

201035023A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の
構造活性相関に基づく毒性評価システムに関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者
早川 和一
(金沢大学)

平成23(2011)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の
構造活性相関に基づく毒性評価システムに関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

金沢大学

早川 和一

研分担者

京都薬科大学

細井 信造

金沢大学

鈴木 信雄

国立医薬品食品衛生研究所

杉本 直樹

平成23（2011）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の構造活性相関に基づく毒性評価システムに関する研究…………… 1
早川和一 (金沢大学)

II. 分担研究報告

1. エストロゲン受容体への作用に関する研究…………… 15
早川和一 (金沢大学)
2. 構造活性相関の解析に関する研究…………… 34
細井信造 (京都薬科大学)
3. 生物材料を用いた試験に関する研究…………… 51
鈴木信雄 (金沢大学)
4. 有機化合物の絶対純度の決定に関する研究…………… 82
杉本直樹 (国立医薬品食品衛生研究所)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 101

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 105

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成 22 年度総括研究報告書

ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の構造活性相関に基づく毒性評価システム
に関する研究

研究代表者 早川 和一 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 教授

研究分担者 細井 信造 京都薬科大学 薬学教育研究センター 准教授

研究分担者 鈴木 信雄 金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設 准教授

研究分担者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

研究要旨

多環芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbon: PAH）類のようにステロイド系ホルモン受容体に結合してかく乱作用を発現する医薬品や化学物質に焦点を合わせ、その毒性発現の有無を予測可能とする方法として、酵母two-hybrid法によるエストロゲン様/抗エストロゲン作用試験構造に基づく一次スクリーニング法、並びに魚鱗を用いる二次スクリーニング法を組み合わせた方法を完成することを最終目的とし、まず、ステロイド系ホルモン受容体に結合してかく乱作用を発現する可能性があるPAH類及びその酸化体類（OHPAH 65種、PAHQ 20種、PAHK 9種）を対象として、毒性指標として酵母two-hybrid法を用いたエストロゲン様/抗エストロゲン作用の強さを求めた。上述の対象化合物の構造に関わる物理学的パラメータを総合して構造活性相関を解析して、毒性を発現する構造要件を明らかにすることを目的とした。その結果、PAH及びPAHKはいずれの活性も示さなかったが、OHPAHとPAHQのいくつかはエストロゲン様活性または抗エストロゲン活性を示した。水酸基以外のキノン体のように官能基に酸素を持つことでERを介するエストロゲン様活性や抗エストロゲン活性を発現することが初めて示された。さらに、強い活性を示すOHPAH とPAHQは、環数、L/B比及びO-H distanceの3つの構造パラメータがE2の値と近い狭い範囲にあることから、明確な構造活性相関のあることが明らかになった。以上のことは、これら3つの構造パラメータの値から、未知のPAH酸化体類の活性の有無が予測可能なことを示唆している。魚類のウロコは、カルシウム出し入れをし、ヒトの骨と同様に骨を作る細胞（骨芽細胞）と骨を壊す細胞（破骨細胞）が石灰化した骨基質の上に共存しており、シンプルな骨のモデルである。さらに、ウロコは再生するという性質をもち、その再生ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性が非常に高いことが判明した。そこで本研究では、二次スクリーニング法として魚のウロコを用いる評価系を開発することを目的に、一次スクリーニング法としての酵母two-hybrid法に続いて行う、①再生ウロコを用いた評価システムの構築、②評価システムによる細胞毒性の検出、③ウロコにおけるエストロゲン受容体の検出、④エストロゲン及び多環芳香族炭化水素の作用の解析を行った。また、PAH類について国際単位系(SI)にトレーサブルな信頼性の高い分析法を構築するために、定量核磁気共鳴法（定量NMR: quantitative NMR (qNMR))を応用し、9種の水酸化PAH (OHPAH) 類の市販試薬について計量学的に信頼性の高い純度値を求めた。その結果、OHPAH市販試薬製品の純度値は、 $93.4 \pm 0.4 \sim 101.6 \pm 0.2\%$ (AV \pm RSD)であり、記載されていた7種の純度値（98.0%または99.0%以上）とは異なるものがあった。純度値の記載がなかった2種の純度値は93.4%および94.3%であり、仮に補正をしないと得られる定量値は6.6および5.7%の誤差を生じることになる。

A. 研究目的

環芳香族炭化水素 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon: PAH) 類は、ディーゼル排ガス粉塵 (diesel exhaust particulate: DEP) や原油中に含まれる有害化学物質である。DEP については、これまで主に肺がんや慢性的な呼吸器疾患のリスクに注目が置かれていたが、近年では内分泌攪乱作用の点からも注目を集めるようになった。DE を吸入した雄マウス及びラット、成長期のラットで精子産生の抑制が報告された。著者らは、DEP 抽出物 (DEPE) の抗アンドロゲン作用について、アンドロゲンレセプター (AR) を安定導入したヒト前立腺がん PC3/AR 細胞を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによる検討を行い、DEPE が抗アンドロゲン作用を持ち、その中には PAH のようにアрил炭化水素受容体 (AhR) のアゴニストとして作用するものや、AR アンタゴニストとして作用するものが存在することを明らかにした。これまで、DEPE 中の抗アンドロゲン物質の一つとして OHPhe (hydroxyphenanthrene) が同定され、個々の物質の評価により水酸化 PAH (hydroxyl polycyclic aromatic hydrocarbon: OHPAH) 類のいくつかに特に強い抗アンドロゲン活性が見られた。

そこで、本研究は PAH 類のようにステロイド系ホルモン受容体に結合してかく乱作用を発現する医薬品や化学物質に焦点を合わせ、その毒性発現の有無を予測可能とする方法として、酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン様/抗エストロゲン作用試験構造に基づく一次スクリーニング法、並びに魚鱗を用いる二次スクリーニング法を組み合わせた方法を完成することを最終目的とする。即ち、第一にステロイド系ホルモン受容体に結合してかく乱作用を発現する可能性がある PAH 類及びその代謝物を対象として、毒性指標として酵母 two-hybrid 法を用いたエストロゲン様/抗エストロゲン作用の強さを求めた。次いで、酵母 two-hybrid アッセイ法によって得られた多環芳香族炭化水

素 (PAH) の水酸化体 (OHPAH) のエストロゲン様及び抗エストロゲン活性について、いくつかの構造的または物理化学的特徴との間に相関が見られることが分かっている。そこで、酵母 two-hybrid アッセイ法及び受容体結合試験法で活性及び結合親和性が見られた PAH のキノン体 (PAHQ) についても同様に相関の有無を検討した。

