

## アルキルフェノール類のホルモン受容体結合作用

佐藤 かな子\*, 長井 二三子\*

### Competitive Binding of Alkylphenols to Human Estrogen and Androgen Receptors

Kanako SATOH\* and Fumiko NAGAI\*

The binding affinities of various alkylphenols ( $C_nH_{2n+1}-C_6H_4-OH$ ) for human estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ), and androgen receptor (ADR) were determined by non-RI binding receptor assay. The binding potency of alkylphenols to both ER $\alpha$  and ER $\beta$  seems to be related to the number of alkyl carbons (n). Nonylphenol (NP, n=9) had the highest binding affinity for ER $\alpha$  ( $IC_{50} = 7.2 \times 10^{-7}$  M) and ER $\beta$  ( $IC_{50} = 8.0 \times 10^{-7}$  M). Dodecylphenol (DP, n=12), *t*-octylphenol (*t*-OP, n=8) and octylphenol (OP, n=8) also bound to both ER $\alpha$  and ER $\beta$  with an equal relative affinity. The  $IC_{50}$  values of NP and OP for ERs approximate their concentrations, which influence the endocrine function of the fishes. Hexylphenol (HP, n=6), pentylphenol (PeP, n=5) and propylphenol (PrP, n=3) had binding affinity for ER $\alpha$ . Furthermore, NP, DP and *t*-OP had notable binding affinity for ADR, and the  $IC_{50}$  values were  $1.3 \times 10^{-5}$  M,  $1.3 \times 10^{-5}$  M and  $7.4 \times 10^{-5}$  M, respectively. These results suggest that some alkylphenols might have diverse effects on the endocrine system *in vivo*. Phenol (n=0), methylphenol (MP, n=1), and ethylphenol (EP, n=2) had no binding affinity for these receptors.

**Keywords:** 内分泌攪乱作用 endocrine disruptor, ノニルフェノール nonylphenol, オクチルフェノール octylphenol, エストロゲン受容体 estrogen receptor, アンドロゲン受容体 androgen receptor, ドデシルフェノール dodecylphenol, アルキルフェノール alkylphenol

### 緒言

環境省は、昨年(2001年)4-*n*-nonylphenol (NP)を内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)であることを世界で初めて確認したのに続いて、本年6月に4-*n*-octylphenol (OP)も内分泌攪乱化学物質であると報道発表した。NP及びOPは、工業用洗剤(非イオン界面活性剤)の原料やプラスチックの可塑剤として使用されており、1999年には日本国内でそれぞれ1万9千トン及び1万トン使用されたと推定されている。日本石鹸洗剤工業会は1998年、日本石鹸洗剤組合は1999年から家庭用洗剤への使用を自粛している。日本界面活性剤工業会は、昨年からは、クリーニングや自動車洗浄など、排水処理が不完全な汚泥が環境中に排出される場合は使用を自粛するよう呼びかけ、これらを含んだ排水が河川に流れ出る可能性についての調査を開始した。

ホルモン様作用物質検索の手段として、ホルモン受容体に対する結合能を調べることが有効であると言われており、内分泌攪乱化学物質の第一層スクリーニングに位置づけられている<sup>1)</sup>。従来、ホルモン受容体への結合力を測定するためには、ラジオアイソトープ(RI)を用いた受容体競合結合反応が用いられてきたが、数多くの化合物に対するスクリーニング法として採用するには、法律に基づいた測定施設が必要であること、放射性廃棄物等問題が多い。私達

は、非RIホルモン受容体結合試験法を用いて、種々の化学物質のヒトエストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )及び $\beta$ (ER $\beta$ )、更にヒトアンドロゲン受容体(ADR)に対する結合作用を検討してきた<sup>2, 3)</sup>。

今回、NP及びOP等も含めた他のアルキルフェノール類のER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、及びADRに対する影響を調べたので報告する。

### 実験の部

**試薬** 検討したアルキルフェノール類の純度、メーカー及びこれらの省略記号を表1に記載した。その他の試薬は、和光純薬またはナカライテスクの特級品を用いた。アルキルフェノール類は、ジメチルスルフォキシドに溶解してホルモン受容体への影響を調べた。

