

Fig. 3 Time courses of atmospheric PAHs, NPAHs and TSP at Noto Peninsula in 2006 and 2007

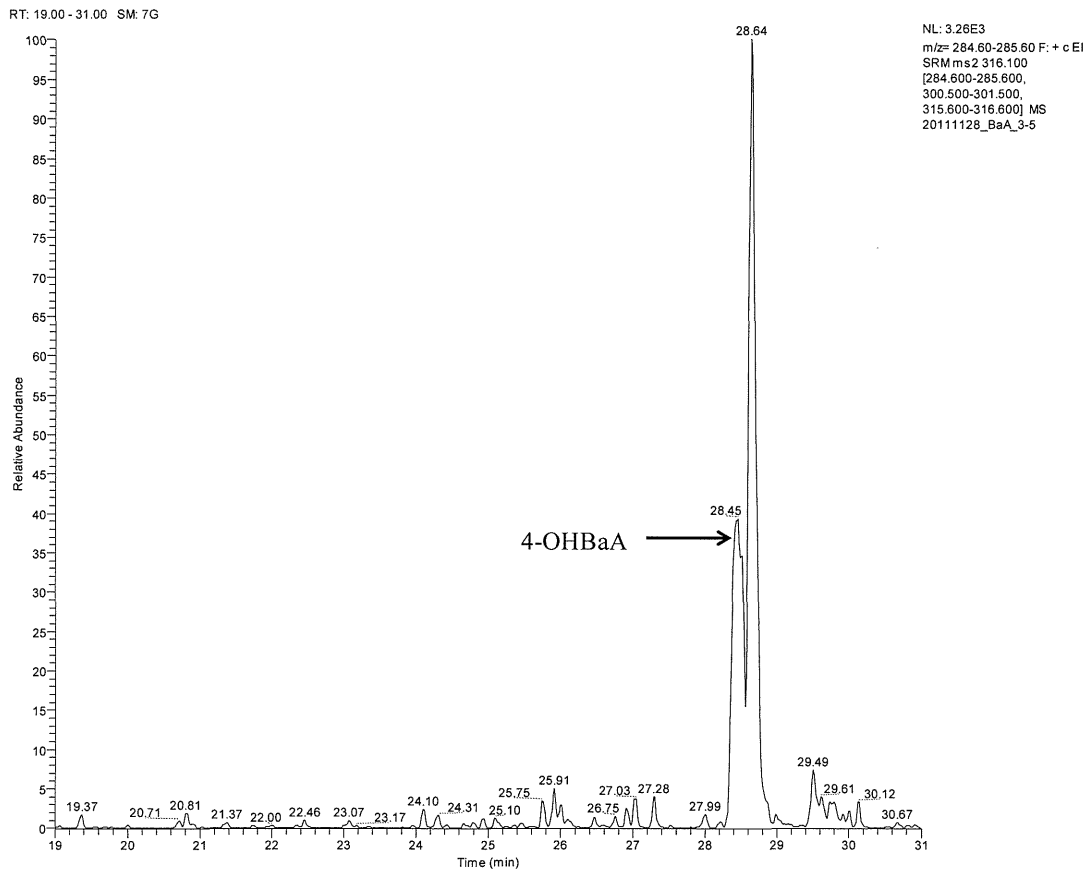


Fig. 4 A chromatogram of bile from goldfish after injection of BaA (10 ng/gBW)

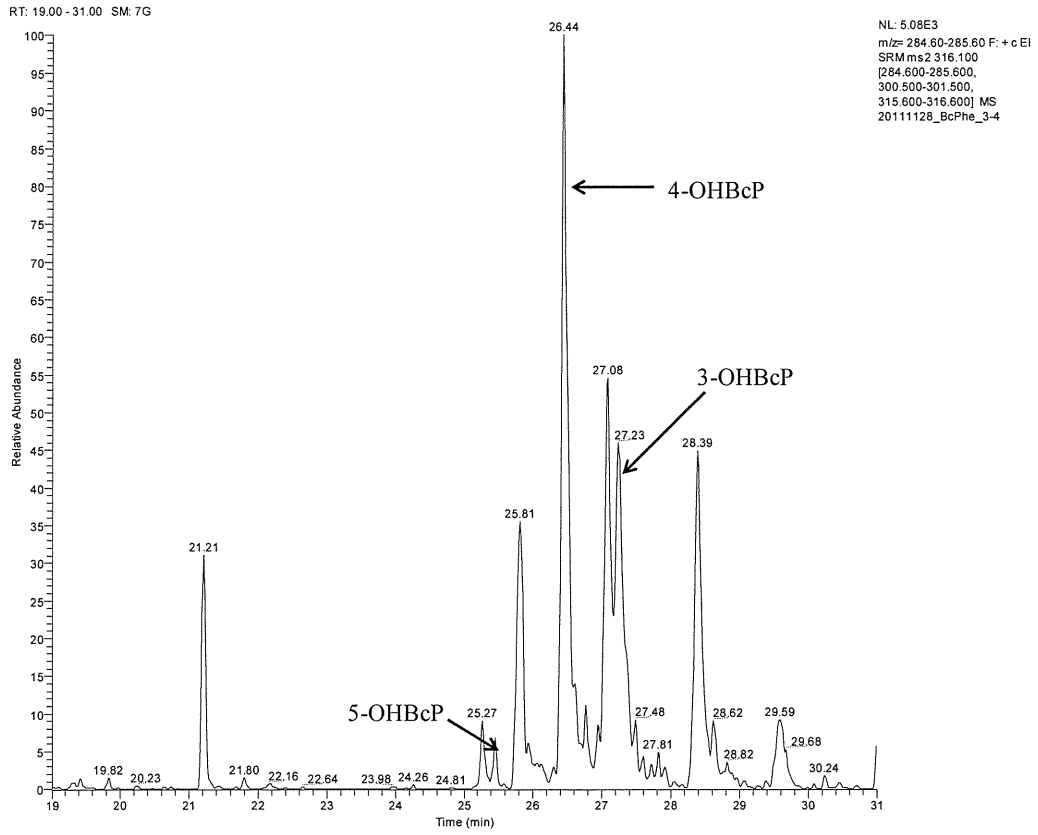


Fig. 5 A chromatogram of bile from goldfish after injection of BcP (10 ng/gBW)

