

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月23日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00559

研究課題名(和文)生活用品に含まれる化学物質の核内受容体を介した内分泌への活性発現に至る複合影響

研究課題名(英文) Influence of chemicals used in consumer products on endocrine-system via activation of nuclear receptors

研究代表者

北村 繁幸 (Kitamura, Shigeyuki)

日本薬科大学・薬学部・客員教授

研究者番号：40136057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生活用品に含まれる化学物質は日常生活を豊かにするうえで欠かせない。生活用品には、防腐剤、品質の維持、着色料、着香料、柔軟剤、可塑剤、紫外線吸収剤や難燃剤などがあり、多かれ少なかれ化学物質が含まれている。本研究課題では、生活用品に含まれる化学物質を広く取り上げ、生体機能維持に重要な働きをする核内受容体に対する活性化についての検討を行った。その結果、幾つかの化学物質が核内受容体を活性化することを見出した。さらに、それぞれの核内受容体の活性化に対応したシトクロムP450分子種が誘導されることを明らかにした。また、近年使用量が増えているリン系難燃剤が薬物代謝酵素活性へ直接的な影響を及ぼすことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、使用量が増加している生活用品に含まれる化学物質の安全性評価は重要で早急な課題と言える。本研究によって、幾つかの化学物質が核内受容体を介して薬物代謝酵素系に影響することを見出した。このことは薬物以外に、ホルモンや脂質などの内在性物質の代謝にも影響することから、内分泌攪乱作用に繋がる。このような現状において、本研究課題である「生活用品に含まれる化学物質の核内受容体を介した安全性評価」は、社会のニーズに応じたものであり、安全な日常生活を送る上から欠かせないものである。今後、本研究で、危険性を指摘した化学物質に対して、さらなる安全性評価がなされることが望まれる。

研究成果の概要(英文)：Some chemicals were added into consumer products. It is necessary to conduct the safety assessment of these chemicals. In this study, these chemicals are tested agonistic and antagonistic actions on nuclear receptors using reporter gene assay. Some chemicals such as phthalates, salicylates, parabens, bisphenol A, synthetic musks, UV-filters, brominated flame retardants and pesticides exhibited agonistic and/or antagonistic actions towards estrogen receptor, androgen receptor, thyroid hormone receptor, pregnane X receptor, constitutive androstane receptor and peroxisome proliferator-activate receptor. These chemicals also induced drug-metabolizing enzymes, especially cytochrome P450, via these nuclear receptor activation. Organophosphate flame retardants directly inhibited carboxylesterase in rat livers. In this manner, these chemical may induce endocrine-disrupting actions.

研究分野：環境科学、薬物代謝

キーワード：核内受容体 環境化学物質 内分泌攪乱 生活用品 シトクロムP450

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 殺菌剤や紫外線吸収剤をはじめとして、生活に密着した生活用品に含まれる化学物質に接することが多くなってきた。生活用品に含まれる化学物質は日常生活を豊かにするうえで欠かせない。防腐剤、品質の維持、着色料、着色料、柔軟剤、可塑剤、紫外線吸収剤や難燃剤などに、多くの化学物質が加えられている。日常生活を送るうえで、このような化学物質を避けることが出来ない。しかし、それらの化合物がすべて安全とは言い切れない。

(2) 紫外線吸収剤は現在、紫外線から皮膚を守るうえで、必需品になっている。しかし、皮膚から吸収され、体内に蓄積することも考えられる。また、ベンズトリアゾール系紫外線吸収剤は、プラスチック製品の劣化防止の目的で広く使用されているが、環境への流出が問題になっており、魚介類からも検出されており、魚介類を通してヒトへの取り込みが考えられる。

#### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、生活用品に含まれる化学物質として、フタル酸エステル、パラベン、カルバメート系農薬、ビスフェノール類、ムスク系化粧品香料、サリチル酸エステル系着色料、プロム化あるいはリン系難燃剤を取り上げ、内分泌系への影響について検討を行う。

(2) ある種の化学物質は核内受容体を介して、薬物、ホルモンあるいは脂質代謝を変動させることが知られている。生活用品に含まれる化学物質の各種核内受容体に対するアゴニスト、アンタゴニスト活性をスクリーニングする。核内受容体活性を示した化学物質について、核内受容体を介したラット *in vivo* および *in vitro* での薬物代謝酵素活性への影響評価を行う。

#### 3. 研究の方法

(1) 生活用品に含まれる化学物質の核内受容体に対する活性は既存の方法あるいは本研究グループによって確立させた培養細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ法で行った。

