

氏 名	すみ だ か よ 住 田 佳 代
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2508 号
学位授与の日付	平 成 16 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Development of <i>in vitro</i> methods for detecting the effects of various chemicals on the hormone receptors (インビトロアッセイ法を用いたホルモン様化学物質検出法の開発)

論文調査委員 (主 査) 教 授 井 上 國 世 教 授 小 川 正 教 授 吉 川 正 明

論 文 内 容 の 要 旨

今日、内分泌攪乱化学物質が大きな社会問題として取り上げられている。現在流通する化学物質は8万種以上あると考えられ、高感度で簡便な内分泌攪乱化学物質検出法の開発が望まれている。

本論文は、種々の検出法のうちで、エンドポイントに至るまでの各ステップのメカニズムが解明されている検出法としてレセプターを介する転写活性を指標とした培養細胞レポーター遺伝子アッセイを選択し、ホルモン様 (主にエストロゲン様) 化学物質検出のための評価法を開発したものである。その主な内容は以下のとおりである。

1. 脊椎動物のうち爬虫類のエストロゲンレセプター (ER) は、リガンド結合領域付近の部分配列しか報告がなく、ワニおよびトカゲのRNAからRT-PCR法によりそれぞれの全長ER α cDNAをクローニングした。得られたcDNA断片を用いて発現プラスミドを構築した。また、ルシフェラーゼ遺伝子上流にTATAプロモーターおよびビテロゲニン由来のエストロゲン応答配列を組み込み、レポータープラスミドを構築した。両プラスミドを一過性にHeLa細胞に導入し、化合物添加後のルシフェラーゼの活性を測定するエストロゲン様化学物質検出のためのレポーター遺伝子アッセイ系を確立した。

2. エストロゲンのERへの結合に関わるリガンド結合領域のアミノ酸配列は生物種間で良好に保存されているわけではなく、種差が存在する。そこで、各種のエストロゲン様化学物質検出のためのレポーター遺伝子アッセイ系を構築し、ヒトとラット、鳥類、爬虫類、両生類、魚類の各生物間の種差を調べた。その結果、ラット、ニワトリ、トカゲ、ワニ、カエルではヒトと比較して顕著な種差が認められないことを示した。また、ニジマスでは17 β -エストラジオール (E₂) に対する応答性がヒトに比較して約100分の1に低下していることが判明した。この応答性の差について検討するために、培養温度がHeLa細胞 (37℃で培養) よりも低いBF-2細胞 (24℃で培養) を用いてヒトとニジマスのERの転写活性化を比較した。その結果、応答性の差は約10倍になったことから、この応答性の差の要因のひとつとして細胞培養温度が考えられた。

3. 代謝を受けて初めてホルモン攪乱作用を持つような化合物を検出するインビトロアッセイ法として、薬物代謝酵素系を導入したレポーター遺伝子アッセイ法を確立した。また、トランススチルベン (TS) が代謝活性化の陽性対照化合物となることを見出した。すなわち、前処理 (予め試験管内で被験化学物質をラット肝S9で処理して細胞に添加する系) および同時処理 (細胞に被験化学物質とラット肝S9または肝ミクロソームを同時に添加する系) について、測定条件を検討した。得られた条件下で、陽性対照であるTSは代謝活性化され、エストロゲン活性を示した。一方、E₂では、熱処理したS9を用いた場合にはエストロゲン活性が認められたが、S9を用いた場合には活性は溶媒対照とほぼ同レベルにまで低下した。さらに、確立した代謝活性化過程を導入したレポーター遺伝子アッセイ法を用いて4種のピレスロイド剤を試験した。その結果、S9および熱処理したS9を用いた両群で溶媒に対する転写活性化倍率の上昇は認められず、これらのピレスロイド剤は薬物代謝酵素処理を受けても代謝活性化されず、エストロゲン様活性を示さないことが示された。

4. 各種ピレスロイドを中心にプロゲステロンレセプターに対する影響を3種類のインビトロアッセイ法を用いて調べた。

化合物の細胞毒性の評価にコントロールアッセイを用い、培地中の化合物の溶解度を濁度で測定することによって、濃度設定を行った。その結果、ピレスロイド剤はプロゲステロン様あるいは抗プロゲステロン様作用を示さないことが明らかになった。このようにインビトロアッセイ法を用いてホルモン様化学物質の精緻な影響評価を行う場合には、細胞毒性や溶解度に起因する偽陽性の結果が得られる場合があることから、化合物の濃度設定に留意すること、また、エンドポイント（転写活性能、リガンド依存的なレセプターとコアクチベーターとの結合性、レセプターとの結合など）の異なる複数のアッセイ法を組み合わせることが重要であることを示した。

論文審査の結果の要旨

近年、内分泌攪乱化学物質のヒトを含めた生体および環境に与える影響が危惧され、社会的問題となっている。しかしながら、数万種以上にものぼる化学物質を高感度に、かつ、簡便に試験できるインビトロアッセイ法が存在せず、その開発が望まれている。本論文は、レセプターを介する転写活性を指標とした培養細胞レポーター遺伝子アッセイを用いて、ホルモン様、主に、エストロゲン様化学物質の検出のための評価法を開発したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. これまで部分配列の報告しかなかった爬虫類エストロゲンレセプター (ER) α について、初めてワニおよびトカゲの全長 ERcDNA をクローニングした。そして、これを用い、エストロゲン様化学物質検出のためのレポーター遺伝子アッセイ系を確立した。

2. ワニおよびトカゲに加え、ヒト、実験動物（ラット）と各種環境生物（ニワトリ、カエル、ニジマス）について、計 7 種のエストロゲン様化学物質検出のためのレポーター遺伝子アッセイ系を確立した。これらを用いて ER α を介した転写活性化の種差を検討し、ニジマス ER 以外はヒト ER と比較して顕著な種差がないことを明らかにした。また、ニジマス ER は E₂ に対する応答性がヒト ER に比較して約 100 分の 1 に低下していることを見出し、この応答性の差が細胞の培養温度に起因することを示した。

3. 代謝を受けて初めて内分泌攪乱作用を持つような化合物（代謝活性化化学物質）を検出するために、薬物代謝酵素系を導入したレポーター遺伝子アッセイ法を確立し、さらに、トランススチルベンが代謝活性化の陽性対照化合物となることを見出した。このアッセイ法を用いて 4 種のピレスロイド剤を試験した結果、これらのピレスロイド剤は薬物代謝酵素処理を受けても代謝活性化されず、エストロゲン様活性を示さないことを示した。

4. 各種ピレスロイド剤について、ヒトプロゲステロンレセプターに対する影響を 3 種類のインビトロアッセイ法を用いて調べ、すべてのアッセイにおいてピレスロイド剤はプロゲステロン様あるいは抗プロゲステロン様作用を示さないことを示した。インビトロアッセイ法を用いてホルモン様化学物質の精緻な影響評価を行う場合には、コントロールアッセイなどを用いて濃度設定に留意しながら、エンドポイントの異なる複数のアッセイ法を組み合わせることで評価することが重要であることを示した。

以上のように本論文は、レセプターを介する転写活性を指標とした培養細胞レポーター遺伝子アッセイを用いて、ホルモン様化学物質検出法を開発したものであり、酵素化学、毒性学および環境化学の分野に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 15 年 10 月 16 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。