

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21710

研究課題名(和文)ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤のAhR活性化に起因する代謝運命と毒性機構の解明

研究課題名(英文)Metabolic fate and mechanism of toxicity caused by AhR activation derived from benzotriazole UV stabilizers

研究代表者

永吉 晴奈(Nagayoshi, Haruna)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：70516757

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): AhRリガンドであるベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤(BUVSs)のリスク評価を試みた。まず、8種の主要なシトクロムP450によるBUVSsの酸化代謝を検討した。その結果、BUVSsはAhR依存적および非依存적の複数のシトクロムP450によって酸化されAhRリガンド活性を失うこと、更にUV-P、UV-9については酸化代謝物の存在を確認した。また、umu試験を用いてBUVSsのDNA損傷性を評価したところ、UV-326を除いていずれも陰性であり、総合して低リスク群のリガンドであると推察した。UV-326は陽性に近い反応を示したため、より詳細なDNA損傷性の解析が必要だろう。

研究成果の概要(英文): In this study, risk assessment of 4 types of benzotriazole ultraviolet stabilizers (BUVSs) which show AhR ligand activities was attempted. First, oxidation of BUVSs by 8 types of major cytochrome P450s and changes in AhR ligand activity caused by oxidation were evaluated. As a result, BUVSs were oxidized by both AhR-dependent and independent cytochrome P450s, then, lose their original AhR ligand activity. It means that BUVSs would be categorized "no risk AhR ligand". Metabolite search was also conducted using LC-MS/MS, then UV-P and UV-9 confirmed the presence of oxidative metabolites. In addition, when the DNA damage property of BUVSs was evaluated using umu test, all BUVSs except for UV-326 were negative. From above, BUVSs other than UV-326 were considered as harmless low-risk AhR ligands. In the case of UV-326, it showed nearly positive response by umu test, therefore, comprehensive genotoxicity assessment were required.

研究分野: 環境毒性学

キーワード: ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤 AhR シトクロムP450 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤 (BUVSs)はプラスチック製品の原料やフィルム、塗料、化粧品等に幅広く使用されている紫外線吸収剤である。近年、BUVSsによる環境汚染が懸念されており、実際に水環境、野生生物等に汚染の報告がある (Nakata, H. et al., Environ. Sci. Technol. 2009, 43 (18), p6920-6926)。申請者は、2015年にBUVSsのうちUV-P、UV-9、UV-090、UV-326にヒトダイオキシン受容体 (AhR) リガンド活性があることを世界で初めて報告した (Nagayoshi, et al. Environ. Sci. Technol. 2015, 49 (1), p 578-587)。

AhRの活性化はダイオキシン類や多環芳香族炭化水素類 (PAHs)の毒性発現に必須の現象であり、アレルギー反応等の免疫応答の亢進や発がんにも関係していることが近年報告されている (Duarte, J.H. et al., PLoS One, 2013, 8(11) e79819, Mimura, J. and Fujii-Kuriyama, Y., Biochimica et biophysica acta. 2003, 1619 (3), p263-268)。

BUVSsがハウスダストに存在すること、また化粧品や生活に身近な化成品にも使用されていることを考慮すると、BUVSsが化粧品やハウスダスト由来のアレルギー発症の一端を担っている可能性があり、BUVSsのAhRリガンドとしてのリスクの解明が急務である。しかしながら、申請者の報告まで、BUVSsがAhRリガンドとして機能することが知られていなかったため、この側面から評価した研究は世界を見ても皆無といっていよい状況であった。

2. 研究の目的

本研究ではBUVSsの代謝経路と代謝産物の毒性を解明し、BUVSsのAhRリガンドとしてのリスク評価に資する知見を提供すること目的とした。

AhRリガンドには環境汚染物質のみならず、食品中のポリフェノールなど多岐にわたる物質が該当する。AhRリガンドの多くはヒトに対するリスクの低い物質である。例えば、ポリフェノール類はAhRリガンドとして機能するものの、人体に対してはリスクを持たない。その理由として、速やかな代謝・排泄が考えられている。

現在得られているAhRリガンドに関する知見から、ハイリスクなAhRリガンドは残留性が高く、AhR活性が持続する代謝を受けた際にDNA損傷性や変異原性を獲得するという特徴を持つため、本研究では、この2点に着目して、代謝前後のAhRリガンド活性の変化と代謝後のDNA損傷性について評価した。