(2) ラット肝ミクロソームに核内受容体活性を示した化合物を添加することで、シトクロム P450 活性あるいはカルボキシルエステラーゼ活性への影響についての *in vitro* 実験を行った。また、ラットに化合物を投与し、各種 P450 分子種の mRNA 量を測定すると共に、個々の P450 分子種の活性は各種 P450 分子種測定キットを用いて測定した。

(3) 新生仔ラットあるいは両生類を用いた *in vivo* 実験では、被験物質を新生仔ラットに投与あるいは幼生生物 (オタマジャクシ) のメディウム液に加えることで暴露させた。

#### 4. 研究成果

(1) 各種生活用品に含まれる化学物質の核内受容体 estrogen receptor, androgen receptor, thyroid hormone receptor, pregnane X receptor, constitutive androstane receptor and peroxisome proliferator-activate receptor の活性化についてのスクリーニングを行った。その結果、サリチル酸エステル系着色料(Ozaki et al., 2016)、カルバメート系農薬(Fujino et al., 2016)、プロム化難燃剤 (Matsubara et al., 2017)、紫外線吸収剤 octyl methoxycinnamate(Watanabe et al., 2018)、ビスフェノール A 類(Kojima et al., 2019)の代謝的活性変動を踏まえた核内受容体の活性化を明らかにすることが出来た。

(2) ベンズトリアゾール系紫外線吸収剤(Watanabe et al., 2019)および合成ムスク香料(渡部ら 2017)が核内受容体を介したラット in vivo でのシトクロム P450 を誘導することを見出した。一方、リン系難燃剤は核内受容体を活性化するとともに、加水分解酵素であるカルボキシルエステラーゼをラット in vitro で強く阻害することを見出した(津越ら 2018)。

(3) 新生仔ラットにおいて、ブロム化難燃剤が高感度で甲状腺ホルモンを攪乱する遺伝子を見出した(Fujimoto et al., 2018)。両生類(カエル)を用いた化学物質の影響評価に関しても、ブロム化難燃剤がシトクロム P450 を誘導するとともに、甲状腺ホルモン系を攪乱することを見出した(Mori et al., 2017)。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- 1) Kojima H., Takeuchi S., Sanoh S., Okuda K., Kitamura S., Uramaru N., Sugihara K., Yoshinari K. Profiling of bisphenol A and eight its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicology*, **413(2)** 48-55 (2019). DOI 10.1016/j.tox.2018.12.001 査読有
- 2) Watanabe Y., Hattori S., Emori C., Tachibana K., Kojima H., Yoshinari K., Kitamura S., Effects of benzotriazole ultraviolet stabilizers on rat PXR, CAR and PPAR $\alpha$  transcriptional activities. *Fundamental Toxicological Sciences*, **6(2)** 57-63 (2019). [http://www.fundtoxicsci.org/index\\_e.html](http://www.fundtoxicsci.org/index_e.html) 査読有
- 3) Fujimoto N., Kitamura S., Uramaru N., Miyagawa S., Iguchi T. Identification of hepatic thyroid hormone-responsive genes in neonatal rats: Potential targets for thyroid hormone-disrupting chemicals. *Toxicol. Lett.*, **286**, 48-53 (2018). DOI 10.1016/j.toxlet.2018.01.005 査読有
- 4) Takaoka N., Sanoh S., Okuda K., Kotake Y., Sugahara G., Yanagi A., Ishida Y., Tateno C., Tayama Y., Sugihara K., Kitamura S., Kurosaki M., Terao M., Garattini E., Ohta S. Inhibitory effects of drugs on the metabolic activity of mouse and human aldehyde oxidases and influence on drug-drug interactions. *Biochem. Pharmacol.*, **154**, 28-38 (2018). DOI 10.1016/j.bcp.2018.04.017 査読有
- 5) Kitamura S. Effect of the metabolic modification of environmental chemicals on endocrine-disrupting activity. *Yakugaku Zasshi* **138(5)**, 693-713 (2018). DOI 10.1248/yakushi.17-00214 査読有
- 6) Watanabe Y., Emori C., Uramaru N., Fujimoto N., Kitamura S. Study of metabolic activation of the UV-filter octyl methoxycinnamate for endocrine-disrupting activity. *Fundamental Toxicological Sciences*, **5(6)** 185-193 (2018). URL: [http://www.fundtoxicsci.org/index\\_e.html](http://www.fundtoxicsci.org/index_e.html) 査読有
- 7) Masuda A., Masuda M., Kawano T., Kitsnai Y., Nakayama H., Nakajima H., Kojima H., Kitamura S., Uramaru N., Hosaka T., Sasaki T., Yoshinari K. Construction of the database of rat repeated-dose toxicity tests of pesticides for the toxicological characterization of hepatocyte hypertrophy. *Yakugaku Zasshi*, **137** 611-622 (2017). DOI 10.1248/yakushi.16-00259 査読有