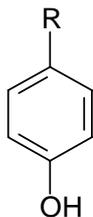
**エストロゲン受容体結合作用の測定** 東洋紡のLigand Screening System-Estrogen Receptor ( $\alpha$ )及び( $\beta$ )キット、及び和光純薬のEstrogen-R ( $\alpha$ ) Competitor Screening キットを用いた。前者は酵素免疫競合法であり、ヒトER $\alpha$ または $\beta$ 溶液、未標識の17 $\beta$ -エストラジオール( $E_2$ )及び測定試料を混和し、4℃で1時間反応後、遊離している $E_2$ 濃度を抗 $E_2$ 抗体及び抗体標識 $E_2$ と4℃で1時間、競合反応し、比色定量した。一方、後者は、固相化したヒトER $\alpha$ に、蛍光標識 $E_2$ 及び測定試料とを室温で2時間競合させた後、ERに結合

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

Table 1. Data on alkylphenols

Chemicals	Abbreviation	R	Supplier	Purity (%)
Phenol		H-	Wako	>99.5
4-Methylphenol	MP	CH <sub>3</sub> -	Tokyo Kasei	>99
4-Ethylphenol	EP	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -	Kanto Kagaku	>97.0
4- <i>n</i> -Propylphenol	PrP	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -	Kanto Kagaku	98.6
4- <i>n</i> -Pentylphenol	PeP	n-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> -	Kanto Kagaku	99.0
4- <i>n</i> -Hexylphenol	HP	n-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> -	Kanto Kagaku	99.6
4- <i>n</i> -Octylphenol	OP	n-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> -	Kanto Kagaku	98.6
4- <i>t</i> -Octylphenol	t-OP	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CCH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -	Tokyo Kasei	>93
4- <i>n</i> -Nonylphenol	NP	n-C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> -	Kanto Kagaku	99.5
4- <i>n</i> -Dodecylphenol	DP	n-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> -	Kanto Kagaku	70 ~ 80

Table 2. Binding affinities of alkylphenols for ER $\alpha$ , ER $\beta$  and ADR

Chemicals	ER $\alpha$		ER $\beta$		ADR	
	IC <sub>50</sub> (M)	RBA- $\alpha^a$	IC <sub>50</sub> (M)	RBA- $\beta^b$	IC <sub>50</sub> (M)	RBA-A <sup>c</sup>
DES	1.6 $\times 10^{-8}$	100	1.7 $\times 10^{-8}$	100	- <sup>d</sup>	-
Mibolerone	- <sup>d</sup>	-	- <sup>d</sup>	-	1.7 $\times 10^{-8}$	100
Benzene	NE <sup>e</sup>	-	NE	-	NE	-
Phenol	NE	-	NE	-	NE	-
MP	NE	-	NE	-	NE	-
EP	NE	-	NE	-	NE	-
PrP	1.1 $\times 10^{-4}$	0.015	- <sup>d</sup>	-	NE	-
PeP	1.0 $\times 10^{-5}$	0.160	- <sup>d</sup>	-	NE	-
HP	9.8 $\times 10^{-6}$	0.163	- <sup>d</sup>	-	NE	-
OP	9.8 $\times 10^{-6}$	0.163	1.2 $\times 10^{-5}$	0.142	>1.9 $\times 10^{-4}$	<0.009
<i>t</i> -OP	2.0 $\times 10^{-6}$	0.800	2.4 $\times 10^{-6}$	0.708	7.4 $\times 10^{-5}$	0.023
NP	7.2 $\times 10^{-7}$	2.22	8.0 $\times 10^{-7}$	2.13	1.3 $\times 10^{-5}$	0.131
DP	1.4 $\times 10^{-6}$	1.14	1.2 $\times 10^{-6}$	1.42	1.3 $\times 10^{-5}$	0.131

a)RBA- $\alpha$  and b)RBA- $\beta$  were calculated as a ratio of the IC<sub>50</sub> value of diethylstilbestrol (DES) to that of the chemicals.

c)RBA-A was calculated as a ratio of the IC<sub>50</sub> value of mibolerone to that of the chemicals. d)Not determined. e)NE; no effect at 1.9 $\times 10^{-4}$  M.

している蛍光E<sub>2</sub>量を検出した。いずれの方法においても、アルキルフェノール類のエストロゲン受容体結合力 (RBA- $\alpha$ とRBA- $\beta$ ) は、合成エストロゲンであるジエチルスチルベステロール (DES) と比較算出した。

アンドロゲン受容体結合作用の測定 東洋紡のLigand Screening System-Androgen Receptorキットを用いた。ヒトADR溶液、未標識のテストステロン及び測定試料を混和し、4 で1時間反応後、遊離しているテストステロン濃度を抗テストステロン抗体及び抗体標識テストステロンと4 で1時間、競合反応し、比色定量した。アルキルフェノール類のアンドロゲン受容体結合力 (RBA-A) は、合成テストステロンであるミボレロンと比較算出した。

