

博士論文

紫外線吸収剤 Benzophenone-3 およびその誘導体
の代謝と内分泌攪乱活性への影響

2015 年

渡部 容子

目次

略語一覧

| | |
|---|----|
| 第一章 序論 | 1 |
| 第二章 BP-3 の代謝 | |
| 第一節 BP-3 のラットにおける代謝 | |
| 第一項 緒言 | 5 |
| 第二項 BP-3 のラット肝ミクロソームによる代謝物の同定 | 6 |
| 第三項 BP-3 の代謝物の定量 | 9 |
| 第四項 5-OH BP-3 および 2,4-diOH BP のラット肝ミクロソームでの代謝 | 12 |
| 第五項 BP-3 のラット CYP 分子種による代謝 | 13 |
| 第二節 BP-3 のヒトにおける代謝 | |
| 第一項 BP-3 のヒト肝ミクロソームによる代謝 | 15 |
| 第二項 BP-3 のヒト CYP 分子種による代謝 | 16 |
| 第三節 小括 | 17 |
| 第三章 BP-3 の内分泌攪乱活性への代謝的影響 | |
| 第一節 BP-3 の内分泌攪乱活性への代謝的影響 | |
| 第一項 緒言 | 19 |
| 第二項 BP-3 代謝抽出物のエストロゲン活性 | 21 |
| 第三項 BP-3 代謝抽出物の抗アンドロゲン活性 | 22 |
| 第二節 BP-3 および各種代謝物の内分泌攪乱活性 | 23 |
| 第三節 BP-3 およびその誘導体の内分泌攪乱活性 | |
| 第一項 BP-3 およびその誘導体のエストロゲン活性 | 24 |
| 第二項 BP-3 およびその誘導体の抗アンドロゲン活性 | 27 |
| 第四節 小括 | 28 |
| 第四章 総括 | 30 |
| 実験の部 | 35 |
| 引用文献 | 46 |
| 論文の基礎となる原著 | 50 |
| 謝辞 | 51 |

略語一覽

| | |
|----------------------|---|
| BP | benzophenone |
| BP-3 | benzophenone-3 (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone) |
| 2,4-diOH BP | 2,4-dihydroxybenzophenone |
| 5-OH BP-3 | 2,5-dihydroxy-4-methoxybenzophenone |
| 2,3,4-triOH BP | 2,3,4-trihydroxybenzophenone |
| 2,4,5-triOH BP | 2,4,5-trihydroxybenzophenone |
| 3-OH BP-3 | 2,3-dihydroxy-4-methoxybenzophenone |
| 2'-OH BP-3 | 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone |
| 3'-OH BP-3 | 2,3'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone |
| 2,2',4-triOH BP | 2,2',4-trihydroxybenzophenone |
| 2,4,4'-triOH BP | 2,4,4'-trihydroxybenzophenone |
| 2,3',4-triOH BP | 2,3',4-trihydroxybenzophenone |
| 2,2',4,4'-tetraOH BP | 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone |
| 2,3,4,4'-tetraOH BP | 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone |
| 2,3',4,4'-tetraOH BP | 2,3',4,4'-tetrahydroxybenzophenone |
| Ace | acetone |
| AR | androgen receptor |
| CHO cell | Chinese hamster ovary cell |
| Dex | dexamethasone |
| DHT | 5 α -dihydrotestosterone |
| E2 | 17 β -estradiol |
| NADPH | β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| HF | hydroxyflutamide |
| 3-MC | 3-methylcholanthrene |
| MeOH | methanol |
| MUG | 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside |
| PB | phenobarbital |
| REC | relative effective concentration |
| RIC | relative inhibitory concentration |
| RT | retention time |
| UV | ultraviolet |

