

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22510071

研究課題名（和文）ブロム化難燃剤の甲状腺ホルモン攪乱における鍵を握る水酸化代謝物のターゲットの解明

研究課題名（英文） Determination of targets for thyroid hormone disruption by brominated flame retardants

研究代表者

北村 繁幸 (KITAMURA SHIGEYUKI)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40136057

研究成果の概要（和文）：

ある種の臭素系難燃剤が生体内で、甲状腺ホルモンと類似した構造の代謝物に変化することで、甲状腺ホルモンの作用を攪乱することを示した。これらの代謝物が甲状腺ホルモン機能を攪乱するには、甲状腺ホルモン受容体を始めとする核内受容体に対して親和性を示すこと、甲状腺ホルモン依存性のある種の蛋白質機能維持因子あるいは甲状腺ホルモン産生に係わる調節因子に対して攪乱作用を示すことを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Some brominated flame retardants were converted to the active metabolites which are related structures to thyroid hormone. These active metabolites showed higher affinity to thyroid hormone receptor and related nuclear receptors, and inhibited thyroid hormone dependent protein function-regulating factor, protein disulfide isomerase and thyroid hormonal level-regulating factor, iodotyronine deionidase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ブロム化難燃剤、内分泌攪乱、代謝的活性化、水酸化代謝物、甲状腺ホルモン、核内受容体、プロテインジスルフィドイソメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

ブロム化難燃剤はパソコン、テレビ等の家電品や建材の難燃性を目的として、広く使用

されている。Tetrabromobisphenol A や polybrominated diphenyl ether (PBDE) などがあり、我が国での使用量は非常に多く、

その恩恵は多大なものである。しかし、体内での蓄積量の増加に伴い何らかの作用が発現されることが危惧されている。

一方、水酸化 PCB は PCB の活性代謝物として、その毒性に深く関与している。ブロム化難燃剤においても、その水酸化体がヒト血中から検出されている。この中には、芳香環に結合した水酸基とハロゲンが隣接し、甲状腺ホルモンとの構造類似性が見られるものがあり、甲状腺ホルモン作用を攪乱することが予想される。

2. 研究の目的

ブロム化難燃剤はその残留性からダイオキシンに続く残留性物質としての関心を集めている。これまでに、研究代表者は PBDE の活性代謝物の検討を行い、幾つかの水酸化代謝物が甲状腺ホルモン類似構造をとることで、甲状腺ホルモン受容体(TR)に対する親和性を発現することを示した。しかし、水酸化代謝物の甲状腺ホルモン攪乱作用の明確なるターゲットを明らかにするには至っていなかった。

本研究では、PBDE の水酸化代謝物を活性本態として捉え、各種核内レセプターとの親和性の他に、甲状腺ホルモン依存性で細胞内蛋白質機能維持因子である protein disulfide isomerase (PDI) との相互作用あるいは甲状腺ホルモン産生に係わる調整因子である iodotyronine deionidase (IYD) 活性への影響を加味し、PBDE の甲状腺ホルモン攪乱の全容を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ブロム化難燃剤の水酸化体の活性発現のターゲットを解明するために、(1)各種レセプターとの親和性、(2)PDI および IYD との親和性さらに(3)それらの生体影響に関する研究を遂行し、(4)PBDE のこれらの攪乱における代謝的活性化を確立させる。

(1)核内受容体を介した内分泌攪乱作用の活性測定は、研究代表者らが確立させた培養細胞を用いたレポーターアッセイを用いて行う。

(2)PDI および IYD との親和性についても受容体競合アッセイで行う。

(3)新生仔実験動物、両生類およびミジンコにおける *in vivo* レベルでの影響について、研究代表者らの手法に基づき検討する。

(4)研究代表者らがこれまでに行ってきた内分泌攪乱物質の代謝的活性化の実績を踏まえ、PBDE の代謝的活性化を確立する。

4. 研究成果

研究代表者は臭素化難燃剤 polybrominated diphenyl ether (PBDE)の幾つかの水酸化代謝物が甲状腺ホルモン類似構造をとることで、

甲状腺ホルモン受容体(TR)との親和性を示すことを見出した。しかし、水酸化代謝物の明確なるターゲットを示すには至っていなかった。

本研究では、これらの水酸化体の(1)TR を始めとする核内受容体を介した甲状腺ホルモン攪乱作用、(2)甲状腺ホルモン依存性の細胞内蛋白質機能維持因子 protein disulfide isomerase (PDI)と相互作用、(3)甲状腺ホルモン産生に係わる iodotyronine deiodinase (IYD) に対する影響を新たなターゲットとして捉え、(4)これら化学物質の *in vivo* 評価をも加味し、(5)これらの攪乱活性の構造活性相関に関しても念頭に入れ、PBDE の水酸化体の甲状腺ホルモン攪乱に関する検討を行い、次のような結果を得ることが出来た。