- 8) Matsubara K., Nakamura N., Sanoh S., Ohta S., Kitamura S., Uramaru N., Miyagawa S., Iguchi T., Fujimoto N. Altered expression of the Olr59, Ethe1, and Slc10a2 genes in the liver of F344 rats by neonatal thyroid hormone disruption. *Journal of Applied Toxicology*, **37(9)** 1030-1035 (2017). DOI 10.1002/jat.3452 査読有
- 9) Ozaki H., Sugihara K., Watanabe Y., Moriguchi K., Uramaru N., Sone T., Ohta S., Kitamura S. Comparative study of hydrolytic metabolism of dimethyl phthalate, dibutyl phthalate and di(2ethylhexyl) phthalate by microsomes of various rat tissues. *Food and Chemical Toxicology*, **100** 217-224 (2017). DOI 10.1016/j.fct.2016.12.019 査読有
- 10) Mori J., Sanoh S., Kashiwagi K., Hanada H., Shigeta M., Suzuki K., Yamamoto T., Kotake Y., Sugihara K., Kitamura S., Kashiwagi A., Ohta S. Developmental changes in drug-metabolizing enzyme expression during metamorphosis of *Xenopus tropicalis*. *The Journal of Toxicological Sciences*, **42(5)** 605-613 (2017). DOI 10.2131/jts.42.605 査読有
- 11) Tange S, Fujimoto N., Uramaru N, Wong FF, Sugihara K., Ohta S, Kitamura S. In vitro metabolism of methiocarb and carbaryl in rats, and its effect on their estrogenic and antiandrogenic activities. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **41** 289-297 (2016). DOI 10.1016/j.etap.2015.08.014. Epub 2015 Aug 14. 査読有
- 12) Tanoue C., Sugihara K., Tayama Y., Uramaru N., Watanabe Y., Ohta S., Kitamura S. Variability of zalepron 5-oxidase activity in mice and humans, and inhibition by raloxifene. *Drug Metabolism Letters*, **10** 278-285 (2016). DOI 10.2174/1872312810666161227145358 査読有
- 13) Shizuko Maeda, Eiko Takahashi, Yoshitaka Tayama, Shigeyuki Kitamura, Toyohisa Tsukamoto, Katsushi Miyake, Kazumi Sugihara. Estimation of occupational exposure to drugs during tablet crushing. *Fundamental Toxicological Sciences*, **3** 177-183 (2016). 査読有
- 14) Ozaki H., Sugihara K., Watanabe Y., Ohta S., Kitamura S. Cytochrome P450-inhibitory activity of parabens and phthalates used in consumer products. *The Journal of Toxicological Sciences*, **41** 551-560 (2016). DOI 10.2131/jts.41.551. 査読有
- 15) Fujino C, Tamura Y, Tange S, Nakajima H, Sanoh S., Watanabe Y., Uramaru N, Kojima H, Yoshinari K, Ohta S, Kitamura S. Metabolism of methiocarb and carbaryl by rat and human livers and plasma, and effect on their PXR, CAR and PPAR $\alpha$  activities. *J. Toxicol. Sci.*, **41** 677-691 (2016). DOI 10.2131/jts.41.677. 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

○国際学会

- 1) Kazumi Sugihara, Yoshitaka Tayama, Seigo Sanoh, Shigeyuki Kitamura, Shigeru Ohta Sex differences of aldehyde oxidases in mouse liver Assessment of inhibitory effects of drugs on mouse and human aldehyde oxidases through in silico, in vitro, and in vivo approaches. 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX
- 2) Naoki Takaoka, Seigo Sanoh, Katsuhiko Okuda, Go Sugahara, Ami Yanagi, Yuji Ishida, Chise Tateno, Yoshitaka Tayama, Kazumi Sugihara, Shigeyuki Kitamura, Mami Kurosaki, Mineko Terao, Enrico Garattini, Shigeru Ohta, Yaichiro Kotake Assessment of inhibitory effects of drugs on mouse and human aldehyde oxidases through in silico, in vitro, and in vivo approaches. 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX

