

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法による エストロゲン活性測定の実環境水質への応用*

深 澤 均**・渡 邊 雅 之**

キーワード ①酵母ツーハイブリッド・アッセイ法 ②エストロゲン活性 ③ビスフェノール A
④アルキルフェノール類

要 旨

環境水中に高頻度で検出されたビスフェノール A (BPA) とアルキルフェノール (AP) の塩素置換体や前駆物質を合成・精製し、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン活性測定法でそれらのエストロゲン活性を測定した。その結果、BPA は塩素置換体になることでエストロゲン活性が強まるが、AP 類は活性が弱まることが認められた。また AP 類は、水酸基がエトキシレートやカルボン酸に変わることによって活性が弱まることが認められた。BPA 汚染が認められた排水を、固相吸着・ジクロロメタン溶出により前処理し、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン活性測定法で測定した。その結果、明確なエストロゲン活性は示されなかった。その理由として、BPA の活性が弱いことと、排水に含まれるアンタゴニスト様活性を示す物質の影響によることが示唆された。

1. はじめに

内分泌攪乱物質が社会的問題になり、平成10年に環境省(当時環境庁)が内分泌攪乱物質(環境ホルモン物質)として67物質(群)を指定した¹⁾。国土交通省(当時建設省)および環境省はそれぞれ一級および二級河川についてこれら物質の水環境汚染の実態調査を実施し、各自治体もそれぞれ独自に国の調査の補足調査を行った。これらの調査により全国および各自治体の汚染実態も明らかになった。

静岡県では全国調査で検出された24物質を選定し、河川等8地点の水質、底質を調査した²⁾。その結果、調査した物質の汚染実態が明らかになったが、環境ホルモン物質の生理的作用が明確でなかったため、汚染物質が環境生態系へ与える影響の評価はできなかった。しかしながら、当県とし

ても何らかの影響調査を行う必要性を感じ、調査した物質のうち検出頻度が高く、高濃度で検出された物質を対象に、環境ホルモン作用のうち主にエストロゲン作用について調査検討する計画を立てた。

エストロゲン活性を測定する技術を持ち合わせていない筆者らは、迅速でかつ容易な操作で、多数の検体を測定できる酵母アッセイ法が国立環境研究所で開発³⁾されたことを知り、調査研究の協力を依頼し、同研究所との共同研究として取り組むこととした。

当県調査で環境汚染が認められた物質のうち、ビスフェノール A (BPA) は塩素置換体が、アルキルフェノール (AP) 類は前駆物質やその塩素置換体が環境中に存在することが想定された。そこで、これらの物質のエストロゲン活性が明らかでない

* Measurement of Estrogen Activities of Environmental Water Samples by using yeast Two-hybrid Assay

**Hitoshi FUKAZAWA, Masayuki WATANABE (静岡県環境衛生科学研究所) Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

ことから、筆者らはその関連物質を合成・精製し、エストロゲン活性強度を明らかにすることを試み、環境水として環境ホルモン物質のBPAが検出された排水のエストロゲン活性の発現強度についても検討した。

本報告では、国立環境研究所と行った共同研究の成果の一部を「酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン活性測定の実用」の事例ということで述べる。

2. 実 験

2.1 被験化学物質

ビスフェノール A (BPA) 類：BPA とその一塩素置換体から四塩素置換体の 6 種類、アルキルフェノール (AP) 類：ノニルフェノール (NP)、オクチルフェノール (OP)、プチルフェノール (BP) およびその関連物質の 19 種類について、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法を用いてエストロゲン・ア

ゴニスト活性を測定した。

BPA, NP, OP と BP は和光純薬および関東化学製試薬を用い、他の標準物質は BPA の塩素化⁴⁾ および既報⁵⁾ により合成・精製し、高分解能 MS および NMR スペクトルを解析し構造決定したものをを用いた。対象とした物質の記号の名称を表 1 に示す。