第一章 序論

紫外線は波長によって UVA (315-400 nm)、UVB (280-315 nm)、UVC (100-280 nm) の 3 種に大別される。UVC はオゾン層によって吸収散乱されるためにほとんど地表に到達しないが、UVA、UVB はオゾン層を通過し、地表に到達する。UVA は皮膚の浸透性が高く、フリーラジカルや活性酸素の生成に関与している。また、UVB は健康線とも呼ばれ新陳代謝の亢進やビタミン D₃ の合成に関与しているが、皮膚がんや白内障の原因とされており、人体に有害な紫外線を効果的に防御する対策が必要とされている。

紫外線遮断剤には、紫外線吸収剤と紫外線散乱剤がある。紫外線吸収剤は、紫外線を吸収し、熱などのエネルギーに変換して紫外線が皮膚の細胞に浸透するのを防ぐ。紫外線散乱剤は、物理的に紫外線を散乱、反射させて紫外線の影響を防ぐ。一般的に紫外線吸収剤に比べ紫外線散乱剤は安全性が高いといわれている。しかし、紫外線吸収剤のほうが、紫外線防止効果が高く、使用する際に皮膚が白くならず伸びが良いなど使用感が良いことから汎用されている。紫外線吸収剤は、日焼け止め、化粧品などのパーソナルケア製品をはじめとしてサングラスや衣料品、UV カット洗剤・柔軟剤など日常的に接する多くの商品に含まれており、美白という美容的価値観が定着した現在では一般的に広く使用されている。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。紫外線吸収剤は、紫外線による皮膚がんや、光線過敏症などの予防に有効だとされているが、皮膚に直接塗布するものが多く、経皮や粘膜から吸収され人体に影響を及ぼすことが懸念されている。