## 結 果

### 1. アルキルフェノール類のヒトエストロゲン受容体結合作用

種々の濃度のアルキルフェノール類をE<sub>2</sub>共存下で、ヒトER $\alpha$ 又は $\beta$ と反応させ、競合曲線を求めた。この曲線より得られたE<sub>2</sub>の受容体への結合を50%阻害するアルキルフェノール類の量 (IC<sub>50</sub>値) 及びDESのER $\alpha$ 及び $\beta$ に対するIC<sub>50</sub>値を

それぞれ100とした時のアルキルフェノール類の相対結合活性 (RBA- $\alpha$ , RBA- $\beta$ ) を表2に示した。

ER $\alpha$ に対する結合力は、NPが最も強く、IC<sub>50</sub>値は7.2 $\times 10^{-7}$  M, RBA- $\alpha$ は2.22だった。次にDP, 及びt-OPの結合力が強く、IC<sub>50</sub>値はそれぞれ1.4 $\times 10^{-6}$  M, 2.0 $\times 10^{-6}$  M, RBA- $\alpha$ は1.14, 0.800だった。OP, HP及びPePの結合力は同程度であり、それぞれのIC<sub>50</sub>値は9.8 $\times 10^{-6}$  M, 9.8 $\times 10^{-6}$  M及び1.0 $\times 10^{-5}$  Mであり、RBA- $\alpha$ は0.163, 0.163及び0.160だった。PrPの結合力は弱かった (IC<sub>50</sub>値: 1.1 $\times 10^{-4}$  M, RBA- $\alpha$ : 0.015)。EP, MP, フェノール, ベンゼンはいずれも1.9 $\times 10^{-4}$  Mで結合作用を示さなかった。

ER $\beta$ に対する結合力もNPが最も強かった (IC<sub>50</sub>値: 8.0 $\times 10^{-7}$  M, RBA- $\beta$ : 2.13)。次に結合力が強いのはDP (IC<sub>50</sub>値: 1.2 $\times 10^{-6}$  M, RBA- $\beta$ : 1.42), 次はt-OP (IC<sub>50</sub>値: 2.4 $\times 10^{-6}$  M, RBA- $\beta$ : 0.708) だった。OPのIC<sub>50</sub>値は1.2 $\times 10^{-5}$  M, RBA- $\beta$ は0.142だった。EP, MP, フェノール, ベンゼンは1.9 $\times 10^{-4}$  MでER $\beta$ にも結合作用を示さなかった。

### 2. アルキルフェノール類のヒトアンドロゲン受容体結合作用

種々の濃度のアルキルフェノール類をテストステロン共

存下で、ヒトADRと反応させ、競合曲線を求めた。この曲線より得られたテストステロンの受容体への結合を50%阻害するアルキルフェノール類の量 ( $IC_{50}$ 値) 及びADRに対するミボレロンの  $IC_{50}$  値を100とした時のアルキルフェノール類の相対結合活性 (RBA-A) を表2に示した。

最も強くADRに結合したアルキルフェノールは、NPとDPで、両物質共に  $IC_{50}$  値は  $1.3 \times 10^{-5}$  M, RBA-Aは0.131であった。次に強い結合作用を示したのはt-OPであり、 $IC_{50}$  値:  $7.4 \times 10^{-4}$  M, RBA-A: 0.023であった。OPは、 $1.9 \times 10^{-4}$  Mでテストステロンの結合を完全には阻害しなかった HP PeP PrP, EP, MP, フェノール, ベンゼンは、 $1.9 \times 10^{-4}$  Mでいずれも結合作用を示さなかった。

#### 考察及び結論

非ステロイド性エストロゲンであり、流産防止薬として用いられたDESの発ガン作用が注目されているが、更にヒトERへの強い結合力<sup>2)</sup>も有している。同じアルキルフェノールであるOP及びNPも、ラットの子宮重量を増加させる<sup>4)</sup>。更に、これらの化合物には、ヒト乳ガン由来MCF-7細胞の増殖を促進する作用が認められており<sup>5)</sup>。ERへの結合作用もRI法により報告されている<sup>6,7)</sup>。今回は、パラ位に炭素鎖数の異なるアルキル置換基を有するフェノール類 ( $C_nH_{2n+1}-C_6H_4-OH$ ) のヒトER $\alpha$ , ER $\beta$ 及びADRに対する結合作用について酵素抗体法により検討した。その結果、ERに親和性を示すためにはフェノール性水酸基及びパラ位に炭素数4個以上のアルキル炭素が必要であり、NP (n=9) 及びDP (n=12) と長いアルキル基を持つフェノールの方が強い結合力を持っていた。アルキル炭素8個の場合は、3級アルキル基を持つt-OPの結合力の方がOPより強かった。3級アルキル基の存在がERへの結合力を強くする傾向はパラベン類<sup>3)</sup>においても見られた。更にPeP (n=5) 及びHP (n=6) もOPと同程度の作用を有することが明らかになった。炭素数4個以下のアルキルフェノールは、結合作用が非常に弱いか、認められなかった。この結果は、アルキル炭素数2, 4, 6, 8, 9のアルキルフェノールについて検討したTabira等<sup>6)</sup>のと同様である。しかし、酵母を用いたツーハイブリッド法<sup>7)</sup>では、アルキル基の長さでエストロゲン様作用との相関関係は必ずしも見られていない。

