

ク質あたりの発光量を求めるために、BCA法により細胞溶解液中のタンパク質量を求めた。試薬と反応させた後、562nmの吸光度を吸光度計により測定するものである。Lowry法は細胞溶解液中に界面活性剤が含まれているので用いられない。

標準タンパク質としてウシ血清アルブミン（BSA, Bovine Serum Albumin、和光純薬）を用いて検量線を作成し、濃度を定量した。

#### 4) エストロジェン様作用の強度の表示法

上の測定までで、単位タンパク質あたりの発光量が求められるが、播種細胞数、細胞の状態等、様々な要因により変動があるのが実際である。試験間の誤差要因を除くため、Sotoらの方法を参考に<sup>13)</sup>同一プレートに添加した17βエストラジオールを標準物質として、以下の式より酵素活性相対値(%)を求めた。

$$\text{酵素活性相対値(\%)} = \frac{L_E - L_C}{L_E - L_C} \times 100$$

$L_E$  :  $1.0 \times 10^{-9}\text{M}$ における17βエストラジオールの単位タンパク質あたりの発光量

$L_C$  : DCC培養液のみときの単位タンパク質あたりの発光量

$L$  : 試験物質の単位タンパク質あたりの発光量

なおここで相対値の算出に $L$ として $1.0 \times 10^{-9}\text{M}$ における17βエストラジオールの単位タンパク質あたりの値を用いているのは、この濃度で反応が最大に達するためである(図-5.23参照)。

#### 5) 最大活性濃度に対する17βエストラジオール( $E_2$ )濃度値

ある試験物質

の酵素活性相対値がほぼ最大値に達するときの投与濃度を $C$ として、以下の式により最大活性濃度に対する17βエストラジオール( $E_1$ )濃度値を求める。この式において $C$ は酵素活性が最大となる $E_2$ の最少濃度(すなわち $1.0 \times 10^{-9}\text{M}$ )である。

$$\text{最大活性濃度に対する } E_2 \text{ 濃度値} = C / C$$

酵素活性相対値と最大活性濃度に対する $E_1$ 濃度値を掛け合わせることで17βエストラジオールに対する作用強度(17βエストラジオールを1としたときの試験物質のエストロジェン様作用の強度)を求めることができ、これを用いて試験物質間の強弱比較を行う。

#### 6) 試薬フミン酸に関する実験

第一段階として試薬フミン酸(和光純薬)を用いてMVLNアッセイを行った。この試薬フミン酸は、石灰化度の低い泥炭、亜炭などの若年炭類に含まれているアルカリ可溶の不定形高分子有機酸であり、硝酸処理は行われていない。

試薬フミン酸3.0gを20mMの水酸化ナトリウム溶液1Lに一晩攪拌して溶解し、1Nの塩酸でpH7.3に調整後、不溶成分をグラスファイバーフィルター(ADVANTEC、GS25)で濾別して、試薬フミン酸溶液とした。この溶液のTOCは1200mg/Lであった。

塩素処理を行う場合には、次亜塩素酸ナトリウム溶液（和光純薬）を蒸留水で希釈して添加した。密栓後20℃の暗所で72時間反応させた。pHコントロールの目的から塩素処理実験に通常加えられるリン酸緩衝液はMVLN細胞に対して毒性を示すので、本実験では添加しなかった。残留塩素は消去せず、そのままMVLN細胞の投与試料とした。培養液中の残留塩素が30mg-Cl/LまではMVLN細胞に影響が無いことを確認している。

## 7) 琵琶湖水に関する実験

自然水として琵琶湖水を用いた。琵琶湖南湖天津市渚公園付近の表流水をポリエチレン製バケツで採水し、ポリエチレン製タンクに入れた。直ちにメンブランフィルター（0.45 μm、Millipore）にて吸引濾過を行った。これを以下の2通り方法（概略のみ示す）で濃縮した<sup>19)</sup>。

### CSP800 樹脂を用いる方法

- ①樹脂のコンディショニング……吸着剤は、三菱化成製のMCIゲルCSP800を日本ウォーターズリミテッドがカートリッジに充填してSep-Pak-Plus(Long)CSP800として販売しているもの（8mm径、20mm長、容積2.0ml）を5個直列に接続して用いた。酢酸エチル、エタノール、蒸留水を用いてコンディショニングを行った。
- ②吸着……濾過水2.0LをCSP800樹脂カートリッジに通液し、吸着させた。
- ③脱離……エタノールを通液し、溶出液1.0mlを採取した。

以上の方法で琵琶湖水2.0Lを1.0mlに濃縮した（濃縮倍率2000倍）。

### XAD7HP 樹脂を用いる方法

- ①XAD7HP樹脂のコンディショニング……オルガノ製のXAD7HP樹脂をカラム（30mm径、95mm長、容積70ml）に充填した。エタノール、蒸留水を用いてコンディショニングを行った。
- ②イオン交換樹脂のコンディショニング……オルガノ製のIR-120B樹脂をカラム（10mm径、80mm長、容積8.0ml）に充填し、3N塩酸→蒸留水→2N水酸化ナトリウム溶液の順に通液した。使用直前に3N塩酸を通液してH<sup>+</sup>型とした。
- ③吸着……濾過水6LをpH2に調整し、XAD7HP樹脂カラム（容量70ml）に17.5ml/minで通液した。
- ④溶出……吸着の終了したカラムに0.1N水酸化ナトリウム溶液約120mlを通液し、吸着成分を脱離させた。
- ⑤再濃縮、脱塩……溶出液をpH2に調整し、XAD7HP樹脂をカラム（10mm径、80mm長、容積8.0ml）に通水し、その後蒸留水で脱塩した。ここに0.1N水酸化ナトリウム溶液10mlを通液し、吸着成分を脱離させた。
- ⑥イオン交換……溶出液10mlを陽イオン交換樹脂に通液してフルボ酸塩、フミン酸塩のH<sup>+</sup>を飽和化し、その後、蒸留水2.0mlを通液して残留物質を回収した。

以上の結果、琵琶湖水6.0Lを12mlに濃縮した（濃縮倍率500倍）。

琵琶湖水を塩素処理する場合には、濾過水に次亜塩素酸ナトリウム溶液（和光純薬）

を蒸留水で希釈して添加した。ここでは初期残留塩素濃度が1.0mg-Cl/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加(注入塩素濃度は1.3mg-Cl/L)し、pHの変化が無いことを確認後、密栓して室温で24時間静置した。24時間後の残留塩素濃度は約0.1mg-Cl/Lであった。

### 8) 試料水の添加

試料水は0.22 μmメンブランフィルターで除菌ろ過しつつMVLN細胞に添加した。pH調整が必要な場合には7.2-7.4程度に調整してから添加した。高濃度で試験をする際は、あらかじめ2倍の濃度で作製した培養液と蒸留水および試料水を適当な濃度で無菌的に混合し、培養液成分の希薄化を防いだ。

## 5. 2. 4 結果と考察

### (1) 試薬フミン酸に関する結果

#### 1) 試薬フミン酸の結果

試薬フミン酸に関する実験結果を図-5.2に示す。培養液中の試薬フミン酸のTOC濃度が5.0mg-TOC/L付近で、ある程度(12%)の作用がみられはじめ、30mg-TOC/L前後で酵素活性相対値はピークを示し、その後は数%に減少している。その強さは最大で17βエストラジオールの26%であった。

いずれの添加濃度においても、細胞溶解液中のタンパク質濃度は200mg/L前後であり、細胞に対する顕著な毒性がみられなかった。すなわち、本実験条件では細胞がダメージを受けることによる発光プロセスへの影響はないものと考えられた。

またレセプターとの反応を阻害するICI182,780<sup>15)</sup>を共存させた結果を表-5.1に示す。試薬フミン酸のエストロジェン様作用(転写活性化効果)の大部分は、レセプターを介したものである。

