

試料水の濃縮法法としては、フミン物質の濃縮を目的とする方法と、塩素処理水中の変異原性を有する副生成物の濃縮を目的とする方法とを比較して検討した。試料水としては、琵琶湖水とその塩素処理水とした。この結果、

①水道原水および塩素処理水としての水道水のエストロゲン様作用を検出するためには、XAD7HP樹脂を用いるフミン物質の濃縮を目的とした方法が適当である。

②この方法を用いて、1.2L程度を100倍以上に濃縮して試料を調製すればよい。

(2) 水道水に含まれるエストロゲン様作用の主体をなす成分について

水道水に含まれる化学物質16種についてMVLNアッセイを行い作用強度を調べるとともに、水中濃度の測定例をもとに相対的重要度を求めて比較した。この結果、

①XAD7HP樹脂で濃縮される琵琶湖水中有機物および塩素処理水の重要度が高く、*in vitro*アッセイを用いた場合、水道水中のエストロゲン様作用の主要な成分として検出される。

②個別の化学物質としては、4-ノニルフェノールおよび17βエストラジオールについて今後着目すべきである。

(3) 塩素処理による影響について

①初期残留塩素濃度1.0mg/Lで琵琶湖水の塩素処理を行った結果、エストロゲン様作用は2.3倍に強められた。

②試薬フミン酸を用いた実験では、(添加塩素濃度):(TOC濃度)≒2:1でエストロゲン様作用が最も強められ、2.9倍となった。

③クロロホルムにはエストロゲン様作用はない。

④オゾン処理の効果については、消費率が通常程度(1.7mg-O₃/L)および高消費率の場合ともに、原水の作用は大きく変化しなかった。一方、過酸化水素を共存させた場合では、作用は大きく低減した。

参 考 文 献

1)Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC), Final Report, 1998

2)K.Waller, S.H.Swan, G.DeLorenze, and B.Hopkins, Trihalomethanes in Drinking Water and Spontaneous Abortion, *Epidemiology*, Vol.9, pp.134-140, 1998

3)International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria, Disinfectants and Disinfectant By-products, 1998

4)篠塚則子、フミン物質と環境、東京大学生産技術研究所所報、Vol.45, No.7, pp.2-9, 1993

5)筒木潔、熊田恭一、腐植酸の化学、肥料化学、第3号、pp.93-131, 1980

6) M.Pons,D.Gagne,J.C.Nicolas,M.Mehtai;A New Cellular Model of Response to Estrogens:A Bioluminescent Test to Characterize (Anti)Estrogen

Molecules, BioTechniques, Vol.9, No.4, pp.450 - 459(1990)

7) E.M. Thurman, R.L. Malcolm; Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances, Environmental Science & Technology, Vol.15, No.4, pp.463-466, (1981)

8) 鈴木、内海、バイオアッセイ 水環境のリスク管理、講談社サイエンティフィック、1998

9) 米林甲陽、フミン物質の分離とキャラクタリゼーション、水環境学会誌、Vol.18, No.4, pp.7-10, 1995

10) 横田崇、新井賢一、遺伝子導入と発現・解析法、羊土社 (1997)

11) 堀尾武一、山下仁平、蛋白質・酵素の基礎実験、南江堂 (1981)

12) 日本生化学会編、新生化学実験講座(II)、タンパク質、東京化学同人、(1990)

13) A.Soto: The E-SCREEN Assays as tool to Identify Estrogens: An update on Estrogenic Environmental Pollutants, Environmental Health Perspectives, Vol.103, (Supplement 7), pp.113 - 122, (1995)

14) 植田洋行、京都大学修士論文、1999

15) Alan E. Wakeling and Lean Bowler, ICI182,780, A New Antiestrogen with Clinical Potential, J.Steroid Biochem.Molec.Biol., Vol.43, No.1-3, pp.173-177, 1992

16) 筒木潔、フミン物質（腐食物質）の生体機構とその性質、水環境学会誌、Vol.18, No.4, pp.2-6, 1995

17) 建設省河川局、水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果（前期調査）、(1998)

5.3 蛍光偏光度法による外因性内分泌攪乱物質のエストロゲン受容体結合性の測定及び構造活性相関評価

国立公衆衛生院 相澤貴子 胡建英 守田康彦 増田修一 浅見真理 国包章一

1. はじめに

生物作用を予測するモデル、即ち構造活性相関 (QSAR) は数多くの化学物質の中から内分泌攪乱作用を有する可能性があり、さらに実験スクリーニング法で調べる必要のある化学物質を選出する際に活用することがEPA「内分泌攪乱化学物質のスクリーニングと試験法」に関する諮問委員会で勧告されている¹⁾。QSAR法は実験時間や費用が軽減できること、作用メカニズムの解明に有用な情報を提供できること、実験手法で得られるデータに比べて整合性が高いことなどの利点がある。しかし、化学物質の内分泌攪乱作用のすべてのメカニズムは明らかにされておらず、モデル化するのに必要な実験データが少ないことから、既存の QSAR モデルは予測ができる物質の数が少ない欠点が指摘されている。

