

	しらいし ふじお
氏 名	白石 不二雄
授 与 学 位	博士 (環境科学)
学 位 記 番 号	環博第19号
学位授与年月日	平成19年3月27日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院環境科学研究科 (博士課程) 環境科学専攻
学 位 論 文 題 目	酵母 Two-Hybrid assay を用いた内分泌かく乱物質の 評価手法の開発に関する研究
指 導 教 員	東北大学教授 彼谷 邦光
論 文 審 査 委 員	主査 東北大学教授 彼谷 邦光 東北大学教授 末永 智一 東北大学教授 星野 仁

論 文 内 容 要 旨

1996年、シーア・コルボーンらにより、「奪われし未来」(邦題)が上梓され、内分泌かく乱作用による自然界での異常が報告されると、世界中に強い衝撃を与えた。内分泌かく乱作用による障害は、これまでの環境毒と異なり、生物の死や疾病へ直結するといったものではなく、繁殖機能の低下や知能指数の低下といった静かに顕在化する継世代的影響であり、しかも生体内のホルモン受容体との結合によってもたらされるため低濃度暴露でおこる可能性が指摘された。その中で特に繁殖機能の低下や生殖器の異常など性ホルモンのかく乱が注目され、内分泌かく乱作用の研究の取りかかりの一步として、性ホルモンとして生殖機能に深く関係するステロイドホルモンの働きを模倣する化学物質の検索のための研究が進められた。本来、ホルモン作用を有するとは考えられない化学物質が、女性ホルモンや男性ホルモンなどの受容体との結合能を有するか、否かを選別(スクリーニング)する試験(アッセイ)法の開発が *in vivo*、*in vitro* の両試験で様々な生物種について検討されるとともに、環境中の内分泌かく乱物質の曝露実態を調べることのできる *in vivo*、*in vitro* の両アッセイ法の試みも行われるようになった。

本論文は、環境中に排出される数多くの化学物質の様々な内分泌かく乱作用を、できるだけ、簡便にかつ迅速にスクリーニングする手法として開発された酵母 Two-Hybrid assay 法に改良を加え、迅速性と正確性を備えた内分泌かく乱物質の評価手法の構築を行うことを目的とした。まず、酵母 Two-hybrid 法の改良(第2章)を行い、構築した酵母 Two-Hybrid assay 法を用いて、内分泌かく乱作用、特に社会的問題となったエストロゲン作用が疑われる様々な化学物質のスクリーニング(第3章)を行うとともに、ヒトおよび生態系への内分泌かく乱作用がもっとも注目されるポリ塩化ビフェニール(Polychlorinated Biphenyl; PCB)の代謝物である水酸化PCBの異性体91種類について、酵母 Two-hybrid assay 法を用いてエストロゲン活性、甲状腺ホルモン活性、およびレチノイド X(エックス)受容体(RXR)結合活性のスクリーニングを試み、構造との関連の評価(第4章)を行った。さらに、生態系への内分泌かく乱作用が問題となっている水環境試料のエストロゲン活性を、迅速、かつ高感度にモニタリングするための手法を確立し、様々な環境水のエストロゲン活性の評価と東京湾流域のエストロゲン活性のモニタリング(第5章)を試みた。

第2章では、酵母 Two-Hybrid assay の改良について述べている。酵母 Two-Hybrid assay 系はホルモン受容体とコアクチベーターを共存させることで、生体でのホルモン作用発現メカニズムを模倣したシステムであり、

しかも4時間という比較的短い暴露時間でホルモン活性を測定できるという長所を有する。そこで酵母 Two-Hybrid assay 法の液体法をベースにして、操作性にすぐれ、しかも高感度に活性が計測できるアッセイ系の構築をめざし、ヒト・エストロゲン受容体 (hER) α が導入された酵母を用いてエストロゲン・アゴニストおよびアンタゴニスト試験を確立した。図-1 には改良した改良・構築した酵母 Two-Hybrid assay 法の手順の概略を従来法(液体法)と比較して示した。すなわち、従来法は、他の酵母アッセイ系に比べて極めて短時間でできるアッセイ系ではあるが、マイクロチューブによる曝露や遠心操作後、酵母を溶菌するなどの煩雑な操作を必要とする。一方、改良法は発光測定用 96 ウェルプレート上で曝露や溶菌などのすべての操作を行い、また、レポーター遺伝子発現酵素の β -ガラクトシダーゼを化学発光測定法により測定することで、操作性にすぐれ、しかもエストロゲン活性を高感度に測定できる。