アルキルフェノール類はビスフェノール類等<sup>3)</sup>に見られるようにER $\alpha$ と $\beta$ に同程度の親和性を有していた。このことは、NPとOPについて検討したGutendorf等<sup>8)</sup>の結果と一致している。

アルキルフェノール類はヒトADRに対しても結合したが、 $IC_{50}$  値の比較によると、その結合力はERに対するより弱かった。ADRに対する結合力は、NP (n=9) およびDP (n=12) とアルキル基の長い方が強かった。炭素数8個のアルキルフェノール類に関しては、3級アルキル鎖を有するt-OPのADRに対する結合力はERに対する場合と同じくOPよりかなり強いことが明らかになった。炭素数6以下では結合は認め

られなかった。

アルキルフェノール類は、ビスフェノール類等<sup>2)</sup>で見られるように、ER及びADRの両受容体に結合した。また、NPより長いアルキル鎖を有する化合物であるDPにもER及びADRに強い結合作用を認めたが、試薬の純度が低いこともあり、さらに、検討が必要であると考えられる。今後は、アルキルフェノール類について細胞増殖試験やレポーター遺伝子アッセイ等を行い、ホルモン様作用及び抗ホルモン作用について検討する予定である。

1990年代に、イギリスの河川において雌雄同体の魚が年々多く見かけられるようになり、その原因物質としてNPが疑われた。Jobling等<sup>9)</sup>はこれらの物質を含む水槽でニジマスを飼育し、血清中のビトロジェニンの濃度上昇を指標に影響を調べ、NPは10  $\mu$ g/L ( $4.3 \times 10^{-8}$  M), OPは3  $\mu$ g/L ( $1.5 \times 10^{-8}$  M) から内分泌攪乱作用があることを示唆している。今回得られたNP及びOPのER $\alpha$ に対する  $IC_{50}$  値は魚類の内分泌系に影響を及ぼす濃度に近い値である。アメリカおよびヨーロッパ諸国では、閾値 (生体の反応が起こり始める濃度) に安全係数1/10をかけた値、つまりNPで1.0  $\mu$ g/L ( $4.3 \times 10^{-9}$  M), OPで0.3  $\mu$ g/L ( $1.5 \times 10^{-9}$  M) が規制の目安と考えられている。河川や河口流域の水中NP濃度は、スイス、イギリスでは数十 $\mu$ g/Lから数百 $\mu$ g/Lに達し、日本でも0.05~2.6  $\mu$ g/L濃度と報告されている<sup>10)</sup>。私達の実験結果からも、河川濃度は内分泌攪乱を引き起こす可能性のあることが示唆された。

#### 文 献

- 1) Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report by Endocrine Disrupter Screening Program, United State Environmental Protection Agency, 1998.
- 2) Kanako Satoh, Fumiko Nagai, and Naoto Aoki : *J. Health Sci.*, 47, 495-501, 2001.
- 3) Kanako Satoh, Fumiko Nagai, and Naoto Aoki, *et al.* : *Yakugaku Zasshi.*, 120, 1429-1433, 2000.
- 4) Lee, P. C. and Lee, W. : *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 57, 341-348, 1996.
- 5) Soto, A. N., Justicia, H. and Wray, J. W. *et al.* : *Environ Health Perspect.*, 92, 167-173, 1991.
- 6) Tabira, Y., Nakai, M. and Asai, D., *et al.* : *Eur. J. Biochem.*, 262, 240-245, 1999.
- 7) Nishihara, T., Nishikawa, J. and Kanayama, T., *et al.* : *J. Health Sci.*, 46, 282-298, 2000.
- 8) Gutendorf, B. and Westendorf, J. : *Toxicol.*, 166, 79-89, 2001.
- 9) Jobling, S., Scheahan, D., and Osborne, J. A., *et al.* : *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 194-202, 1996.
- 10) 磯部友彦, 高田秀重 : 水環境学会誌, 21, 203-208, 1998.