(1) 水酸基とブロムが置換基として隣接した構造を持つ PBDEs において、TR に対して親和性を示すことをレポーターアッセイあるいはバインディングアッセイより示した。さらには、抗アンドロゲン作用およびグルココルチコイド受容体に対して、アゴニスト活性を示すことを chinese hamster ovary cells を用いた転写活性化アッセイより明らかにした。

(2) PDI には甲状腺ホルモンおよびエストロゲン結合部位が存在し、それぞれのホルモンと結合することで、作用を発現している。本研究から、ブロムが隣接した水酸化 PBDEs は PDI に対して、強い親和性を示した。

(3) 遺伝子組み換えによって発現させた IYD に対して、ある種の水酸化 PBDEs が結合活性を示した。

(4) ある種の水酸化 PBDEs には、オタマジャクシのカエルへの変態を遅らせる効果が見られた。

(5) 水酸化 PCB が甲状腺ホルモン攪乱活性を示すには、水酸基に2つのクロルが隣接する必要があった。しかし、水酸化 PBDEs は2つのブロムが隣接するとかえって、活性が減少し、ひとつのブロムが結合した方が高い傾向が見られた。

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18件)

1) Ozaki H., Sugihara K., Watanabe Y., Fujino C., Uramaru N., Sone T., Ohta S., Kitamura S., Comparative study of the hydrolytic metabolism of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-, heptyl- and dodecylparaben by microsomes of various rat and human tissues, *Xenobiotica*, in press (2013). DOI:10.3109/00498254.2013.802059