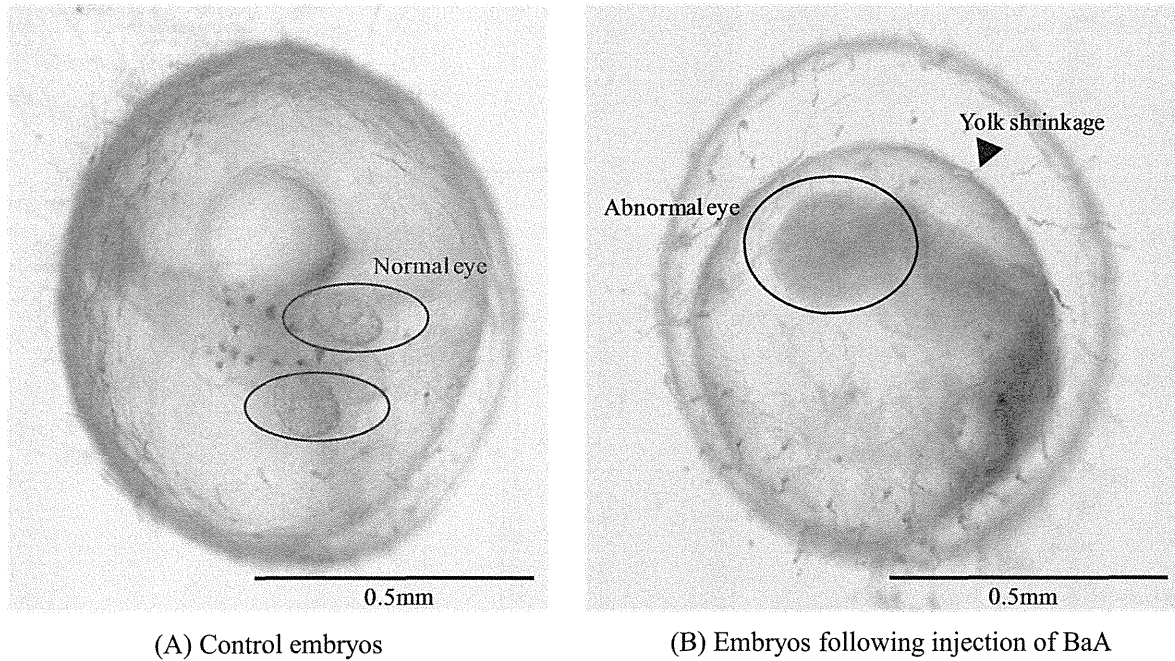


Fig. 6 Comparison of control embryos and PAH-injected embryos at 2dpf (day post-fertilization). (A) Control embryos : showing normal development, (B) Embryos following injection of BaA : showing yolk shrinkage and abnormal development, especially eyes and pigmentation.

Table 1 Calculated purities of samples from listed proton signals

PAH	Signal										Average (%, RSD %)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Anthracene	a) 4H, m	4H, m	2H, s									
	b) 7.25	7.82	8.29									
	c) 98.6	98.3	98.1									98.3 (0.2)
Fluoranthene	2H, m	2H, m	2H, d	2H, m	2H, d							
	7.17	7.45	7.68	7.79	7.85							
	98.5	99.0	99.7	99.4	99.0							99.1 (0.4)
Benz[ <i>a</i> ]anthracene	2H, m	1H, t	2H, m	1H, d	1H, d	1H, m	1H, m	1H, s	1H, d	1H, s		
	7.35	7.41	7.48	7.65	7.69	7.88	7.99	8.26	8.73	9.16		
	96.2	94.2	94.5	96.1	95.2	95.0	94.9	95.3	95.6	95.5		95.2 (0.6)
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthene	2H, m	1H, t	1H, t	1H, t	1H, m	3H, m	1H, s	1H, d	1H, d			
	7.22	7.45	7.50	7.60	7.81	7.92	8.23	8.39	8.57			
	99.3	98.6	98.0	99.4	99.1	99.5	100.0	99.3	98.9			99.1 (0.6)
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthene	2H, m	2H, t	2H, d	2H, m	2H, d	2H, s						
	7.29	7.50	7.70	7.77	7.94	8.26						
	99.0	98.3	97.6	98.6	98.2	98.0						98.3 (0.5)
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	1H, t	1H, t	2H, d+t	1H, d	1H, d	1H, d	1H, d	1H, d	1H, s	2H, d+d		
	7.59	7.64	7.79	7.85	7.95	8.09	8.14	8.19	8.42	8.96		
	89.5	90.6	91.0	90.7	90.7	89.5	89.0	89.6	89.9	91.6		90.2 (0.9)
Indeno[ <i>1,2,3-cd</i> ]pyrene	2H, t+t	2H, t+d	1H, d	2H, d+d	2H, d+d	2H, d+d	1H, s					
	7.25	7.90	7.95	8.01	8.12	8.30	8.57					
	91.1	88.7	89.9	89.8	90.9	89.2	90.8					90.1 (1.0)
Dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracene	2H, t	2H, t	2H, d	2H, d	2H, d	2H, d	2H, s					
	7.43	7.51	7.62	7.76	7.85	8.78	9.17					
	95.6	95.8	95.9	96.0	95.9	95.5	95.4					95.7 (0.2)
Benzo[ <i>g,h,i</i> ]perylene	2H, t	2H, d	2H, d	2H, d	2H, d							
	7.86	7.97	8.02	8.25	8.97							
	81.3	81.1	80.8	80.9	81.0							81.0 (0.2)

a) Upper column shows a number of proton with the spin-spin coupling (s: singlet, d: doublet, t: triplet, m: multiplet).

b) Middle column shows the signal region (ppm).

c) Lower column shows the purity of each signal (%).

Table 2 Summary of commercial reagent products purities calculated by qNMR and labeled percentage of peak area on chromatogram by manufacturer

PAH	Purity (%)			
	qNMR (n = 3 Ave., RSD %)		Manufacturer *	
Anthracene	98.6	0.54	> 99.5	GC
Fluoranthene	99.2	0.10	—	—
Benz[ <i>a</i> ]anthracene	95.3	0.21	—	—
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthene	99.3	0.17	99.9	HPLC/UV
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthene	98.2	0.27	> 99	—
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	90.2	0.04	> 96	HPLC
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pyrene	91.0	0.95	96.2	HPLC/UV
Dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracene	96.0	0.31	97.1	HPLC/UV
Benzo[ <i>g,h,i</i> ]perylene	76.1	6.62	—	—

\* The purity means the area percentage of main peak on chromatogram.

