

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12373

研究課題名(和文) 超微量分析手法を基盤とした化粧品等に含まれる紫外線吸収剤の経皮免疫毒性影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of transdermal immunotoxic effects of UV absorbers contained in cosmetics, etc. based on ultra-trace analysis methods

研究代表者

角谷 秀樹 (KAKUTANI, Hideki)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：00581414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎の発症機序の環境因子として化粧品や日焼け止めに含まれるUVSsが、アトピー性皮膚炎の増悪化に関与する可能性があるかと推察した。そこで、本研究では、マウスの即時型、および遅延型皮膚反応に対するUVSsの作用について、皮膚アレルギーモデルマウスを用い、UVSsの皮膚毒性評価の基礎情報の収集を行った。その結果、UVSsにはアレルギー反応を増悪もしくは軽減するものが存在することが示唆された。今後この作用機序を詳細に解析することで化粧品に含まれるUVSsの安全性に関する情報提供になるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、国民の健康に対する予防医学的知見及び学術・医療・衛生行政等の分野への有益な知見の提供が期待でき、現在まで未解明な様々なアレルギー疾患等に対する予防とその治療対策の一助となるものと確信される。さらに、安全で安心、そして魅力的な化粧品/香粧品の創出に結びつくことに期待している。

研究成果の概要(英文)：It was speculated that UVSs contained in cosmetics and sunscreen as an environmental factor for the pathogenesis of atopic dermatitis may be involved in the exacerbation of atopic dermatitis. In this study, we collected basic information on the skin toxicity evaluation of UVSs using skin allergy model mice for the effects of UVSs on immediate and delayed skin reactions in mice. As a result, it was suggested that some UVSs exacerbate or alleviate allergic reactions. It is expected that detailed analysis of this mechanism of action will provide information on the safety of UVSs contained in cosmetics.

研究分野：細胞生物学

キーワード：紫外線吸収剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

紫外線による生体反応は、急性障害と慢性障害に分類され、急性障害の代表的なものが日焼け反応(サンバーン、サンタン)で、慢性障害としては長年にわたって紫外線を浴び続けることによって起こる光老化(シミ、シワ等)や皮膚癌等が知られている。従って、これらの予防には紫外線による皮膚への刺激を軽減することが必要不可欠である。そのため、近年、美白が好まれることも相まって老若男女に関わらず日焼け止め等の化粧品が広く使用されている(SBIアラプロモ社の調査によると調査対象者の82%が紫外線対策として日焼け止めを使用すると回答している)。日焼け止めには紫外線を無害な熱エネルギーに変換する紫外線吸収剤(UVSs)が用いられている。UVSsは、その基本骨格からベンゾトリアゾール系、ベンゾフェノン系、シアノアクリレート系、トリアジン系に分類され、薬事法に基づく化粧品基準によりポジティブリストに上げられ、化粧品中への配合量が制限されている。さらに、UVSsは日焼け止め等のパーソナルケア製品以外にサングラスや衣料品、UVカット洗剤・柔軟剤等日常的に接する多くの商品に含まれており、特に近年では、男性や小児の美容への関心の高まりにより、使用量は増加の一途をたどっている。事実、富士キメラ総研は、2021年のUVSsの市場規模は2017年比約17%増の約40億円に上ると予想していることから、今後益々UVSsの需要が増すことは疑いの余地はない。一方、ベンゾトリアゾール系UVSsであるUV-320は、その高い蓄積性と難分解性が注視され、2004年に化審法の第一種特定化学物質に指定され、同系統のUV-327とUV-350は監視化学物質に指定されているものの、これら3つのUVSs以外は未だ規制はされていない。UVSsの多くがダイオキシン類受容体であるAhR結合活性を有すること(Nagayoshi H. *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, 2015)、並びにTCDDと同程度のlog Kowを有することから、申請者はダイオキシン類と同様の毒性を有しているものと推察した。さらに、規制対象物質のみならず未規制のUVSsも環境・生体中に存在することを明らかとしたことから、これらUVSsのヒトに対する毒性評価、特に皮膚におけるアレルギーの誘発・増悪性を包括的に解明することが急務であると確信した。