PAH 類のいくつかはダイオキシンレセプターと言われるアрил炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon receptor : AhR) に結合し、Cytochrome P450 (CYP) を誘導する。AhR はリガンド活性化型の転写因子であり、全身に発現しているが特に肺や胸腺、肝臓で発現レベルが高い。そして PAH は誘導された CYP1A1 によって代謝され OHPAH になることが知られている。したがって、体内で CYP1A1 により代謝された PAH 類が内分泌かく乱化学物質の本体である可能性が高い。一方 PAH は原油にも含まれており、1997 年 1 月に日本海で発生したロシア船籍タンカーナホトカ号の重油流出事故では、流出した大量の重油による海洋生態系への影響が危惧されている。また 2010 年 4 月に起きたメキシコ湾の石油掘削基地の爆発により原油が流出した。これは 1989 年に 4 万キロリットルが流出したアラスカ州のタンカー事故 (エクソンバルディーズ号原油流出事故) を超え、過去最悪の環境汚染を引き起こす恐れがある。実際にエクソンバルディーズ号の重油汚染海水で孵化した稚魚に脊柱彎曲が観察されている。

本研究では環境中での有機汚染物質の毒性化反応の中で、特に魚の骨代謝に焦点を絞り研究を行った。そこで魚の骨代謝の影響を評価する方法として、魚類のウロコに注目した。魚類のウロコは、骨基質タンパク上に骨形成を行う骨芽細胞と骨吸収を行う破骨細胞が共存している。さらにウロコは再生するという性質を持ち、その再生ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性が非常に高いことを報告している。以上の

ことから、上述の一次スクリーニング法に続く二次スクリーニング法を開発することを念頭に、本研究では、①再生ウロコを用いた評価システムの構築、②評価システムによる細胞毒性の検出、③ウロコにおけるエストロゲン受容体の検出、④エストロゲン及び多環芳香族炭化水素の作用の解析を行った。

ところで、物質量の絶対値は、国際単位系 (International System of Units: 以下、SI) にトレーサブルな測定によって得られると定義されている。このような測定法は「一次標準測定法」と呼ばれている。市場に流通する「実用標準物質」は、「国家標準物質 (NMIJ CRM)」を介して同じ物質同士の校正の連鎖で SI トレーサビリティを確保している (計量標準供給制度 (JCSS : Japan Calibration Service System))。「国家標準物質」は SI にトレーサブルな方法である上述の「一次標準測定法」を利用して厳密に値付けを行っている。この「国家標準物質」を利用して「二次標準物質」、次いで「実用標準物質」を段階的に校正しつつ量的な拡大を行い、市場に要求される量を供給している。それぞれの試薬会社はその要求に応えるべく、各社独自の方法、例えば、比吸光度あるいはクロマトグラム上で観察される主ピークの面積百分率などから純度や含量を品質保証の目的で値付けて供給している。すなわち、ほとんどの市販標準品や試薬は、「国家標準物質」を上位標準とした標準物質供給システムで値付けされては供給されておらず、SI トレーサビリティの連鎖から外れているため、極端に言えば、これらに表示された純度値を保証する根拠はないに等しいということになる。

本研究対象化合物の PAH 及びその誘導体類もその一つであり、その純度が低い場合には、単位量当りの活性値の補正が必要である。そこで、定量分析値の精度と信頼性を向上するために、SI にトレーサブル且つ測定対象の標準品を必要としない新規分析法の開発研究の一環として、主要被検化合物の内から OHPAH 9 種を

選択し、それらの市販試薬の絶対純度を核磁気共鳴装置 (quantitative NMR: qNMR) により測定し、SI への計量トレーサビリティの確保を行い、その結果をフィードバックした。

B. 研究方法

1. 酵母 two-hybrid 法を用いたエストロゲン様及び抗エストロゲン活性の測定

主な被検化合物は、2~6 環の USEPA 指定 16 PAH のうち蛍光特性を有する 15 化合物、その水酸化体 (OHPAH) 合計 65 化合物、PAH のキノン体 (PAHQ) 20 化合物、PAH のケトン体 (PAHK) 9 化合物とした。Fig.1~4 には、それぞれの化合物名と略称、構造を示した。さらに、ビスフェノール A (BPA) 及びノニルフェノール (NP) も被検化合物とした。

エストロゲン様及び抗エストロゲン活性の評価は ER リガンド結合ドメイン GAL4 の DNA 結合領域 (GAL4-DBD) と hER α の融合蛋白を産生するプラスミドと、GAL4 の転写活性化領域 (GAL4-AD) と ER のコアクチベーターである TIF2 の融合蛋白を産生するプラスミドを導入した *Saccharomyces cerevisia* Y190 株 (Y190ER) を用いた。細胞毒性の評価はコントロールベクター (pGBKT7-53 及び pGADT7-T) を導入した *Saccharomyces cerevisia* Y190 株 (以下 Y190p53-SV40LT) を用いた。エストロゲン様活性の評価では試料溶液による単独処理時の吸光度を、陽性対照である 100 nM E₂ 処理時の吸光度と比較した。抗エストロゲン活性及び細胞毒性の評価では試料溶液と共に 1 nM E₂ を添加し、同様の操作を行った。陽性対象としてエストロゲン様活性評価には E₂ 100 nM を、抗エストロゲン活性評価には E₂ 1 nM を用いた。尚、酵母 two-hybrid アッセイ法を用いてエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を測定する場合、化学物質の毒性がその評価の妨げとなる。抗エストロゲン活性の測定においては、E₂ による β -galactosidase 誘導の活性の低下が試験物質のア

ンタゴニスト活性によるものか、酵母への毒性によるものかは区別することができない。そこで恒常的に β -galactosidase を発現する酵母を用いて、 β -galactosidase 活性の低下が 10%以内となるときの影響が無いと判断した。

2. 物理化学的特性の測定

分子モデリングソフト CAChe を用いたコンピュータシミュレーション解析により、半経験的分子軌道法である PM3 法を用いて、被検化合物の構造最適化及び物理化学的特性（環数、長軸長/短軸長比、水酸基等の官能基と最遠水素との間の距離、部分電荷、第 1 イオン化エネルギー、双極子モーメント、 $\log P$ ）の計算を行い、得られた結果と活性との関係を考察した。

3. 再生ウロコを用いた評価システムの構築

キンギョから麻酔下でウロコを採取した。破骨細胞活性マーカーとして酒石酸耐性酸ホフアターゼ (TRAP) の活性を、*p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として、pH 5.3 の酸性酒石酸緩衝液中で生成する *p*-ニトロフェノールを 405 nm で吸光度を測定することによって求めた。骨芽細胞活性マーカーとしてアルカリホフアターゼ (ALP) の活性を、*p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として、pH 9.5 の 100 mM トリス・塩酸緩衝液) を酸性酒石酸緩衝液中で生成する *p*-ニトロフェノールを同様に測定することによって求めた。ウロコの面積は、メチレンブルー染色を施してイメージスキャナーにより自動測定した。細胞毒性は、テトラゾリウム塩を発色基質とする細胞内脱水素酵素の活性を生成するホルマザンの 450 nm の吸光度から測定する生細胞数測定から計算した。また、再生ウロコからキアゲンのキットにより mRNA を抽出し、cDNA を合成した。