## 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）  
平成 24 年度分担研究報告書

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

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

本課題研究の主対象化合物である多環芳香族炭化水素（PAH）とニトロ多環芳香族炭化水素（NPAH）の環境動態と健康リスクの関係を考察した。これまでの環日本海域に位置する各都市の大気及び海水・河川水中の PAH、NPAH 濃度の継続調査より次のことが明らかになった。大気中には多種類の PAH、NPAH が含まれており、特に中国で極めて高濃度であった。この主要原因とし、産業（工場）や家庭（住居）における多量の石炭消費と石炭燃焼設備の大気汚染対策の遅れ等の影響が考えられた。一方、能登半島で大気試料を連続捕集すると、中国の冬季暖房期のみ大気中 PAH のみならず NPAH の濃度が上昇し、組成と後方流跡線の解析からも、これらが日本まで長距離輸送され、この間の日本海への負荷の可能性も示唆された。以上より、大気における PAH、NPAH の動態を明らかにすることができた。次に、昨年度に引き続き、PAH の代謝物である PAH 誘導体が示す毒性作用について調べた結果、NPAH の強い変異原性に加えて、PAH キノン体（PAHQ）の活性酸素種産生作用、PAHQ 及び PAH 水酸化体（OHPAH）によるエストロゲン受容体結合に関わる内分泌かく乱作用が明らかになった。さらに、これら内分泌かく乱作用と化合物の構造との間に相関性があることも明らかになった。また、これら NPAH や OHPAH、PAHQ が環境や生体中に存在することが明らかにされている。以上より、PAH のみでなく環境中に存在するこれ等 PAH 誘導体も、ヒトや動物の健康影響を引き起こす要因となっている可能性が考えられた。

A. 研究目的

多環芳香族炭化水素（PAH）類はヒトや野生生物への影響が懸念されると同時に、偏西風等によって長距離輸送されることから越境汚染を引き起こす可能性も危惧されている。また、

PAH は燃焼中に空気や有機物中の窒素と反応してニトロ化体（NPAH）を生成するほか、大気輸送中に様々な化学反応によって NPAH を含む PAH 誘導体を生成する。これ等 PAH 誘導体の中には、例えば NPAH が強い変異原性を示す



ように、多様な毒性を発現する可能性が危惧される。そこで昨年度に引き続いて、大気輸送とその間に起こる PAH 誘導化反応、及び生体内代謝により生成される PAH 誘導体を中心に、これらが示す毒性と生体影響との関わりについて、化学分析及び毒性解析の両側面から検討した

## B. 研究方法

中国東北地方からの冬季季節風の風下に位置する能登大気観測ステーション（石川県能登半島先端）において、大気浮遊粉塵をハイボリュームエアサンプラーで連続捕集した。フィルターは1週間毎に交換した。フィルターを秤量後、PAH、NPAH を有機溶媒で抽出し、さらに精製した。試料中の PAH、NPAH をそれぞれ HPLC 蛍光検出法、HPLC 化学発光検出法 (Tang et al., 2005) を用いて測定し、PAH、NPAH の大気中濃度の季節変動を明らかにした。さらに、中国東北地方の都市（瀋陽市）及び金沢市の大気試料塵の PAH、NPAH 測定結果と季節変動パターン及び濃度、組成を比較し、さらに能登大気観測ステーションで捕集された空気塊の後方流跡線を解析することによって、PAH、NPAH の長距離輸送の実態を明らかにした。

PAH 誘導体が示す毒性については、Ames 試験による変異原性作用の評価、酵母 two-hybrid アッセイ法を用いたエストロゲン様及び抗エストロゲン活性に関する内分泌かく乱作用の評価、そして、FOX アッセイ及び DTT アッセイによる活性酸素種 (ROS) 産生作用の評価を実施した。さらに、内分泌かく乱作用については、各種化合物の構造的及び物理化学的特徴との相関性についても検討した。

## C. D. 結果・考察

1. 能登半島先端で連続捕集した大気試料を用いた PAH、NPAH 長距離輸送の解析

PAH については Environmental Protection Agency (EPA) に環境汚染物質として測定すべき項目としてリストアップされた 16 種類のうち、毒性の観点からヒトの健康に影響を及ぼしやすいとされる 4 環以上の 6 種 PAH を選択した。能登大気観測ステーションの大気中 PAH の濃度は、いずれも 10 月中旬から上昇し翌年の 4 月中旬まで高濃度を維持し、その後低下した。その濃度レベルの差は 10 倍以上であった。この季節変動は毎年繰り返した。10 月中旬から 4 月中旬は、中国国内で石炭を暖房施設で使用する期間に一致する。PAH 組成の比較を行うと、冬季 (10 月中旬～4 月中旬) で PAH 濃度が高かった時の能登大気観測ステーションの大気組成は同季節の瀋陽市の大気組成と近似したが、金沢市の大気組成とは異なっていた。また、能登大気観測ステーションで捕集したこの時期の大気塊の後方流跡線は 2、3 日前に中国東北地方を通過していたが、それ以外の季節の大気塊は日本国内か日本海周辺を通過し、中国東北地方は通過しなかった。さらに、冬季の能登大気観測ステーションの大気中 PAH 濃度は、同時期の瀋陽市の濃度の 1/100～1/300、金沢市の 1/10 以下であった。

NPAH については、特に変異原性が強いことが示されている 11 種を分析対象とした。しかし、能登大気観測ステーションで大気粉塵を 1 週間捕集したフィルターの 1/4 を用いても、従来の HPLC 化学発光検出法では感度が不十分で、夏季の試料について 1-Nitropyrene だけでなく 2-Nitrofluoranthene や 2-Nitropyrene なども定量することは困難であった。そこで、フィルターの使用面積を 1/2 に増やし、さらに前処理方法を改良して定量下限の改善を図り、これを可能とした。本法を用いて、能登大気観測ステーシ

ヨンで連続捕集した大気試料のNPAHを定量した結果、いずれのNPAHもPAHと同様に10月中旬から上昇し翌年の4月中旬まで高濃度を維持し、その後低下する季節変動を繰り返していることが初めて明らかになった(Fig. 1)。また、NPAHの組成分析の結果も、PAHと同様に瀋陽市の大気組成に近似し、金沢市の大気組成とは異なっていた。以上より、冬季に中国東北地方で大量に生成したPAH、NPAHの一部は、日本まで長距離輸送されていることが明らかになった。またこの間に日本海に負荷する可能性も考えられた。