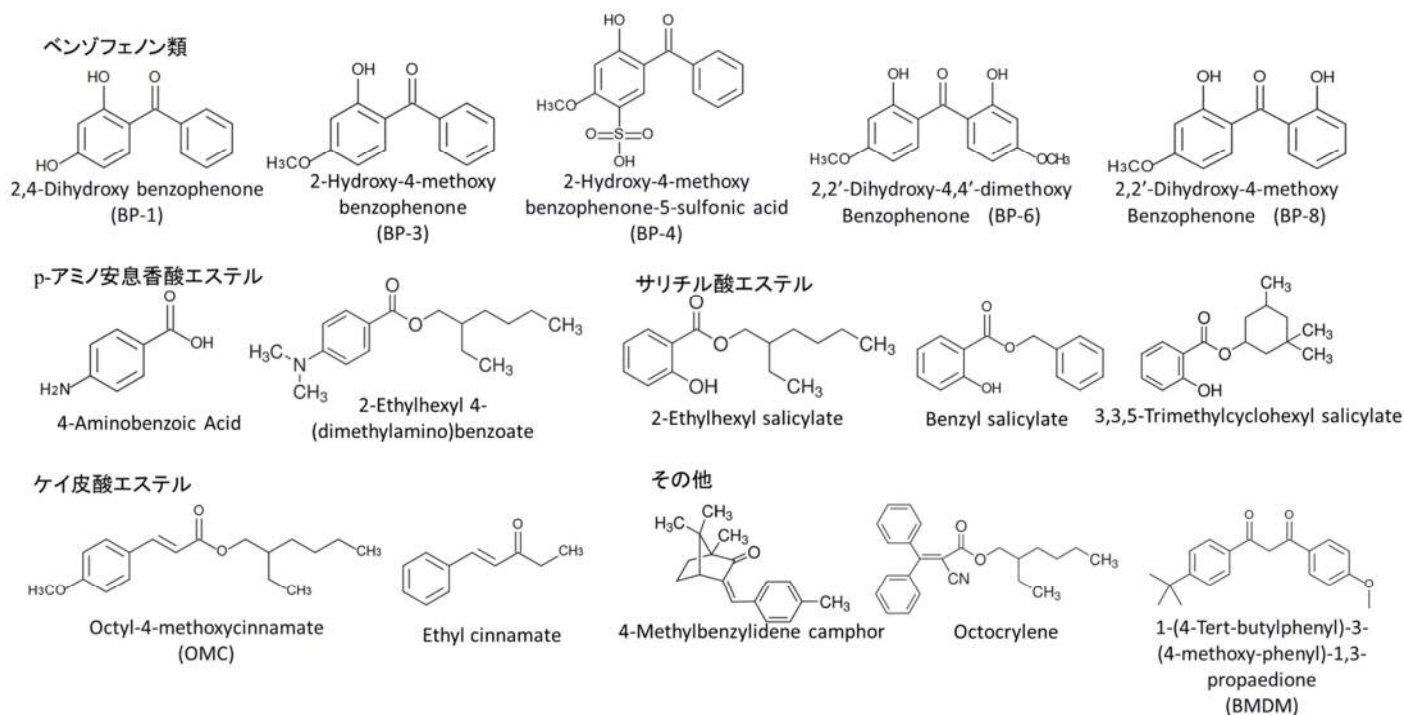


Fig. 1 Structures of UV absorbers.

紫外線吸収剤には、ベンゾフェノン類、*p*-アミノ安息香酸エステル、サリチル酸エステル、ケイ皮酸エステルなどがある (Fig. 1)。紫外線吸収剤には、それぞれ特異な吸収極大があり、幅広く吸収極大をカバーするため、市販の日焼け止めには通常、複数の紫外線吸収剤が用いられている。

その中で、Benzophenone-3 (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone; BP-3)は、吸収力はあまり強くないが、UVA を中心に UVB まで広く吸収する性質を持っているため、多くの製品に使用されている。Liao and Kannan (2014) の調査によると中国、アメリカにおいて約 81% のパーソナルケア製品に BP-3 が含まれている。また、使用量から皮膚吸収を介した BP-3 の暴露量はアメリカ成人女性で幾何平均値 24.4 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、95 パーセンタイル値 5160 $\mu\text{g}/\text{day}$ と算出されている。また、中国、アメリカにおける調査で子供、成人の尿サンプルのほとんどに BP-3 が検出され、特にアメリカの成人では、幾何平均値で 15.7 ng/ml と高い濃度で尿中に BP-3 見られたと報告がされている (Wang and Kannan, 2013)。さらに、BP-3 は脂溶性が高く皮膚から吸収されることによって生物濃縮がおこり、ヒトや野生動物への影響が懸念されている(Liao and Kannan, 2014)。BP-3 は魚や水環境中(下水汚泥など)からも見つかっており(Zhang et al., 2011; Bluthgen et al., 2012; Gago-Ferrero et al., 2013)、さらにヒトの尿や母乳からも検出されている(Gonzalez et al., 2006; Leon et al., 2010; Krause et al., 2012; Wang and Kannan, 2013)。農業従事者は、皮膚がんの予防のためにも日焼け止めの使用が推奨されているが、BP-3 を含む市販の日焼け止めの使用は農薬の経皮吸収率を上げるとの報告もある (Brand et al., 2002)。BP-3 は、肝毒性などいくつかの毒性作用を有するが、皮膚散布後の急性および亜慢性全身毒性が低いため、ヒトへの局所適用は安全であると考えられている (Okereke et al., 1995)。しかし、BP-3 の有害反応として、光アレルギーが報告されている (Schauder and Ippen, 1997)。さらに、MCF-7 cell 用いたレポーター遺伝子アッセイにおいて BP-3 を含むいくつかの benzophenone (BP) 類は、エストロゲン活性を示すため重要な問題となっている(Suzuki et al., 2005; Molina-Molina et al., 2008)。エストロゲン応答は、核内受容体ファミリーのメンバーである二つの異なる estrogenic receptor (ER) 、ER α と ER β を介して行われる(Kumar et al., 2011)。ER α と ER β は、エストロゲンに対して同様の親和性を持っているが、組織分布や生理機能では明確な違いがあるため、エストロゲン活性を適切に評価するためには ER α および ER β 両方のデータが必要となる(Shanle and Xu, 2011)。小島らは、Chinese hamster ovary (CHO) cell を用いた高感度な ER α 、ER β および androgen receptor (AR) 活性に対するアッセイ系を構築している(Kojima et al., 2003, 2004; Watanabe et al., 2013)。本研究では、この高感度な ER α 、ER β および AR 活性に対するレポーター遺伝子アッセイ系を用い、BP-3 とその代謝物に対するエストロゲン活性および抗アンドロゲン活性を測定した。