2.2 環境試料

試料水は、富士市田子の浦港へ注ぐ専用排水路 2 カ所 (T-1, T-2) と港のほぼ中央部と出口 (灯台付近) の 4 カ所で採水した。試料はステンレス製バケツで表層水を採水し、褐色ガロンびんに汲み入れ、冷蔵して実験室に搬送した。

2.3 分析方法

2.3.1 試料水の前処理

試料水はガラス繊維濾紙 (GF/C, 45mmφ, Whatman 社製) で濾過した。あらかじめジクロロメタン、メタノール各 10ml ずつで洗浄し、精製水 20

表 1 調査対象物質

No.	物質名	略号
1	bisphenol A	BPA
2	3-chlorobisphenol A	3-CIBPA
3	3,5-dichlorobisphenol A	3,5-diCIBPA
4	3,3'-dichlorobisphenol A	3,3'-diCIBPA
5	3,3',5-trichlorobisphenol A	3,3',5-triCIBPA
6	3,3',5,5'-tetrachlorobisphenol A	3,3',5,5'-tetraCIBPA
7	4-n-nonylphenol	nNP
8	4-nonylphenol (異性体混合物: mix)	NP
9	2-chloro-4-nonylphenol (mix)	CINP
10	2,6-dichloro-4-nonylphenol (mix)	diCINP
11	4-nonylphenol monoethoxylate (mix)	NP 1 EO
12	4-nonylphenol diethoxylate (mix)	NP 2 EO
13	2-chloro-4-nonylphenol monoethoxylate (mix)	CINP 1 EO
14	2,6-dichloro-4-nonylphenol monoethoxylate (mix)	diCINP 1 EO
15	4-n-octylphenol	nOP
16	4-t-octylphenol	OP
17	2-chloro-4-t-octylphenol	ClOP
18	2,6-dichloro-4-t-octylphenol	diClOP
19	2-chloro-4-t-octylphenoxy acetic acid	ClOPEC
20	4-t-butylphenol	BP
21	2-chloro-4-t-butylphenol	CIBP
22	2,6-dichloro-4-t-butylphenol	diCIBP
23	4-t-butylphenoxy acetic acid	BPEC
24	2-chloro-4-t-butylphenoxy acetic acid	CIBPEC
25	2,6-dichloro-4-t-butylphenoxy acetic acid	diCIBPEC

ml でコンディショニングした固相ディスク (C18 FF, 47mmφ, 3 M 製) に, 吸引マニホールド (3 M 製) を用いて濾液 800mL を通し, 精製水で洗浄, 減圧脱水後, ガラス製シャーレに移し, ホットプレート上で 37°C, 1 時間乾燥させた。次いでジクロロメタン 8 ml (4 ml × 2 回) で溶出し, 溶出液を窒素気流下蒸発乾固した。ジメチルスルフォキシド (DMSO) で溶解し, エストロゲン活性と発光細菌毒性のアッセイ測定用検体とした。

2.3.2 エストロゲン活性の測定

被験化学物質および試料水を前処理したアッセイ測定用検体のエストロゲン活性の測定は, 西川らの酵母 two-hybrid 法により作成した遺伝子組換え酵母のエストロゲン試験法⁶⁾を, 96 ウェルマイクロプレートと化学発光法の採用により迅速かつ鋭敏に測定できるように改良した白石らの酵母ツーハイブリッド・アッセイ法³⁾で測定した。

また, 代謝物によるエストロゲン活性も検討するため, 物質そのままの試験 (-S9 試験) に加えて, ラット肝 S9 により 37°C, 1 時間処理した試料について行う試験 (+S9 試験) を併せて行った。

酵母ツーハイブリッド法については白石らにより詳細に報告されているのでフローのみ図 1 に示す。

2.3.3 発光細菌毒性試験

環境試料によるホルモン活性の有無の評価において, 試験濃度が適正であるか, どうかを毒性の強度で評価した。簡便な毒性試験法である, 白石らが改良した「発光細菌 *Photobacterium phosphoreum* を用いた発光細菌毒性試験⁷⁾」により毒性を調べた。