## 2. PAH 誘導体が示す毒性作用と構造活性相関の検討

PAH 誘導体(水酸化体(OHPAH) 64種、ケトン体(PAHK)及びキノン体(PAHQ) 27種)のエストロゲン様/抗エストロゲン作用について調べた結果、OHPAHの中に特に強いエストロゲン様/抗エストロゲン作用を示す化合物が存在し、これらは4環構造から成る化合物であり、さらに、受容体との結合親和性とも相関した結果を示した。また、これら活性作用を示す化合物について、分子上の構造特異性を示すL/B比(長軸Lと短軸Bの比;母核構造の違いを表す)及びO-H distance(水酸基及びケトン基の位置の違いを表す)の2つのパラメータを測定した結果、各パラメータの値は一定の範囲に存在することが分かった。そして、これら強い活性作用を示すOHPAHがERアゴニスト化合物として知られる17β-エストラジオール(E<sub>2</sub>)と類似した構造であることより、エストロゲン様活性物質の受容体との結合作用機序について検討した結果、これらはERのbinding pocket内で水素結合やファンデルワールス力などによりアミノ酸と共有結合を形成する作用機序

が推定された(Fig. 2)。一方、抗エストロゲン作用を示したPAHQに関しては、受容体との高い親和性を有しており、エストロゲンと競合してアンタゴニスト作用を示すものと考えられた。さらに、この様な構造活性相関が示されたことで、今後、毒性作用が明らかでない未知化合物についての活性化作用の予測も可能と考えられた。次に、PAHQに特有なROS産生作用について、各種PAHQが示す活性作用について検討した。本研究では、2~4環のベンゼン環で構成されるPAHQを対象とし、レドックスサイクルにおけるいくつかのエンドポイントについて評価を行った。その結果、特に1,2-NQ、9,10-PQ、5,6-CQ、B[c]P-5,6-Q等のオルト(o-)PAHQが強いROS産生作用を示すことが明らかとなった。これらは、実際、環境及び生体中からも検出される化合物であることや、大気粉塵試料がROS産生作用を示すこと等を考慮すると、これらo-PAHQは、ROS産生作用を通じて生体に悪影響を及ぼす可能性を秘めた重要な物質であることが初めて明らかになった。

## E. 結論

PAH誘導体を中心に、東アジアを取り巻く環境において、主要な大気汚染物質の一つであるPAH類は、OHPAHやPAHQなどのPAH誘導体へと姿を変えてヒトの健康を脅かす危険性がある。今後もPAH誘導体の毒性や環境中濃度、動態を追跡しなくてはならない大きな環境対象である。

## F. 参考文献

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**, 274-280 (2011)

Tang, N., Taga, R., Hattori, T., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K., Simultaneous determination of twenty-one mutagenic nitropolycyclic aromatic hydrocarbons by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Bioluminescence and Chemiluminescence Progress and Perspective*, ed. by A. Tsuji et al., World Science, London, pp. 441-444, 2005.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tnag, N., Yoda, Y., Otani, N., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K., Shima, M: Personal and atmospheric concentrations of ozone in southeastern Hyogo prefecture, Japan. *Chem. Pharm. Bull.*, **60** (8), 962-966 (2012).
- 2) Bekki, K., Takigami, H., Suzuki, G., Toriba, A., Tang, N., Kameda, T., Hayakawa, K.: Gene expression changes of phase I and II metabolizing enzymes induced by PAH derivatives. *Polycycl. Aromat. Comp.*, **32**(2), 141-153 (2012).
- 3) Kameda, T., Akiyama, A., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K.: Atmospheric formation of hydroxynitrofluoranthene from photochemical reactions of 2-nitrofluoranthene. *Polycycl. Aromat. Comp.*, **32**, 177-187 (2012).
- 4) Pham, C. T., Kameda, T., Toriba A., Tang, N., Hayakawa, K.: Characteristics of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in Hanoi-Vietnam, as a typical motorbike city. *Polycycl. Aromat. Comp.*, **32** (2), 296-312

(2012).

- 5) Chizhova, T. Hayakawa, K., Tischenko, P. Nakase, H., Koudryashova, Yu., Distribution of PAHs in the northwestern part of the Japan Sea. *Deep-Sea Research II*, **86-87**, 19-24 (2013).
- 6) Bekki, K., Toriba, A., Tang, N., Kameda, T., Hayakawa, K.: Biological Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Derivatives. *J. UOEH*, **35** (1), 17-24 (2013).
- 7) Pham, C. T., Kameda, T., Toriba A., Hayakawa, K.: Polycyclic atmospheric polycyclic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in particulates emitted by motorcycles. *Environ. Pollutiton*, **171** (1), (2013). in press

### 2. 学会発表

- 1) Chondo, Y., Nassar, H. F., Yoshida, S., Ying, L., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K.: Determination of Nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in rivers. 第21回環境化学討論会, 2012. 7. 11-13, 愛媛.
- 2) 亀田貴之, 安積愛理, 福島杏希, 唐寧, 松木篤, 小林茉緒, 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誘導体の二次生成. 第21回環境化学討論会, 2012. 7. 11-13, 愛媛.
- 3) 池盛文教, 亀田貴之, 早川和一, 中村俊夫: 輪島におけるPM1.1の化学組成と炭素安定同位体. 第53回大気環境学会年会, 2012. 9. 12-14, 神奈川.
- 4) 猪股弥生, 梶野瑞王, 佐藤啓市, 大原利眞, 黒川純一, 唐寧, 早川和一, 植田洋匡, 大泉毅, 秋元肇: 北東アジアにおける粒子態PAHsのソース・レセプター解析. 第53回大気環境学会年会, 2012. 9. 12-14,