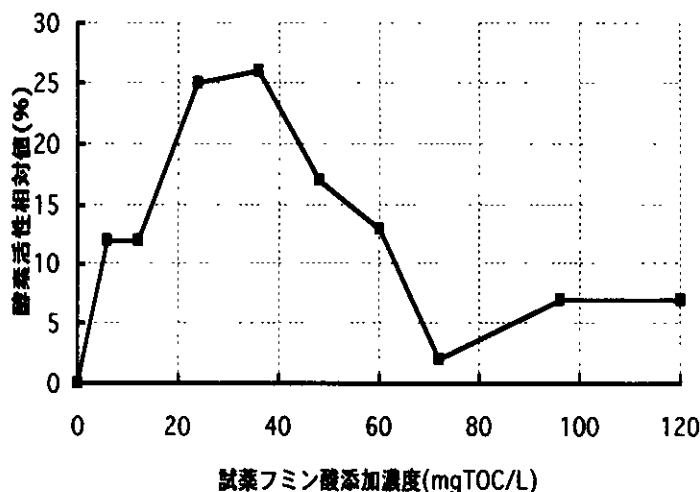


図-5.2 試薬フミン酸のエストロジェン様作用試験

表-5.1 作用メカニズムに関する試験

| 添加試料                      | 単位タンパクあたり増加発光量 |
|---------------------------|----------------|
| 試薬フミン酸(10mg/L)            | 100%           |
| 試薬フミン酸(10mg/L)+ICI182,780 | 28.9%          |
| ICI182,780                | 21.1%          |

#### 2) 試薬フミン塩素処理水の結果

塩素処理した試薬フミン酸溶液のMVLNアッセイを行った結果を図-5.3に示す。残留塩素は2500mg-Cl/L以下ではすべて消費されたが、

3000 および 5000mg-Cl/L の場合はそれぞれ 130 および 510mg-Cl/L であった。培養液中での塩素濃度を、添加 TOC が 60, 120mgTOC/L の場合について下表に示す。残留塩素は 30mg-Cl/L 以上で MVLN 細胞に対して毒性を示し試験結果に影響を与える。この表より試験溶液濃度が 60mg-TOC/L まで残留塩素の影響はなく、試験が行えているものと判断できる。

| 塩素濃度 (mgCl/L)               | 3000 | 5000 |
|-----------------------------|------|------|
| 添加濃度 60mgTOC/L での 培養液中塩素濃度  | 6.5  | 25.5 |
| 添加濃度 120mgTOC/L での 培養液中塩素濃度 | 13   | 51   |

図より、試験溶液の濃度が 60mg-TOC/L のときに各試験溶液とも酵素活性相対値のピークを示し、その後は減少した。

ピーク時の濃度 (60mg-TOC/L)、および 24 mg-TOC/L の場合の塩素濃度と酵素活性相対値の関係を図-5.4 に示す。この図より、塩素濃度 2500mg-Cl/L のときに酵素活性相対値は最も大きくなり、このときの酵素活性相対値は 69% であった。塩素を加えていない試薬フミン酸溶液と比べると、約 2.9 倍酵素活性相対値が大きくなっていることがわかる。TOC と有効塩素濃度で比較すると (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ていることになる。

### 3) 結果の考察

試薬フミン酸には分子量が数百～数万までの分子が含まれている。一般に細胞膜を通過できる分子の大きさは通常 1000 くらいまでであり、実際にどれほどの TOC 量が細胞内に取り込まれているのかは不明である。しかし ICI182,780 を共存させた結果からも、何らかの成分がレセプターと結合しているのは明らかである。エストロゲン様作用を示した理由として以下

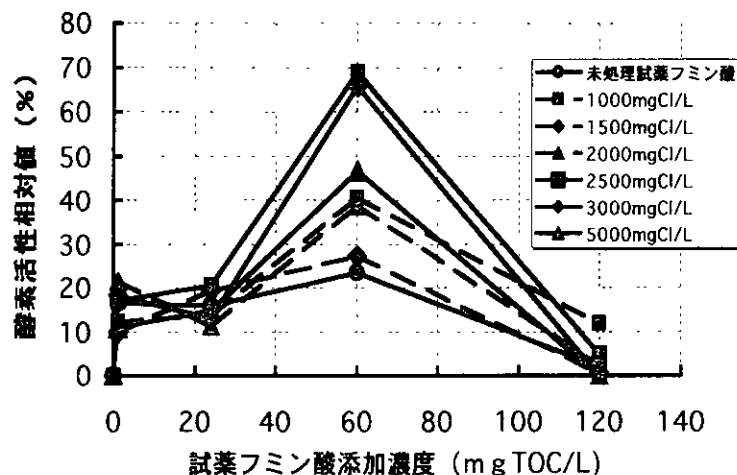


図-5.3 試薬フミン酸の塩素処理によるエストロゲン様作用の変化

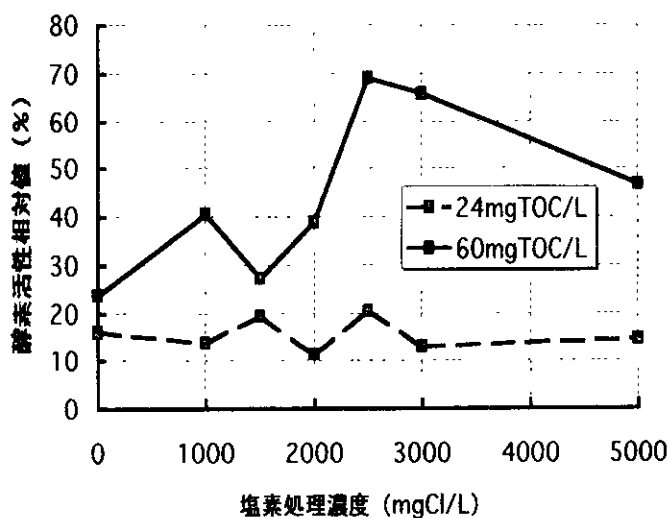


図-5.4 各塩素処理濃度における酵素活性相対値

のことが考えられる。

① TOC としてはわずかな量であるが、試薬フミン酸中の比較的 low 分子（分子量 1000 程度以下）の成分がエストロゲン様作用を示した。

② 試薬フミン酸中の不純物、例えばエストロゲン様作用を示す植物由来のホルモン様物質などが作用を示している。

一方、酵素活性相対値がピークとなる濃度が出現した。一般にホルモン反応は用量-効果関係を示さないことが多いとされるが、今回の試薬フミン酸の試験においても細胞毒性の影響のない 50mg-TOC/L 以上の濃度において酵素活性相対値が減少する現象がみられた。酵素活性に対する阻害効果などが考えられるが、理由については不明点が多い。

また、塩素処理によりエストロゲン様作用が最大で約 3 倍に増加したが、その理由として以下のことが考えられる。

① 塩素化により新たに生成し構造が変化した化合物がエストロゲン様作用を示した。

② 酸化分解により構成分子が低分子化され、細胞膜を通過できる物質が増えた。

③ 構成分子が分解されてフミン酸のキャリアーとしての作用が失われ<sup>16)</sup>、保持されていた微量農薬や金属種等のエストロゲン様作用をもつ化学物質が放出された。

なお主要な塩素処理副生成物であるクロロホルムについて MVLN アッセイを行った。結果を図-5.5 に示すが、エストロゲン様作用はみられなかった。今後このような個別の塩素処理副生成物についての試験を行う必要がある。

#### 4) 試薬フミン酸に関する結果のまとめ

① MVLN アッセイにより、試薬フミン酸にエストロゲン様作用があることを見いだした。

② その作用は、塩素処理により最大で約 2.9 倍に強められた。添加塩素濃度では、(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た。

#### (2) 琵琶湖水に関する結果

##### 1) XAD7HP 樹脂による濃縮琵琶湖水の試験結果

濃縮前後の琵琶湖水の水質データを表-5.2 に示す。容量的には 500 倍に濃縮する操作を行ったが、TOC でみた場合の回収率は約 12% であった。

MVLN アッセイの結果を図-5.6 に示す。横軸は、培養液 1 ml 中に添加した琵琶湖水量を表している。0 ~ 250ml/ml は、TOC では 0 ~ 50mg-TOC/L に