4. qNMR による純度決定

対象化合物には、水酸化ナフタレン OHNp 8 種及び 4-hydroxybenzo[*a*]anthracene (4-OHBaA) (市販品) 用いた。また、高純度ヘキサメチルジシラン(hexamethyl disilane: HMD)、重アセトン(acetone-*d*₆, 99.9 atom %D)、フタル酸ジエチル(diethyl phthalate: DEP、純度 99.98 ± 0.09 w/w % (99.74±0.09 mol/mol %))を用いた。核磁気共鳴装置(NMR)はオートサンプラー付き JNM-ECA (600 MHz) (日本電子(株)製)、ウルトラマイクロ天秤は XP2U (メトラートレド製)を用いた。qNMR 標準液の調製および標準液中の HMD の濃度校正は既報に準じた。すなわち、HMD を精密に量り取り、acetone-*d*₆ に定容し qNMR 用標準液とした。式(1)より、qNMR 用標準液中の HMD の濃度を校正した。

$$W_{HMD} = \frac{M_{HMD} \times I_{HMD}}{H_{HMD}} / \frac{M_{DEP} \times I_{DEP}}{H_{DEP} \times W_{DEP}} \times \frac{P_{DEP}}{100} \quad \text{--- (1)}$$

ただし、 W_{HMD} , W_{DEP} = HMD および DEP の濃度 (mg/mL)、 M_{HMD} , M_{DEP} = HMD および DEP の分子量 (146.38 および 222.24)、 H_{HMD} , H_{DEP} = HMD の $\text{CH}_3 \times 6$ および DEP の $\text{CH}_2 \times 2$ のプロトン数、 I_{HMD} , I_{DEP} = HMD の $\text{CH}_3 \times 6$ および DEP の $\text{CH}_2 \times 2$ のシグナル面積、 P_{DEP} = DEP の純度 (99.98 w/w%)。

OHPAH 標準品を精密に量り取り、qNMR 用標準液に溶解し NMR 試験管に封入したものを試料溶液とした。この試料溶液を qNMR に付し、HMD のシグナル強度面積、OHPAH に由来するそれぞれの特定シグナルの相対面積、分子量、濃度等を式(2)に代入し、OHPAH の純度を算出した。この一連の操作を 3 試行し、各シグナルより算出された純度値の平均を最終的に OHPAH の純度値として表した。

$$P_{OHPAH} = \frac{I_{OHPAH} / H_{OHPAH}}{I_{HMD} / H_{HMD}} \times \frac{M_{OHPAH} / W_{OHPAH}}{M_{HMD} / W_{HMD}} \times 100 \quad \text{--- (2)}$$

ただし、 W_{HMD} , $W_{\text{OHPAH}} = \text{HMD}$ および OHPAH の濃度(mg/mL)、 M_{HMD} , $M_{\text{OHPAH}} = \text{HMD}$ および OHPAH の分子量(146.38 および Table 1)、 I_{HMD} , $I_{\text{OHPAH}} = \text{HMD}$ および OHPAH の特定基のシグナル強度面積、 H_{HMD} , $H_{\text{OHPAH}} = \text{HMD}$ および OHPAH の特定基のプロトン数、 $P_{\text{OHPAH}} = \text{OHPAH}$ の純度(%)。

C. 研究結果

1. PAH と OHPAH、PAHQ、PAHK のエストロゲン様及び抗エストロゲン活性

PAH とモノ水酸化体 (OHPAH) の $\text{hER}\alpha$ におけるエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を測定した結果、PAH はエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を示さないが、OHPAH のいくつかは活性を示した。さらに、活性の強さは OHPAH を構成するベンゼン環の数によって異なる傾向が見られた。4 環構造を持つ OHPAH については、多くの化合物がエストロゲン様活性/抗エストロゲン活性を示し、その強さは 2、3 環構造の化合物よりも強かった。その中でも BaA 及び Chr のモノヒドロキシ体 (4-OHBaA、10-OH BaA、1-OHCh、2-OH Ch、3-OHCh) は強いエストロゲン様活性を、BaA 及び Chr、BcPh のモノヒドロキシ体 (2-OHBaA、9-OHBaA、2-OHCh、6-OHCh、2-OHBcPh、3-OHBcPh、4-OHBcPh) は強い抗エストロゲン活性を示した。特に 3-OHBcP は ER へのアンタゴニストと知られている 4-OHT よりも強い抗エストロゲン活性を示した。5 環構造を持つ OHPAH については、OHBbFR のうち 10-OHBbFR のみ抗エストロゲン活性を示した。11-OHBgCh と 13-OHBgCh は強い抗エストロゲン活性を示し、特に 11-OHBgCh は 5 環構造 OHPAH の中では最も強い活性を示した。一方、6 環構造を持つ OHIDP はいずれの活性もほとんど示さなかった。5、6 環構造の活性の強さは、全体的に 4 環構造の OHPAH よりも弱かった。

20 種の PAHQ のうち、11 種(1,4-PQ、1,2-CQ、

1,4-CQ、5,6-CQ、BcP-5,6-Q、BeP-5,6-Q、BaP-1,6-Q、BaP-4,5-Q、BaP-7,8-Q、BaP7,10-Q、BaP-11,12-Q) が活性を示した。特に 1,2-CQ、1,4-CQ、5,6-CQ、BaP-7,8-Q は強い抗エストロゲン活性を示し、5 環構造を有する PAHQ にも強い抗エストロゲン活性があることがわかった。PAHQ と PAHK のエストロゲン様活性の測定した結果、20 種の PAHQ のうち 3 種(1,2-CQ、BaP-3,6-Q、BaP-7,8-Q) が活性を示したが、これらの活性は弱かった。

2. 再生ウロコを用いた評価システムの構築と OHPAH の作用の解析

ウロコの重量より面積を用いる方が、TRAP、ALPのいずれの活性測定とも精度の高い結果が得られた。さらに、普通ウロコより再生ウロコを用いる方が、低濃度の被検物質の影響を検出できることがわかった。

そこで、上述の被検物質の中から、エストロゲン様作用が強かった4-OHBaAについて、再生ウロコの系に $10^{-6} \sim 10^{-10}$ mol/L の濃度で曝露して、TRAP、ALP活性を測定した。その結果、いずれも上昇が認められた。また、BaA を曝露させた結果、TRAP活性が遅れて上昇し、ALP活性は上昇傾向が認められた。一方、4-OHBaA と BaA とともに使用した濃度範囲では細胞数の減少は確認されず、毒性はなかった。また、キンギョのウロコ (regenerating scale) から、エストロゲン受容体を検出した結果、サブタイプは、 β が最も多く発現しており、 α タイプの発現量は少ないことが判明した。