- 神奈川.
- 5) 酒井茂克, 芥川智子, 濱 寛貴, 早川和一 : 札幌市内の住宅地における大気浮遊粉じんの長期変動. 第 53 回大気環境学会年会, 2012. 9. 12-14, 神奈川.
  - 6) 唐 寧, 余田佳子, 黄 誠金, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一, 島 正之: 間接吸光検出イオンクロマトグラフィーによる個人オゾン曝露の評価. 第 53 回大気環境学会年会, 2012. 9. 12-14, 神奈川.
  - 7) 中村志歩, 早川和一, 亀田貴之, 嵐谷奎一, 鳥羽 陽: 多環芳香族炭化水素の光分解速度に基づく越境汚染指標の検討. 第 53 回大気環境学会年会, 2012. 9. 12-14, 神奈川.
  - 8) 福島杏希, 亀田貴之, 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特異的ニトロ化. 第 53 回大気環境学会年会, 2012. 9. 12-14, 神奈川.
  - 9) 亀田貴之, 片山裕規, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川和一: 黄砂表面における多環芳香族炭化水素酸化誘導体の二次生成. 第 53 回大気環境学会年会, 2012. 9. 12-14, 神奈川.
  - 10) 功刀正行, 鶴川正寛, 松村千里, 鈴木元治, 中野 武, 中瀬久淑, 吉田翔太, 洪 天祥, 唐 寧, 早川和一: アジア東岸海域における POPs 観測とその解析. 日本分析化学会第 61 年会 特別シンポジウム: アジアの環境汚染を測る-分析化学が果たすべき役割は?- , 2012. 9. 19. 石川.
  - 11) 唐 寧, 島 正之, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一: 東アジアの都市における大気中多環芳香族炭化水素類の汚染とその推移. 日本分析化学会第 61 年会 特別シンポジウム: アジアの環境汚染を測る-分析化学が果たすべき役割は?- , 2012. 9. 19. 石川.
  - 12) 末松 千賀子, 唐 寧, 亀田 貴之, 鳥羽陽, 早川和一: 土壌中の多環芳香族炭化水素類及びニトロ多環芳香族炭化水素類の分析法の開発と実試料への応用. 日本分析化学会第 61 年会, 2012. 9. 19, 石川.
  - 13) 北 将大, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一: GC-MS/MS を用いた多環芳香族炭化水素キノン類の一斉分析法の開発と大気粉塵試料への適用. 日本分析化学会第 61 年会, 2012. 9. 19, 石川.
  - 14) 鳥羽 陽, 旭 美樹, 唐 寧, 亀田貴之, 早川和一: 活性酸素種を生成する多環芳香族炭化水素キノン誘導体のヒト尿中代謝物の測定. 日本分析化学会第 61 年会, 2012. 9. 21, 石川.
  - 15) Pham, C. T., Kameda, T., Toriba A., Hayakawa, K.: Polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in motorcycle exhaust particulates and atmosphere in Hanoi, Vietnam. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012. 10. 25-26, 名古屋.
  - 16) 末松千賀子, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一: 東アジア 4 ヶ国 (日本, 中国, 韓国, ロシア) における大気中多環芳香族炭化水素及びニトロ多環芳香族炭化水素の最近 14 年間の変動とその要因. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012. 10. 25-26, 名古屋.
  - 17) 吉田翔太, Yvonne Chondo, 唐 寧, 洪 天祥, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一: 日本海域における多環芳香族炭化水素類の動態. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012. 10. 25-26, 名古屋.
  - 18) 旭 美樹, 細住智恵美, 鳥羽 陽, Thaneeya Chetianukornkul, 唐 寧, 亀田貴之, 早川和一: タイ住民を対象とした多環芳香族炭化水素キノン誘導体の尿中代謝物測定. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロ

- ジー, 2012. 10. 25-26, 名古屋.
- 19) Chuesaard, T., Toriba, A., Chetiyankornkul, T., Kameda, T., Hayakawa, K.: Influence of biomass burning on the levels of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives in Chiang Mai, Thailand. 2nd Annual meeting of the international society of exposure science (ISES2012), 2012. 10. 28-11. 2, Seattle, USA.
  - 20) Toriba, A., Asahi, M., Tang, N., Kameda, T., Hayakawa, K.: Identification and Quantification of the Urinary Metabolites of 9, 10-phenanthrenequinone Associated with Producing Reactive Oxygen Species. 2nd Annual meeting of the international society of exposure science (ISES2012), 2012. 10. 28-11. 2, Seattle, USA.
  - 21) 多田隼也, 早川和一, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 井上嘉則, 加藤敏文: 親水性臭気化合物を用いた新規繊維状吸着剤の吸着特性評価. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会, 2012. 11. 18, 富山.
  - 22) 中村香耶, 山田 丸, 吉田翔太, 亀田貴之, 小林史尚, 松木 篤, 築城寿長, 檜垣誠吾, 岩坂泰信, 早川和一: フタロシアニン担持繊維の多環芳香族炭化水素吸着能及び微生物増殖抑制能評価. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会, 2012. 11. 18, 富山.
  - 23) 袴田真理子, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一: 能登における多環芳香族炭化水素及びニトロ多環芳香族炭化水素の大気中濃度の季節変動とその要因解析. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会, 2012. 11. 18, 富山.
  - 24) 北 将大, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一: GC-MS/MS による多環芳香族炭化水素キノン類の一斉分析法の開発と大気粉塵試料の分析. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会, 2012. 11. 18, 富山.
  - 25) 藤田浩祐, クウリバリ スレイマン, 高橋亮平, 貴志茜衣, 坂本みずほ, 松井元希, 長谷井友尋, 池盛文数, 盛山哲郎, 木戸瑞佳, 世良暢之, 船坂邦弘, 浅川大地, 鳥羽陽, 早川和一, 唐 寧, 趙 利霞, 鄭 海泳, 若林敬二, 渡部仁成, 渡辺徹志: 東アジア地域 5 地点における大気粉塵の化学成分及び変異原性の比較. 日本環境変異原学会第 41 回大会, 2012. 11. 29-30, 静岡.
  - 26) 宇於崎和香, 北 将大, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一: GC-MS/MS によるたばこ煙中の多環芳香族炭化水素キノン類 (PAHQs) の測定. 日本薬学会第 133 年会, 2013. 3. 27-30, 神奈川.
  - 27) Chuesaard, T., 鳥羽 陽, Chetiyankornkul, T., 亀田貴之, 早川和一: Influence of biomass burning on the levels of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives in Chiang Mai, Thailand. 日本薬学会第 133 年会, 2013. 3. 27-30, 神奈川.
  - 28) 小林茉緒, 亀田貴之, 福島杏希, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川和一: 黄砂発生時に中国北京で観測されたニトロ多環芳香族炭化水素の大気内二次生成. 日本薬学会第 133 年会, 2013. 3. 27-30, 神奈川.
  - 29) 袴田真理子, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一: 能登における多環芳香族炭化水素及びニトロ多環芳香族炭化水素の長距離輸送解析. 日本薬学会第 133 年会, 2013. 3. 27-30, 神奈川.
  - 30) Pham, C. T., 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一: Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in particulates between motorcycle and automobile exhausts. 日本薬

学会第 133 年会, 2013. 3. 27-30, 神奈川.