内分泌攪乱作用を予測する既存の QSAR 法は受容体との結合性を予測しているのが殆どである。代表的なモデルを大きく分けると、比較分子力場分析 (CoMFA) と分子の量子力学的な特性にそれぞれ基づく二種類の三次元構造活性相関法 (3D-QSAR) がある。前者はフェノール類、農薬類、DDT 類、PCB 類、植物性類、DES 類およびステロイド類などのエストロゲンおよびアントロゲン受容体との結合性を予測した結果、DDT、DDE などの物質の予測値と測定値はよく一致しているが、ビスフェノール、オクチルフェノールなどの一部のフェノール類物質については適用できていない²⁾。後者ではハロゲン芳香族類の Ah 受容体との結合性および PCB 類のエストロゲン受容体との結合性を予測できると報告されているが³⁾、フェノール類等その他の化合物に関する結果が得られていない。

本研究では、蛍光偏光度を用いたエストロゲン受容体結合アッセイにより、化学物質の結合活性の測定法について検討し、物性パラメータを用いてフェノール類のエストロゲン結合活性を予測するモデルの構築を試みた。

2. 実験方法

2.1 対象物質

本実験で取り扱った対象物質は5種類のプチルフェノール構造異性体、ノニルフェノールを始めとする4種類のその他のアルキルフェノール、ビスフェノールAを始めとする5種類のヒドロキシビフェニルの計14種類のフェノール類である。比較のために1種類の合成エストロゲンDESと4種類のステロイドも検討に加えた。DMSOで10~1mMの対象化学物質の標準溶液を調製し、実験に供した。

2.2 対象物質のエストロゲンレセプター結合性の測定

2.2.1 蛍光偏光度法に基づく受容体結合アッセイの原理

受容体結合アッセイは転写活性化アッセイと結合アッセイがあるが、本研究では精製した組み換えヒトERに結合した高親和性蛍光リガンド(FES1)がテスト化学物質によって置換されるのを、蛍光偏光を用いて測定する方法である。その原理は図-5-3-1に示した。エストロゲン受容体(ER)は蛍光エストロゲン(FES1)と複合体を形成し、高い蛍光偏光度を示す。テスト物質(EDC)を加えて行くと、蛍光エストロゲン物質との競合反応が起こり、蛍光偏光度が変化する。蛍光偏光度とテスト物質の添加濃度との関係から化学物質のエストロゲン受容体との結合活性を計る方法である。対象物質のER結合性はER結合ESの50%置換する競合化学物質のモル濃度(EC50)で表した。

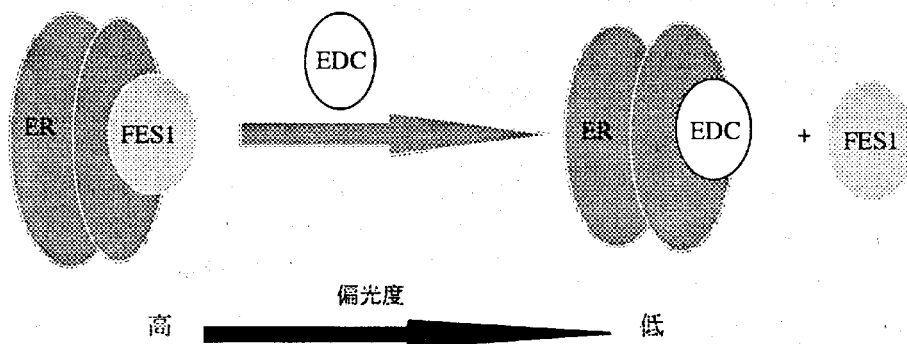


図-5-3-1 蛍光偏光度法に基づく受容体結合アッセイの原理図

ER : エストロゲン受容体 ; FES1 : 蛍光エストロゲン物質 ;

EDC : テスト物質

2.2.2 実験条件

ER結合アッセイはEDC Assay Kit (宝酒造社製)を用いた。蛍光偏光度の測定は、蛍光偏光度測定システムFull-Range Beacon 2000 (PanVera社製)で、360nmの励起波長と530nmの蛍光波長を用いて測定を行った。