3. qNMR による純度決定

化合物 A の特定の置換基上の水素のシグナル面積(I_A)は、置換基上の水素の数(H_A) \times 化合物 A のモル濃度(m_A)として観察される(式 1 の分子)。別の分子構造の化合物 B の特定の置換基上の水素のシグナル面積(I_B)についても同様な関係式が当然成り立つ(式 1 の分母)。よって、2

つのシグナルが異なる化合物(A, B)に由来する場合には個々のシグナル面積と化合物のモル濃度は式1の関係式で表すことができる。さらに純度が明らかな化合物を基準物質として用いれば、モル比と溶液の調製値の関係から測定対象のあらゆる有機化合物の純度を決定できる式2の関係が成り立つ。

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{H_A m_A}{H_B m_B} = \frac{H_A W_A / M_A}{H_B W_B / M_B} \quad \text{---- (1)}$$

$$P_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / W_{\text{std}}} \times P_{\text{std}} \quad \text{---- (2)}$$

ただし、I = シグナル面積、H = 特定基のプロトン数、m = モル濃度、W = 重量、M = 分子量、P = 純度%、sample = 測定対象の有機化合物、std = 基準物質。

以上のもと、9種のOHPAHを試料とし、正確に秤量後、qNMR標準液にそれぞれ溶解し、qNMR測定を行った。qNMRスペクトル上に観察された基準物質HMDおよびOHPAHに由来する各シグナル面積、水素数、濃度等を関係式(1)に代入し、それぞれの純度値を算出した。その結果、OHPAHの試薬製品によりその純度値は大きく異なり、 $93.4 \pm 0.4 \sim 101.6 \pm 0.2\%$ (AV \pm RSD)の幅があることがわかった。また、試薬製品に記載されていたGC面積百分率による純度値は、98.0%または99.0%以上であり、これと比較してqNMRにより得られた7種の純度は、ほぼ記載値の通りであった。qNMRにより得られた純度値が93.4%、94.3%の製品については純度値の記載がなかった。仮に補正せずにこれらを用いると、定量値は6.6および5.7%の誤差を生じることがわかった。

D. 考察

酵母two-hybrid法によって得られたPAH及びOHPAH、PAHQの活性測定の結果から、母核構

造のPAHは全て活性を示さず、OHPAHとPAHQの中に活性を示すものがあったことから、活性が認められた被検化合物について分子構造との関係を考察した。まず、PAHとOHPAHを比較すると、第一にフェノール性水酸基の存在は活性発現に必須である。次に、2~6環構造を有するOHPAHのうち、3~5環構造の化合物にエストロゲン様または抗エストロゲン活性が認められ、特に4環構造の化合物の活性は強かった。しかし、同じ環数を有しても活性の種類やその強さは全く異なり、環数のみで活性の有無を説明することはできない。また、これまでにエストロゲン様活性やERに対する結合親和性を有する多くの化合物に共通する構造的特徴に関する報告がなされ、フェノール環のパラ位に疎水性部を持つとエストロゲン様活性を示し、オルト位がかさ高いとその活性が減弱することが報告されている。しかしながら、酵母two-hybrid法によって得られたOHPAHの測定結果より、オルト位の炭素が縮合にあずかるOHPAHの中でも0.5以上の相対活性値を示す化合物があることから、この条件でも活性の有無の説明には不十分である。この原因として、PAHの分子構造を考える上で2つの因子、即ち、母核構造と水酸基の位置とが活性の発現に関与していることが考えられた。

これまでにエストロゲン様活性やERに対する結合親和性を有する多くの化合物に共通する構造的特徴に関する報告がなされている。また、フェノール環のパラ位に疎水性部を持つとエストロゲン様活性を示し、オルト位がかさ高いとその活性が減弱すると報告されている。しかし、OHPAHではオルト位の炭素が縮環にあずかるOHPAHの中でも強い活性を示すものがあることから、この条件でも活性の有無の説明としては不十分であった。OHPAHでは母核構造と水酸基の位置とが活性の発現に関与していると考え、2つのパラメータを用いた。まず、母核構造の違いを表すパラメータとしてLength-to-breadth ratio (L/B比)を用いた。L/B比

とは、分子のファンデルワールス表面を囲むように書いた四角形の長軸をL軸、短軸をB軸とし、このL軸とB軸の比の最大値を示したものである。一方、水酸基の位置の違いを表すパラメータとしてO-H distanceを使用した。O-H distanceは水酸基の酸素原子から最も離れた位置に存在する水素原子との距離を示したものである。

強いエストロゲン様または抗エストロゲン活性を示すOHPAHモノヒドロキシ体のO-H distanceは8~12 Åであった。この範囲はE2及びDESのO-O distance (10.965 Å及び12.034 Å)と類似しており、これが活性を強く発現する原因の一つであることが考えられた。一方、いくつかのPAHQにも比較的強い抗エストロゲン活性が認められたことは、その活性発現にはフェノール性水酸基は必須ではないことを意味している。そこで、PAHQについてもL/B比とO-H distanceを求めて考察した。尚、PAHQの2つあるカルボニル基のうち、酸素原子と水素原子の距離が最も離れたO-H distanceを用いた。エストロゲン様活性を示した3種のPAHQはL/B比が1.32~1.80、O-H distanceが10.290~11.519 Åの狭い範囲に存在した。このO-H distanceの範囲はE₂の値(11.185/11.695 Å)に近似しており、これが活性を発現する要因の一つであることが考えられた。

以上の結果を総合すると、強いエストロゲン様/抗エストロゲン活性を示すOHPAHは、E2との構造類似が示されたことより、E2とエストロゲン受容体の結合の様に、OHPAHの水酸基がエストロゲン受容体のGlu353残基及びArg394残基と水素結合を形成するとともに、OHPAHの芳香環とPhe404の芳香環の間にvan der Waals力が働くことが推定された。一方、比較的強い抗エストロゲン活性を有するPAHQについては、やはりエストロゲン受容体のGlu353残基及びArg394残基と水素結合を形成すると考えられる。さらに、PAHQの芳香環とPhe404の芳香環の間にvan der Waals力が働く。これら

の相互作用によって、PAHQがE2と類似の結合を行うと考えられた。

上述のように、E2の3位のフェノール性水酸基はGlu 353に対して水素結合のdonorとして働くため、ERとの結合にはフェノール性水酸基の電子供与性の違いが大きく関与していることが考えられる。エストロゲン様活性または抗エストロゲン活性を示すPAHQの第1イオン化エネルギーはそれぞれ8.526~9.029、8.526~9.201 eVの比較的狭い範囲に存在し、E₂の値(8.876 eV)もこの範囲内であった。このことからPAHQでは第1イオン化エネルギーが各活性の強さに影響を及ぼす可能性が示唆された。