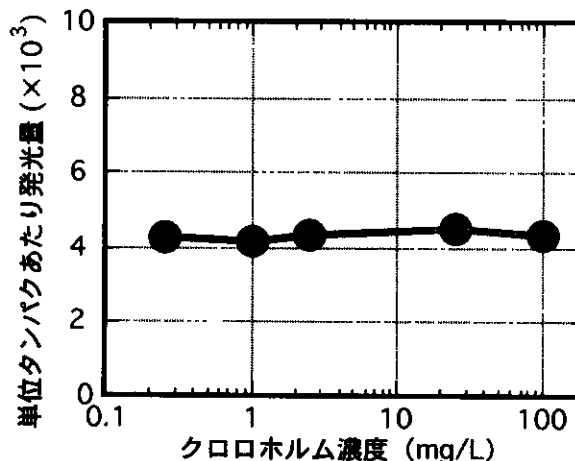


図-5.5 クロロホルムの試験結果

相当する。図より、添加湖水量 50ml/ml- 培養液付近からエストロジェン様作用が検出されていることがわかる。このときの TOC は 10mg-TOC/L であり、これは図-5.2 に示した試薬フミン酸においてエストロジェン様作用が確認されはじめる濃度と大差はない。添加湖水量が 150 ml/ml- 培養液で酵素活性相対値は最大の 32% を示し、それ以降は横這いとなった。

塩素処理によってエストロジェン様作用は強められ、最大で添加湖水量が 250 ml/ml- 培養液のときに酵素活性相対値は 81% であった。塩素処理により最大 3.1 倍、平均 2.3 倍にエストロジェン様作用が強められた。

一方、蒸留水を同様の方法で濃縮し試験したところ、蒸留水添加量 200ml/ml- 培養液まで特にエストロジェン様作用は認められず、容器や樹脂自体の影響はないことを確認した。

## 2) CSP800 樹脂による濃縮琵琶湖水の試験結果

MVLN アッセイの結果を図-5.7 に示す。樹脂からの溶出液はエタノールを溶媒としており、培養液中のエタノール濃度は 0.05% ~ 2.5% である。別に行った実験から、ここで使用した濃度範囲のエタノールによるアッセイへの影響はなかったと考えられた。

図より、エストロジェン様作用は検出されておらず、塩素処理を行ってもエストロジェン様作用は変化しなかった。図-5.6 と比較すると添加湖水量が少ない範囲でなので、さらに試験を行う必要はある。しかし、図-5.6 では塩素処理水の場合、エストロジェン様作用は十分に検出されているため、CSP800 樹脂で濃縮される成分にはエストロジェン様作用はないか極めて弱いものと考えてよ

表-5.2 XAD7HP樹脂による濃縮前後の水質

|     | 試料水   | pH  | TOC (mg/L) | E260 (10mm <sup>-1</sup> ) | TOX (μgC/L) |
|-----|-------|-----|------------|----------------------------|-------------|
| 濃縮前 | 琵琶湖水  | 7.6 | 2.7        | 0.0398                     | 14.5        |
|     | 濾過水   | 7.4 | 1.8        | 0.0191                     | 13.0        |
|     | 塩素処理水 | 7.4 | 2.5        | 0.0159                     | 111         |
| 濃縮後 | 原水    | 5.0 | 107 (11.7) | 2.0 (21)                   | 517 (7.1)   |
|     | 塩素処理水 | 3.4 | 165 (18.2) | 2.0 (21)                   | 4980 (9.0)  |

※括弧の中は回収率を濃縮倍率 (×500) に対する割合 (%) で表示した値

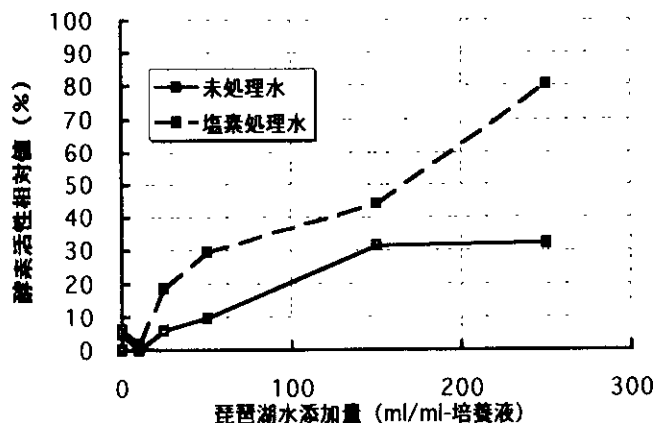


図-5.6 濃縮琵琶湖水の試験結果 (XAD7HP樹脂濃縮法)

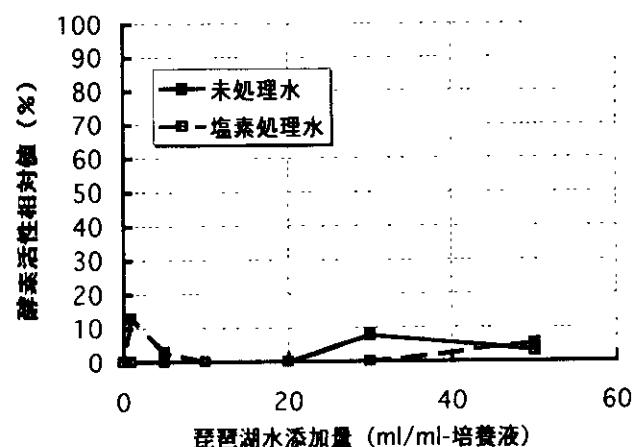


図-5.7 濃縮した琵琶湖水の試験結果 (CSP800樹脂濃縮法)

い。

### 3) 水道水の試験方法に関する考察

CSP800 樹脂は優れた吸着剤であるが極性物質は吸着しにくいという欠点をもつ一方で、XAD7HP 樹脂は吸着性能では CSP800 樹脂に劣るものの弱極性であり極性物質を比較的よく濃縮できる特徴がある。したがって水道原水のエストロジェン様作用の発現には XAD7HP 樹脂で良好に濃縮される成分、すなわち水中フミン物質が寄与している可能性が高いといえる。実際、試薬フミン酸自体にもエストロジェン様作用がみられた。さらに、TOC 濃度で比較した場合、図-5.2 と図-5.6 とはほぼ同程度の作用強度を示していることから、フミン物質そのものにエストロジェン様作用があると推定するのが妥当である。

また琵琶湖水を塩素処理することでエストロジェン様作用が平均 2.3 倍に強められたが、その原因として、以下の可能性が考えられる。

- ①塩素との反応により有機塩素化合物などが生成し、この中にエストロジェン様作用を持つ分子が存在した結果作用が強められた。
- ②有機物の酸化分解および加水分解により構成成分が低分子化し、細胞膜を通過できる分子が増加した結果エストロジェン様作用が強められた。
- ③水中フミン物質との相互作用（錯体形成・吸着・分配・可溶化）で溶存していた微量の金属化学種や難溶性有機化合物（農薬等）が、フミン物質の構造の変化により開放され、エストロジェン様作用を増加させた。

本実験の塩素処理は、(濾過水の TOC 濃度):(注入塩素濃度) = 1.8:1.3  $\approx$  3:2 で行った。しかるに試薬フミン酸に関する実験では、(試薬フミン酸の TOC 濃度):(塩素濃度)  $\approx$  1:2 のとき最も酵素活性相対値が大きくなる結果であった。したがって塩素濃度を高くすることでさらにエストロジェン様作用が強めらる可能性がある。

図-5.4 より、(TOC 濃度):(塩素濃度) = 3:2 のときの試薬フミン酸の塩素処理水の酵素活性相対値は 37.0% であり、試薬フミン酸と比較して約 2.5 倍である。一方、XAD7HP 樹脂濃縮法による塩素処理後の酵素活性相対値の増大割合は平均 2.3 倍であり、両者はほぼ等しいものとなった。これは XAD7HP 樹脂濃縮法にてエストロジェン様作用をもった塩素処理副生成物を有効に濃縮できていることを示すもので、XAD7HP 樹脂による濃縮が水道原水のエストロジェン様作用検出に妥当な方法であるといえる。

