氏名（国籍）	テレンス. P. N. タロレテ（フィリピン）
学位の種類	博　士（農　学）
学位記番号	博甲第3084号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	ALKYLPHENOLS AND PHYTOESTROGENS, THEIR INTERACTION WITH FOOD FACTORS AND MECHANISMS OF ACTION *IN VITRO* （アルキルフェノールや植物エストロゲンなどの生体細胞における食品因子の相互作用と作用機構）

主　査	筑波大学教授	農学博士	前川孝昭
副　査	筑波大学教授	農学博士	佐竹隆顕
副　査	筑波大学助教授	農学博士	杉浦則夫
副　査	筑波大学教授	工学博士	田中秀夫

論文の内容の要旨

環境ホルモン（内分泌攪乱化学物質／Endocrine disruptors）は，“動物の生体内に取り込まれた場合に，本来，その生体内で営まれている正常ホルモンの作用に影響を与える外因性の物質”である。本研究では，環境ホルモンとして疑われている工業用界面活性剤の生分解産物であるアルキルフェノール類（*n*-pentylphenol, *n*-hexylphenol, *n*-heptylphenol, *n*-octylphenol, *n*-nonylphenol）及び植物エストロゲン（genistein及びdaidzein）の神経分化誘導やエストロゲン作用に及ぼす影響を，動物細胞工学的手法により詳細に評価解析し，さらにその作用を調節する食品機能成分に注目し，食用担子菌アガリクスの熱水抽出成分にその作用を見出した。

はじめに，環境ホルモンの神経系への影響を調べるため，神経分化のモデルとして汎用されているラット神経細胞株PC12を用いて，神経分化誘導マーカーであるアセチルコリンエステラーゼ活性に及ぼす影響評価解析を行った。細胞壊死（ネクローシス）は乳酸脱水酵素の放出による細胞障害性，遺伝子にプログラムされた細胞死（アポトーシス）はアガロースゲル電気泳動によるDNA断片化の検出，神経分化誘導阻害はアセチルコリンエステラーゼ活性の測定により調べた。その結果，環境中において暴露しうる濃度として300 μ M，15分間の暴露におけるアルキルフェノール類は，PC12細胞にネクローシスおよびアポトーシスを引き起こさなかったが，0.8 μ Mの24時間暴露によって神経分化を容易に阻害することが判明した。これらの結果から，アルキルフェノールが神経細胞の情報伝達に重要なアセチルコリンエステラーゼ活性を阻害することが明らかになり，次に，この作用を調節する食品因子について検討を試みた。

女性ホルモン調節に関する機能性食品因子として注目されている植物イソフラボンは，その構造が女性ホルモンのエストロゲンに類似しており，近年その神経細胞活性効果が注目されている。そこで，植物エストロゲンであるゲニステインおよびダイゼインを用いて，アセチルコリンエステラーゼを指標としたラット神経細胞株PC12の神経細胞分化誘導活性を調べたところ，ゲニステインおよびダイゼインがアセチルコリンエステラーゼ活性を上昇させることを見出した。さらにこの作用のメカニズムを調べるため，エストロゲン受容体のアンタゴニストであるタモキシフェンを処理し，その影響を調べた。その結果，タモキシフェンによりアセチルコリンエステラーゼ活性の上昇が阻害され，PC12細胞に発現するエストロゲン受容体を介した反応であることが判明した。植物エ

ストロゲンは神経細胞内のエストロゲン受容体を介してアセチルコリンエステラーゼ活性を促進するものと考えられた。

一方，環境ホルモンの作用メカニズムとして，エストロゲン受容体を介した古典的細胞情報伝達系以外に，DNA AP-1 siteを介した転写メカニズムが注目されている。環境ホルモンのエストロゲン作用を調べるモデルとして汎用されているヒト乳腺上皮由来乳がん細胞MCF7を用いて，DNA AP-1 siteを介した転写メカニズムを制御する食品機能成分の検索を行った結果，*Agaricus blasei*（*Class Basidiomycotina*）の水溶性画分にDNA AP-1 site c-Junタンパク質の発現を促進する作用が見出された。このことは，*Agaricus blasei*（*Class Basidiomycotina*）の水溶性画分はヒト乳がん細胞MCF7のDNA AP-1 siteのc-Junタンパク質の発現を促進することを示しており，環境ホルモンによる環境を未然に防ぐ効果を有することを示唆している。即ち，*Agaricus blazei*の水溶性画分に環境ホルモン作用を調節しうる食品機能成分を保有する食品の開発を促進するものと考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では，環境ホルモンとして疑われている工業用界面活性剤の生分解産物であるアルキルフェノール類（*n*-pentylphenol, *n*-hexylphenol, *n*-heptyphenol, *n*-octylphenol, *n*-nonylphenol）及び植物エストロゲン（genistein及びdaidzein）の神経分化誘導やエストロゲン作用に及ぼす影響を，動物細胞工学的手法により詳細に評価解析し，さらにその作用を調節する食品機能成分に注目し，食用担子菌アガリクスの熱水抽出成分にその作用を見出した。

環境ホルモンの神経系への影響を調べるため，神経分化のモデルとして汎用されているラット神経細胞株PC12を用いて，神経分化誘導マーカーであるアセチルコリンエステラーゼ活性に及ぼす影響評価解析を行った。その結果，アルキルフェノールが神経細胞の情報伝達に重要なアセチルコリンエステラーゼ活性を阻害することが明らかになった。次に，植物エストロゲンであるゲニステインおよびダイゼインを用いて，アセチルコリンエステラーゼを指標としたラット神経細胞株PC12の神経細胞分化誘導活性を調べたところ，ゲニステインおよびダイゼインがアセチルコリンエステラーゼ活性を上昇させることを見出した。作用のメカニズムはタモキシフェンによりアセチルコリンエステラーゼ活性の上昇が阻害され，PC12細胞に発現するエストロゲン受容体を介した反応であることが判明した。植物エストロゲンは神経細胞内のエストロゲン受容体を介してアセチルコリンエステラーゼ活性を促進するものと考えられた。さらに，環境ホルモンのエストロゲン作用を調べるモデルとして有効なヒト乳腺上皮由来乳がん細胞MCF7を用いて，食用担子菌の一種*Agaricus blasei*の水溶性画分にDNA AP-1 site c-Junタンパク質の発現が促進され，水溶性画分は環境ホルモンによる影響を未然に防ぐ効果を有することが示唆された。

以上のように，環境ホルモンである工業用界面活性剤の生分解産物とこれと類似する植物エストロゲンの神経分化誘導やエストロゲン作用に及ぼす影響の解析手法の開発とその作用を調節する食品機能成分に着目した基礎的知見を得ており，食品プロセス工学の分野の発展に寄与すると判断した。

よって，著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。