分子内の電子密度の偏りが活性に及ぼす影響を検討する一つの指標として、双極子モーメントとの関係性を評価した。エストロゲン様活性を示したPAHQの双極子モーメントは4.909~5.556 debyeの狭い範囲であったが、E₂の値(1.44 debye)は範囲外であり、活性発現の要因は得られなかった。これまでに、hER α に対する結合親和性とフェノール類の疎水性(log P値; 水/オクタノール分配係数)との間にある一定範囲内において比例関係の成立が報告されている。従って、PAHQも同様の傾向を示す可能性が考えられたため、各化合物のlog P値と活性の強さとの関係性を評価した。エストロゲン様活性を示したPAHQのlog P値は3.462~3.782の狭い範囲に存在し、抗エストロゲン活性を示したPAHQのlog P値は2.459~3.782の比較的狭い範囲に存在した。E₂の値(4.008)に近づくほど活性が強くなり、活性を示す割合が多くなることが示唆された。

以上から、エストロゲン受容体に作用する化学物質の物理化学的特性に基づく一次スクリーニングの要件には、①PAHの官能基(OHPAH若しくはPAHQ)、②環数、③L/B比、④O-H distanceを選択することができると考えられた。ヒトのエストロゲン受容体(hER) α 、 β タイプに対して、二次スクリーニングに適用を検討しているキンギョの再生ウロコ系では β タイ

ブが多く発現していることから、受容体の結合・作用部位のアミノ酸配列が異なることが推定される。従って、作用の発現様式 (agonistic 又は antagonistic) などに違いが生じる可能性を考慮する必要がある。

E. 結論

1. 酵母 two-hybrid アッセイ法により PAH15 種、OHPAH 65 種、PAHQ 20 種、PAHK 9 種のエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を測定した結果、PAH と PAHK はいずれの活性も示さなかったが、PAHQ のいくつかはエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を示した。強い活性を示す OHPAH と PAHQ は、環数、L/B 比及び O-H distance の構造パラメータが E2 の値と近い狭い範囲にあり、構造活性相関のあることが明らかになった。即ち、エストロゲン受容体に作用する化学物質の物理化学的特性に基づく一次スクリーニングの要件には、①PAH の官能基 (OHPAH 若しくは PAHQ)、②環数、③L/B 比、④O-H distance を選択できると考えられた。
2. 酵母 two-hybrid 法でエストロゲン様活性を示した 4-OHBaA は、魚の再生ウロコを用いた系で骨芽細胞及び破骨細胞の活性を上昇させた。魚のウロコではエストロゲン受容体 β タイプが多く発現しており、ヒトとの違いがある。
3. 9 種の OHPAH を qNMR による純度測定を行った結果、7 種については、ほぼ試薬製品に記載されていた GC 面積百分率による記載値の通りであったが純度値の記載がなかった 2 種は、6.6 および 5.7% の誤差があり、補正が必要な場合がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miller-Schlze, J. P., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K., Tamura, K., Dong, L., Simpson, C. D., Exposures to particulate air pollution and nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons amongst taxi drivers in Shenyang, China. *Environ Sci. Technol.*, 44 (1), 216-221 (2010).
- 2) Yang, X.-Y., Igarashi, K., Tang, N., Lin, J.-M., Wang, W., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K., Indirect- and direct-acting mutagenicity of diesel, coal and wood burning-derived particulates and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Res.*, 695, 29-34 (2010).
- 3) Kishida, M., Imamura, K., Kameda, T., Hayakawa, K., Bandow, H., Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere using gas chromatograph-mass spectrometer. *J. Environ. Chem.*, 20 (2), 173-181 (2010).
- 4) Chujo, S., Okamoto, S., Sunahara, R., Hayashi, H., Takii, T., Hayakawa, K., Onozaki, K., Cigarette smoke condensate extracts augment collagen-induced arthritis in mice" has been accepted for publication. *Int. Immunopharmacol.*, 10, 1194-1199 (2010).
- 5) Kameda, T., Akiyama, A., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K., Determination of particle-associated hydroxynitropyrenes with correction for chemical degradation on a quartz fibre filter during high volume air sampling. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 90 (13), 976-987 (2010).
- 6) Hayakawa, K., Suzuki, N., Kitamura, K., Bekki, K., Nakano, J., Yoshita, M., Toriba, A., Kameda, T. and Tang, N., Toxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites

- onfish bone metabolism. *Proceedings of Water Pollution X ;WIT Press-abstract*, 231-241 (2010).
- 7) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 定量 NMR を用いた有機化合物の絶対定量法の開発と食品分析の信頼性の確保, FFI ジャーナル, **215** (2), 129-136 (2010).
 - 8) 早川和一, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 鈴木信雄, 総説: 多環芳香族炭化水素から見た海洋油汚染, 安全工学, **50** (2), 85-92 (2011).
 - 9) 戸次加奈江, 滝上英孝, 鈴木 剛, 唐 寧, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一, 中国・北京及び日本・金沢の大気を示す AhR 活性化作用への PAH 類及びダイオキシン類の寄与, 環境化学, **21** (1), 27-33 (2011).
 - 10) 片山裕規, 後藤知子, 亀田貴之, 唐 寧, 松木 篤, 鳥羽 陽, 早川和一, 日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノンの観測—濃度レベルの把握と発生要因の検討—, 大気環境学会誌, **46**, 20-29 (2011).
 - 11) Okamoto, S., Adachi, M., Chujo, S., Yamada, K., Akita, K., Itoh, S., Takii, T., Hayakawa, K., Onozaki, K., Etiological role of cigarette smoking in rheumatoid arthritis: Nasal exposure to cigarette smoke condensate extracts augments the development of collagen-induced arthritis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **404**, 1088-1092 (2011).
 - 12) 北村敬一郎, 中野 淳, 川部季美, 早川和一, 根本 鉄, 大嶋雄治, 島崎洋平, 服部淳彦, 鈴木信雄, 自動面積測定法によるキンギョのウロコを骨のモデルとしたアッセイ法の改良. 日本海域研究, **42**, 27-34 (2011).
 - 13) Suzuki, N., Yachiguchi, K., Hayakawa, K., Omori, K., Takada, K., Tabata, J.M., Kitamura, K., Endo, M., Wada, S., Srivastav, A.K., Chowdhury, V.S., Oshima, Y., Hattori, A., Effects of inorganic mercury on osteoclasts and osteoblasts of the goldfish scales in vitro. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **56**, 47-51 (2011).
 - 14) Suzuki, N., Danks, J.A., Maruyama, Y., Sasayama, Y., Hattori, A., Ikegame, M., Nakamura, M., Tabata, M.J., Yamamoto, T., Furuya, R., Saijoh, K., Mishima, H., Srivastav, A.K., Furusawa, Y., Kondo, T., Tabuchi, Y., Takasaki, I., Chowdhury, V.S., Hayakawa, K. and Martin T.J., Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. *Bone*, **48**, 1186-1193 (2011).
 - 15) Satone, H., Lee, J.M., Oba, Y., Kusakabe, T., Akahoshi, E., Miki, S., Suzuki, N., Sasayama, Y., Nassef, M., Shimasaki, Y., Kawabata, S., Honjo, T. and Oshima, Y., Tributyltin-binding protein type 1, a lipocalin, prevents inhibition of osteoblastic activity by tributyltin in fish scales. *Aquatic Toxicol.*, **103**, 79-84 (2011).
 - 16) Hayakawa, K., Bekki, K., Yoshita, M., Tachikawa, C., Kameda, T., Tang, N., Toriba, A., Hosoi, S., Estrogenic/antiestrogenic activities of quinoid polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Health Sci.*, **57** (3), (2011), in press.
 - 17) Hayakawa, K., Tang, N., Sato, K., Izaki, A., Tatematsu, M., Hama, H., Li, Y., Kameda, T., Toriba, A., Development of HPLC determination method for trace levels of 1-, 2-nitropyrenes and 2-nitrofluoranthene in airborne particulates and its application to samples collected at Noto Peninsula. *Asian J. Atmos. Environ.*, **5**, (2011), in press.
 - 18) Kameda, T., Akiyama, A., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K., Atmospheric formation of hydroxynitropyrenes from a photochemical reaction of particle-associated 1-nitropyrene. *Environ. Sci. Technol.*, **45** (8), 3325-3332 (2011), in press.
 - 19) 杉本直樹, 分析対象の有機化合物の純度は

