

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790135

研究課題名(和文)バイオミメティックな受容体とHPLCによる化学物質の環境リスク初期評価手法の構築

研究課題名(英文) Establishment of preliminary environmental risk assessment for chemicals with a biomimetic receptor and high-performance liquid chromatography

研究代表者

渡邊 栄喜 (Watanabe, Eiki)

独立行政法人農業環境技術研究所・その他部局等・主任研究員

研究者番号：30354129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト健康や生態系に及ぼす化学物質の影響を評価する際に利用されるエストロゲン活性値を、既存の高速液体クロマトグラフィーと人工的に作製できる疑似受容体分子インプリントポリマーを組み合わせ、スクリーニング的に予測する手法を確立した。確立したエストロゲン活性予測手法で得られた活性値は既存のバイオアッセイ法によるそれらと概ね同様の傾向を示した。すなわち、スクリーニング的にエストロゲン活性を予測する手法としては妥当であると結論できた。

研究成果の概要(英文)：A preliminary method of forecasting the estrogenic revitalization that is used to evaluate the influence of chemicals on human health or ecosystem was established by combining well-established high-performance liquid chromatography with a biomimetic receptor molecule, "molecularly imprinted polymer" that can be artificially created. The estimated values of the relative revitalization obtained from the proposed method and the well-established bioassay method used as a reference method in this study showed a roughly similar tendency. That is, it was concluded that the proposed method was appropriate as a technique for preliminarily forecasting the estrogenic revitalization.

研究分野：分析化学

キーワード：環境化学 分析化学 分子認識素子

## 1. 研究開始当初の背景

受容体、抗体、酵素などが持つ分子認識能は医学、薬学、農学などの幅広い研究場面で活用されている。これらの分子認識素子は、そもそも生体由来の機能性タンパク質であり、種々の利用場面での使用条件に幾つかの制約（例えば温度、pH など）が常に課せられる。近年、人工的に創製される分子認識素子、分子インプリントポリマー（MIP）が既述した機能性タンパク質の分子認識能に匹敵する新たな機能性分子として期待が高まっている。特に、MIP はその利用場面での使用条件が受容体などに比べて、制約が緩く、また、繰り返し利用による MIP の分子認識能への影響も少ないなどの優れた特性を示す。以上のことから、本研究では、MIP の潜在的な利用方法の開拓を目指すことを目的とした。

## 2. 研究の目的

ヒト健康や生態系に及ぼす化学物質の影響を解明するための初期のリスク評価では、エストロゲン活性が重要な指標に位置づけられている。本活性の評価は、ヒト乳ガン細胞増殖試験法など、生体機能を用いたバイオアッセイ法、魚類やほ乳類などを用いた動物試験によって実施されている。しかし、これらの評価方法は試験条件の厳密な設定、試験設備投資や維持管理に特別な配慮が要る。このような既存の評価方法が抱える課題と前項で述べた MIP の特性に着眼し、エストロゲン活性を指標とした化学物質のスクリーニング的な環境リスク初期評価手法を構築することとした。

## 3. 研究の方法

(1)  $17\beta$ -エストラジオール (E2) をテンプレート分子とする MIP (E2-MIP) の作製

エストロゲン活性予測手法開発の基盤となる E2-MIP を調製し、エストロゲン様物質の吸脱着材料を作製した。

(2) エストロゲン活性予測システムの構築

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に、自作の E2-MIP を充填したカラムを装着してエストロゲン活性予測システムを構築した。構築した予測システムで E2 およびエストロゲン様物質を注入した。E2 の保持時間に対するそれぞれの物質の保持時間の相対値をエストロゲン活性値とした。

(3) 構築した予測システムの妥当性の検討

上記(2)で求めたエストロゲン様物質の相対的なエストロゲン活性値の妥当性を評価するため、既存のバイオアッセイ法（酵素ソーハイブリッドアッセイ法）で得られた活性値（国立環境研究所のデータベースを利用）と比較した。

## 4. 研究成果

(1) E2-MIP の基礎的な性能評価

テンプレート分子である E2 と共に、メタクリル酸（テンプレート分子の部分構造を認識するための機能性モノマー）、エチレングリコールジメタクリレート（テンプレート分子の認識空間を維持させるための架橋剤）、ラジカル重合開始剤をジクロロメタンに溶解して、E2-MIP を作製した。作製方法として、バルク重合法および沈殿重合法を利用した。それぞれの重合法で、テンプレート分子非共存下でブランクポリマーも併せて作製し、テンプレート分子の非特異的吸着の有無についても検討した。