2.3.4 全有機炭素量 (TOC) の測定

環境水の汚染指標の 1 つとして TOC 量を測定した。測定はガラスフィルター (1 μm 以下) で濾過した試料について TOC-5000A (島津製作所製) を用いて行った。

3. 結果と考察

3.1 被験化学物質のエストロゲン活性

3.1.1 BPA 類

BPA はポリカーボネート, エポキシ樹脂の原料や感熱紙の顔色剤等に広範囲に用いられており, 水環境調査において全国的に検出率の高い物質で

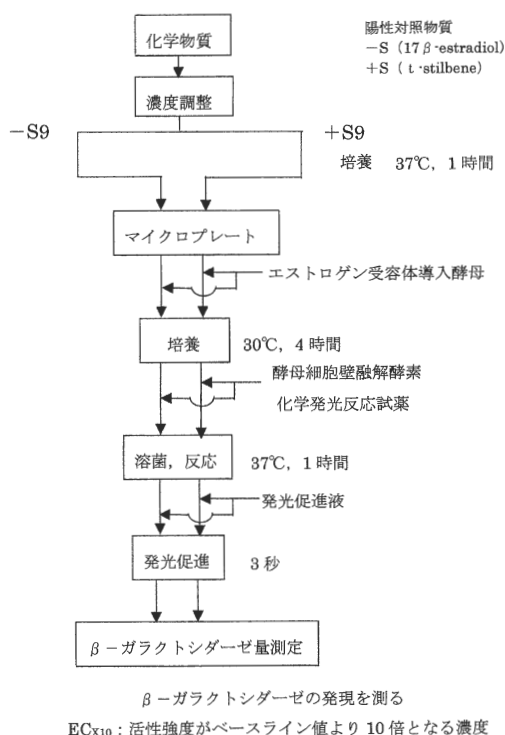


図 1 酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン・アゴニスト活性試験フロー

ある。当県調査では富士市田子の浦港で 2.5 μg/l が検出され, 全国他地点の濃度域 0.02 ~ 1.7 μg/l より高い濃度を示す結果であった²⁾。また, BPA は古紙再生工場においては原料古紙中の感熱紙等に含まれており, 漂白工程で用いる塩素剤により塩素置換体が生成されることが確認された^{4,8)}。また塩素置換体は, 上水や産業廃棄物処分場浸出水の塩素処理によっても生成することが懸念されている^{9,10)}。

そこで, 17β-エストラジオール (E2) に比べ約 1/10000 の弱いエストロゲン活性を示す物質である BPA が塩素置換体になることで活性の強度がどう変化するのか検討した。エストロゲン・アゴニスト活性の測定結果を図 2 に示す。

-S9 試験 [(図 2(a))] においては, BPA および塩素置換 BPA の活性強度は濃度依存的な増加傾向を示し, またすべての塩素置換体は元物質の BPA より 3 ~ 38 倍の活性の増大が認められ, 活性強度は 3,3'-diCIBPA > 3,3',5-triCIBPA > 3,5-diCIBPA ≒ 3-CIBPA > 3,3',5,5'-tetraCIBPA > BPA

であった。一方、+S9試験[図2(b)]においてはBPAが弱い活性を示した以外はアゴニスト活性を示さなかった。ラット肝S9により、BPA類はいずれもアゴニスト活性を示さないか活性の弱い代謝産物になることが認められた。相澤による報告では、蛍光偏光度法によるエストロゲンレセプター結合性試験の結果は、塩素置換体はBPAに比べ2.8~9.1倍エストロゲンレセプター結合能が高く、その強度は $3,3'-diCIBPA > 3-CIBPA > 3,3',5-triCIBPA > 3,3',5,5'-tetraCIBPA > BPA$ である¹¹⁾。

この結果は筆者らの酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン活性試験(-S9試験)の活性強度の結果と同様な傾向を示している。