大丈夫ですか？定量 NMR による絶対純度測定法の開発，日薬雑誌(Folia Pharmacol. jpn.)，(2011)，in press.

3. 学会発表

- 1) Yamada, M., Iwasaka, Y., Zhang, D., Matsuki, A., Chen, B., Trochkin, D., Nagatani, M., Nagatani, T., Hayakawa, K., Shi, G., Submicron aerosols over KOSA source areas in Northwest China. International Symposium on Aerosol and Radiation Studies, 2010. 4. 25-28, Zibo, Shandong, China.
- 2) Hayakawa, K., Suzuki, N., Kitamura, K., Bekki, K., Nakano, J., Toshita, M., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N., Toxi effect of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites on fish bone metabolism. Water Pollution 2010, 2010. 6. 9-11, Bucharest, Romania.
- 3) Yamada, M., Kobayashi, F., Zhang, D., Chen, B., Maki, T., Kakikawa, M., Tobo, Y., Hayakawa, K., Shi, G., Iwasaka, Y., Mixing state of bioaerosols and Asian dust particles examined with microscopes. The 8th International Symposium on Advanced Environmental Monitoring, Sapporo, 2010. 6. 29- 7.1, Hokkaido, Japan.
- 4) 亀田貴之，後藤知子，鳥羽 陽，唐 寧，早川和一，日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノンの観測，濃度レベルの把握と発生要因の検討，第 19 回環境化学討論会，2010. 6. 21-23，愛知.
- 5) 安積愛理，亀田貴之，唐 寧，鳥羽 陽，早川和一，越境輸送中の黄砂粒子表面における多環芳香族炭化水素ニトロ化の可能性，第 19 回環境化学討論会，2010. 6. 21-23，愛知.
- 6) 戸次加奈江，滝上英孝，鈴木 剛，唐 寧，早川和一，ラット肝細胞株における多環芳香族炭化水素誘導体の核内受容体を介した毒性影響，第 19 回環境化学討論会，2010. 6. 21-23，愛知.
- 7) 鈴木信雄，中野 淳，北村敬一郎，田渕圭章，高崎一朗，古澤之裕，近藤 隆，服部 淳彦，笹山雄一，鳥羽 陽，早川和一，重油に含まれる多環芳香族水素類の魚の骨代謝に対する作用. 平成 22 年度日本動物学会中部支部大会，2010. 7. 24-25，愛知.
- 8) Kawabe, K., Suzuki, N., Hayakawa, K., Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish bone metabolism. 2010 Korea-Japan Joint Research Project Symposium. "Aging and Environment", 2010. 9. 2, Busan, Korea.
- 9) Nakano, J., Suzuki, N., Hayakawa, K., Development of the high sensitive bioassay system for analysis of bone metabolism using the regenerating scales. 2010 Korea-Japan Joint Research Project Symposium. "Aging and Environment", 2010. 9. 2, Busan, Korea.
- 10) 唐 寧，亀田貴之，鳥羽 陽，早川和一，中国北京における大気中多環芳香族炭化水素の推移，第 51 回大気環境学会年会，2010. 9. 8-10，大阪.
- 11) 安積愛理，亀田貴之，松木 篤，唐 寧，鳥羽 陽，早川和一，黄砂粒子表面における多環芳香族炭化水素のニトロ化と越境汚染の可能性，第 51 回大気環境学会年会，2010. 9. 8-10，大阪.
- 12) 片山裕規，後藤知子，亀田貴之，松木 篤，唐 寧，鳥羽 陽，早川和一，日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノンの濃度の測定，汚染レベルの比較ならびに発生要因の検討，第 51 回大気環境学会年会，2010. 9. 8-10，大阪.
- 13) 中瀬久淑，木下千尋，谷口 昇，川西琢也，唐 寧，亀田貴之，鳥羽 陽，早川和一，環日本海域における多環芳香族炭化水素の分布・輸送の解析，フォーラム 2010：衛生薬学・環境トキシコロジー，2010. 9. 9-10，東京.