2) Tanoue C., Sugihara K., Uramaru N., Tayama Y.,

- Watanabe Y., Horie T., Ohta S., Kitamura S., Prediction of Human Metabolism of the Sedative-Hypnotic Zaleplon Using Chimeric Mice Transplanted with Human Hepatocytes, *Xenobiotica*, in press (2013). DOI: 10.3109/00498254.2013.788232
- 3) Suzuki G., Tue N.M., Malarvannan G., Sudaryanto A., Takahashi S., Tanabe S., Sakai S., Brouwer A., Uramaru N., Kitamura S., Takigami H., Similarities in the endocrine-disrupting potencies of indoor dust and flame retardants by using human osteosarcoma (U2OS) cell-based reporter gene assays, *Environ Sci Technol*, 47(6), 2898-2908. (2013). DOI: 10.1021/es304691a
- 4) Kamikyouden N., Sugihara K., Watanabe Y., Uramaru N., Murahashi T., Kuroyanagi M., Sanoh S., Ohta S., Kitamura S., 2,5-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone: a novel major in vitro metabolite of benzophenone-3 formed by rat and human liver microsomes, *Xenobiotica*, 43(6) 514-519 (2013). DOI: 10.3109/00498254.2012.742217
- 5) Watanabe Y., Kojima H., Takeuchi S., Uramaru N., Ohta S., Kitamura S., Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptor α and β and androgen receptor, *Food and Chemical Toxicology*, 57, 227-234 (2013). DOI: 10.1016/j.fct.2013.03.036
- 6) Kawabata K., Sugihara K., Sanoh S., Kitamura S., Ohta S., Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment by sunlight and UV-A, -B and -C irradiation, *J Toxicol Sci*, 38(2), 215-223 (2013). DOI: org/10.2131/jts.38.215
- 7) Tanoue C., Sugihara K., Uramaru N., Watanabe Y., Tayama Y., Ohta S., Kitamura S., Strain Difference of Oxidative Metabolism of the Sedative-Hypnotic Zaleplon by Aldehyde Oxidase and Cytochrome P450 in Vivo and in Vitro in Rats, *Drug Metab Pharmacokinet*, 28(3), 269-273 (2013). DOI: org/10.2133/dmpk.DMPK-12-NT-103
- 8) Sanoh S., Horiguchi A., Sugihara K., Kotake Y., Tayama Y., Uramaru N., Ohshita H., Tateno C., Horie T., Kitamura S., Ohta S., Predictability of Metabolism of Ibuprofen and Naproxen Using Chimeric Mice with Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 40(2), 2267-2272 (2012). DOI: 10.1124/dmd.111.040923
- 9) Tayama Y., Sugihara K., Sanoh S., Miyake K., Kitamura S., Ohta S., Developmental Changes of Aldehyde Oxidase Activity and Protein Expression in Human Liver Cytosol. *Drug Metab Pharmacokinet*, 27, 543-547 (2012) DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-11-NT-124
- 10) Sanoh S., Horiguchi A., Sugihara K., Kotake Y., Tayama Y., Ohshita H., Tateno C., Horie T., Kitamura S., Ohta S., Prediction of in vivo hepatic clearance and half-life of drug candidates in human using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos*, 40(2), 322-328 (2012). DOI: 10.1124/dmd.111.040923
- 11) Hashimoto S., Yoshimura H., Okada K., Uramaru N., Sugihara K., Kitamura S., Imaoka S., Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their derivatives on protein disulfide isomerase activity and growth hormone release of GH3 cells. *Chem. Res. Toxicol*, 25(3), 656-663 (2012). DOI: 10.1021/tx200374s
- 12) Kawabata K., Sugihara K., Sanoh S., Kitamura S., Ohta S., Ultraviolet-photoproduct of acetaminophen: Structure determination and evaluation of ecotoxicological effect. *J Photochem Photobiol A Chem*, 249, 29-35 (2012). DOI: 10.1016/j.jphotochem.2012.07.018
- 13) Matsubara K., Sanoh S., Ohta S., Kitamura S., Fujimoto N., An improved thyroid hormone reporter assay to determine the thyroid hormone-like activity of amiodarone, bithionol, closantel and rafoxanide. *Toxicol Lett*, 208, 30-35 (2012). DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.10.004
- 14) Fujimoto N., Kitamura S., Kanno J., Androgen dependent transcription of a mouse prostatic protein gene, PSP94-involvement of estrogen receptors. *J. Steroid Biochem Mol Biol*, 127(3-5), 301-306 (2011). DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.08.001
- 15) Takeuchi S., Shiraishi F., Kitamura S., Kuroki H., Jin K., Kojima H., Characterization of estrogen and androgen receptor activities in 100 hydroxylated polychlorinated biphenyls, including congeners identified in humans. *Toxicology*, 289, 112-121 (2011). DOI: 10.1016/j.tox.2011.08.001
- 16) Tayama Y., Sugihara K., Sanoh S., Miyake K., Morita S., Kitamura S., Ohta S., Effect of tea beverages on aldehyde oxidase activity. *Drug Metab Pharmacokinet*, 26(1), 94-101 (2011). DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-10-NT-078
- 17) Yao, H. T., Chang, Y. W., Uramaru N., Watanabe, Y., Kitamura S., Kuo, Y. H., Lii, C.K., Yeh, T.K., Effects of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on hepatic drug-metabolizing enzymes and plasma tolbutamide concentration in rats. *J. Ethnopharmacol*, 142(1), 121-128 (2012). DOI: 10.1016/j.jep.2012.04.024
- 18) Uramaru N., Shigematsu H., Toda A., Eyanagi R., Kitamura S., Ohta S., Design, synthesis, and pharmacological activity of

nonallergenic pyrazolone-type antipyretic analgesics. *J Med Chem*, 53, 8727-8733 (2010). DOI: 10.1021/jm101208x

〔学会発表〕(計 74 件)

1) Kawabata K., Ogawa Y., Sugihara K., Sanoh S., Kitamura S., Ohta S., Effect of UV irradiation on the ecotoxicity of pharmaceuticals in aquatic environment, *The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology*, Sendai, Japan. (2012).

2) Sanoh S., Naritomi Y., Sato K., Kawamura A., Horiguchi A., Sugihara K., Tateno C., Horie T., Kitamura S., Ohta S., Prediction of human pharmacokinetics by allometric scaling using chimeric mice with humanized liver, *19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations 12th European Regional ISSX Meeting*, Noordwijk aan Zee, Netherlands. (2012).

3) Kitamura S., Watanabe Y., Uramaru N., Takeuchi S., Kojima H., Metabolism of benzophenone-3, a sunscreen, by rat liver microsomes and modification of the endocrine-disrupting activity. SETAC (The Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Asia Pacific 2012 Meeting Abstract, 246 (2012)

4) Uramaru, N., Watanabe, Y., Kitamura, S., Takeuchi S., Kojima H., Metabolism of parabens by rat liver microsomes and its modification of the endocrine-disrupting activity. SETAC (The Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Asia Pacific 2012 Meeting Abstract, 247 (2012).