図-5.6 より添加水量 50ml/ml- 培養液付近から琵琶湖原水のエストロジェン様作用は検出可能となる。本実験では、XAD7HP 樹脂を用いて 6L  $\rightarrow$  12ml へ濃縮しているが、作用の検出だけを目的とする場合には、1.2L を 100 倍濃縮して 12ml とすればよいことになる。塩素処理水である水道水ではエストロジェン様作用は高められているので、この濃縮倍率で作用の検出が可能である。もちろん最終的に得る濃縮水量をさらに少量にできる濃縮装置を準備すれば、必要水量は 1.2L 以下とすることも可能である。

#### 4) 琵琶湖水に関する結果のまとめ

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ジェ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ことを示した。

②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、エストロジェン様作用は2.3倍に強められた。なお、クロロホルムのエストロジェン様作用は認められなかった。

③水道水のエストロジェン様作用を検出するためには、1.2L程度を100倍以上に濃縮して試料を調製すればよいことを示した。

#### (3) オゾン処理の効果に関する結果

琵琶湖水中に含まれるフミン質（正確にはフミン質に対する濃縮法で濃縮された物質）にエストロジェン様作用が認められる。この作用に対するオゾン処理の効果、およびオゾン促進酸化処理の効果について検討した。促進酸化処理としては、過酸化水素を併用する方法とした。

##### 1) 実験方法

1 L容インピンジャーを使用し、1 Lずつオゾン処理を行った。オゾン注入量約 1.8mg-O<sub>3</sub>/min、オゾン化空気曝気量0.5Nl/min。このときオゾン吸収率約92%。オゾン消費率は、注入オゾン量と排出オゾン量との差から算出した。

過酸化水素を併用する場合は、あらかじめ過酸化水素を40mg/Lとなるように添加した上で、オゾン処理を行った。

これらオゾン処理水に対して、XAD7HP樹脂を用い、先に述べた方法で濃縮を行った。

##### 2) 実験結果

オゾン処理前後の水質、およびオゾン処理の状況について表-5.3に示す。MVLNアッセイの結果を図-5.8, 5.9に示す。オゾン消費率1.7mg-O<sub>3</sub>/Lの場合が図-5.8であるが、琵琶湖水の作用が大きく変化したとは認められない。一方、過酸化水素を共存させた場合では、大きく低減する結果となった。オゾン消費率を増大させた場合(図-5.9)でも同様の結果と解釈しうる。

#### (4) 各個化学物質との比較に関する実験

ここでは水道原水に混入する恐れのある化学物質のエストロジェン様作用について調べるとともに、それらの化学物質と濃縮した琵琶湖水の作用強度とを比較することを目的とする。

##### 1) 対象化学物質について

水道水へのエストロジェン様化学物質の混入の経路として、

表-5.3 オゾン処理状況

| 試水               | オゾン消費率<br>(mg-O <sub>3</sub> /L) | pH  | E <sub>260</sub> | DOC<br>(mg/L) |
|------------------|----------------------------------|-----|------------------|---------------|
| 琵琶湖水<br>ろ水       | —                                | 7.4 | 0.023            | 2.1           |
| オゾン処理水           | 1.7                              | 7.4 | 0.016            | 1.6           |
|                  | 18.2                             | 7.4 | 0.009            | 1.8           |
| オゾン-過酸<br>化水素処理水 | 1.7                              | 7.3 | 0.012            | 1.6           |
|                  | 21.5                             | 7.1 | 0.009            | 1.5           |



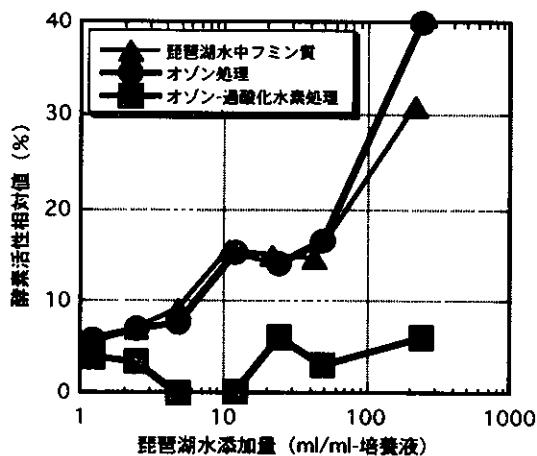


図-5.8 オゾンおよびオゾン-過酸化水素処理の効果  
オゾン消費率1.7mg-O<sub>3</sub>/L

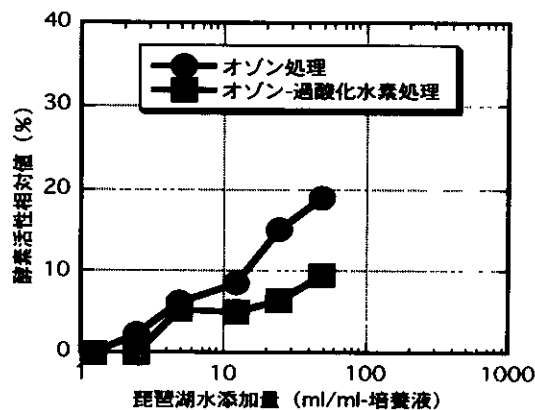


図-5.9 オゾンおよびオゾン-過酸化水素処理の効果  
オゾン消費率 オゾン処理のみ : 18.2mg-O<sub>3</sub>/L  
オゾン-過酸化水素処理 : 21.5mg-O<sub>3</sub>/L

①水道原水に含まれており、浄水処理で除去されず水道水に混入する恐れのある化学物質

②水道施設に用いられる資材や塗装、ライニング剤から溶出し、水道水に混入する化学物質が考えられる。

これらの物質の中から特にエストロゲン様作用の疑われる化学物質 16 種を取り上げ試験することとした。対象とした化学物質 16 種類の性状を表-5.4 に示す。

## 2) 試験結果

対象化学物質は難溶性のものが多いためエタノールに溶解し、0.22 μm メンブレンフィルターで除菌ろ過しつつ MVLN 細胞に添加した。DCC 培養液中のエタノール濃度が 1.0% までは試験結果に影響を与えないことを確認しており、エタノール濃度がす