- 14) 細住 智恵美, 鳥羽 陽, Thaneeya Chetiyankornkul, 唐 寧, 亀田貴之, 早川 和一, 親水和相互作用クロマトグラフィー／タンデム質量分析法による尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の分析, フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010. 9. 9-10, 東京.
- 15) 鳥羽 陽, 矢部和昭, 細住智恵美, Thaneeya Chetiyankornkul, 唐 寧, 亀田貴之, 早川 和一, メトキシフェノール類をバイオマーカーとした木材燃焼煙の曝露評価, フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010. 9. 9-10, 東京.
- 16) Li, Y., Araki, Y., Tang, N., Toriba, A., Kameda, T., Hayakawa, K., On-line concentration and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in small volume seawater samples with HPLC with fluorescence detection, フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010. 9. 9-10, 東京.
- 17) 中野 淳, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 田渕圭章, 高崎一郎, 古澤之裕, 近藤 隆, 服部 淳彦, 笹山雄一, 早川和一, 水酸化した多環芳香族水素類 (4-hydroxybenz[a]anthracene) の魚の骨代謝に対する作用, フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010. 9. 9-10, 東京.
- 18) 安間麻莉, 李 英, 中瀬久淑, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一, 海洋中多環芳香族炭化水素類の分析法の開発, 日本分析化学会第 59 回年会, 2010. 9.15-17, 仙台.
- 19) Hayakawa, K., Behaviors of polycyclic aromatic hydrocarbons in East Asia. The 4th International Symposium on Environment of Rim of the Japan/East Sea, 2010. 10. 18-19, Jeju, Korea.
- 20) Hong, C-S., Seo, K-J., Park, S-H., Jung, W-S., Lee, D-I., Iwasaka, Y., Hayakawa, K., Characteristics of Atmospheric Aerosol at Ullengdo, Korea in 2009. The 2nd Korea-Japan Symposium on Environmental Chemistry, 2010. 11. 3-5, Soul, Korea.
- 21) Yamada, M., Zhang, D., Iwasaka, Y., Shi, G., Hayakawa, K., Vertical Distribution of Dust and Sulfate particles over Asian Dust Sources. The 2nd Korea-Japan Symposium on Environmental Chemistry, 2010. 11. 3-5, Soul, Korea.
- 22) 杉本直樹, 田原麻衣子, 多田敦子, 久保田 領志, 清水久美子, 山崎 壮, 河村葉子, 合田幸広, 西村哲治, qNMR に基づく有機化合物の微量分析の検討, 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会, 2010. 11. 11-12, 兵庫.
- 23) 奈良雅之, 服部淳彦, 大西晃宏, 赤塚陽子, 鈴木信雄, 松田准一, 再生ウロコの振動分光学研究, 平成 22 年度日本分光学会年次講演会, 2010. 11. 18-20, 京都.
- 24) 中野 淳, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 鳥羽 陽, 早川和一, 多環芳香族水素類の魚の骨代謝に対する作用, 平成 22 年度日本薬学会北陸支部第 122 回例会, 2010. 11. 21, 石川.
- 25) Hayakawa, K., Tang, N., Izaki, A., Kameda, T., Toriba, A., Atmospheric pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in East Asia. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010.12.15-20, Hawaii, USA.
- 26) Sugimoto, N., Tahara, M., Kubota, R., Shimizu, K., Hayakawa, K., Nishimura, T.: Development of a novel quantitative GC/MS using multidimensional property database. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010.12.15-20, Hawaii, USA.
- 27) Sato, K., Inomata, Y., Kajino, M., Ueda, H., Hayakawa, K., Tang, N., Kurokawa, J., Model simulation of atmospheric concentrations and

- depositions of polycyclic aromatic hydrocarbons and persistent organic pollutants in East Asia. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010.12.15-20, Hawaii, USA.
- 28) 早川和一, 中瀬久淑, 洪天祥, 鳥羽陽, 亀田貴之, 川西琢也, 日本海の多環芳香族炭化水素類の濃度分布調査, 第45回日本水環境学会年会, 2011.3.18-20, 札幌.
- 29) 谷内口孝治, 鈴木信雄, 早川和一, 無機水銀は魚のウロコの骨芽細胞と破骨細胞の活性を抑制する, 第45回日本水環境学会年会, 2011.3.18-20, 札幌
- 30) 戸次加奈江, PAHの生体影響に対し輸送及び生体内代謝がどの様に関与しているのか, 日本薬学会第131年会, 2011.3.28-31, 静岡.
- 31) 片山裕規, 亀田貴之, 後藤知子, 鳥羽陽, 唐寧, 早川和一, 日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノン濃度, 日本薬学会第131年会, 2011.3.28-31, 静岡.
- 32) 旭美樹, 鳥羽陽, 外山喬士, 熊谷嘉人, 亀田貴之, 唐寧, 早川和一, 活性酸素を生成する9,10-phenanthrenequinoneの尿中代謝物の同定と定量, 日本薬学会第131年会, 2011.3.28-31, 静岡.
- 33) 濱寛貴, 伊崎陽彦, 徳田貴裕, 唐寧, 亀田貴之, 鳥羽陽, 早川和一, 多環芳香族炭化水素類による東アジア諸国の大気汚染の変遷, 日本薬学会第131年会, 2011.3.28-31, 静岡.
- 34) 立松路也, 唐寧, 亀田貴之, 鳥羽陽, 早川和一, 立山における多環芳香族炭化水素類汚染の実態, 日本薬学会第131年会, 2011.3.28-31, 静岡.
- 35) 鳥羽陽, 竹内直樹, 田村憲治, 呉慶, 董麗君, 張雪梅, 亀田貴之, 唐寧, 早川和一, ディーゼル排ガス曝露指標を指向したヒト尿中1-ニトロピレン代謝物の測定, 日本薬学会第131年会, 2011.3.28-31, 静岡.
- 36) 亀田貴之, 安積愛理, 松木篤, 唐寧, 鳥羽陽, 早川和一, 越境輸送中の黄砂粒子表面におけるニトロ多環芳香族炭化水素の二次生成, 日本薬学会第131年会, 2011.3.28-31, 静岡.
- 37) 川部季美, 中野淳, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 亀田貴之, 鳥羽陽, 早川和一, 多環芳香族炭化水素類がキンギョの再生ウロコに及ぼす影響の*in vivo*解析, 日本薬学会第131年会, 2011.3.28-31, 静岡.
4. 招待講演
- 1) Sugimoto, N., Innovation of Analytical Technique for Food Chemistry and Safety. 第10回国際計量標準シンポジウム, 2010.5.26, 東京.
- 2) 杉本直樹, qNMRを用いた有機化合物の絶対定量法の開発と実用化に関する研究, 日本食品化学学会第16回総会学術大会, 2010.6.9-10, 大阪.
- 3) 杉本直樹, 定量NMRの食品分析への応用, 東京コンファレンス2010, 2010.9.1-3, 千葉.
- 4) 早川和一, 化学物質による海洋汚染の現状と課題, 第43回安全工学研究発表会オーガナイズドセッション, 2010.11.11, 東京.
- 5) Hayakawa, K., Contribution of International Monitoring Network to Environmental Preservation in East Asia, The 17th Asian Symposium on Ecotechnology (ASET17), 2010.11.11, Kurobe, Toyama.
- 6) 早川和一, 環境汚染物質の国際共同研究を通じた衛生薬学教育, 熊本大学薬学部第4回エコファーマシンポジウム, 2011.2.8, 熊本.