48 μ lの10mMスクリーニング緩衝液の中に2 μ lのDMSO標準試料を加え、エストロゲン受容体と蛍光エストロゲン物質との複合体を50 μ l添加して、室温で競合反応をさせた。1時間置いた後、反応系の蛍光偏光度を測定し、蛍光偏光度と化学物質添加濃度との関係から、各対象物質のエストロゲン受容体との結合活性を測定した。

2.3 用いたパラメータ

対象化学物質の最高被占分子軌道エネルギー(ϵ_{HOMO})と最低空分子軌道エネルギー(ϵ_{LUMO})は半経験分子軌道法に基づくCAGe(CAGe Scientific社製)計算ソフトで計算した。同ソフトにより $0.01e/\text{\AA}^3$ の確率密度値における等電子密度面の分子体積(Vm)を計算し、分子サイズ指標とした。オクタノール/水分配係数(logPow)はACD/logPow (Advanced Chemistry Development Inc.)で計算した。

3. 結果及び考察

エストロゲン受容体の結晶構造解析結果から、ステロイドとエストロゲン受容体の作用は水素結合、疎水性と立体相互作用が考えられる。本研究では、分子間の水素結合を行う際にプロトンの授受能力を表す ϵ_{HOMO} または ϵ_{LUMO} 、疎水性パラメータの $\log\text{Pow}$ 及び立体相互作用に影響するパラメータである分子サイズを用いて、対象物質のエストロゲンレセプター結合活性との相関関係を求めた。表-5-3-1には19種類の物理化学特性と本実験で測定した結合活性値を示した。

3.1 各対象物質の受容体との結合活性

例として図-5-3-2に5種類のフェノール類の競合結合曲線を示した。ノニルフェノールの結合活性が一番高いのに対して、フェノールの結合活性が一番低い。比較するために、図-5-3-3にステロイド類の競合曲線を示した。DESの結合活性が最も高く、フェノールの約 $1/1.5 \times 10^7$ となっている。

合成化学物質以外に市販フミン酸の受容体アッセイも行い、その結果を図-5-3-4に示した。図から求めた結果、フミンの EC_{50} は $189 \mu\text{g/l}$ と高い活性を示した。一般的にフミン分子上に多数のヒドロキシ等官能基を有することが報告されており、受容体と結合する可能性があると考えられる。しかし、受容体の穴の大きさは $17\beta\text{-estradiol}$ の体積の約2倍であるとされており、分子量が大きいフミン成分は原理的に受容体との結合が難しいと想像できる。即ち、図-5-3-4はフミン酸の受容体結合活性を表しているとするれば、分子体積が受容体の穴より小さいフミン酸成分によるものと推定することができる。その他の理由として考えられるのは、フミ

表-5-3-1 19種類化学物質の物理化学特性とエストロゲン受容体結合活性値

	化学物質	$\log\text{Pow}$	ϵ_{HOMO} (eV)	ϵ_{LUMO} (eV)	V_m \AA^3	EC_{50}^* (nM)
1	4-n-nonylphenol	6.19	-8.942	0.320	167.90	9505
2	4-tert-octyl-phenol	5.66	-8.990	0.349	155.35	14100
3	4,4'-biphenyldiol	2.42	-8.441	-0.31	112.88	106414
4	bisphenol A	3.43	-8.972	0.272	149.19	110300
5	4-hydroxybiphenol	3.20	-8.640	-0.336	108.89	426700
6	4-sec-butylphenol	3.35	-8.980	0.333	106.93	581700
7	3-hydroxybiphenol	3.23	-8.911	-0.408	108.96	619600
8	2-hydroxybiphenol	2.94	-8.808	-0.46	108.91	996900
9	4-tert-butylphenol	3.17	-8.997	0.347	106.66	1013000
10	2-sec-butylphenol	3.35	-9.047	0.293	106.94	1382000
11	4-ethyl-phenol	2.47	-8.926	0.334	82.23	1700000
12	3-tert-butylphenol	3.17	-9.093	0.314	106.83	2285000
13	2-tert-butylphenol	3.17	-9.094	0.314	106.80	2362000
14	phenol	1.48	-9.176	0.291	58.97	95000000
15	diethylstilbestrol	7.03	-8.653	-0.027	178.01	6.3
16	$17\beta\text{-estradiol}$	4.13	-8.900	0.339	186.53	23.0
17	estriol	2.94	-8.931	0.308	190.24	49.7
18	estrone	3.69	-9.005	0.237	181.52	330.9
19	$5\alpha\text{-dihydro-testosterone}$	3.75	-10.43	0.874	198.53	126000.0