表-5.4 試験対象化学物質の性状

| 分類         | 物質名              | 分子量    | CAS No.    | 溶解度          | 原水 | 資材 | 主な用途  |
|------------|------------------|--------|------------|--------------|----|----|---|
| フタル酸エステル類  | フタル酸ジ-2-エチルヘキシル  | 390.56 | 117-81-7   | 45 μg/l      | ○  | ○  | プラスチック可塑剤、樹脂原料、接着剤、インキ                          |
|            | フタル酸ジ-n-ブチル      | 278.34 | 84-74-2    | 400mg/l      | ○  | ○  | プラスチック可塑剤、樹脂原料、実験動物で精巣重量の減少、精細管萎縮、精子数減少がみられると報告 |
|            | フタル酸ブチルベンジル      | 312.37 | 85-68-7    | 2.69mg/l     | ○  | ○  | プラスチック可塑剤、樹脂原料、接着剤                              |
| アジピン酸類     | アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル | 370.57 | 103-23-1   | 200mg/l      |    | ○  | 塩ビ樹脂可塑剤、潤滑油、耐寒用可塑剤                              |
|            | フェノール            | 94.11  | 108-95-2   | 67g/l (16°C) |    | ○  | 樹脂原料(フェノール樹脂)                                   |
| アルキルフェノール類 | 4-エチルフェノール       | 122.17 | 123-07-9   |              |    | ○  | 樹脂原料その他   |
|            | 4-オクチルフェノール      | 206.33 | 1806-26-4  | 不溶           | ○  |    | 界面活性剤等の原料、フェノール樹脂の原料                            |
|            | 4-tert-ニルフェノール   | 220.36 |            |              | ○  |    |   |
|            | 4-ニルフェノール        | 220.36 | 25154-52-3 |              | ○  |    | 非イオン系界面活性剤原料、洗剤、ワニスポリスチレンから溶出                   |
|            | p-tert-ブチルフェノール  | 150.22 | 98-54-4    | 水に難溶         | ○  | ○  | 接着剤、樹脂安定剤、生殖毒性なし                                |
|            | 2-sec-ブチルフェノール   | 150.22 | 89-72-5    | 水に難溶         | ○  | ○  | 接着剤、樹脂安定剤、生殖毒性なし                                |
|            | 2-tert-ブチルフェノール  | 150.22 | 88-18-6    | 水に難溶         | ○  | ○  | 接着剤、樹脂安定剤、生殖毒性なし                                |
|            | o-ヒドロキシビフェニル     | 170.21 | 90-43-7    | 水に不溶         |    | ○  | ゴム原料  |
|            | ビスフェノール A        | 228.29 | 80-05-7    | 不溶           | ○  | ○  | 塗料 接着剤原料、エポキシ樹脂 ポリカーボネート樹脂原料、PC 樹脂原料、生物分解される。   |
|            | エピクロロヒドリン        | 92.5   | 106-89-8   | 60g/L        |    | ○  | エポキシ樹脂原料<br>微生物による分解半減期は2週間以内とされる               |
| 人畜由来ホルモン   | 17β エストラジオール     | 272.39 | 50-28-2    | 不溶           | ○  |    | 人畜由来ホルモン  |

べて1.0%以下の範囲で実験を行った。

MVLNアッセイの結果を以下に順次示す。当該物質が最大活性を与えるときの濃度に対するE濃度値については、重量濃度で比較した場合とモル濃度で比較した場合について求めた。またそれぞれの試験は、ICI182,780を共存させた場合についても行っており、レセプターを介してエストロゲン様作用を発現しているといえることを確認した。

①フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (図-5.10)

検出されたのは非常に弱い作用であるが、繰り返し実験を行い、誤差ではないことを確認した。実験した濃度の範囲では細胞毒性はみられなかった。

|                | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|----------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)    | 12                   | 12                   |
| 最大活性濃度に対するE濃度値 | $2.7 \times 10^{-6}$ | $4.0 \times 10^{-6}$ |

②フタル酸ジ-n-ブチル (図-5.11)

エストロゲン様作用は認められなかった。 $1.1 \times 10^{-2}$ g/L以上の濃度では細胞は死滅こそしなかったものの回収されたタンパク質量が非常に少なく、細胞毒性を示していた。

③フタル酸ブチルベンジル (図-5.12)

実験した濃度の範囲では細胞毒性はみられなかった。

|                | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|----------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)    | 65                   | 65                   |
| 最大活性濃度に対するE濃度値 | $4.8 \times 10^{-1}$ | $5.6 \times 10^{-1}$ |

④アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (図-5.13)

弱いエストロゲン様作用が検出されているが、10%程度の酵素活性相対値は信頼性が低い。 $9.3 \times 10^{-2}$ g/L以上の濃度では細胞毒性により細胞は死滅した。

|                | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|----------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)    | 12                   | 12                   |
| 最大活性濃度に対するE濃度値 | $2.9 \times 10^{-5}$ | $4.0 \times 10^{-5}$ |

⑤フェノール

酵素活性相対値がプラスとなる発光量はみられなかった。 $5.0 \times 10^{-3}$ g/L以上では細胞毒性を示した。ただし培養液中のフェノール濃度が上昇するにつれて発光量は増大しており、目立った細胞毒性はみられないことから、RNA転写活性化～発光量の定量までいずれかの段階で何らかの妨害作用があった可能性がある。すなわちフェノールはエストロゲン様作用を示さないか、もしくはエストロゲン様作用を持つものの本試験法では検出できなかったといえる。

⑥4-エチルフェノール (図-5.14)