BP-3 のエストロゲン活性や抗アンドロゲン活性に関してはこれまでに *in vivo* および *in vitro* での様々な報告がある。*in vivo* でのエストロゲン活性を評価する uterotrophic assay (子宮肥大試験)においては、BP-3 自体はほとんど活性を示さないとの報告が多いが(Suzuki et al., 2005; Ohta et al., 2012)、Schlumpf ら (2001) の報告では、弱い活性があると報告されている。

また、BP-3 を含むいくつかの BP 類は抗アンドロゲンレポーター遺伝子アッセイにおいて陽性であることが見出され、BP 誘導体の構造活性相関が検討されている(Suzuki et al., 2005)。しかしながら、Yamasaki ら(2003)は、BP 類は *in vivo* での抗アンドロゲン活性の指標である Hershberger assay で活性がないと報告している。一方、ヒトにおいて、BP-3 を局所適用後、ボランティア全員の尿中から BP-3 が検出されたが、生殖ホルモンレベルはテストステロンのわずかな違いを除いて、変化はなかったとの報告がある(Janjua et al., 2004)。

このように BP-3 は、弱いエストロゲン活性や抗アンドロゲン活性の報告もあるが、化学物質の安全性を評価するにあたって生体内での代謝を考慮することは必須である。これまでも、そのもの自身では活性を示さないが、生体内で代謝を受けることで、初めて活性を示す化合物が報告されており、内分泌攪乱活性物質の代謝的活性化として、*trans*-stilbene、diphenyl、diphenylmethane、2,2-diphenylpropane、styrene oligomers chalcone、dibenzyl、azobenzene、*trans*-stilbene oxide、methoxychlor、2-nitrofluorene、benzo[*a*]pyrene などが知られている (Kitamura et al., 2008) (Fig. 2)。