5. 学会賞等

- 1) 杉本直樹, qNMR を用いた有機化合物の絶対定量法の開発と実用化に関する研究. 日本食品化学学会奨励賞受賞, 2010.

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の構造活性相関に基づく毒性評価システム
に関する研究
平成 22 年度分担研究報告書

エストロゲン受容体への作用
—酵母 two-hybrid 法を用いた多環芳香族炭化水素及びその酸化的代謝物の
エストロゲン様/抗エストロゲン活性—

研究分担者 早川 和一 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 教授

研究要旨

PAH類のようにステロイド系ホルモン受容体に結合してかく乱作用を発現する医薬品や化学物質に焦点を合わせ、その毒性発現の有無を予測可能とする方法として、酵母two-hybrid法によるエストロゲン様/抗エストロゲン作用試験構造に基づく一次スクリーニング法、並びに魚鱗を用いる二次スクリーニング法を組み合わせた方法を完成することを最終目的とし、本分担研究は、ステロイド系ホルモン受容体に結合してかく乱作用を発現する可能性があるPAH類及びその酸化体類（OHPAH 65種、PAHQ 20種、PAHK 9種）を対象として、毒性指標として酵母two-hybrid法を用いたエストロゲン様/抗エストロゲン作用の強さを求め、細井の分担研究より得られる上述の対象化合物の構造に関わる物理学的パラメータを総合して構造活性相関を解析して、毒性を発現する構造要件を明らかにすることを目的とした。その結果、PAH及びPAHKはいずれの活性も示さなかったが、OHPAHとPAHQのいくつかはエストロゲン様活性または抗エストロゲン活性を示した。水酸基以外のキノン体のように官能基に酸素を持つことででもERを介するエストロゲン様活性や抗エストロゲン活性を発現することが初めて示された。さらに、強い活性を示すOHPAH とPAHQは、環数、L/B比及びO-H distanceの3つの構造パラメータがE2の値と近い狭い範囲にあることから、明確な構造活性相関のあることが明らかになった。以上のことは、これら3つの構造パラメータの値から、未知のPAH酸化体類の活性の有無が予測可能なことを示唆している。

A. 研究目的

著者らはこれまで多環芳香族炭化水素（Polycyclic Aromatic Hydrocarbon: PAH）類の大気中の環境動態を詳細に解析し、ディーゼル排ガス粉塵（diesel exhaust particulate: DEP）や重油中に PAH 類が含まれることも明らかにしてきた。

DEP についてはこれまで、主に肺がんや慢性的な呼吸器疾患のリスクに注目が置かれてい

たが、近年では内分泌攪乱作用の点からも注目を集めるようになった。その中でも重要視されているのが男性生殖器能に及ぼす種々の影響である。DE を吸入した雄マウス及びラット、成長期のラットで精子産生の抑制が報告された。本研究室では、DEP 抽出物 (DEPE) の抗アンドロゲン作用について、アンドロゲンレセプター (AR) を安定導入したヒト前立腺がん PC3/AR 細胞を用いたルシフェラーゼレポータ

ージーンアッセイによる検討を行い、DEPE が抗アンドロゲン作用を持ち、その中には PAH のようにアрил炭化水素受容体 (AhR) のアゴニストとして作用するものや、AR アンタゴニストとして作用するものが存在することが明らかになった。これまで、DEPE 中の抗アンドロゲン物質の一つとして OHPhe (hydroxyphenanthrene) が同定され、個々の物質の評価により水酸化 PAH (hydroxyl polycyclic aromatic hydrocarbon: OHPAH) 類のいくつかに特に強い抗アンドロゲン活性が見られた。

そこで、本研究は PAH 類のようにステロイド系ホルモン受容体に結合してかく乱作用を発現する医薬品や化学物質に焦点を合わせ、その毒性発現の有無を予測可能とする方法として、酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン様/抗エストロゲン作用試験構造に基づく一次スクリーニング法、並びに魚鱗を用いる二次スクリーニング法を組み合わせた方法を完成することを最終目的とする。

この中であって、本分担研究は、ステロイド系ホルモン受容体に結合してかく乱作用を発現する可能性がある PAH 類及びその代謝物を対象として、毒性指標として酵母 two-hybrid 法を用いたエストロゲン様/抗エストロゲン作用の強さを求め、細井の分担研究より得られる上述の対象化合物の構造に関わる物理学的パラメータを総合して構造活性相関を解析して、毒性を発現する構造要件を明らかにすることを目的とする。そして、得られた情報を鈴木 of 分担研究に提供して、一次スクリーニング法を開発する。

B. 研究方法

1. 被検化合物

主な被検化合物は、2~6 環の USEPA 指定 16 PAH のうち蛍光特性を有する 15 化合物、その水酸化体 (OHPAH) 合計 65 化合物、PAH のキノン体 (PAHQ) 20 化合物、PAH のケトン

体 (PAHK) 9 化合物とした。Fig.1~4 には、それぞれの化合物名と略称、構造を示した。さらに、ビスフェノール A (BPA) 及びノニルフェノール (NP) も被検化合物とした。

2. 酵母の調製

細胞毒性の評価はコントロールベクター (pGBKT7-53 及び pGADT7-T) を導入した *Saccharomyces cerevisia* Y190 株 (以下 Y190p53-SV40LT) を用いた。

エストロゲン様及び抗エストロゲン活性の評価は ER リガンド結合ドメイン GAL4 の DNA 結合領域 (GAL4-DBD) と hER α の融合蛋白を産生するプラスミドと、GAL4 の転写活性化領域 (GAL4-AD) と ER のコアクチベーターである TIF2 の融合蛋白を産生するプラスミドを導入した *Saccharomyces cerevisia* Y190 株 (Y190ER) を用いて、以下の要領で行った。

SD 合成培地に Y190p53-SV40LT または Y190ER を植菌し、27°C で一晩培養した。この培養液を SD 合成培地によって適度に希釈したもの (600 μ L) に試料溶液 (6 μ L) を加えた後、27°C で 4 時間培養した。4 時間培養後、培養液を 14,000 rpm で 5 分間遠心分離した後に上清を除去した。沈渣に、Z-buffer に Zymolyase 20T を 1 mg/mL となるように加えた細胞溶解液を加えて激しく攪拌し、37°C で 20 分間放置した。20 分後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した ONPG solution (120 μ L) を細胞溶解液に加え、27°C で適度な黄色の発色を示すまで放置し、次いで 1 M Na₂CO₃ 溶液 (300 μ L) を加えて反応を停止させた。この反応液を 14,000 rpm で 5 分間遠心分離した後に、上清 (200 μ L) を 96 穴マイクロプレートに移し、プレートリーダー (Multiscan JX: サーモバイオアナリシスジャパン株式会社) で 405 nm における吸光度を測定した。