3.1.2 アルキルフェノール類

環境ホルモン物質として問題になっているNP、OPは、それ自体でも洗剤や分散剤に用いられているが、その大部分は分子内に酸化エチレン(EO)基を含むアルキルフェノールポリエトキシレート(APEO)として用いられている。APEOは、水環境中に放出されると親水基のEO基のみが好気的に順次分解されアルキルフェノールモノエトキシレート(AP1EO)やアルキルフェノキシ酢酸

(APEC)となり、さらに嫌氣的分解でAPとなるとされている。NPはEO基の減少した生分解産物であるNPnEOやNPnECとともに下水処理水や河川水中^{12,13)}から検出されており、また下水処理の塩素滅菌により塩素や臭素が置換したNPnEOおよびNPnEC化合物が生成することが報告¹⁴⁾されている。また、BPは塩ビ樹脂の安定剤として大量に用いられており環境中でも高い検出率で検出されている。

これらのAP類の環境中での生態への影響が懸念されることから、それらのエストロゲン活性を明らかにすべく、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン活性の測定法により活性を測定した。-S9試験によるNP類、OP類およびBP類の測定結果をそれぞれ図3.1~3.3に示す。-S9試験において、調査対象物質のうちいくつかの物質でエストロゲン・アゴニスト活性が認められたが、+S9試験ではすべて活性が消失した。-S9試験におけるエストロゲン・アゴニスト活性については、各APはアルキル鎖が分枝したtert-体は直鎖のn-体より活性が強いことが認められた。またNP類では、CINP、diCINPはNPと比較して同程度の活性の低下が認められた。NP1EOとCINP1EOは極く弱い活性を示しNP2EOとdiCINP1EOでは活性が認められなかった。OP類の活性は $OP > CIOP > diCIOP$ であり、塩素置換の進行により活性が減少した。CIOPECは活性が認められなかった。BP類の活性はNP類、OP類と比較して低かった。CIBP、diCIBPの活性はBPそのものより低く、BPECとその塩素置換体では活性は認められなかった。

以上の結果を他の報告結果と対比してみた。APの活性は側鎖のアルキル基が分枝鎖(tert-)体では強く、直鎖(n-)体では弱く現われたが、西村らの報告¹⁵⁾と同じ傾向であった。APは-OH基が-(OCH₂CH₂)_n-OH、-OCH₂COOHになることによりエストロゲン・アゴニスト活性の低下が認められた。これらの結果はSumpterの酵母アッセイ法を用いたエストロゲン活性試験の結果¹⁶⁾と同様な傾向であった。

また、AP類は-OH基のオルト位に塩素置換することにより、エストロゲン・アゴニスト活性が低下することが判明した。Nishiharaらは、-S

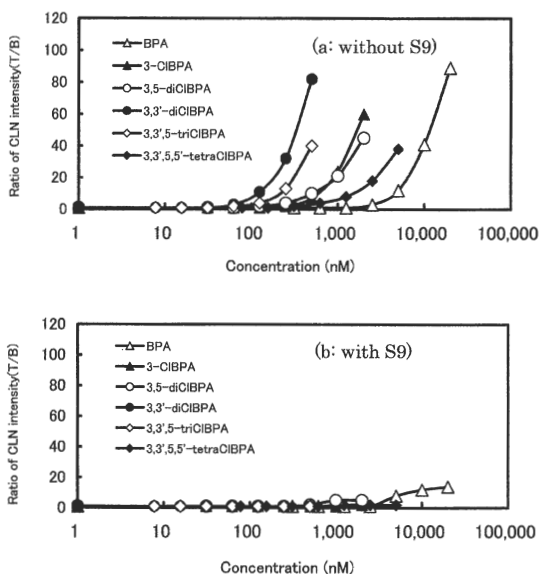


図2 BPA類の酵母アッセイ法によるエストロゲン・アゴニスト活性

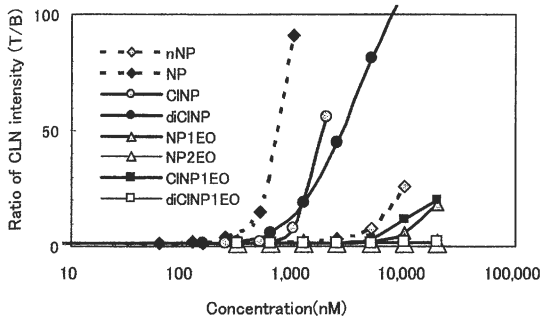


図 3.1 NP 類のエストロゲン・アゴニスト活性(-S9)