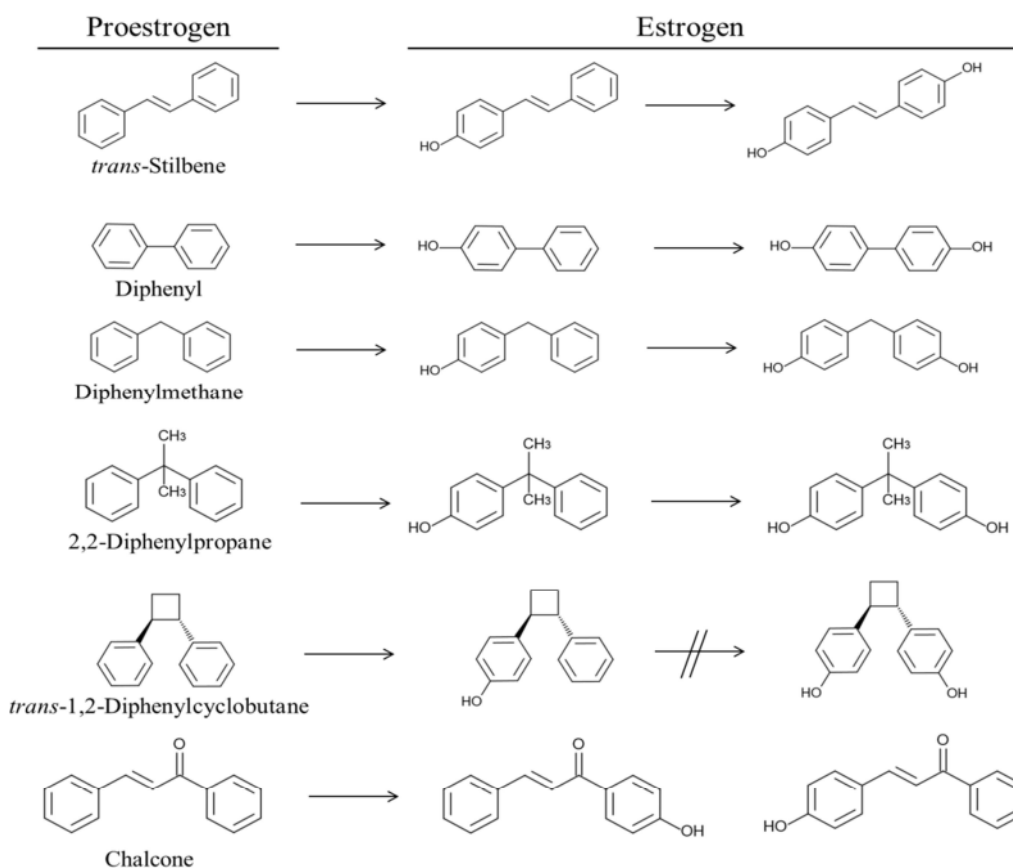


Fig. 2 Metabolic pathways for the activation of environmental chemicals to estrogens by the cytochrome P450 system shown by Kitamura et al. (2008).

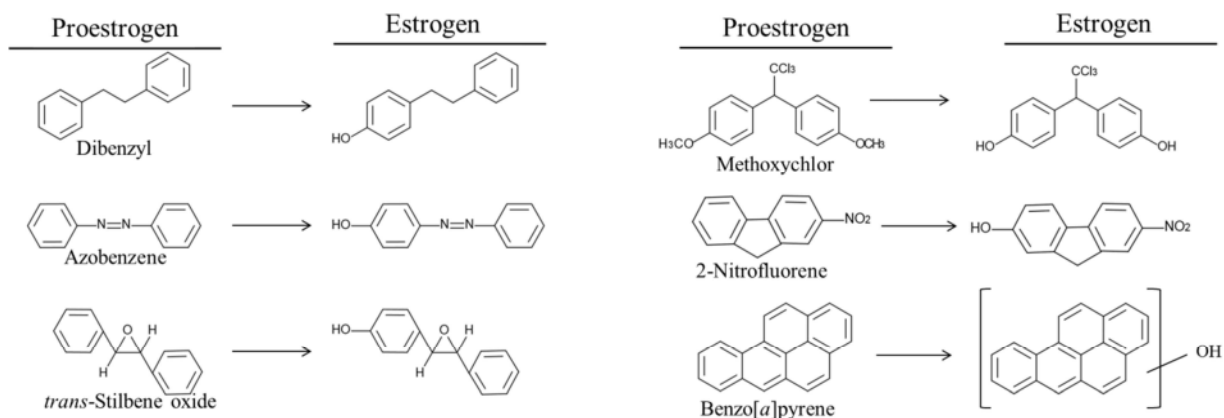


Fig. 2 (continued) Metabolic pathways for the activation of environmental chemicals to estrogens by the cytochrome P450 system shown by Kitamura et al. (2008).

BP-3 はこのように幅広くパーソナルケア製品に使用されており、近年、BP-3 が再注目されている。また、パーソナルケア製品は、皮膚に塗布し使用する製品が多い中、BP-3 は皮膚からの吸収が多いとも言われており、体内における毒性影響も懸念されている。しかし、体内に吸収されると、BP-3 は代謝を受けるため、BP-3 自身の毒性影響だけではなく、その代謝物の影響も考慮しなければならない。そこで、本研究では、BP-3 の代謝を深く精査すると共に BP-3 の代謝によるエストロゲン活性および抗アンドロゲン活性への影響、また、個々の代謝物のエストロゲン活性および抗アンドロゲン活性への影響について検討を行った。