*本実験での実測値

ン酸によりエストロゲン受容体が蛍光エストロゲン物質を変性させたことや、フミン酸が蛍光エストロゲン物質との結合により、見かけのサイズが変化したことなどがあげられる。

3.2 14種類のフェノール類のエストロゲン受容体結合活性の構造活性相関(QSAR)

14種類のフェノール類を対象とする場合、logEC50と表-5-3-1に示した4つのパラメータとの回帰分析を行った結果、式(1)に示したようにlogEC50は ϵ_{HOMO} 、 V_m との間に良い相関が得られた。

$$\log EC50 = -1.46 \epsilon_{\text{HOMO}} - 0.032 V_m - 3.64 \quad (1)$$

$$r^2 = 0.95 \quad n = 14 \quad s = 0.248$$

比較するためにステロイド等を含む19種類化学物質を対象として、同様な回帰分析を行った結果、フェノール類と類似した式(2)のような相関関係が得られた。

$$\log EC50 = -2.22 \epsilon_{\text{HOMO}} - 0.046 V_m - 9.01 \quad (2)$$

$$r^2 = 0.92 \quad n = 19 \quad s = 0.602$$

式(1)と(2)から、物質の ϵ_{HOMO} と V_m が高いほど、エストロゲンレセプターとの結合性が強いことが分かる。本研究で扱う物質のエストロゲンレセプターとの結合は立体相互作用と化学物質を水素受容体とする水素結合によるものが明らかである。

図-5-3-5には式(1)と(2)に基づいて予測したEC50活性値と測定値との関係を示した。図から物理化学的な特性に基づき活性評価を行う際には、フェノールを一つのグループとして扱った方が予測精度が高いことが分かる。

4. 結論

- (1) ϵ_{HOMO} と V_m をパラメータとして求めた式(1)を用いてフェノール類物質のエストロゲン結合活性を精度よく予測できることが明らかになった。今後、上記予測モデルを用いて、環境中から検出されるその他のフェノール類の結合活性を予測して行く予定である。
- (2)蛍光偏光度法によるエストロゲン結合アッセイ法を用いた場合、フミン質のDose-responseからフミンが高い結合活性を示したように見えたが、エストロゲン受容体と競合結合によるかどうかについて結論を出すのは現在のところで根拠がなく、その他のアッセイ方法と併せて考える必要がある。本法を用いて環境水中の微量化学物質のエストロゲン受容体結合性を評価することを目的とする場合に、フミン質を除く前処理法の検討が必要とされている。

参考文献：

- 1) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC), Final Report, Chapter 4, p23, 27, August, 1998.
- 2) Chris L. Waller et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 1240-1248, 1996.
- 3) S.P. Bradbury et al., *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.17, No.1, p15-25, 1998.

