

学位論文題名

Effects of a Diphenyl Ether-Type Herbicide,
Chlornitrofen, and Its Amino Derivative on Androgen
and Estrogen Receptor Activities

(ジフェニルエーテル系除草剤クロルニトロフェン及び
そのアミノ代謝物によるアンドロゲン及びエストロゲン受容体を
介した内分泌攪乱作用)

学位論文内容の要旨

<緒言>

Chlornitrofen (CNP)は国内で生産され、1965～1994年の約30年間、水田除草剤として主に国内で大量に使用された。その総使用量は8万トン以上と見積もられている。CNPはその性質から散布時期に淡水魚や貝類に高濃度に蓄積されることが報告されている。また、環境中でのCNPの代謝経路として、水田の低質土壌においてCNPの有するニトロ基がアミノ基に還元されたアミノ代謝物(CNP-amino)に変換されることも報告されている。実際に、水道水や貝類からCNPとCNP-aminoが同時に検出されたことが報告されている。さらに、新潟大の研究では、県内の胆嚢癌死亡率とCNP使用量が統計学的に良く相関することを報告している。このように、CNPの使用は水田地帯を中心とした水系汚染を引き起こし、さらに水田の周りの湖や海洋における魚介類へCNPやCNP-aminoの蓄積をもたらしたと考えられている。最近、様々な化学物質がヒトや野生生物の生殖機能に悪影響を及ぼすことが社会問題となっており、このような化学物質は内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)と呼ばれている。環境省では環境ホルモンとして疑われる化学物質を65種類リストアップしているが、その6割以上を殺虫剤や除草剤などの農薬が占めている。例えば、殺虫剤Vinclozolinはアンドロゲン受容体(AR)を介して抗アンドロゲン作用を有するARアンタゴニストであることや、殺虫剤DDTやMethoxychlorはエストロゲン受容体(ER)を介してエストロゲン作用を誘導するERアゴニストであることが報告されている。一方、国内で水田除草剤として大量に使用され、現在も低質土壌に残留していることが報告されているCNPの内分泌攪乱作用については、ほとんど明らかにされていない。今回我々はCNPおよびCNP-aminoのARとERに対する作用を検討するため、感度や特異性に優れたレポーター遺伝子アッセイ系を開発した。この二つのアッセイ系を用いて、CNP及びCNP-aminoのホルモン受容体を介した作用を既知の環境ホルモンとともに測定し、さらに、hARおよびhER α に対する結合作用も検討したので報告する。

<方法>

CNPおよびCNP-aminoは和光純薬(株)製の標準品を用いた。レポーター遺伝子アッセイはhAR(or hER α)発現プラスミドおよびルシフェラーゼ遺伝子上流にAR(or ER)応答配列を組み込んだプラスミドをチャイニーズハムスター卵巣由来(CHO)細胞に導入し、試料と24時間培養後Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて行った。hARおよびhER α との競合的結合試験はLigand Screening System (TOYOBO)を用いて行った。

<結果>

様々なステロイドホルモンについて試験した結果、AR の系ではジヒドロテストステロン(DHT)、ER 系ではエストラジオール(E₂)が低濃度でレポーター遺伝子を誘導することが確認された。AR 系において、CNP はやや弱いアンドロゲン活性を示したが、CNP-amino には認められなかった。しかしながら、DHT で誘導したアンドロゲン活性を CNP 及び CNP-amino は用量依存的に抑制した。とくに CNP の抑制作用は、AR アンタゴニストの Vinclozolin や *p,p'*-DDE よりも強かった。抗アンドロゲン活性の強さは、以下のとおりであった (CNP > Vinclozolin > *o,p'*-DDT = *p,p'*-DDE > CNP-amino)。ER の系において、CNP および CNP-amino は用量依存的にエストロゲン活性を示した。エストロゲン活性の強さは以下のとおりであった (*o,p'*-DDT > CNP-amino > *p,p'*-DDT > CNP)。また、E₂ により誘導されたエストロゲン活性を CNP および CNP-amino は抑制しなかった。