2. 研究の目的

本申請課題では、UVSsが有するアレルギーの誘発・増悪性を包括的に解明することが急務であると推察し、機器分析的手法と分子生物学・免疫学的手法を用いてUVSsの単独・複合曝露による皮膚免疫毒性影響を科学的根拠に基づいて立証し、安全性を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス

6週齢の雌性BALB/cマウスは、清水実験材料より購入し、12時の明暗サイクル、 $23 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ の条件下、少なくとも1週間馴化させた。なお、動物実験に際しては、摂南大学動物実験委員会承認を受け、動物実験における指針を遵守して行った。

(2) 接触過敏症モデル動物を用いた検討

マウスの背部の毛をトリマーで剃った。感作は、毛を剃った背部にvehicle(アセトン:オリーブ油=4:1)、0.5% DNFB、5% BUVSs、5% BUVSsと0.5% DNFBの混合したものを、 $25 \mu\text{L}/\text{匹}$ で滴下し、実験0日目と1日目に合計2回行った。耳介への惹起には、5% BUVSs単独もしくは0.5% DBFBを0.2%に変更したものを $20 \mu\text{L}/\text{匹}$ 塗布し、24時間後、耳介の厚さを、マイクロメータを使用して測定した。耳介の厚さを測定後、血液を採取し、室温にて30分放置した後、 $3000 \times g$ で10分間遠心し、上清を -20°C で保存した。

(3) アスカリス二相反応モデル動物を用いた検討

実験0日目に感作のため、アスカリス抽出物とアラムを1:1で混合した溶液を $500 \mu\text{L}/\text{匹}$ で腹腔内投与した。投与直後に、あらかじめ剃毛したマウスの背部に3% UVSsを $25 \mu\text{L}/\text{匹}$ で塗布した。その後、1日1回、感作期間である14日間塗布した。最終塗布から24時間後に体重測定をした後、耳介への惹起として、左耳には生理食塩水、右耳にはアスカリス抽出物 $10 \mu\text{L}/\text{耳}$ で皮内投与した。惹起後、マイクロメータを用いて経時的に耳介の厚さを測定した。測定した耳介の厚さからESR(ear swelling response)を下式により算出した。

$$\text{ESR} = ((\text{皮内投与後の耳介の厚さ} - \text{皮内投与前の耳介の厚さ}) / \text{皮内投与前の耳介の厚さ}) \times 100$$

耳介の厚さを測定後、血液を採取し、室温にて30分放置した後、 $3000 \times g$ で10分間遠心し、上清を -20°C で保存した。

(4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるタンパク量の測定

前日にCapture Antibodyを炭酸緩衝液(pH 9.6)に溶解し、96穴NUNC Immuno plateに $100 \mu\text{g}/\text{well}$ となるように分注し、 4°C で一晩固相化した。4%ブロックエースを用いて、室温にて2時間ブロッキングした。0.05% Tween 20を含む、Tris-buffered saline (TBS: 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1 M NaCl) (TBS-T)にて10倍希釈したブロックエース(sample diluent)を用いて、各種サン

ルを適宜、希釈し、100 μ L/well でプレートに添加し、室温にて 2 時間反応させた。その後、sample diluent にて Detection Antibody を適宜、希釈し、100 μ L/well となるように加え、室温にて 1 時間反応させた。また、sample diluent にて Avidin-HRP を適宜、希釈し、100 μ L/well となるように加え、室温にて 30 分間反応させた。次に、TMB solution を加え、室温で 30 分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。TriStar LB941 microplate reader (Berthold) を用いて、450 nm 吸光度を測定した。