$5.0 \times 10^{-1}$ g/Lでは細胞は死滅しており、細胞毒性を示していた。

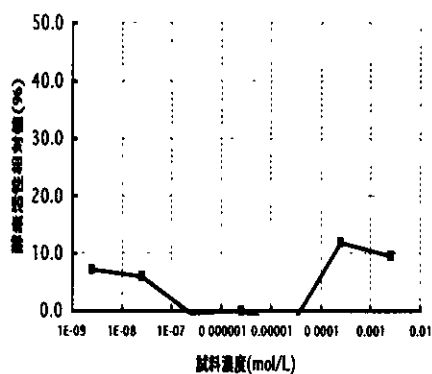


図-5.10 フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの試験結果

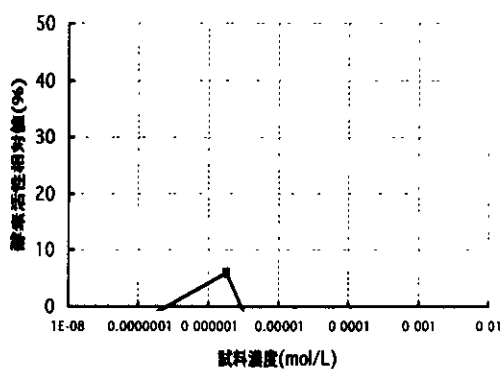


図-5.11 フタル酸ジ- $\gamma$ -フェニルの試験結果

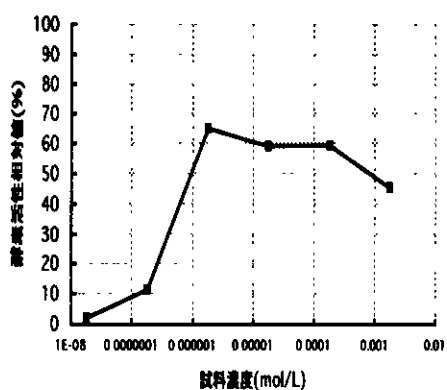


図-5.12 フタル酸ジ- $\gamma$ -ベンジルの試験結果

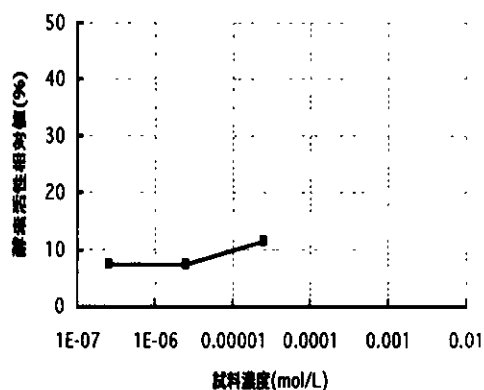


図-5.13 アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの試験結果

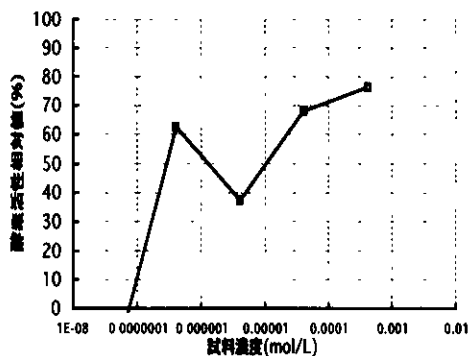


図-5.14 4-エチルフェノールの試験結果

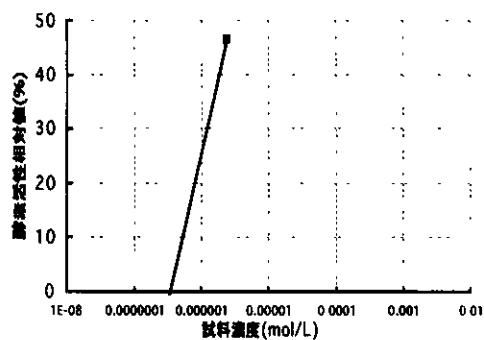


図-5.15 4-オクチルフェノールの試験結果

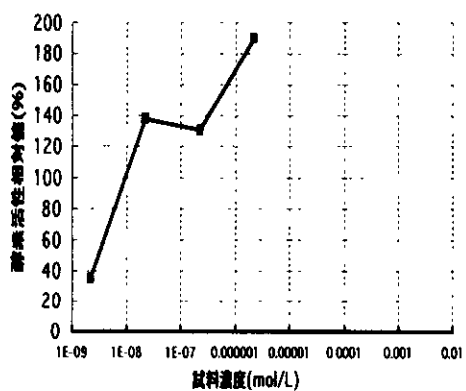


図-5.16 4-ニトロフェノールの試験結果

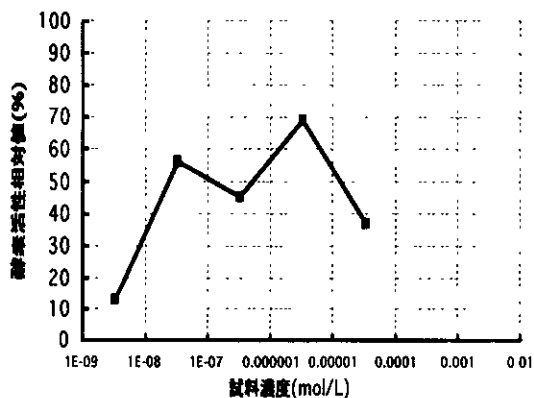


図-5.17 p-t-チルフェノールの試験結果

|                               | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)                   | 63                   | 63                   |
| 最大活性濃度に対する E <sub>2</sub> 濃度値 | $5.4 \times 10^{-3}$ | $2.4 \times 10^{-3}$ |

⑦ 4- オクチルフェノール (図-5.15)

$5.0 \times 10^{-1}$ g/L以上では細胞は死滅しており、細胞毒性となっていた。

|                               | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)                   | 47                   | 47                   |
| 最大活性濃度に対する E <sub>2</sub> 濃度値 | $5.4 \times 10^{-1}$ | $4.2 \times 10^{-1}$ |

⑧ 4- ノニルフェノール (図-5.16)

強いエストロゲン様作用を検出した。 $5.0 \times 10^{-5}$ g/L以上では細胞は死滅した。

|                               | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)                   | 140                  | 140                  |
| 最大活性濃度に対する E <sub>2</sub> 濃度値 | $5.6 \times 10^{-2}$ | $4.5 \times 10^{-2}$ |

⑨ 4-n- ノニルフェノール

酵素活性相対値がプラスとなる発光量はみられなかった。 $5.0 \times 10^{-3}$ g/L以上の濃度では細胞は死滅した。ただし濃度に応じて発光量は増加しており、細胞毒性が特に強いいため本来のエストロゲン活性が検出できなかった可能性が考えられる。また類似の構造の4- ノニルフェノールが非常に強いエストロゲン様作用を有していることより、4-n- ノニルフェノールにはエストロゲン様作用を発現する性質が無い、もしくは細胞毒性が強くエストロゲン様作用を検出できない物質であるといえる。

⑩ p-t- プチルフェノール (図-5.17)

$5.0 \times 10^{-2}$ g/L以上では細胞は死滅しており、細胞毒性を示した。

|                               | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)                   | 56                   | 56                   |
| 最大活性濃度に対する E <sub>2</sub> 濃度値 | $5.4 \times 10^{-2}$ | $3.0 \times 10^{-2}$ |

⑪ 2-sec- プチルフェノール (図-5.18)

$7.8 \times 10^{-6}$ g/L以上では細胞は死滅しており、細胞毒性を示した。

|                               | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)                   | 19                   | 19                   |
| 最大活性濃度に対する E <sub>2</sub> 濃度値 | $3.5 \times 10^{-2}$ | $1.9 \times 10^{-2}$ |

⑫ 2-tert- プチルフェノール (図-5.19)

$7.8 \times 10^{-4}$ g/L以上では細胞は死滅しており、細胞毒性を示した。

|                               | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)                   | 19                   | 19                   |
| 最大活性濃度に対する E <sub>2</sub> 濃度値 | $3.5 \times 10^{-1}$ | $1.9 \times 10^{-1}$ |

⑬ o- ヒドロキシジフェニル (図-5.20)

$5.0 \times 10^{-3}$ g/L以上の濃度では細胞は死滅しており、細胞毒性を示した。

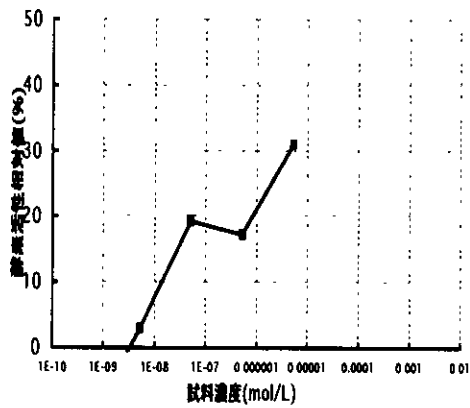


図-5.18 2-sec-ブチルフェノール試験結果

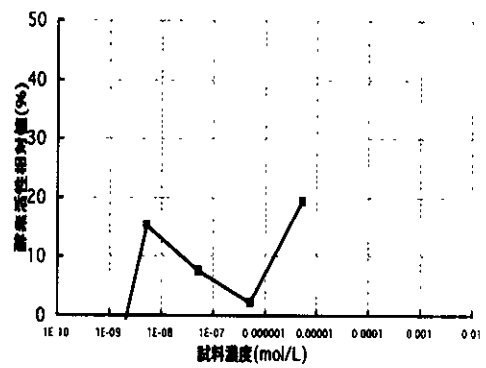


図-5.19 2-tert-ブチルフェノール試験結果

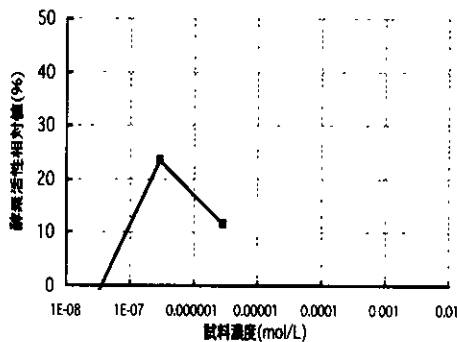


図-5.20 o-ヒドロキシジフェニルの試験結果

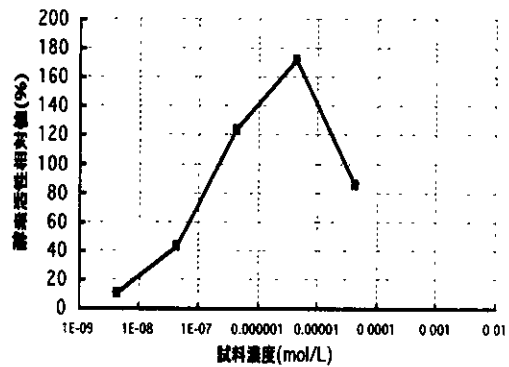


図-5.21 ビスフェノールAの試験結果

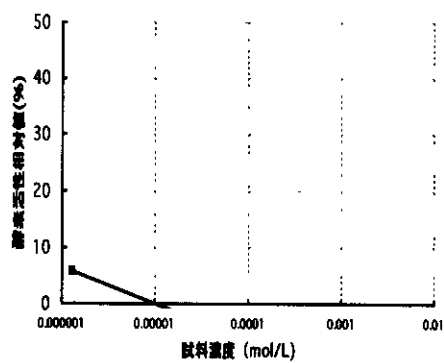


図-5.22 エピクロヒドリンの試験結果

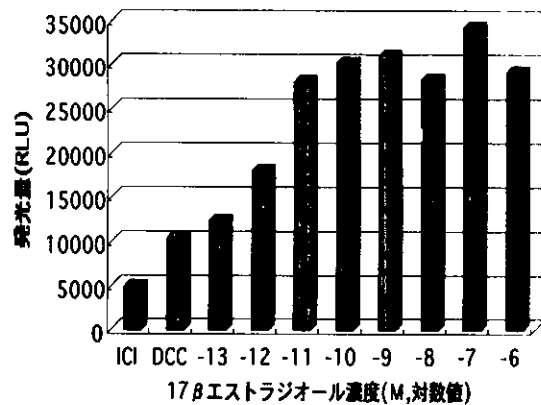


図-5.23 17βエストラジオールの濃度と発光量の関係

|                               | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)                   | 23                   | 23                   |
| 最大活性濃度に対する E <sub>2</sub> 濃度値 | $5.4 \times 10^{-3}$ | $3.4 \times 10^{-3}$ |