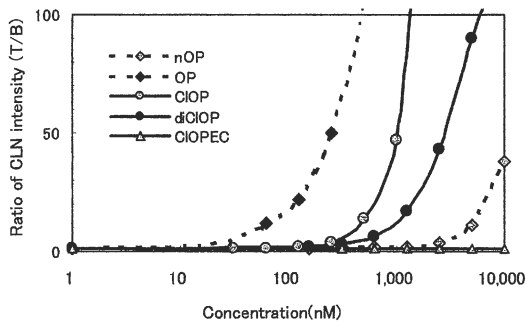


図 3.2 OP 類のエストロゲン・アゴニスト活性(-S9)

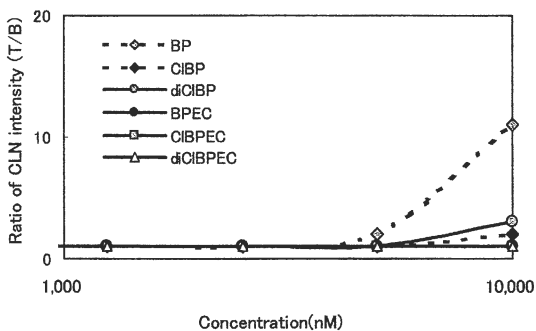


図 3.3 BP 類のエストロゲン・アゴニスト活性(-S9)

9 試験でエストロゲン・アゴニスト活性を示す物質の構造活性相関において、フェノール性水酸基を有し、水酸基のパラ位に疎水性基を持つ化学物質が活性を示しやすい物質であり、水酸基のオルト位にかさの大きな置換基が入ると活性は弱くなるとしている¹⁷⁾。このことは、筆者らの AP 類の塩素置換体の試験結果と同じ傾向であった。しかし、3.1.1 で述べたように BPA の塩素置換体では逆の傾向を示し、活性が強くと発現されたことは興味ある現象である。エストロゲン活性の発現に関

わる因子は、被験物質の溶解度、毒性、細胞壁の透過性、レセプターへの結合性や酵母との反応時間等非常に複雑多様であり、今後他の試験結果も活用して総合的な解析によりこれら一連の化合物について活性発現の機構の解明を行いたい。

また、塩素置換したこれらの物質については、エストロゲン活性以外に他の生理活性の増強や残留性も考えられるので、さらに検討していく必要があると思われる。

3.2 環境ホルモン物質が検出された環境水

環境ホルモン様物質としてリストアップされている BPA が検出された環境水質について、その環境水が示すエストロゲン活性を把握するため、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン活性測定法を用いて測定した。

バイオアッセイによる測定は、対象とする水質中に存在する物質を総括的に把握することが可能である。逆に存在する物質の相互作用により過大や過小に評価する可能性もある¹⁸⁾ことから、試料の抽出・濃縮を含む前処理が問題になった¹⁹⁻²¹⁾。ここでは、検出された BPA と、一般河川での検出頻度が高くまた活性の強い E2 の双方が測定できる系として、前処理法を検討した。抽出・濃縮方法(溶媒)、濃縮倍率についても検討し、操作性から固相抽出・ジクロロメタン溶出の系を採用した²¹⁾。操作方法は 2.3.1 に示した。

エストロゲン活性、TOC および発光細菌毒性試験の測定結果を表 2 に示す。エストロゲン・アゴニストの活性は弱いか認められない程度であった。対象とした試料の GC/MS による測定では試料 T-1, T-2 中には BPA が数十 $\mu\text{g/l}$ 程度検出されており、港出口は検出されない程度に濃度減少がみられた。BPA はエストロゲン活性が E2 に比べ約 10^{-4} 程度と弱いことから、その濃度差による活性の違いは水質測定結果へは現われないものと推測された。しかしながら、発光細菌毒性試験では TOC 濃度の高い地点で毒性が高いことを示していることから、試験系に関与した何らかの抑制を示す物質が存在していることが示唆された。