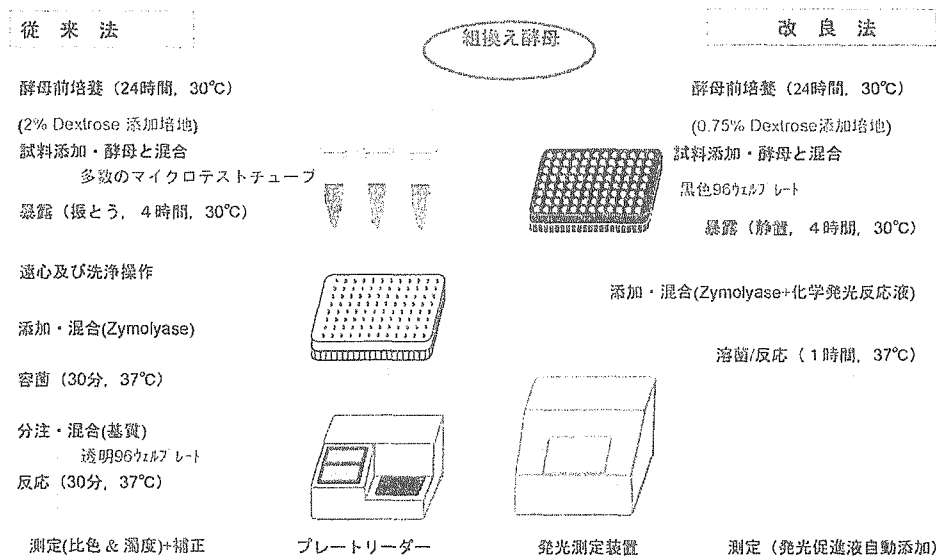


図-1 改良酵母 Two-Hybrid assay 法の手順(概略)

第 3 章では、広く一般社会生活で使われているか、あるいは副産物として環境に放出されている化学物質の中から、入手できた化学物質 291 物質を用いて、内分泌かく乱作用、とくにエストロゲン活性について、ヒトへの影響の観点からヒトのエストロゲン受容体 (hER) α を組み込んだ酵母を、また魚類など水系生物への影響の観点からメダカのエストロゲン受容体 (medER) α を組み込んだ酵母を用いてスクリーニングし、両エストロゲン受容体に対する応答の比較検討を行った。

hER 酵母アッセイおよび medER 酵母アッセイの両アッセイ系を用いてアゴニスト活性のスクリーニングを行った結果、hER 酵母アッセイの-S9 試験で陽性と判定された化学物質は、64 種類 (21%) であり、medER 酵母アッセイでは 85 種類 (29%) であった。どちらかのアッセイ系で陽性と判定されたのは 111 種類 (38%) であった。とくに、植物エストロゲンや工業関連物質においては、medER 酵母アッセイでの陽性率と活性強度が高くなる傾向が示された。一方、+S9 試験で活性が発現、あるいは増強する化学物質が計 37 種類 (13%) に認められた。また、hER α 導入酵母によるアンタゴニスト試験および酵母 YTOX 株による酵母毒性試験を組み合わせたアンタゴニストアッセイ系において、-S9 試験で陽性と判定された化学物質は 16 種類 (5.7%) であったが、+S9 試験

で活性が発現するか、あるいは増強する化学物質が計 64 種類(23%)に認められ、どちらかで陽性と判定されたのは 74 種類(27%)であった。

第4章では、水酸化 PCB のエストロゲン活性、甲状腺ホルモン活性、および RXR 結合活性のスクリーニングについて述べている。PCB の地球レベルによる環境汚染による生物への影響が指摘され、高濃度の PCB に汚染された環境から食物を摂取していた生体では繁殖能力の低下、甲状腺ホルモン機能の低下、免疫機能の低下など内分泌かく乱作用が問題となっている。安定、かつ難分解性といわれている PCB であるが、わずかずつ生体内で代謝され、水酸化体が形成されていることが知られている。計 91 種類の水酸化 PCB を入手し、これら水酸化 PCB について、エストロゲン・アゴニスト活性、甲状腺ホルモン・アゴニスト活性、およびレチノイド X 受容体 (RXR) 結合アゴニスト活性を各核内受容体が導入された酵母 Two-Hybrid assay 法を用いてスクリーニングし、それぞれの活性と異性体の構造との関係を比較検討した。エストロゲン・アゴニスト活性の陽性を示す異性体の数は、hER 酵母アッセイで 30%、medER 酵母アッセイで 70%を示し、塩素数が少ない異性体が多い傾向にあり、また、水酸基の位置はパラ位 (4-OH) にある異性体が多くなり、17 β -エストラジオール(E2)に対する相対活性も hER 酵母アッセイおよび medER 酵母アッセイの両系とも高い傾向が認められた。hTR 酵母アッセイでは 26%がアゴニスト活性を示し、水酸基の位置と活性の関係では、オルト位に水酸基のある異性体で 3,5,3'-トリオドサイロニン(T3)に対する相対活性の平均値が高い傾向にあり、hRXR 酵母アッセイでは 22%がアゴニスト活性を示し、オルト位に水酸基のある異性体で顕著な 9-*cis*-レチノイン酸に対する相対活性が高いことが示された。