第二章 BP-3 の代謝

第一節 BP-3 のラットにおける代謝

第一項 緒言

これまでに、BP-3 をラットに経口投与させた *in vivo* 代謝での尿中主代謝物として 2,4-diOH BP が報告されており、その他に 2,3,4-triOH BP、2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone (2'-OH BP-3) が報告されている (Okereke et al., 1993; Jeon et al., 2008) (Fig. 3)。さらに、BP-3 をラット皮膚に塗布して得られた代謝物としても、2,4-diOH BP、2'-OH BP-3 および 2,3,4-triOH BP が報告されている (Okereke et al., 1994)。また、ラット初代肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験からも同様の代謝物が検出されているが、さらに BP-3 のモノヒドロキシル化された代謝物も主代謝物として検出されている (Nakagawa and Suzuki 2002)。

一方、Van Liempd ら (2007) は、 β -ナフトフラボン前処理ラットの肝ミクロソームと BP-3 を反応させたところ、2,4-diOH BP 以外に 2 つの代謝物が得られたと報告している。それらは、BP-3 のモノヒドロキシル化された代謝物であるとしているが、ヒドロキシル基の位置を決定するには至っていない。

本研究では、BP-3 のラットおよびヒト肝ミクロソームでの代謝実験を行い、実験の部 Table 2 に示す 14 種類の BP-3 誘導体を対照物質として用いることによって、今回新たに 3 つの代謝物を同定した。

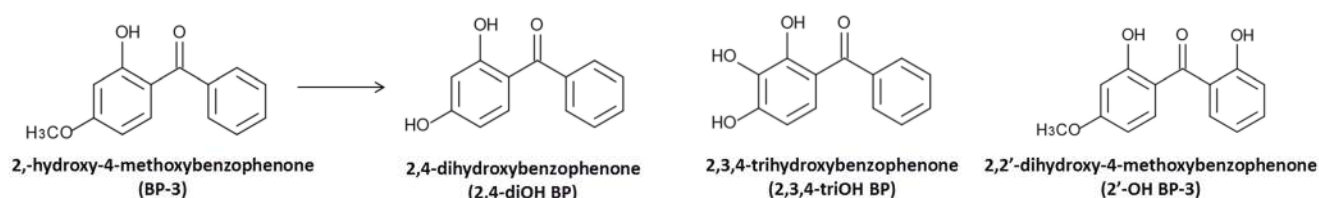


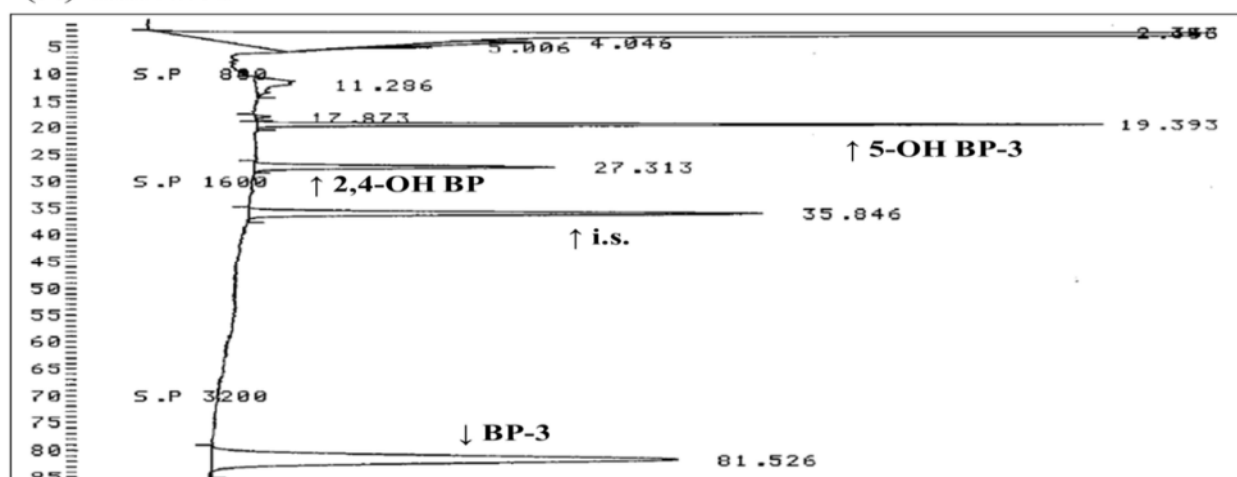
Fig. 3 Postulated metabolic pathways of BP-3 *in vivo* shown by Okereke et al. (1993)