⑭ビスフェノールA (図-5.21)

強いエストロゲン様作用を検出した。いずれの濃度においても細胞毒性は観察されなかった。

|                               | 重量濃度基準               | モル濃度基準               |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| 酵素活性相対値 (%)                   | 120                  | 120                  |
| 最大活性濃度に対する E <sub>2</sub> 濃度値 | $2.7 \times 10^{-3}$ | $2.3 \times 10^{-3}$ |

⑮エピクロロヒドリン (図-5.22)

エストロゲン様作用は検出されなかった。1.2 × 10<sup>-1</sup>g/L以上の濃度では細胞は死滅しており、細胞毒性を示した。

⑯17βエストラジオール (図-5.23)

DCC培養液中、およびICIを添加した場合とともに示す。1.0 × 10<sup>-9</sup>M付近で発光量は飽和に達し、その後は定常状態を保ちながら徐々に減少することがわかる。このときの濃度を重量で表示すると、2.7 × 10<sup>-7</sup>g/Lとなる。

⑰試薬フミン酸

図-5.2, 5.3の結果より、酵素活性相対値および最大活性濃度に対するE<sub>2</sub>濃度値を計算した。

|                              | 重量濃度基準(フミン酸)           | 重量濃度基準(塩素処理水)          |
|------------------------------|------------------------|------------------------|
| 酵素活性相対値 (%)                  | 26                     | 69                     |
| 最大活性濃度に対するE <sub>2</sub> 濃度値 | 9.1 × 10 <sup>-6</sup> | 4.5 × 10 <sup>-6</sup> |

⑱琵琶湖水中フミン物質 (XAD7HP樹脂により濃縮)

図-5.6の結果より、酵素活性相対値および最大活性濃度に対するE<sub>2</sub>濃度値を計算した。

|                              | 重量濃度基準(フミン物質)          | 重量濃度基準(塩素処理水)          |
|------------------------------|------------------------|------------------------|
| 酵素活性相対値 (%)                  | 32                     | 81                     |
| 最大活性濃度に対するE <sub>2</sub> 濃度値 | 1.8 × 10 <sup>-6</sup> | 1.1 × 10 <sup>-6</sup> |

3) 試験結果の評価

最大活性濃度に対するE<sub>2</sub>濃度値を横軸に、酵素活性相対値を縦軸にとり、試験結果をプロットしたものを図-5.24に示す。なお横軸は重量基準の数値を用いている。

4-ノニルフェノールやビスフェノールAといった、内分泌攪乱作用の原因であると報告されている化学物質が17βエストラジオールの近くに位置している。それに対して、試薬フミン酸、水中フミン物質およびこれらの塩素処理水は、図の左下部分に位置し、エストロゲン様作用は相対的に弱いことがわかる。

つぎに、

作用強度 = (酵素活性相対値) × (最大活性濃度に対するE<sub>2</sub>濃度値) …… (1)  
 により各化学物質の作用強度を算出した。作用強度とは17βエストラジオールを1としたときの当該物質のエストロゲン様作用の強度を表している。この数値と全国の環境水中における検出濃度<sup>1)</sup>を掛け合わせ、相対的重要度を求めた (式2)。

$$\text{相対的重要度} = (\text{作用強度}) \times (\text{水中検出濃度}) \dots\dots (2)$$

調査例として、建設省河川局による『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年10月)をとりあげている。

ここで水中濃度の不明な化学物質については相対的重要度を算出せず、琵琶湖水中有機物に関しては水中濃度を1.8mg-TOC/Lとした。また琵琶湖南湖および北湖における濃度データのあるものについてはその算出結果も併記した。なお検出下限値以上、

定量下限値未満を示すtrについては検出下限値の数値を計算に用いた。結果を表-5.5および図-5.25に示す。

図より、琵琶湖水中有機物およびその塩素処理水の相対的重要度が、一般に他の化学物質よりも大きいことがわかる。琵琶湖においては値がこれを越えているのは4-ノ

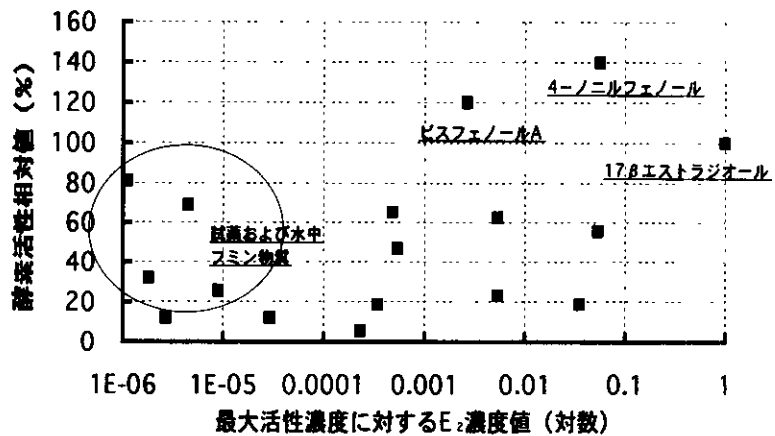


図-5.24 各化学物質の最大活性濃度に対するE<sub>2</sub>濃度値と酵素活性相対値との関係

ニルフェノールのみである。これはすなわち、XAD7HP樹脂で濃縮されたフミン物質を主体とする物質群が、水道原水中のエストロジェン様作用の主要な成分であることを示している。その作用は塩素処理によって2.3倍程度に高まることはすでに示した。

また、17βエストラジオールも琵琶湖水中有機物およびその塩素処理水とオーダーが同じであるといえる。このように、今後着目すべき物質として、4-ノニルフェノールおよび17βエストラジオールとを指摘することができる。

実験上の課題としては、XAD7HP樹脂で濃縮されエストロジェン様作用を示した物質群の中にこれら2物質がどの程度寄与しているかを調査する必要がある。

また、水道資材からの化学物質の溶出についてのデータを得、同様な相対的重要度の評価をする必要がある。しかし、ここで示した結果から、水道資材からの溶出化学物質よりは、水道原水由来あるいは消毒副生成物によるエストロジェン様作用の方が圧倒的に強いと推測してもよいものと思われる。