○国内学会

- 3) 浦丸 直人, 坂本 佳澄, 鈴木 智貴, 木根淵 有香, 川村 涼, 渡部 容子, 北村 繁幸, 樋口 敏幸 ラズベリーケトンの還元的代謝および 3T3-L1 細胞の脂肪化抑制 日本薬学会 139 年会 千葉 2019 年
- 4) 杉原 数美, 村川 晃大, 荒井 美幸, 田山 剛崇, 清水 良, 北村 繁幸, 太田 茂 離乳期におけるラット肝 CYP および aldehyde oxidase の変動 日本薬学会 139 年会 千葉 2019 年
- 5) 田山 剛崇, 西村 さとみ, 杉原 数美, 北村 繁幸, 佐和 章弘, 三宅 勝志 Aldehyde oxidase および CYP2A6 が nicotine 代謝に及ぼす影響 日本薬学会 139 年会 千葉 2019 年
- 6) 津越 幸枝, 渡部 容子, 杉原 数美, 北村 繁幸 リン系難燃剤のラット肝および小腸カルボキシルエステラーゼに対する阻害効果 フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー 佐世保 2018 年
- 7) 佐藤志穂, 渡部容子, 立花 研, 浦丸直人, 小島弘幸, 吉成浩一, 樋口敏幸, 北村繁幸 フタル酸エステル類とその代謝物が核内受容体およびの転写活性に及ぼす影響 日本薬学会第 138 年会 2017 年
- 8) 岸沙也香, 村川晃大, 平本耕一, 清水 良, 佐能正剛, 太田 茂, 北村繁幸, 杉原数美 薬物代謝酵素アルデヒドオキシダーゼのマウスにおける性差と系統差 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 2017 年
- 9) 内藤祐子, 田坂真希, 富吉博也, 濱崎千尋, 清水 良, 佐能正剛, 太田 茂, 北村繁幸, 杉原数美 マウス肝アルデヒドオキシダーゼの性特異的発現機序の検討 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 2017 年
- 10) 杉原数美, 平本耕一, 田坂真希, 田山剛崇, 佐能正剛, 太田 茂, 北村繁幸 マウス肝アルデヒド酸化酵素分子種の系統差と性差 日本薬物動態学会第 32 回年会 2017 年
- 11) 國澤和憲, 岡田達司, 堂脇美緒, 井上沙也香, 清水 良, 北村繁幸, 太田 茂, 杉原数美 塩素消毒処理による医薬品および生活関連化学物質の毒性変動調査 フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー 2017 年
- 12) 服部祥子, 渡部容子, 立花 研, 小島弘幸, 吉成浩一, 北村繁幸 ベンズトリアゾール系紫外線吸収剤の PXR, CAR, および PPAR 活性とシトクロム P450 活性への影響 日本薬学会第 137 年会 仙台 2017 年
- 13) 清水 良, 浦丸直人, 渡部容子, 太田 茂, 北村繁幸, 杉原数美 臭素化難燃剤 PBDE 類による AhR の活性化を介した UGT 遺伝子発現誘導機構・内受容体 PXR および CAR 転写活性作用を示す甲状腺ホルモン構造類似環境化学物質のスクリーニング 日本薬学会第 137 年会 仙台 2017 年
- 14) 藤野智恵里, 渡部容子, 浦丸直人, 佐能正剛, 小島弘幸, 吉成浩一, 太田 茂, 北村繁幸 カルバメート系農薬のラットおよびヒトでの in vitro 代謝とその核内受容体活性への影響 日本薬学会第 137 年会 仙台 2017 年
- 15) 津越幸枝, 渡部容子, 杉原数美, 北村繁幸 リン系難燃剤のラットカルボキシルエステラーゼ活性に対する阻害効果 日本薬学会第 137 年会 仙台 2017 年
- 16) 柳川ひらり, 渡部容子, 小島弘幸, 吉成浩一, 北村繁幸 リン系難燃剤のラット核内受容体 PXR, CAR および PPAR に対するアゴニスト活性 日本薬学会第 137 年会 仙台 2017 年
- 17) 渡部容子, 服部祥子, 立花 研, 佐能正剛, 太田 茂, 北村繁幸 合成ムスク類のラット in vivo における肝シトクロム P450 活性への影響 日本薬学会第 137 年会 仙台 2017 年

18) 杉原数美 医薬品類による環境汚染と環境因子による毒性変動 日本薬学会第 137 年会  
仙台 2017 年

19) 佐能正剛 3次元培養およびヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた肝臓における薬物代謝、  
毒性評価 日本薬学会第 137 年会 仙台 2017 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：佐能 正剛

ローマ字氏名：SANOH, seigo

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科（薬）

職名：助教

研究者番号（8桁）：00552267

研究分担者氏名：清水 良

ローマ字氏名：SHIMIZU, ryo

所属研究機関名：広島国際大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：00570491

研究分担者氏名：杉原 数美

ローマ字氏名：SUGIHARA, kazumi

所属研究機関名：広島国際大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20271067

研究分担者氏名：藤本 成明

ローマ字氏名：FUJIMOTO, nariaki

所属研究機関名：広島大学

部局名：原爆放射線医科学研究所

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40243612

研究分担者氏名：渡部 容子

ローマ字氏名：WATANABE, yoko

所属研究機関名：日本薬科大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：60628056

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。