3. 研究の方法

(1) シトクロム P450 による酸化的代謝

UV-P、UV-9、UV-090、UV-326にヒトブールド肝ミクロソーム、ヒト組換えミクロソーム CYP1A1、1A2、1B1 (以上 AhR 依存的に機能)と CYP2A6、2B6、3A4、2C19、2E1 (以上 AhR 非依存的に機能)を反応させ、反応前後における AhR リガンド活性を酵母レポーター遺伝子アッセイによって比較した。また、反応によって生じた酸化的代謝産物の探索を液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて行った。

(2) umu 試験

変異原性試験キットウムラック AT-F (株式会社蛋白質精製工業)を使用した。前培養した菌液に被験物質を加え、本培養した。その際、代謝活性化の影響を見るために S9 を加えた培養も行った。一定時間培養後に発色剤を加えて反応させ、吸光度から変異原性を確認した。

4. 研究成果

(1) シトクロム P450 による酸化的代謝

AhR リガンドである BUVSs 4 種を代表的な 8 種類のシトクロム P450 によって酸化させ、酸化前後の AhR リガンド活性を比較した。その結果、UV-P はヒトミクロゾームの他、CYP1A1、1A2、1B1、2A6 との反応で、UV-9 はヒトミクロゾーム、CYP1A1、1A2、1B1、2A6、2B6 との反応で、UV-326 はヒトミクロゾームとの反応で、UV-090 は CYP2B6 との反応で酸化され、反応後の AhR リガンド活性が顕著に低下した (表 1)。このことから、BUVSs はヒト体内では短時間しか AhR リガンド能を持たない可能性が示され、BUVSs がポリフェノール類のようにリスクが低い、あるいはリスクを持たない AhR リガンドであると推察した。

表 1 CYPs による BUVSs の代謝試験結果まとめ

	UV-P	UV-9	UV-326	UV-090
HLM	○	○	○	×
CYP1A2	○	○	×	×
CYP1B1	○	○	×	×
CYP2A6	○	○	×	×
CYP2B6	×	○	×	○
CYP3A4	×	×	×	×
CYP2C19	×	×	×	×
CYP2E1	×	×	×	×

また、LC-MS/MS による酸化的代謝物、すなわち BUVSs の水酸化体を探索したところ、AhR リガンド活性が低下したシトクロム P450 の反応液から、特徴的な酸化的代謝物が少なくとも 6 種類存在することを明らかにした。そのマススペクトルを図 1 から図 6 に示す。AhR リガンドは一般的には自らが AhR を活性化した際に誘導される CYP1A1、1A2、1B1 によって代謝されるが、今回いずれの BUVSs も AhR 非依存的に機能する CYPs による代謝と AhR リガンド活性の低下を確認した。

BUVSs を代謝した CYP2A6 はたばこの煙由来のニトロソアミンや、一部のポリ塩化ビフェニル類 (PCBs) の代謝など、広範囲の物質の代謝に寄与する CYPs 分子種である。また CYP2B6 も PCB をはじめとした多くの環境汚染物質を酸化する代表的 CYPs の一つである。これらの分子種と BUVSs が反応したメカニズムについてはドッキングシミュレーション法等の計算化学的手法によって解明できるだろう。

また、UV-326 においてはヒトミクロゾーム以外には今回試験に供したいずれの CYPs によっても AhR 活性が低下しない、すなわち代謝されなかった。本研究で評価対象とした 4 種の BUVSs のうち UV-326 に関しては、他の物質とは違う代謝運命をたどる可能性がある。