第二項 BP-3 のラット肝ミクロソームによる代謝物の同定

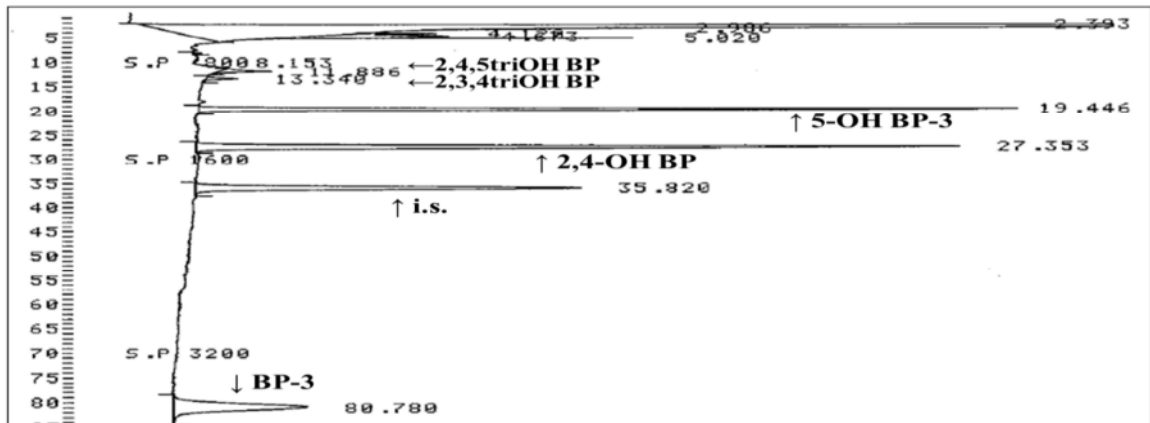
まず、BP-3 のラット肝ミクロソームによって生成される *in vitro* 代謝物の単離、精製を試みた。BP-3 を未処置および phenobarbital (PB)、3-methylcholanthrene (3-MC)、dexamethasone (Dex) および acetone (Ace) 前処置ラット肝ミクロソームを用い、NADPH 存在下、リン酸緩衝液中で代謝させた。それらの抽出物を HPLC 分析した結果、未処置ラット肝ミクロソームで代謝させた試料から 5-OH BP-3 と 2,4-diOH BP に相当する保持時間 (retention time: RT) RT 19.4 min と RT 27.3 min のピークが得られた。また、PB および 3-MC 前処置ラット肝ミクロソームを用いた場合では、RT 19.4 min と RT 27.3 min のピークに加え、RT 11.9 min と RT 13.3 min のピークが見られた。これらはそれぞれ、2,4,5-triOH BP と 2,3,4-triOH BP に対応する保持時間であった。さらに、3-MC 前処置ラット肝ミクロソームを用いた場合でのみ RT 18.0 min の 3-OH BP-3 に対応するピークが見られた (Fig. 4)。なお、これらのピークは、熱処理を行うことで代謝活性を失活したミクロソームを用いた場合では検出されなかった。このことは、上記 5 種の代謝物が BP-3 から酵素的に生成されることを示している。

しかし、今回のラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 実験からは、Okereke らがラット *in vivo* 実験で報告している 2'-OH BP-3 に対応する RT 34.5 min のピークは今回検出されなかった。