5) 小原裕月, 佐能正剛, 杉原数美, 岸野貴大, 田山武崇, 浦丸直人, 立野知世, 北村繁幸, 太田茂, ヒト・マウスにおけるアルデヒドオキシダーゼの代謝活性と基質特異性の比較, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

6) 山頭征岳, 佐能正剛, 杉原数美, 江尻洋子, 堀江透, 北村繁幸, 太田茂, ラット初代肝細胞スフェロイドにおける蛍光プローブを用いたアセトアミノフェンによる肝毒性評価, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

7) 藤本真美, 佐能正剛, 成富洋一, 佐藤公也, 河村章生, 堀口彩, 杉原数美, 立野知世, 堀江透, 北村繁幸, 太田茂, ヒト肝細胞移植キメラマウスにおけるアロメトリックスケーリングを用いたヒト体内動態予測の検証, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

8) 村橋毅, 伊藤貴信, 大津亜紀子, 小宮山拓実, 橋沼亨, 樋口敏幸, 北村繁幸: 調剤薬局調剤室における医薬品による室内環境汚染, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜.

(2013).

9) 川畑公平, 尾川雄一, 杉原数美, 佐能正剛, 北村繁幸, 太田茂, アセトアミノフェンおよびスリダクの水環境中における光分解物の同定, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

10) 清水良, 山口雅史, 浦丸直人, 黒木広明, 北村繁幸, 太田茂, 杉原数美, PCB および PBDE の水酸化代謝物のヨードチロシン脱ヨウ素化酵素阻害作用, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

11) 段野正裕, 垂井真紀, 入江朋子, 田崎智也, 伊藤格, 三間昭平, 清水亨, 北村繁幸, 杉原数美, 穀物によるマウス肝薬物代謝酵素の変動, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

12) 田山武崇, 杉原数美, 三宅勝志, 北村繁幸, 太田茂, Allopurinol 代謝における xanthine oxidase および aldehyde oxidase の関与, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

13) 浦丸直人, 井上俊夫, 渡部容子, 太田茂, 北村繁幸, パラベン類のラット肥満細胞におけるヒスタミン遊離作用及びモルモット皮膚反応の構造活性相関の検討, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

14) 白鳥由衣, 渡部容子, 小島弘幸, 武内伸治, 江森千紘, 浦丸直人, 北村繁幸, ラット肝ミクロソームによるベンゾフェノン系紫外線吸収剤の代謝とエストロゲン活性の変動, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

15) 渡部容子, 小島弘幸, 武内伸治, 長本哲明, 浦丸直人, 太田茂, 北村繁幸, 紫外線吸収剤ベンゾフェノン-3 のラットおよびヒトによる代謝とエストロゲンおよび抗アンドロゲン活性の変動, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

16) 渡部容子, 田中聡一, 藤野智恵里, 浦丸直人, 太田茂, 北村繁幸, 保存剤パラベン類のヒトおよびラット組織ミクロソームでの加水分解活性の構造代謝相関, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

17) 藤野智恵里, 渡部容子, 浦丸直人, 北村繁幸, 保存剤パラベン類のラット肝および小腸ミクロソームでのエステル交換反応, 日本薬学会第 133 年会, 3 月, 横浜. (2013).

18) 小原裕月, 佐能正剛, 杉原数美, 岸野貴大, 田山剛崇, 浦丸直人, 立野知世, 北村繁幸, 太田茂, ヒト・マウス・ヒト肝キメラマウスにおけるアルデヒドオキシダーゼの酵素活性の比較, 日本薬物動態学会第 27 回年会, 11 月, 千葉. (2012).

19) 藤本真美, 佐能正剛, 成富洋一, 佐藤公也, 河村章生, 堀口彩, 杉原数美, 立野知世, 堀江透, 北村繁幸, 太田茂, ヒト肝細胞移植キメラマウスにおけるアロメトリックスケーリングを用いたヒト血中動態予測性の検証, 日本薬物動態学会第 27 回年会, 11 月, 千葉. (2012).

20) 山頭征岳, 佐能正剛, 杉原数美, 江尻洋子, 堀江透, 北村繁幸, 太田茂: ラット肝細胞スフェロイドにおける蛍光プローブを

用いたアセトアミノフェン、ジクロフェナクによる肝毒性評価, 日本薬物動態学会第 27 回年会, 11 月, 千葉. (2012).