バイオアッセイによる測定は、その水質中に存在する物質を総括的に把握することが可能であるが、その結果の評価は慎重に行うべきである。今

表2 環境水のエストロゲン活性、TOC濃度、発光細菌毒性の測定結果

項目	地点	測定月(2001年)				
		7月	8月	9月	10月	11月
エストロゲン	T-1 *1)	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
アゴニスト	T-2 *2)	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
活性(-S9) (as E2 ; ppt)	港中央	<0.2	<0.2	<0.2	0.24	0.28
	港出口	<0.2	<0.2	<0.2	0.27	0.22
エストロゲン	T-1	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
アゴニスト	T-2	0.36	0.29	0.50	<0.2	<0.2
活性(+S) (as E2 ; ppt)	港中央	0.31	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
	港出口	0.25	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
TOC濃度 (ppm)	T-1	40	36	33	19	27
	T-2	44	49	38	32	23
	港中央	28	15	16	7.5	7.0
	港出口	17	9.2	8.9	5.9	8.6
発光細菌毒性 (IC50 ; C.R.) *3)	T-1	42	23	23	38	28
	T-2	54	28	25	38	38
	港中央	73	57	60	120	87
	港出口	103	57	83	116	86

*1,*2) : T-1, T-2は港への流入水

*3) : (IC50 ; C.R.)は発光細菌の50%生物発光抑制(IC50)を示す試料の濃縮倍率(C.R.)を示す

回の環境試料水のエストロゲン活性の測定結果では、アゴニスト活性が弱いか認められなかったが、エストロゲン活性物質が存在していないとは断定できない。同時に行った酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン・アンタゴニスト試験では排水路の試料はE2換算で数百ppt相当を阻害するアンタゴニスト様活性が認められることやエストロゲン・エライザ法によりE2が数ppt程度に検出された。環境水質によってはバイオアッセイシステムを特異的に阻害する物質の存在も疑われることより、今後は試料の分画化やあるいは他のバイオアッセイ方法を用いるなどして、検討を行うことも必要と考えられる。

4. まとめ

環境水の環境ホルモン物質は化学分析により汚染実態が明らかになってきたが、汚染物質のホルモン作用による生態影響は未解明な部分が多い。化学分析とバイオアッセイにより総合的に環境ホルモン物質の実態を明らかにすることが緊急の課題である。

環境水中に高頻度で検出されたBPAとAPは塩素置換体や前駆物質が存在する可能性があるがそれらのエストロゲン活性が明確でないことから、それらの関連物質を合成・精製し、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン活性測定法でそれらのエストロゲン活性を測定した。その結果、BPAは塩素置換体になることでエストロゲン活性が強まるが、AP類は活性が弱まることが認められた。またフェノール性水酸基を持つAP類は、水酸基がエトキシレートやカルボン酸に変わることによって活性が弱まることが認められた。

BPA汚染が認められた専用排水路からの環境水のエストロゲン活性の実態を把握するため、固相吸着・ジクロロメタン溶出による前処理方法を採用した酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン活性測定法を応用した。しかしながら、今回、試験に供した排水からは明確なエストロゲン・アゴニスト活性は示されなかった。その理由としてBPAの活性が弱いことと排水に含まれるアンタゴニスト様活性を示す物質の影響によることが示唆された。

