伝子は、BaA を始めとした発がん物質により発現が誘導される遺伝子として知られている (7)。ヒキガエル毒自体では、0.1、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で CYP1A1 の発現量を高めたが、BaA によって高まる発現レベルよりも低かった。また、ヒキガエル毒と E_2 を複合曝露させた場合には、CYP1A1 の発現量はヒキガエル毒単独よりも低下し、 E_2 はヒキガエル毒の CYP1A1 の発現量を高める効果を抑制することが考え

られた。一方、ヒキガエル毒と BaA を複合曝露させた場合では、0.01、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で BaA 単独での発現量よりも高まった。しかし、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では低下し、増殖試験で 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では添加 3 日目に細胞死が認められたため、細胞への傷害が現れたことによる低下とも考えられた。

IL-6 遺伝子は、炎症マーカーで、IL-6 の発現により炎症や組織障害を起こすのかを判断することができ、BaA でも発現量が増すことが報告されてきた (3, 9, 10)。ヒキガエル毒については、濃度依存的に IL-6 の発現量を高め、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では BaA よりも発現量が高く、炎症や組織障害を起こす作用があることが考えられた。また、ヒキガエル毒と E_2 を複合曝露させた場合には、ヒキガエル毒による上昇が顕著に抑制され、 E_2 がヒキガエル毒の炎症や組織障害を引き起こす作用を抑制することが考えられた。ヒキガエル毒と BaA を複合曝露させた場合には、両者が相加的に作用し、さらに高まった。ヒキガエル毒は、BaA による pS2 発現の増加を抑制するが、CYP1A1 や IL-6 では、互いの上昇効果をさらに高める傾向にあった。したがって、ヒキガエル毒と E_2 や BaA は、互いに影響し合い、作用することが考えられた。また、これまで報告してきた植物葉が上記 3 遺伝子の発現量を抑制するという効果とは異なっていた (10)。

最近、乾燥したヒキガエルの皮膚から抽出したシノブフォタリンの MCF-7 細胞におけるマイクロアレイ遺伝子発現解析も報告され、その作用機序の一端が明らかになってきた (20)。また、ヘビ毒でも MCF-7 細胞を用いて、その効果が報告されてきた。Bradshaw らは、様々なヘビから抽出した毒で、細胞毒性が認められたことを報告した (21)。また、コブラの毒液に含まれるポリペプチドが MCF-7 細胞にアポトーシスを起こし、乳がん治療への有効性も示唆された (22)。さらに、ミツバチ毒メリチンでは、濃度依存的に MCF-7 細胞の浸潤レベルを低下させることも報告された (23)。乳がんに対する様々な毒の効果が検証されており、今後の利用が期待される。また、同じ生物毒でも、がんのタイプにより、その作用が異なることも報告されてきた (19, 21)。さらに研究していく必要がある。

参考文献

1. Zhang Y. : Why do we study animal toxins? : *Dongwuxue Yanjiu*, 36, 183-222, 2015.
2. Meng Q, Yau LF, Lu JG, Wu ZZ, Zhang BX, Wang JR, Jiang ZH. : Chemical profiling and cytotoxicity assay of bufadienolides in toad venom and toad skin. *J. Ethnopharmacol.*, 187, 74-82, 2016.
3. Kuruto-Niwa R, Ito T, Goto H, Nakamura H, Nozawa R, Terao Y. : Estrogenic activity of the chlorinated derivatives of estrogens and flavonoids using a GFP expression system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 23, 121-128,