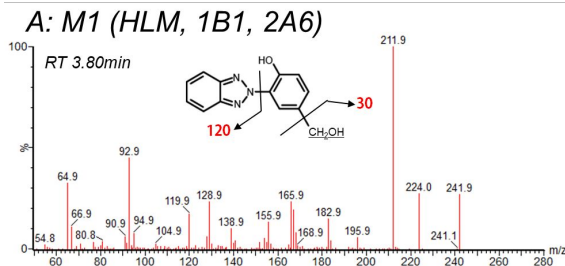


図 1. UV-P 代謝物のマススペクトル 1

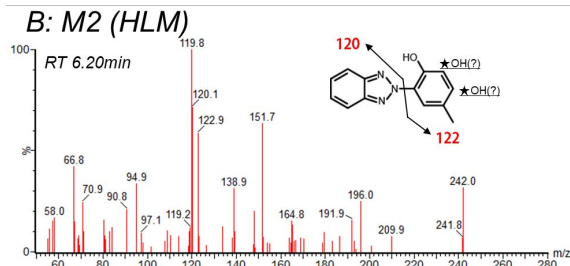


図 2. UV-P 代謝物のマススペクトル 2

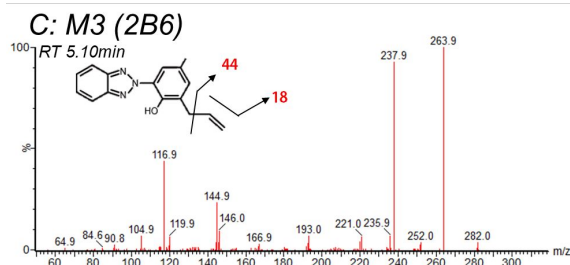


図 3. UV-9 代謝物のマススペクトル 1

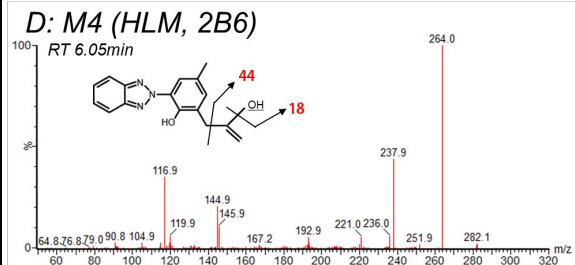


図 4. UV-9 代謝物のマススペクトル 2

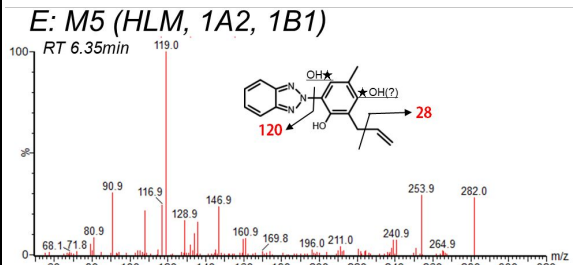


図 5. UV-9 代謝物のマススペクトル 3

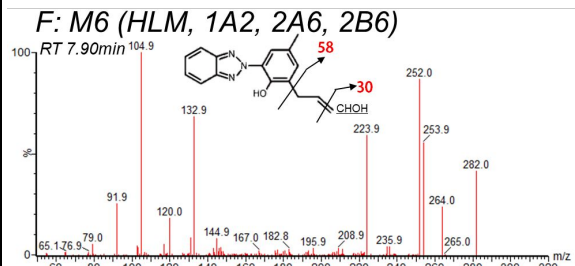


図 6. UV-9 代謝物のマススペクトル 4

(2) umu 試験

4 種の BUVSs の DNA 損傷性について、評価した。評価バッテリーとして、新規医薬品や新規化合物承認の際に必要な遺伝毒性試験として幅広く用いられている umu 試験を選択した。定石通り、代謝活性下および非活性下の DNA 損傷性を併せて評価するため、同試験を S9 存在/非存在下において実施した。

一般的に、溶媒標準の吸光度と比較して、2 倍以上の吸光度を示した場合、変異原性が疑われる。本実験の結果からは、いずれの物質にも明らかな DNA 損傷性は認められなかった (図 7)。しかしながら、UV-326 については 2 倍をわずかに下回る反応が確認された。

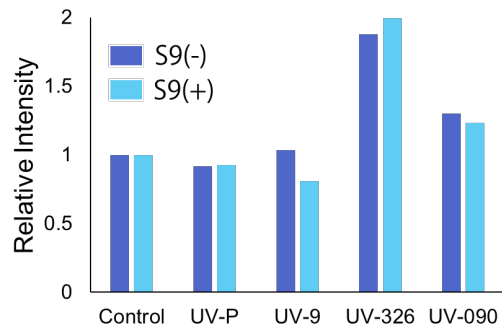


図 7 umu 試験結果

DNA 損傷性のメカニズムは多岐にわたるため、それを評価する試験系は umu 試験以

外にも複数存在する。今後は、それら複数の評価系も用いて総合的に UV-326 の DNA 損傷性、変異原性について慎重に検討する必要があるだろう。

以上から、AhR リガンドである BUVSs4 種 (UV-P、UV-9、UV-090、UV-326) はいずれもヒト体内において比較的速やかに代謝され AhR 活性を失うことが示唆された。つまり、BUVSs はハイリスクな AhR リガンドではないと推察された。しかしながら、UV-326 については、酸化に寄与する CYPs 分子種の特定に至らなかったことや変異原性の可能性も疑われることから、他の DNA 損傷性評価系等を用いて、そのリスクについて評価していきたい。

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 1 件)

永吉晴奈、柿本健作、梶村計志、小西良昌、ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の AhR リガンドとしてのリスク、第 27 回環境化学討論会、2018 年

〔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：
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

永吉 晴奈 (Nagayoshi, Haruna)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主任研究員
研究者番号：70516757

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()