競合的結合試験による CNP および CNP-amino の hAR および hER α に対する結合能の検索結果は上記の活性結果と良く一致していた。

<考察>

本研究において、AR あるいは ER を介した転写活性を測定するためのレポーター遺伝子アッセイ系を開発した。この方法は、これまで報告されている酵母やヒト細胞 (HepG2 など) を用いた方法よりも感度が数十倍高く、操作も簡便であることから、農薬等を含む様々な化学物質について内分泌攪乱作用を検証する方法として極めて有用と考えられた。この方法により、CNP は既知の AR アンタゴニストに比べ、強い抗アンドロゲン活性を有することやその代謝物 CNP-amino は CNP よりも強いエストロゲン活性を有することが明らかとなった。これらの作用は、受容体との結合試験により AR あるいは ER α を介した AR アンタゴニストおよび ER α アゴニスト作用であることが示唆された。最近、*o,p'*-DDT, Bisphenol-A, Butyl benzyl phthalate などの環境エストロゲンが抗アンドロゲン作用を併せ持つことが報告されており、CNP および CNP-amino においても同様の結果を得た。CNP と CNP-amino の化学構造の違いは、ベンゼン環に連結した官能基がニトロ基かアミノ基かの違いであるが、これらの官能基が AR および ER との結合に重要な役割を果たしていることが考えられた。Vinclozolin や *p,p'*-DDE は動物を用いた研究から *in vivo* で抗アンドロゲン作用を示すことが報告されていることから、CNP および CNP-amino も *in vivo* において作用を有する可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 博 美
副 査 教 授 宮 崎 勝 巳
副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

Effects of a Diphenyl Ether-Type Herbicide, Chlornitrofen, and Its Amino Derivative on Androgen and Estrogen Receptor Activities

(ジフェニルエーテル系除草剤クロルニトロフェン及び
そのアミノ代謝物によるアンドロゲン及びエストロゲン受容体を
介した内分泌攪乱作用)

Chlornitrofen(CNP)は国内で生産され、1965～1994年の約30年間、水田除草剤として主に国内で大量に使用された。その総使用量は8万トン以上と見積もられている。CNPはその性質から散布時期に淡水魚や貝類に高濃度に蓄積されることが報告されている。CNPは、土壤中でそのニトロ基が還元されアミノ代謝物(CNP-amino)に変換されることが報告されており、実際に、水道水や貝類からCNPとCNP-aminoが同時に検出されている。さらに、新潟大の研究では、県内の胆嚢癌死亡率とCNP使用量が統計学的に良く相関することを報告している。このように、CNPの使用は水田地帯を中心とした水系汚染を引き起こし、さらに水田の周りの湖や海洋における魚介類へCNPやCNP-aminoの蓄積をもたらしたと考えられている。最近、様々な化学物質がヒトや野生生物の生殖機能に悪影響を及ぼす内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)として社会問題となっている。例えば、殺虫剤Vinclozolinはアンドロゲン受容体(AR)を介して抗アンドロゲン作用を有するARアンタゴニストであることや、殺虫剤DDTやMethoxychlorはエストロゲン受容体(ER)を介してエストロゲン作用を誘導するERアゴニストであることが報告されている。一方、国内で水田除草剤として大量に使用され、現在も低質土壌に残留していることが報告されているCNPの内分泌攪乱作用については、ほとんど明らかにされていない。申請者はCNPおよびCNP-aminoのARとERに対する作用を検討するため、感度や特異性に優れたレポーター遺伝子アッセイ系を開発し、この二つのアッセイ系を用いて、CNP及びCNP-aminoのホルモン受容体を介した作用を既知の環境ホルモンとともに測定すると共に、hARおよびhER α に対する結合作用も検討した。

<方法>CNPおよびCNP-aminoは和光純薬(株)製の標準品を用いた。レポーター遺伝子アッセイはhAR(またはhER α)発現プラスミドおよびルシフェラーゼ遺伝子上流にAR(またはER)応答