第5章では、水環境のエストロゲン活性モニタリングについて述べている。酵母 Two-Hybrid assay 法を用いて、生態系への内分泌かく乱作用が問題となっている水環境試料のエストロゲン活性を、迅速、かつ高感度にモニタリングするための手法を確立し、適用するために、ヒト・エストロゲン受容体 (hER) α 導入酵母アッセイおよびメダカ・エストロゲン受容体 (medER) α 導入酵母アッセイを併用することで多重的に評価できる手法の検討を行い、あわせて様々な水環境のモニタリングを行った。

都市部中流域の河川水のエストロゲン活性は hER および medER 酵母アッセイの両系とも同程度の E2 換算活性値を示し、主なエストロゲン作用物質はエストラジオール関連物質であることが推察された。製紙工場排水や産廃処分場浸出水では medER 酵母アッセイで顕著な強い活性がみられることから、工業系エストロゲン作用化学物質の高濃度汚染によることが推察された。両酵母アッセイ系の化学物質に対する感受性の違いを評価に取り入れることで、環境水に含まれるエストロゲン作用物質の推測が可能となることが示唆された。東京湾の海水、東京湾に流入する河川、および沿岸部の下水処理場排水のエストロゲン活性のモニタリングを行ったところ、東京湾海水のエストロゲン活性は、東京湾全域の 20 定点調査において、湾奥では微弱なエストロゲン活性がみられるが、湾口ではほとんどみられず、下水処理場排水や流入河川水の比較的強いエストロゲン活性は海水による希釈に加えて、微生物などの分解により速やかに減衰することが示唆された。

本論文で改良・構築した酵母 Two-Hybrid assay は、多種多様な化学物質の内分泌かく乱作用を迅速かつ便にスクリーニングできるとともに、様々な水環境の内分泌かく乱作用の曝露モニタリングに適用できることが示された。

論文審査結果の要旨

内分泌かく乱作用はこれまでの毒性作用とは異なり、繁殖機能の低下や知能の低下など、継代的な影響として注目され、ホルモン受容体との結合により比較的低濃度曝露でおこる可能性が指摘され、社会的問題となっている。本研究では、内分泌かく乱作用を示す可能性のある多種多様な化学物質を選別（スクリーニング）するとともに、環境中の内分泌かく乱作用を調査（モニタリング）できる、操作性にすぐれた、高感度検出バイオアッセイ系の構築に関する研究内容であり、全章6章より構成される。

第1章は序論であり、これまで検討されてきた内分泌かく乱作用の様々な検出法の原理と操作性について述べ、本研究の目的と意義について言及している。

第2章は、内分泌かく乱作用として注目されたエストロゲン活性を測定するヒト・エストロゲン受容体（hER）導入酵母アッセイについて、従来法に比べてより簡便な操作性と高感度に計測できるアッセイ系への改良を試み、試験操作を96ウェルマイクロプレート上で行うことで極めて操作性にすぐれたシステムに改良した。また、レポーター遺伝子発現酵素の β -ガラクトシダーゼを従来法の比色法から化学発光法に変更した。これらの改良により、再現性にすぐれた高感度アッセイ系を構築している。

第3章は、内分泌かく乱作用が疑われている多種多様な291種類の化学物質について、hER酵母アッセイとメダカ・エストロゲン受容体（medER）酵母アッセイの両系を用いて、エストロゲン活性のスクリーニングを行い、化学物質の分類別、およびS9代謝化試験の有無により、活性の特徴を述べている。

第4章は、地球的な汚染が注目され、様々な内分泌かく乱作用が問題視されているポリ塩化ビフェニール（PCB）のモノ水酸化体の91異性体について、hERおよびmedER酵母アッセイによるエストロゲン活性と甲状腺ホルモン活性およびレチノイドX受容体（RXR）結合活性についてスクリーニングを行い、それぞれの活性と塩素数や水酸基の位置から、構造活性相関を明確にし、水酸化PCBにより引き起こされる生体内での様々な内分泌かく乱作用の懸念を指摘している。

第5章は、エストロゲン活性の水環境における生態系への影響と動態を把握するために、環境水のエストロゲン活性のモニタリング手法の構築を試みている。様々な環境水について、hER酵母アッセイとmedER酵母アッセイを併用するモニタリング手法で行い、エストロゲン活性を示す汚染化学物質の種類を推測できる評価法を確立した。また、東京湾に関連する水域のエストロゲン活性のモニタリングを数年にわたり実施し、水域におけるエストロゲン活性の動態について解析している。

第6章は総括であり、各章のまとめを考察するとともに、今後の課題について言及している。

よって、本論文は博士（環境科学）の学位論文として合格と認める。