3. 招待講演

- 1) 早川和一: 東アジアの大気・海洋中の多環芳香族炭化水素類の挙動と毒性. 日本分析化学会第 61 年会 環境分析研究懇談会, 2012. 9. 19. 石川.
- 2) Hayakawa, K.: Change of environmental pollution in east Asia over the last 14 years

from view point of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. The 6th Shanghai International Symposium on Analytical Chemistry, 2012. 10. 16-18, Shanghai, China.

- 3) 早川和一: 環日本海域の PAH 類の汚染. 2013 年度日本海洋学会春季大会シンポジウム; 日本海および周辺海域でいま進みつつある環境の変化: その驚くべき実態に迫る!, 2013. 3. 25. 東京

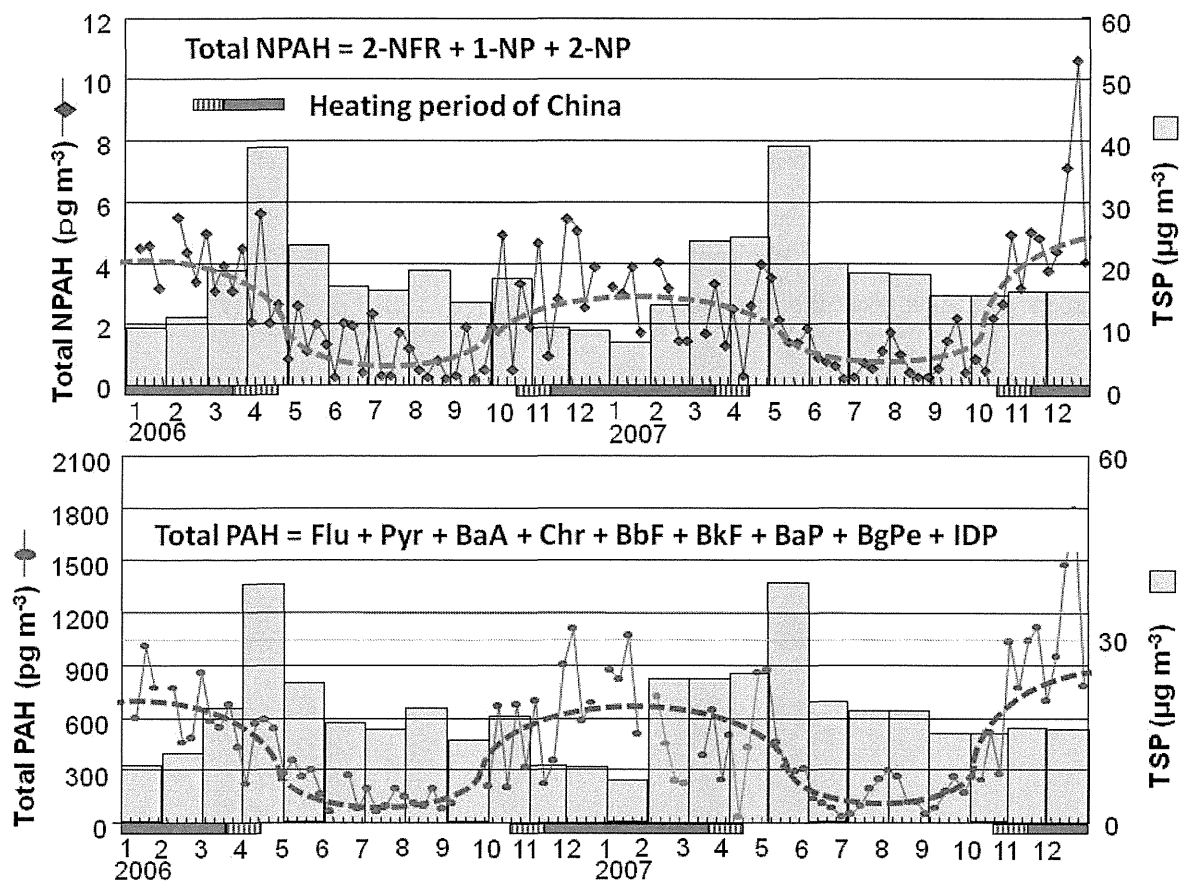


Fig. 1 Time courses of atmospheric PAHs, NPAHs and TSP at Noto Peninsula in 2006 and 2007