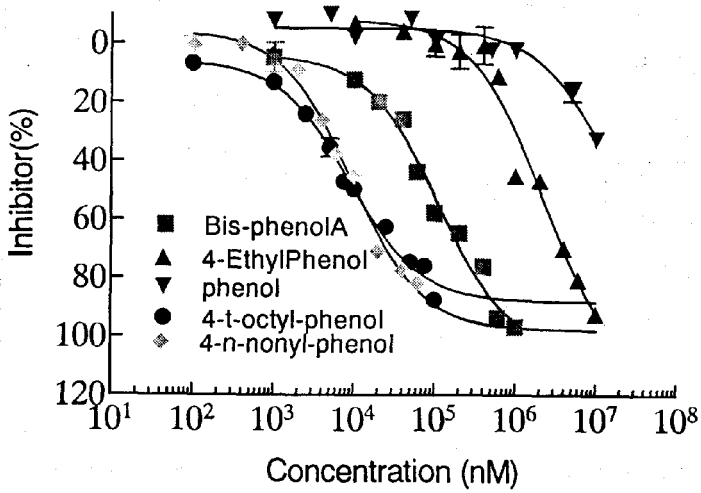


図-5-3-2 5種類のフェノールの競合結合曲線

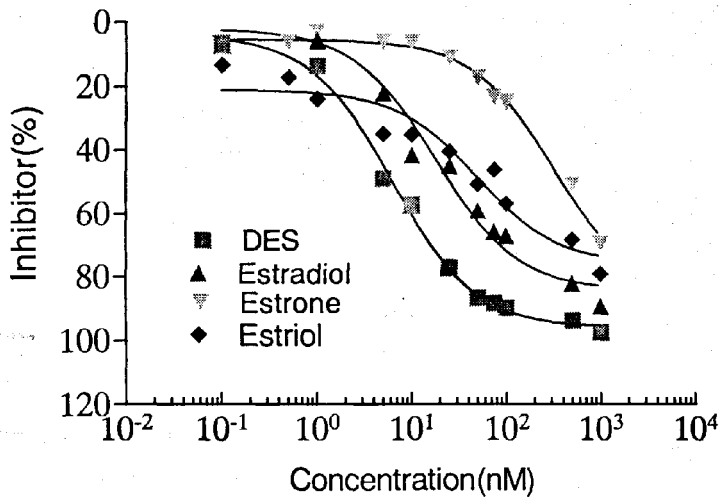


図-5-3-3 3種類のステロイド、DESの競合結合曲線

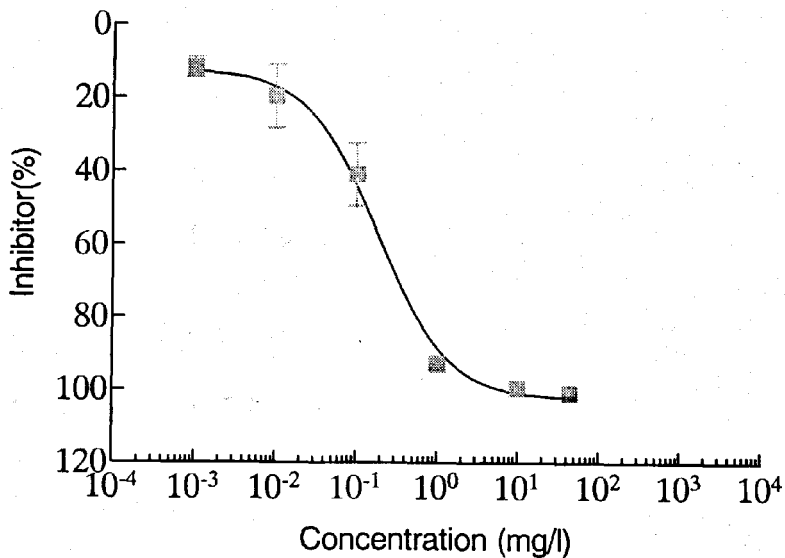


図-5-3-4 市販フミン酸の競合結合曲線

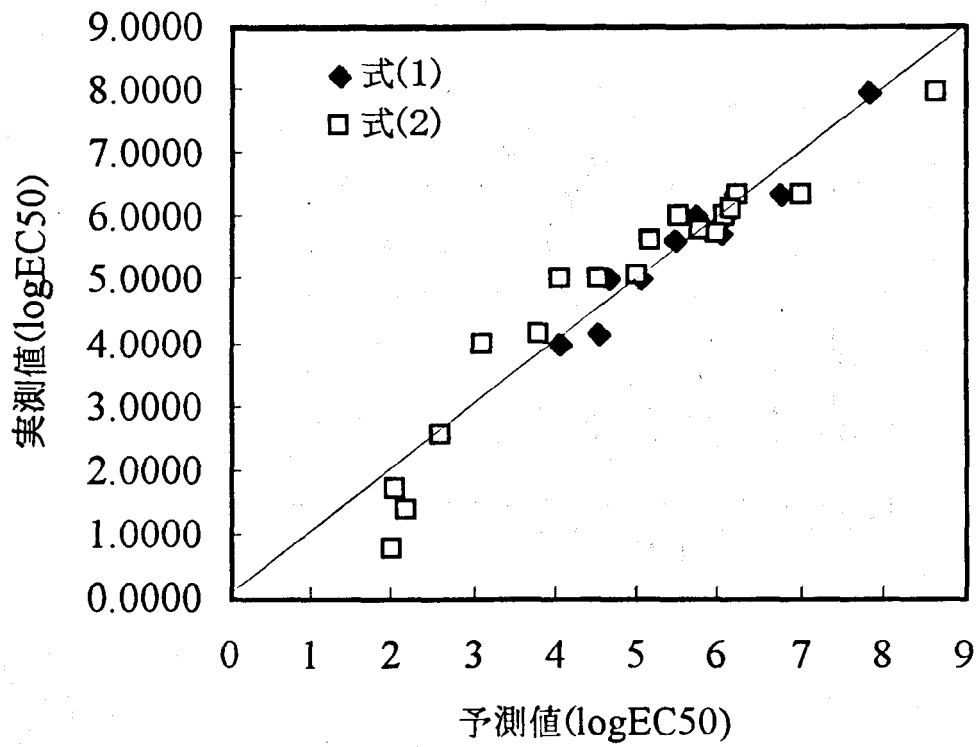


図-5-3-5 logEC50の実測値と予測値との関係図