- 2007.
4. Nakamura H, Shiozawa T, Terao Y, Shiraishi F, Fukazawa H. : By-products produced by the reaction of estrogens with hypochlorous acid and their estrogen activities. *J. Health Science*, 52, 124-131, 2006.
 5. Kuruto R, Ohura T, Terao Y. : Effects of the chlorinated derivatives of environmental pollutant on gene expression. *Tokoha Gakuen University Research Review (Faculty of Education)*, 30, 377-391, 2010.
 6. Kuruto R, Yamamoto S, Ohura T. : Effects of halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons on gene expression. *Tokoha Gakuen University Research Review (Faculty of Education)*, 33, 279-294, 2013.
 7. Ohura T, Morita M, Kuruto-Niwa R, Amagai T, Sakakibara H, Shimoi K. : Differential action of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons on aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling in breast cancer cells. *Environ. Toxicol.*, 25, 180-187, 2010.
 8. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. : The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.*, 103, 113-122, 1995.
 9. Kuruto R, Abe T, Yoshida K, Ohura T. : The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and their halogenated derivatives on estrogenic action. *Tokoha University Research Review (Faculty of Education)*, 35, 269-290, 2015.
 10. Kuruto R, Aburame M, Sakurai S, Ohura T. : The effects of plant leaves on the action of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Tokoha University Research Review (Faculty of Education)*, 37, 239-253, 2017.
 11. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. : A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44, 1299-1305, 1997.
 12. Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, Watanabe M. : A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.*, 36, 47, 1999.
 13. Chen KK, Kovarikova A. : Pharmacology and toxicology of toad venom. *J. Pharm. Sci.*, 56, 1535-1541, 1967.
 14. Wu XY, Gao HM, Wang ZM. : Advances on chemical constituents in crude medicines from toads. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Formulae*, 16, 207-214, 2010.
 15. Miao Q, Bi LL, Li X, Miao S, Zhang J, Zhang S, Yang Q, Xie YH, Zhang J, Wang SW. : Anticancer effects of bufalin on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: roles of apoptosis and autophagy. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 1370-1382, 2013.
 16. Yin JH, Zhu XY, Shi WD, Liu LM. : Huachansu injection inhibits metastasis

- of pancreatic cancer in mice model of human tumor xenograft. *BMC Complement Altern. Med.*, 14, 483, 2014.
17. Qi F, Inagaki Y, Gao B, Cui X, Xu H, Kokudo N, Li A, Tang W. : Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas- and mitochondria- mediated pathways. *Cancer Sci.*, 102, 951-958, 2011.
 18. Wang Y, Lonard DM, Yu Y, Chow DC, Palzkill TG, Wang J, Qi R, Matzuk AJ, Song X, Madoux F, Hodder P, Chase P, Griffin PR, Zhou S, Liao L, Xu J, O'Malley BW. : Bufalin is a potent small-molecule inhibitor of the steroid receptor coactivators SRC-3 and SRC-1. *Cancer Res.*, 74, 1506-1517, 2014.
 19. Gao F, Wang X, Li Z, Zhou A, Tiffany-Castiglioni E, Xie L, Qian Y. : Identification of anti-tumor components from toad venom. *Oncol. Lett.*, 14, 15-22, 2017.
 20. Li J, Rong MH, Dang YW, He RQ, Lin P, Yang H, Li XJ, Xiong DD, Zhang LJ, Qin H, Feng CX, Chen XY, Zhong JC, Ma J, Chen G. : Differentially expressed gene profile and relevant pathways of the traditional Chinese medicine cinobufotalin on MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Med. Rep.*, 19, 4256-4270, 2019.
 21. Bradshaw MJ, Saviola AJ, Fesler E, Mackessy SP. : Evaluation of cytotoxic activities of snake venoms toward breast (MCF-7) and skin cancer (A-375) cell lines. *Cytotechnology*, 68, 687-700, 2016.
 22. Ebrahim K, Shirazi FH, Vatanpour H, Zare A, Kobarfard F, Rabiei H. : Anticancer Activity of Cobra Venom Polypeptide, Cytotoxin-II, against Human Breast Adenocarcinoma Cell Line (MCF-7) via the Induction of Apoptosis. *J. Breast Cancer*, 17, 314-322, 2014.
 23. Wang J, Li F, Tan J, Peng X, Sun L, Wang P, Jia S, Yu Q, Huo H, Zhao H. : Melittin inhibits the invasion of MCF-7 cells by downregulating CD147 and MMP-9 expression. *Oncol. Lett.*, 13, 599-604, 2017.