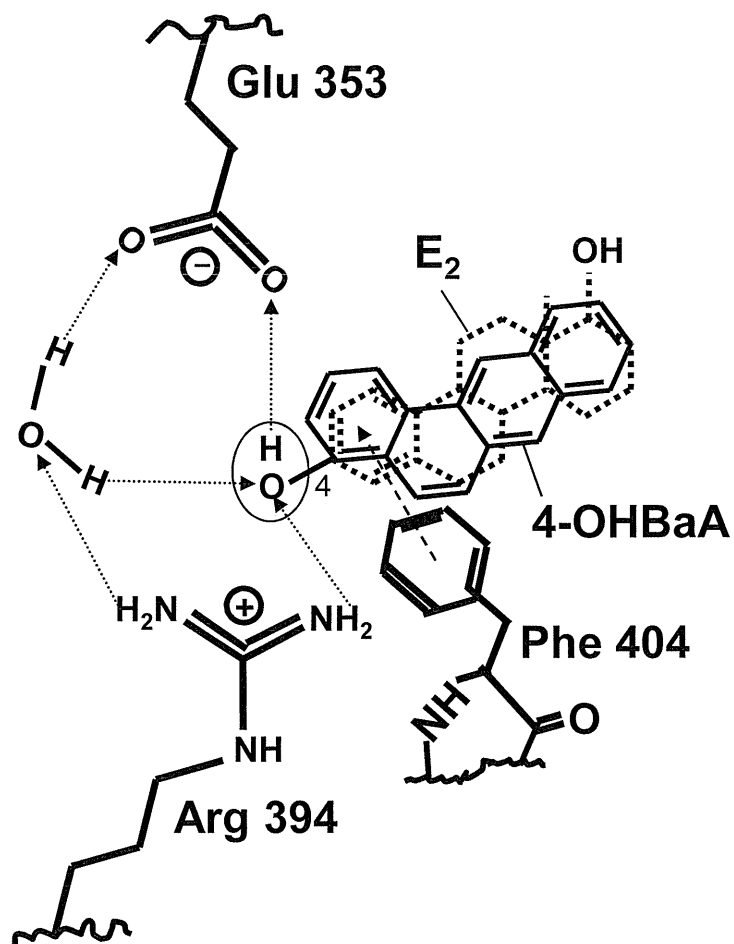


Fig. 2 A possible binding of 4-OHBaP to hER



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 24 年度分担研究報告書

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

構造活性相関の解析  
—多環芳香族炭化水素酸化体の分子構造と活性との関係—

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

研究要旨

酵母 two-hybrid アッセイ法を用いたエストロゲン様/抗エストロゲン活性を検討した多環芳香族炭化水素 (PAH) の酸化体について、一次スクリーニングの為のパラメータ抽出の可能性を検討した。PHA キノン体および PHA ケトン体 29 種について SCIGRESS を用いて 14 種のパラメータを算出し、相対エストロゲン様活性 ( $REP_E$ )、相対抗エストロゲン活性 ( $REP_{AE}$ ) および相対結合活性 (RBA) との相関を調べたところ、可能性のある 4 つのパラメータ (heat of formation, ionization potential, logP, polarizability) が浮かび上がってきた。しかしながら、活性酸素種 (ROS) 産生および consumption of SH group との相関からは可能性のあるパラメータは浮かび上がってこなかった。また、CIMPL を用いて、分子構造と活性値を見ながら、活性を上げるのに必要と思われるフラグメント構造の抽出をフラグメント QSAR 解析(QFAR)および SAL 解析により行った。その結果、RBA については、末端にキノン構造を持つものがより高い活性を示すことが分かった。また、 $REP_{AE}$  については CQ 型骨格で 5,6 位  $\alpha$ -キノイド構造が、 $REP_E$  については RBA とは異なり、estrone 骨格や 5 環性 BaP 型骨格で 2 つのカルボニル基を有することが活性を上げるためのフラグメントとして抽出された。

A. 研究目的

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、受容体結合試験法で結合親和性が見られた PAH のキノン体 (PAHQ) を中心にパラメータによる一次スクリーニングの可能性および活性発現において重要となるフラグメント構造の抽出について検討した。

B. 研究方法

計算化学統合プラットフォーム SCIGRESS を用いて分子力場計算 (MM3) を行い、次いで半経験的分子軌道計算 (PM3) により構造最適化後 14 種のパラメータ (双極子モーメント、電子親和性、生成熱、イオン化ポテンシャル、log P、polarizability、部分電荷、L/B 値など) の計算を行い、活性 (相対エストロゲン様活性:  $REP_E$ 、相対抗エストロゲン活性:  $REP_{AE}$ 、RBA、ROS、consumption of SH group) との相関を検討した。更に分子構造や物理化学的特性、活性値などの

データを可視化・解析するソフトウェア CIMPL を用いてフラグメント QSAR 解析 (QFAR) と SAL 解析を行い、活性発現において重要な役割を果たしているフラグメント構造の抽出を行った。

### C. D. 結果・考察

#### 1. 1次スクリーニングの可能性について

##### 1-1. 活性 (ROS, consumption of SH group) とパラメータとの相関

各パラメータについてリミットを設定した (Table 1 のうすい灰色で示した部分)。しかしながら強い活性を示した化合物と重なった箇所はなかった。このデータを視覚的に見やすくするために、レーダーチャートを作成した (Fig. 1-3)。2つの活性とも強かった場合は黒四角、うち1つのみ強い場合は灰色で示した。12種のパラメータのレーダーチャートから明らかのように、活性とパラメータの大きさとの間に明確な相関は認められなかった。

##### 1-2. 活性 ( $REP_E \times 10^4$ , $REP_{AE}$ , RBA) とパラメータとの相関

各パラメータについてリミットを設定した (Table 2 のうすい灰色で示した部分)。更に強い活性を示した化合物と重なった箇所は濃い灰色で表わした。このデータを視覚的に見やすくするために、レーダーチャートを作成した (Fig. 4-6)。活性が強かった場合は黒四角で示した。12種のパラメータのレーダーチャートから明らかのように、4つのパラメータ (生成熱, イオン化ポテンシャル,  $\log P$ , 分極率) に明確な相関が認められた。生成熱では 40~60 kcal/mol に、イオン化ポテンシャルでは -8.5~-9.0 eV に、 $\log P$  では 3.5~4.0 に、分極率では 25~35 Å に強い活性が認められた。

#### 2. 活性発現に必要なフラグメント構造の抽出

##### 2-1. RBA におけるフラグメントの抽出

分子構造の類似度に基づいてクラスタリングを行い3つのグループ (第一クラスター~第三クラスター) に分かれた (Fig. 7)。第一クラスターに活性を持つものが集まる傾向が認められた。そこでこれらのうち、活性値が示されているものについてフラグメント QSAR (QFAR) を実行した (Fig. 8)。求められた係数が+の場合、活性が上がるフラグメントであると言える。Fig. 9 は実測値 (actual) と予測値 (calculated) をプロットしたものであり、QFAR 解析の結果から  $R^2$  が 0.990 であり精度は極めて良かった。さらに第一クラスターに属する分子のうち、活性値を持つもの 37 種について SAL 解析を行った。

マトリックス図 (Fig. 10-(A)) は縦と横に同じ順に化合物が並んでおり、外側のバーは活性値を表し、色が濃いと高活性を意味する。右表 (Fig. 10-(B)) はスコアが高い組合せの分子構造を示した表で、(a) で囲んだ化合物は高活性、(b) で囲んだ化合物は低活性を示す。結果的に、末端が *p*-キノン構造となっているものに高い活性が認められた。

##### 2-2. $REP_E \times 10^4$ におけるフラグメントの抽出

QFAR 解析の結果、estrone 骨格や 5 環性 BaP 型骨格で2つのカルボニル基を有する化合物に高い活性が認められた (Fig. 11)。Fig. 12 は実測値 (actual) と予測値 (calculated) をプロットしたものであり、QFAR 解析の結果から  $R^2$  が 0.523 であり精度は良くなかった。Fig. 13 は SAL 解析の結果である。(a) で囲んだ化合物が  $REP_E \times 10^4$  高活性なものであり、QFAR 解析の結果と同様に estrone 骨格や 5 環性 BaP 型骨格で2つのカルボニル基を有する化合物に高い活性が認められた。