4 . 研究成果

(1) 接触過敏症モデル動物を用いた検討

BUVSs 単独塗布では耳介の腫れに変化は観察されなかった。一方、DNFB と混合塗布すると、BUVSs は DNFB による耳介の腫れを抑制した。またマウスの死亡や異常行動も観察されなかった。次に、Th1 系のサイトカイン量を測定すると、Tinuvin P、UV-234、UV-320、UV-326、UV-329、UV-360 において IFN- γ 量が減少した。TNF- α 量 で有意な差は得られなかった。Th2 系のサイトカイン量を測定すると、IL-4 量、IL-10 量では有意な差は得られなかった。IgE 抗体価には、BUVSs の単独群、DNFB と BUVSs の混合群で大きな差は見られなかった。このことから、BUVSs の接触過敏反応抑制作用は IFN- γ 量に依存することが示唆される。また、TNF- α 、IL-4、IL-10、Ig-E と耳介の厚さを比較すると相関は得られなかった。以上より、BUVSs は DNFB 誘発性接触皮膚炎を抑制する傾向にあると推察される。

(2) アスカリス二相反応モデル動物を用いた検討

即時相において、UV-320 は即時反応を抑制した。UV-320 以外の UVVs は即時反応を増悪した。特に、benzophenone-3、benzophenone-6、benzophenone-12、5809-23-4 は有意に即時反応を増悪した。遅延相においては、benzophenone-8、benzophenone-12、5809-23-4 は遅延反応を増悪する傾向が観察された。これらのことより、UV-320 以外の UVVs は皮膚に塗布することで、アレルギー反応を増悪することが示唆された。次に、UVVs の塗布は、アスカリス二相反応モデルマウスの耳介腫脹に影響を及ぼしたことから、その作用機序を検討するために血中の炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ と、ヒスタミン量、アスカリス特異的 IgE 抗体価を測定した。アスカリス抽出物刺激によって誘導されるサイトカイン産生に及ぼす UVVs の影響を検討した。その結果、炎症性サイトカイン、ヒスタミン量は vehicle 群に比べ UVVs 塗布群で増加傾向を示すものもあったが、有意に増加するものは観察されなかった。さらにアスカリス特異的 IgE は、vehicle 群に比べ UVVs 塗布群で減少傾向が観察され、遅延相では増加傾向を示し、benzophenone-12、5809-23-4 は有意に増加した。以上より、耳介の腫脹と惹起後 30 分、20 時間における血中炎症性サイトカイン、ヒスタミン、アスカリス特異的 IgE との間に相関性は確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hideki Kakutani, Tomohiro Yuzuriha, Ema Akiyama, Teruyuki Nakao and Souichi Ohta	4. 巻 9
2. 論文標題 Long-term orally exposure of dioxins affects antigen-specific antibody production in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Reports	6. 最初と最後の頁 53-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxrep.2021.12.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計29件（うち招待講演 0件／うち国際学会 7件）