エストロジェン様作用が強いかかわらず水中の測定値が無く相対的重要度が不

表-5.5 水中での相対的重要度の評価

| 化合物名                         | 最大活性濃度に対するE <sub>2</sub> 濃度値 <sup>a)</sup> (重量) | 酵素活性相対値 | 作用強度                | 水中濃度例(μg/L)         | 相対的重要度                |
|------------------------------|---|---------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| 17βエストラジオール(E <sub>2</sub> ) | 1.0   | 100%    | 1                   | ND~0.027            | 0~2.7×10 <sup>2</sup> |
| フタル酸ジ-エチルヘキシル                | 2.7×10 <sup>6</sup>                             | 12%     | 3.2×10 <sup>7</sup> | ND~9.4              | 0~3.0×10 <sup>6</sup> |
| フタル酸ブチルベンジル                  | 4.8×10 <sup>4</sup>                             | 65%     | 3.1×10 <sup>4</sup> | ND~1.0              | 0~3.1×10 <sup>4</sup> |
| アジピン酸ジ-エチルヘキシル               | 2.9×10 <sup>5</sup>                             | 12%     | 3.5×10 <sup>6</sup> | ND~0.16             | 0~3.4×10 <sup>7</sup> |
| 4-エチルフェノール                   | 5.4×10 <sup>3</sup>                             | 63%     | 3.4×10 <sup>3</sup> | ...                 | -                     |
| 4-オクチルフェノール                  | 5.4×10 <sup>4</sup>                             | 47%     | 2.5×10 <sup>4</sup> | ND~4t               | 0~2.6×10 <sup>5</sup> |
| 4-ノニルフェノール                   | 5.6×10 <sup>2</sup>                             | 140%    | 7.8×10 <sup>2</sup> | ND~1.9              | 0~1.5×10 <sup>1</sup> |
| p-t-ブチルフェノール                 | 5.4×10 <sup>2</sup>                             | 56%     | 3.0×10 <sup>2</sup> | ...                 | -                     |
| 2-sec-ブチルフェノール               | 3.5×10 <sup>2</sup>                             | 19%     | 6.7×10 <sup>1</sup> | ...                 | -                     |
| 2-tert-ブチルフェノール              | 3.5×10 <sup>4</sup>                             | 19%     | 6.7×10 <sup>3</sup> | ...                 | -                     |
| o-ヒドロキシジフェニル                 | 5.4×10 <sup>3</sup>                             | 23%     | 1.2×10 <sup>4</sup> | ...                 | -                     |
| ビスフェノールA                     | 2.7×10 <sup>3</sup>                             | 120%    | 3.3×10 <sup>3</sup> | ND~1.4              | 0~4.6×10 <sup>3</sup> |
| エピクロロヒドリン                    | 2.3×10 <sup>4</sup>                             | 5.9%    | 1.4×10 <sup>5</sup> | ...                 | -                     |
| 試薬フミン酸                       | 9.1×10 <sup>6</sup>                             | 26%     | 2.4×10 <sup>6</sup> | 1.8×10 <sup>4</sup> | 4.3×10 <sup>1</sup>   |
| 試薬フミン酸塩素処理水                  | 4.5×10 <sup>6</sup>                             | 69%     | 3.1×10 <sup>6</sup> | 1.8×10 <sup>4</sup> | 5.6×10 <sup>1</sup>   |
| 琵琶湖水中フミン物質(XAD7HP樹脂)         | 1.8×10 <sup>6</sup>                             | 32%     | 5.8×10 <sup>7</sup> | 1.8×10 <sup>4</sup> | 1.0×10 <sup>4</sup>   |
| 琵琶湖水中フミン物質塩素処理水(XAD7HP樹脂)    | 1.1×10 <sup>6</sup>                             | 81%     | 8.9×10 <sup>7</sup> | 1.8×10 <sup>4</sup> | 1.6×10 <sup>4</sup>   |

ND:検出下限値未満 t:検出下限値以上、定量下限値未満

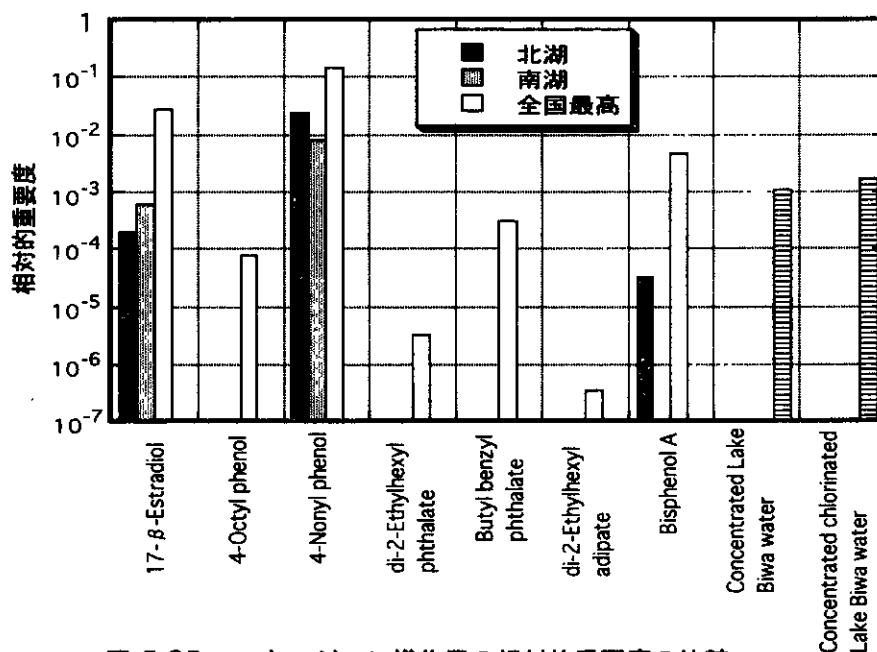


図-5.25 エストロゲン様作用の相対的重要度の比較

明であった物質、例えば4-エチルフェノール等に関しては、今後環境水中の濃度をま  
ず測定する必要があるだろう。

さらに、ここで用いた化学物質は浄水処理において塩素と反応しうる。本実験では  
各化学物質の塩素処理については検討を行わなかったが、実際はビスフェノールAの  
ように塩素によって速やかに分解されるものもあり、その分解生成物も含めてさらに  
検討が必要であると考えらる。

#### 4) 化学物質との比較に関するまとめ

①水道水に含まれる化学物質16種についてエストロゲン様作用を調べた。4-  
ノニルフェノールやビスフェノールAなど内分泌攪乱化学物質としてリストアップさ  
れる物質のエストロゲン様作用が相対的に強かった。

②水中存在濃度を考慮し相対的重要度によって評価したところ、XAD7HP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、水道水中のエストロ  
ジェン様作用の主要な成分であることを指摘した。

③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ことを指摘した。

### 5.2.5 まとめ

EDSTACがエストロゲン様作用検出のためのin vitro試験として最も推奨してい  
るMVLNアッセイを導入した。これを用いて、消毒副生成物のエストロゲン様作用  
について検討する必要があるとの観点から調査研究を行った。得られた結果を以下に  
まとめる。

#### (1) 水道水のエストロゲン様作用検出のための試料調製方法について



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ジェ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ジェ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ジェ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、エストロジェン様作用は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でエストロジェ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ジェン様作用はない。

④オゾン処理の効果については、消費率が通常程度(1.7mg-O<sub>3</sub>/L)および高消費率の場合ともに、原水的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(旧)、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, (Supplement7), 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が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<sup>1)</sup>。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的一部分のフェノール類物質については適用できていない<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>、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種類のブ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。

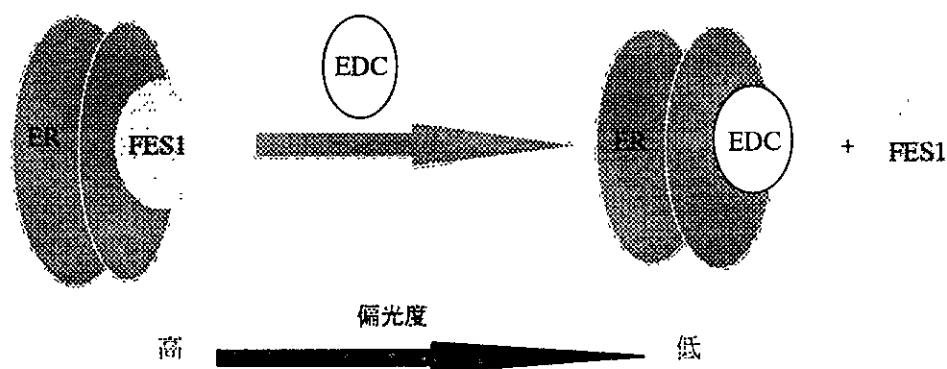


図-5-3-1 蛍光偏光度法に基づく受容体結合アッセイの原理図

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  $\mu$ lの10mMスクリーニング緩衝液の中に2  $\mu$ 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  $\mu$ 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( $\epsilon_{\text{HOMO}}$ )と最低空分子軌道エネルギー( $\epsilon_{\text{LUMO}}$ )は半経験分子軌道法に基づくCACHe(CACHe 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( $V_m$ )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。