2mL 容チューブに秤量したブランクポリマー 10mg に、E2（ジクロロメタン溶液）を加えて、非特異的吸着の有無を検討した結果、E2 の殆どはブランクポリマーに吸着しないことが分かった。また、非特異的吸着はポリマーの重合方法に左右されなかった。次に、2mL 容チューブに秤量した E2-MIP 10 mg に、E2（ジクロロメタン溶液）を加えて、吸着平衡を検討した結果、E2 は E2-MIP の分子認識空間に速やかに吸着することが明らかとなった。

E2-MIP の再生利用による分子認識能への影響に関して、それぞれの重合方法で作製したポリマー 50mg を 3mL 容エンピティカラムに充填し、E2（ジクロロメタン溶液）の負荷洗浄（ジクロロメタン） E2 の溶出（メタノール） カラム再生（1%酢酸含有メタノール、ジクロロメタン）のサイクルを 50 回繰り返し行い評価した。沈殿重合法で作製した E2-MIP は、上記のサイクルをおよそ 30 回繰り返したが、負荷した E2 はいずれもメタノール中に回収された。しかし、その後は、徐々にジクロロメタンによる洗浄画分に E2 が検出されるようになり、50 回の再生利用で、およそ 40% の E2 が洗浄画分に検出された。すなわち、E2-MIP の分子認識能はおよそ 30 回程度の再生利用は可能だが、それ以上の再生利用では E2 に対する分子認識能が徐々に低下することが分かった。一方、バルク重合法で作製した E2-MIP についても同様の試験を試みたが、通液が非常に困難であった。当該重合法ではポリマー塊として産生させるため、重合反応が終了した後、ポリマー塊を破碎することが必要である。破碎したポリマーを篩い分けして、各試験に供するが、沈殿重合法とは異なり、重合反応時にポリマー径を制御することが困難で、回収されるポリマー径が不均質であることが主因であると考えられた。さらに、ポリマー塊の破碎は、分子認識空間の損失を引き起こすことが知られており、以後の試験に支障を来すことが考えられたので、沈殿重合法で作製した E2-MIP を活用することとした。

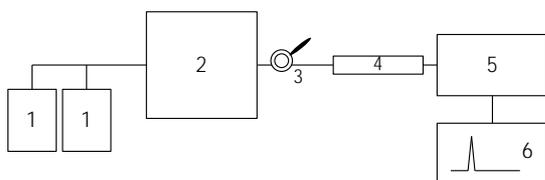
沈殿重合法で作製した E2-MIP のロット間差（4 ロット）について検討した。試験内容は上記の内容と同一で実施した。吸着平衡に

達する時間は各ロット共に、ほぼ同等であった。一方、再生利用による分子認識能への影響についても、上述の結果とほぼ同様で、30~40回の再生利用には堪えうる性能を有していたものの、それ以上の利用においては、徐々にその認識能が減少した。

以上の分子認識能を有する E2-MIP を次の試験に供することとした。

## (2) エストロゲン活性予測システムの構築および妥当性の検討

前項(1)で作製した E2-MIP を HPLC 用充填カラム化したものを既存の HPLC (ダイオードアレイ検出器搭載) に装着して、エストロゲン活性予測システムを構築した (図 1)。



1: 移動相 2: 送液ポンプ 3: インジェクタ 4: E2-MIP 充填カラム 5: ダイオードアレイ検出器 6: インテグレータ

図 1 エストロゲン活性予測システム

図 1 に示した予測システムに、エスと現活性を有する E2, エストリオール (E3), エストロンならびにエチニルエストラジオール (EE2) を注入し、それぞれの化合物の保持時間を求め、次式を用いて、相対的なエストロゲン活性値を算出した。