1. 発表者名 角谷秀樹、杠 智博、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 ダイオキシン類が有する生体バリア破綻作用における芳香族炭化水素受容体の重要性
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾晃幸、宮尾咲衣、角谷秀樹、杠 智博、太田壮一、泉川孝子、伊東厚子、黒田晴代、茂木真貴子
2. 発表標題 母乳汚染を引き起こすリン酸エステル系難燃剤の汚染経路の解明
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾晃幸、西條瑞希、角谷秀樹、杠 智博、太田壮一
2. 発表標題 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤による人体汚染実態とその汚染源の解明
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杠 智博、角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 紫外線吸収剤による肝脂質代謝系攪乱影響に関する in vitro 検討
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾晃幸、角谷秀樹、杠 智博、太田壮一
2. 発表標題 紫外線吸収剤が示すマウス肝薬物代謝酵素誘導能の比較
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杠 智博、神田亜矢子、角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 有機リン系難燃剤が有する代謝性疾患関連受容体に対する作用の検討
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Kakutani, Tomohiro Yuzuriha, Teruyuki Nakao, Souichi Ohta
2. 発表標題 TBBPA facilitated adipocyte differentiation but not osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells
3. 学会等名 9th International Symposium on Flame Retardants (BFR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teruyuki Nakao, Tomohiro Yuzuriha, Hideki Kakutani, Souichi Ohta
2. 発表標題 Organophosphorus flame retardants (OPFRs) in human breast milk in Japan: Implications for human exposure
3. 学会等名 9th International Symposium on Flame Retardants (BFR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Souichi Ohta, Tomohiro Yuzuriha, Hideki Kakutani, Teruyuki Nakao
2. 発表標題 In vitro assessment of lipid metabolism disruption by organophosphorus flame retardants
3. 学会等名 9th International Symposium on Flame Retardants (BFR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Kakutani, Tomohiro Yuzuriha, Teruyuki Nakao, Souichi Ohta
2. 発表標題 Aryl hydrocarbon R plays an important role in Caco-2 cells exposed with TCDD
3. 学会等名 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Yuzuriha, Hideki Kakutani, Teruyuki Nakao, Souichi Ohta
2. 発表標題 Investigation of glucose and lipid metabolism disruption by organophosphorus flame retardants in human hepatoma cells
3. 学会等名 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Souichi Ohta, Hideki Kakutani, Tomohiro Yuzuriha, Teruyuki Nakao
2. 発表標題 TCDD facilitates the antigen-specific immunoglobulin production under oral or nasal administration
3. 学会等名 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teruyuki Nakao, Hideki Kakutani, Tomohiro Yuzuriha, Souichi Ohta, Takako Izumikawa, Atsuko Itou, Haruyo Kuroda, Makiko Mogi
2. 発表標題 Assessment of human exposure to organophosphorus flame retardants (OPFRs) in Japan
3. 学会等名 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角谷秀樹、杉本 冴、杠 智博、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 Tight junction構成タンパク質発現に及ぼすAhRリガンドの影響
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角谷秀樹、池田和樹、杠 智博、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 ヒト単球様細胞株を用いた炎症性サイトカイン産生を指標とした紫外線吸収剤の毒性評価
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角谷秀樹、赤荻澄香、杠 智博、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 皮膚アレルギーモデルマウスを用いた紫外線吸収剤の毒性評価
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杠 智博、荒木瑞久、角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 紫外線吸収剤が有する核内受容体活性化作用の評価
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杠 智博、田中寧々、角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤のNAFLD増悪への関与
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾晃幸、青木未奈、角谷秀樹、杠 智博、太田壮一
2. 発表標題 トランス型脂肪酸摂取マウスにおける脂肪酸分布特性と血中脂質への影響
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾晃幸、吉村優花、角谷秀樹、杠 智博、太田壮一
2. 発表標題 有機リン系難燃剤による母乳汚染とその汚染経路の究明
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木未奈、中尾晃幸、角谷秀樹、杠智博、太田壮一
2. 発表標題 食品に含まれるトランス脂肪酸幾何異性体の分析方法の構築
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田壮一、角谷秀樹、杠智博、中尾晃幸
2. 発表標題 ヒト間葉系幹細胞の分化に及ぼすTCDDとTBBPAの複合的曝露影響
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角谷秀樹、杠智博、中尾晃幸、太田 壮一
2. 発表標題 マウス授乳期の経母乳を介したTCDD曝露の有無による仔マウスにおける免疫機能に対する毒性影響
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角谷秀樹、赤荻澄香、杠智博、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 皮膚アレルギー増悪化作用を有する紫外線吸収剤の探索
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杠智博、田中寧々、角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 紫外線吸収剤によるNAFLDの増悪化への関与
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角谷秀樹、杉本冴、杠智博、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 芳香族炭化水素受容体を介したダイオキシン類による生体バリア破綻特性
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角谷秀樹、池田和樹、杠智博、中尾晃幸、太田壮一
2. 発表標題 チトクロムP450活性を指標とした健康有害物質の複合曝露影響の評価
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾晃幸、杠智博、角谷秀樹、太田壮一
2. 発表標題 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤による底質中の分布特性と組成解析
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杠智博、角谷秀樹、中尾晃幸、太田 壮一
2. 発表標題 紫外線吸収剤の核内受容体活性化作用
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関