21) 杉原数美, 佐光華佳, 田上加苗, 三間昭平, 佐能正剛, 北村繁幸, 太田茂, 食餌がマウス肝薬物代謝酵素に及ぼす影響の 1H-NMR メタボローム解析, 日本薬物動態学会第 27 回年会, 11 月, 千葉. (2012).

22) 渡部容子, 小島弘幸, 武内伸治, 浦丸直人, 太田茂, 北村繁幸, 抗菌剤パラベン類の内分泌攪乱作用の特徴と構造活性相関, フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 10 月, 名古屋. (2012).

23) 川畑公平, 尾川雄一, 杉原数美, 佐能正剛, 北村繁幸, 太田茂, アセトアミノフェンの水環境中における光分解と光毒性, フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 10 月, 名古屋. (2012).

24) 松原加奈, 中村直樹, 佐能正剛, 杉原数美, 浦丸直人, 北村繁幸, 宮川信一, 井口泰泉, 藤本成明, 太田茂, 環境科学物質による甲状腺ホルモン攪乱作用の in vitro および in vivo 評価, フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 10 月, 名古屋. (2012).

25) 藤野智恵里, 田中聡一, 渡部容子, 浦丸直人, 北村繁幸, アルコール存在下におけるパラベン類の代謝, 第 56 回日本薬学会関東支部大会, 10 月, 東京. (2012).

26) 白鳥由衣, 渡邊麻友, 渡部容子, 浦丸直人, 北村繁幸, ラット肝ミクロソームによるベンゾフェノン系紫外線吸収剤の代謝, 第 56 回日本薬学会関東支部大会, 10 月, 東京. (2012).

27) 荒井優子, 青木純一, 渡部容子, 浦丸直人, 山路誠一, 北村繁幸, セリ科生薬エキスのラット肝シトクロム P450 系への影響, 第 56 回日本薬学会関東支部大会, 10 月, 東京. (2012).

28) 田中聡一, 渡部容子, 浦丸直人, 北村繁幸, カルボキシエステラーゼおよびシトクロム P450 が関与する抗菌剤パラベン類の代謝, 第 56 回日本薬学会関東支部大会, 10 月, 東京. (2012).

29) 長本哲明, 山川亜以子, 中尾浩文, 渡部容子, 浦丸直人, 北村繁幸, ラットにおける紫外線吸収剤ベンゾフェノン-3 の in vivo - in vitro 代謝の相関性, 第 56 回日本薬学会関東支部大会, 10 月, 東京. (2012).

30) 杉原数美, 渡部容子, 北村繁幸, 原田亜紀子, 太田茂, 山路誠一, 62 種生薬エキスの Ah レセプター結合活性の評価, 第 29 回和漢医薬学会学術大会, 9 月, 東京. (2012).

31) 川畑公平, 尾川雄一, 杉原数美, 佐能正剛, 北村繁幸, 太田茂, 水環境中医薬類の太陽光・紫外線による毒性変動, 第 39 回日本毒性学会学術年会, 7 月, 仙台. (2012).

〔図書〕(計 2 件)

1) 北村繁幸(分担執筆): 衛生薬学—健康と環境—, 永沼章, 姫野誠一郎, 平塚明 編集, 丸善出版, 2013 年 3 月出版

415 - 430 ページ

2) Kitamura S., Sugihara K., Fujimoto N., Yamazaki T., Organophosphates as endocrine disruptors. Anticholinesterase pesticides: Metabolism, neurotoxicity and epidemiology. Ed Tetsuo Satoh, Ramaesh C. Gupta, Chapter 17 John Wiley & Sons, Inc. 11 River Street, New Jersey 07030-5774, 189-202 (2010).

〔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

北村 繁幸 (KITAMURA SHIGEYUKI)
日本薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 40136057

(2) 研究分担者

藤本 成明 (FUJIMOTO NARIAKI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所
研究者番号: 40243612
杉原 数美 (SUGIHARA KAZUMI)
広島国際大学・薬学部
研究者番号: 20271067
小島 弘幸 (KOJIMA HIROYUKI)
北海道道立衛生研究所
研究者番号: 10414286

(3) 連携研究者

柏木 昭彦 (KASHIWAGI AKIHIKO)
広島大学 理学研究科
研究者番号: 50106796
浦丸 直人 (URAMARU NAOTO)
日本薬科大学・薬学部
研究者番号: 90424069