$$\text{相対的なエストロゲン活性(\%)} = (\text{被検物質の保持時間} \div \text{E2 の保持時間}) \times 100$$

確立したエストロゲン予測システムおよび上記の相対的なエストロゲン活性値の算出式を用いて得られた結果を表 1 に示す。

E2 のエストロゲン活性値に対するそれぞれの被検物質の相対値は、EE2 で 72%, エストロンで 31%, E3 で 64%であった。これらエストロゲン化合物の相対的な活性値を既存のバイオアッセイ法 (酵母ツーハイブリッドアッセイ法, 国立環境研究所のデータベースを利用) で示された活性値は、それぞれ EE2 で 56%, エストロンで 16%, E3 で 0.45%であり、両者を比較すると、E3 では乖離が認められたものの、他の 2 化合物の活性値は概ね同様に活性値の低下が認められた。一方、ビスフェノール A やノニルフェノールなど、エストロゲン活性を有すると報告されている化合物、いわゆる内分泌攪乱化学物質については、確立した予測システムにおける保持時間がボイドマーカ (アセトン溶液) の保持時

間よりも早かった。すなわち、これらの被検物質は、E2-MIP 充填カラムにほとんど保持されないことから、当該物質のエストロゲン活性値は陰性であると判断した。バイオアッセイ法で得られた活性値と比較すると、ビスフェノール A やノニルフェノールなどは、極めて小さいながらも、エストロゲン活性を示しているが、E2 などのエストロゲン化合物と比較した場合、それらの活性値は極めて小さく、無視できる値と考えられる。確立した予測システムがスクリーニング的にエストロゲン活性を予測する方法であることを考慮した場合、バイオアッセイ法で僅かながら陽性を示すと判定された物質群に対して、陰性を示したことに対する結果は妥当であると判断した。ただし、さらに正確なエストロゲン活性を検証する必要がある場合は、バイオアッセイ法などを用いることが妥当であると考えられる。

表 1 確立したエストロゲン活性予測システムとバイオアッセイ法で求めたエストロゲン活性値の比較

被検物質	エストロゲン活性予測システム		酵母ツーハイブリッドアッセイ法 (E2 に対する相対的活性値, (%))
	保持時間 (分)	相対的なエストロゲン活性値, (%)	
E2	25.3	100	100
EE2	18.2	72	56
エストロン	7.9	31	16
E3	16.3	64	0.45
ビスフェノール A	保持されず	陰性	0.0042
ノニルフェノール	保持されず	陰性	0.033
4-tert- オクチルフェノール	保持されず	陰性	0.21
ダイゼイン (イソフラボン類)	保持されず	陰性	陰性
ゲニステイン (イソフラボン類)	保持されず	陰性	0.051
カルバリル (殺虫剤)	保持されず	陰性	陰性
エトフェンブロックス (殺虫剤)	保持されず	陰性	陰性

ボイドマーカ (アセトン溶液) よりも保持時間が早く、E2-MIP 充填カラムを素通りしていると考えられたため、本システムでは当該物質のエストロゲン活性を「陰性」と判定した。

前項(1)において、E2-MIP の再生利用による分子認識能への影響に関する結果を述べ

たが、本項においては、充填カラム化した E2-MIP の再生利用についても検討した。その結果、充填カラム化した場合においても、前項(1)と同様に、再生利用回数の増加に伴い、その分子認識能に低下が認められた。充填カラムにおける低下は前項(1)とほぼ同様におよそ 30 回の繰り返し注入により、それ以降の分子認識能が低下した。すなわち、本来保持されるべき物質の保持力が低下した。

以上の結果から、受容体や抗体などの機能性タンパク質に比べて容易に作製が可能な人工分子認識素子 MIP と汎用性に優れた HPLC を組み合わせることで、オンラインで種々の物質の相対的なエストロゲン活性をスクリーニング的に予測できることが示唆された。その反面、MIP の再生利用による分子認識能への影響に関する結果から明らかとなったように、およそ 30 回の繰り返し利用が可能であったものの、ODS カラムなど従来の HPLC 用充填カラムの耐久性と比較すると、E2-MIP 充填カラムの耐久性には課題が残された。

ヒト健康や生態系に及ぼす化学物質の影響を解明するための初期リスク評価では、エストロゲン活性が重要な指標の一つとして位置づけられるため、本研究で確立したエストロゲン予測手法は学術的に意義があると結論できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

渡邊 栄喜 (WATANABE, Eiki)

独立行政法人農業環境技術研究所・有機化

学物質研究領域・主任研究員

研究者番号：30354129

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：