配列を組込んだプラスミドをチャイニーズハムスター卵巣由来(CHO)細胞に導入し、試料と 24 時間培養後 Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて行った。hAR および hER α との競合的結合試験は Ligand Screening System (TOYOBO)を用いて行った。

<結果>様々なステロイドホルモンについて試験した結果、AR の系ではジヒドロテストステロン(DHT)、ER 系ではエストラジオール(E₂)が低濃度でレポーター遺伝子を誘導することが確認された。AR 系において、CNP はやや弱いアンドロゲン活性を示したが、CNP-amino には認められなかった。しかし、DHT で誘導したアンドロゲン活性を CNP 及び CNP-amino は用量依存的に抑制した。とくに CNP の抑制作用は、AR アンタゴニストの Vinclozolin や *p,p'*-DDE よりも強かった。抗アンドロゲン活性の強さは、以下のとおりであった (CNP > Vinclozolin > *o,p'*-DDT = *p,p'*-DDE > CNP-amino)。ER の系において、CNP および CNP-amino は用量依存的にエストロゲン活性を示した。エストロゲン活性の強さは以下のとおりであった (*o,p'*-DDT > CNP-amino > *p,p'*-DDT > CNP)。また、E₂により誘導されたエストロゲン活性を CNP および CNP-amino は抑制しなかった。

競合的結合試験による CNP および CNP-amino の hAR および hER α に対する結合能の検索結果は上記の活性能結果と良く一致していた。

<考察>本研究で開発した AR あるいは ER を介した転写活性を測定するためのレポーター遺伝子アッセイ系は、これまで報告されている酵母やヒト細胞 (HepG2 など) を用いた方法よりも感度が数十倍高く、操作も簡便であることから、農薬等を含む様々な化学物質について内分泌攪乱作用を検証する方法として極めて有用と考えられた。この方法により、CNP は既知の AR アンタゴニストに比べ、強い抗アンドロゲン活性を有することやその代謝物 CNP-amino は CNP よりも強いエストロゲン活性を有することが明らかとなった。これらの作用は、受容体との結合試験により AR あるいは ER α を介した AR アンタゴニストおよび ER α アゴニスト作用であることが示唆された。最近、*o,p'*-DDT, Bisphenol-A, Butyl benzyl phthalate などの環境エストロゲンが抗アンドロゲン作用を併せ持つことが報告されており、CNP および CNP-amino においても同様の結果を得た。CNP と CNP-amino の化学構造の違いは、ベンゼン環に連結した官能基がニトロ基かアミノ基の違いであるが、これらの官能基が AR および ER との結合に重要な役割を果たしていることが考えられた。Vinclozolin や *p,p'*-DDE は動物を用いた研究から *in vivo* で抗アンドロゲン作用を示すことが報告されていることから、CNP および CNP-amino も *in vivo* において作用を有する可能性が考えられた。

公開発表に際し、副査の宮崎教授から CNP の体内代謝について、ER や AR との結合性とホルモン活性およびその構造との関係について、次いで副査の小林教授から、CNP 大量使用地区における出生性比の偏りの解釈について、多くの環境ホルモン物質が女性化の方向に働く事実の生物界における意義について、主査の藤田教授から、生体内の CNP 濃度について、affinity から考えた場合の生体におけるホルモン作用の程度、CNP の 2 つの benzene 環の位置関係 (角度) について、最後に、フロアーから、本アッセイ系で得られた値と生物活性との関係、高感度アッセイ系である必要性についての質問があった。申請者は、何れの質問に対しても、自らの実験結果と文献を引用して、概ね妥当な回答を行った。

本研究は、ER または AR を介して発現する環境ホルモン物質を高感度に検出する遺伝子レポーターアッセイ系を開発し、CNP およびそのアミノ代謝物が高いエストロゲン活性および抗アンド

ロゲン活性を同時にもつことを初めて見出した。本法は、今後、広く種々の物質のホルモン活性のスクリーニングに用いられることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。