— 参考文献 —

- 1) 環境庁：外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について、一環境ホルモン戦略計画SPEED'98一、1998
- 2) 静岡県環境部生活環境室：平成10年度外因性内分泌攪乱化学物質調査、平成11年、1999
- 3) 白石不二雄、白石寛明、西川淳一、西原力、森田昌敏：酵母Two-Hybrid Systemによる簡便なエストロゲンアッセイ系の開発。環境化学、10、57-64、2000
- 4) Fukazawa, H., Hoshino, K., Shiozawa, T., Matsushita, H. and Terao, Y.: Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere*, 44, 973-979, 2001
- 5) 渡邊雅之、深澤均、平賀由利子、白石不二雄、白石寛明、寺尾良保：塩素置換アルキルフェノール類のエストロゲン活性。第11回環境化学討論会講演要旨集、518-519、2002
- 6) Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T.: New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 154, 76-83, 1999
- 7) 白石不二雄、白石寛明、西川淳一、曾我義博、佐野友春、彼谷邦光、西原力、森田昌敏：酵母を用いたエストロゲン・アンタゴニストアッセイ系の開発と有機スズへの応用。環境化学、11、65-73、2001
- 8) Fukazawa, H., Watanabe, M., Shiraishi, F., Shiraishi, H., Shiozawa, T., Matsushita, H. and Terao, Y.: Formation of chlorin-

- ated derivatives of bisphenol A in waste paper recycling plants and their estrogenic activities. *J. Health Sci.*, **48**, 242-249, 2002
- 9) 赤塚靖, 鎌田素之, 亀井翼, 眞柄泰基: 浄水処理プロセスによるエストロゲン様活性の挙動に関する研究. 第35回日本水環境学会年会講演集, 99, 2001
 - 10) 国立環境研究所特別研究報告: 塩素処理によるビスフェノール A の分解, pp47-48, 廃棄物埋立処分における有害物質の挙動に関する研究 (特別研究), 国立環境研究所, 2001
 - 11) 相澤貴子: 内分泌攪乱化学物質の塩素処理副生成物とそのエストロゲン様活性, 用水と廃水, **44**, 21-27, 2002
 - 12) 小島節子, 渡辺正敏: 名古屋市内の水環境中のアルキルフェノールポリエトキシレート (APE) および分解生成物の分布, 水環境学会誌, **21**, 302-309, 1998
 - 13) 栗林栄, 二階堂悦生, 杉本東: 下水処理場における環境ホルモンの全国調査, 用水と廃水, **44**, 39-45, 2002
 - 14) 池道彦, 藤田正憲: 水環境における内分泌攪乱物質の生分解挙動—ノニルフェノールエトキシレートとビスフェノール A を例として—, 環境技術, **29**, 38-42, 2000
 - 15) 西村哲治, 埴岡伸光, 神野秀人, 安藤正典, 金子裕美, 武田健, 西川淳一, 西原力: 酵母 Two-Hybrid System 法によるフェノール類のエストロゲン様活性の検討, 第33回日本水環境学会年会講演集, 179, 1999
 - 16) Routledge, E.J. and Sumpter, J. P.: Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ.Toxicol.Chem.*, **15**, 241-248, 1996
 - 17) Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, K., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S. and Utsumi, H.: Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.*, **46**, 282-298, 2000
 - 18) 鎌田素之, 平野景子, 大野雪子, 亀井翼, 眞柄泰基: 酵母 Two-hybrid 法を用いた環境試料のエストロゲン様活性評価に関する研究, 水環境学会誌, **24**, 865-870, 2001
 - 19) 細川将洋, 近貞幸治, 亀谷隆志, 浦野絃平: 河川水の女性ホルモン活性試験のための濃縮・精製方法と評価方法, 第35回日本水環境学会年会講演集, 110, 2001
 - 20) 恩田建介, 中村由美子, 森田智之, 宮晶子: 遺伝子組換え酵母を用いる女性ホルモン活性測定における下水夾雑物質の影響, 第4回環境ホルモン学会研究発表会要旨集, 89, 2001
 - 21) 白石不二雄, 丸尾直子, 白石寛明, 磯部友彦, 西川淳一, 西原力, 森田昌敏: 水環境試料の *in vitro* エストロゲン試験法のための前処理手法について—酵母アッセイ法およびエストロゲン ELISA 測定法での比較—, 第11回環境化学討論会講演要旨集, 504-505, 2002