### 2-3. REP<sub>AE</sub>におけるフラグメントの抽出

RBA 活性においては、*p*-キノン構造を末端に持つものの方がより高い活性を示したが、REP<sub>AE</sub>では真ん中よりの環に *o*-キノン構造を持つものにも活性が認められた (Fig. 14)。Fig. 15 は実測値 (actual) と予測値 (calculated) をプロットしたものであり、QFAR 解析の結果から R<sup>2</sup> が 0.912 でありそれなりの精度を持つと考えられる。Fig. 16 は SAL 解析の結果である。A で囲んだ化合物が REP<sub>AE</sub> 高活性なものであり、QFAR 解析の結果と同様に真ん中よりの環に *o*-キノン構造を有するものが高活性を示した。B で囲んだ化合物は低活性を示したものである。

### E. 結論

活性 (ROS, consumption of SH group, REP<sub>E</sub> × 10<sup>-4</sup>, REP<sub>AE</sub>, RBA) とパラメータとの相関について調べた結果、REP<sub>E</sub> × 10<sup>-4</sup>, REP<sub>AE</sub>, RBA については 1 次スクリーニングのために利用可能な 4 つのパラメータ (生成熱, イオン化ポテンシャル, log P, 分極率) が浮かび上がってきた。つまり REP<sub>E</sub> × 10<sup>-4</sup>, REP<sub>AE</sub>, RBA については活性があるかどうかの判断をパラメータ値に基づ

いてできる可能性が示された。

RBA におけるフラグメントの抽出の試みにおいては末端が *p*-キノン構造となっているものに高い活性が認められた。

















REP<sub>E</sub> × 10<sup>-4</sup> におけるフラグメントの抽出の試みにおいてはデータの精度はよくないものの、estrone 骨格や 5 環性 BaP 型骨格で 2 つのカルボニル基を有する化合物に高い活性が認められた。

REP<sub>AE</sub> におけるフラグメントの抽出の試みにおいては、*p*-キノン構造を末端に持つもののみならず、真ん中よりの環に *o*-キノン構造を持つものにも活性が認められた。

以上のことから、REP<sub>E</sub> × 10<sup>-4</sup>, REP<sub>AE</sub>, RBA については生成熱、イオン化ポテンシャル、log P、分極率の 4 つのパラメータの値に基づいて、活性の有無を予測する可能性が示された。

また、REP<sub>E</sub> × 10<sup>-4</sup>, REP<sub>AE</sub>, RBA の活性については、QFAR 解析および SAL 解析よりそれらの活性を上げるのに必要と考えられるフラグメントを抽出することができた。

Table 1 Structures, activities and parameters

No	Structure	ID	Ring No.	RMS	Consumption of SH groups	Dipole moment (Debye)	electron affinity (eV)	heat of formation (kcal/mol)	ionization potential (eV)	log P	polarizability (angstrom <sup>3</sup> )	atom-ary polarizability (angstrom <sup>3</sup> )	charge partial (charge, e)	density HOMO	density LUMO	electrophilic susceptibility	nucleophilic susceptibility	radical susceptibility	L/B ratio	O-H Distance	
1		Nap	2	88.7	-	0	0.575	45.201	-8.621	3.049	17.221	H13	0.151	0	0	0	0	0	1.333	0	
2		1,2-NQ	2	70.7	68.8	6.957	-0.416	10.368	-9.921	1.457	18.485	C9	0.384	0	0.114	0.047	0.225	0.136	1.246	7.354	O12-H14
3		1,4-NQ	2	109.3	70.1	1.995	2.456	2.725	-10.49	1.457	17.944	C7	0.498	0	0.117	0.007	0.232	0.119	1.144	6.049	O11-H14
4		Phe	3	108	-	0.027	0.689	61.741	-8.537	4.051	24.47	H19	0.153	0	0	0	0	0	1.572	0	
5		1,4-PQ	3	85.3	44.9	2.393	-0.228	24.334	-9.285	2.459	25.356	C11	0.506	0.002	0.109	0.004	0.216	0.11	1.367	8.368	O15-H17
6		9,10-PQ	3	176.1	87.7	6.883	-0.573	20.297	-9.587	2.459	25.286	C9	0.384	0	0.12	0.028	0.235	0.131	1.367	7.351	O16-H19
7		Ant	3	91	-	0	1.215	69.57	-8.036	4.051	25.563	H19	0.157	0	0	0	0	0	1.687	0	
8		1,4-AQ	3	79.7	55.9	3.331	-0.341	22.137	-9.368	2.459	25.602	C11	0.504	0.001	0.113	0.002	0.211	0.108	1.425	8.086	O15-H18
9		9,10-AQ	3	114	1.3	0	-0.519	9.42	-10.272	2.459	24.76	C7	0.509	0	0.112	0.004	0.218	0.111	1.439	6.024	O15-H18
10		Chr	4	95.7	-	0	0.976	80.351	-8.285	5.053	32.328	H23	0.154	0	0	0	0	0	1.831	0	
11		1,4-CQ	4	111.8	10.3	3.022	-0.257	41.083	-9.027	3.462	33.094	C15	0.509	0.002	0.11	0.003	0.214	0.108	1.624	10.259	O19-H22
12		5,6-CQ	4	143.4	67	6.681	-0.569	41.936	-9.076	3.462	33.086	C8	0.392	0.003	0.105	0.012	0.204	0.108	1.661	8.51	O19-H29
13		BcP-1,4-Q	4	89.9	9.5	2.652	-0.415	51.197	-8.969	3.462	32.544	C18	0.498	0.001	0.106	0.001	0.206	0.104	1.126	9.681	O19-H26
14		BcP5,6-Q	4	155.4	53.4	7.273	-0.534	47.25	-8.975	3.462	32.79	C12	0.384	0	0.09	0.007	0.178	0.092	1.108	9.296	O20-H24
15		BaA	4	102.1	-	0.059	1.146	84.72	-8.135	5.053	33.054	H23	0.158	0	0	0	0	0	1.694	0	
16		1,2-BAQ	4	105.2	12.1	0.703	-0.553	31.467	-9.151	3.462	32.412	C10	0.516	0.002	0.103	0.003	0.199	0.101	1.652	8.343	O20-H28

以上 -0.5以下 0以上 -0.5以下 2~4 以上 以上 以上