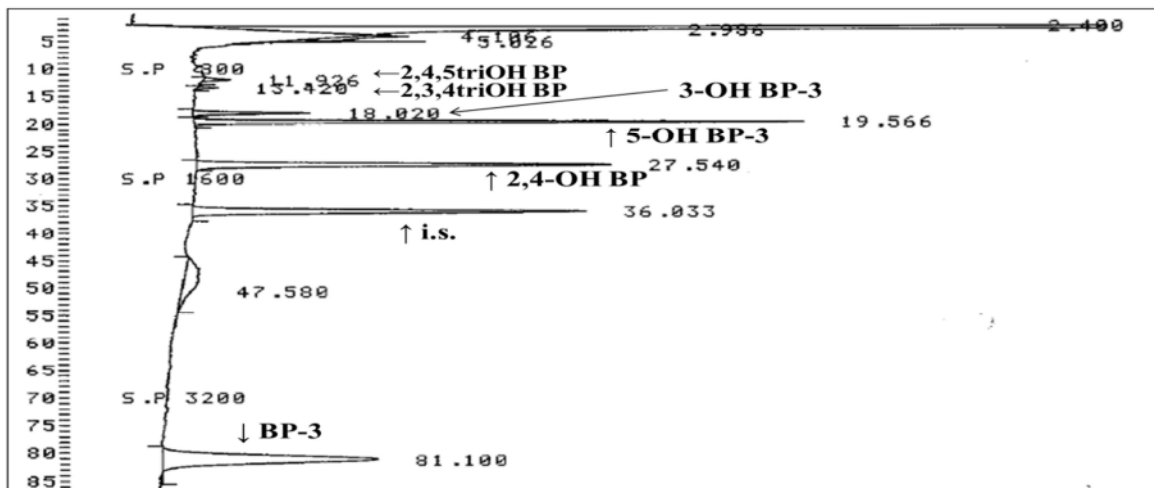
(A) untreated



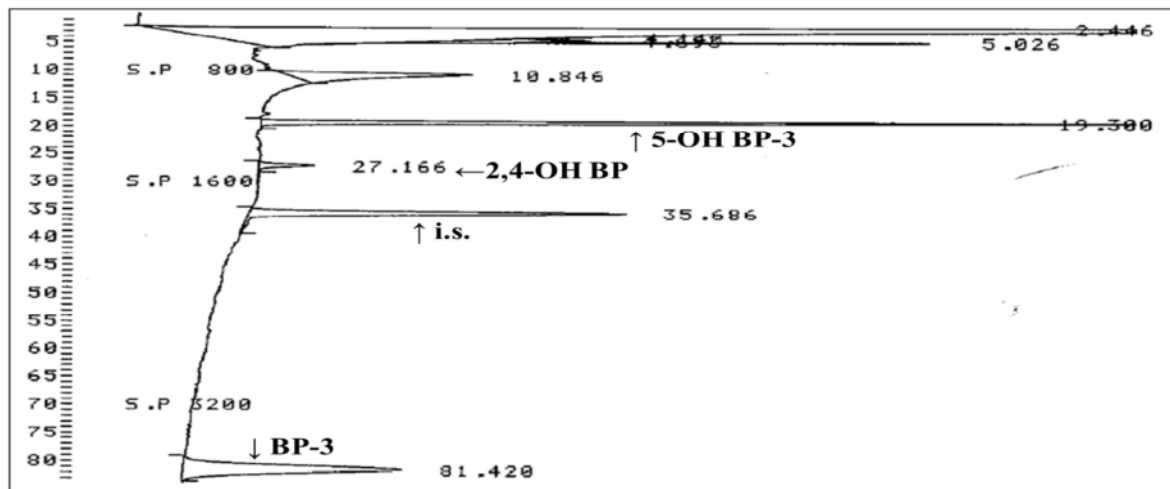
(B) Phenobarbital-treated



(C) 3-methylcholanthrene-treated



(D) Dexamethasone-treated



(E) Acetone-treated

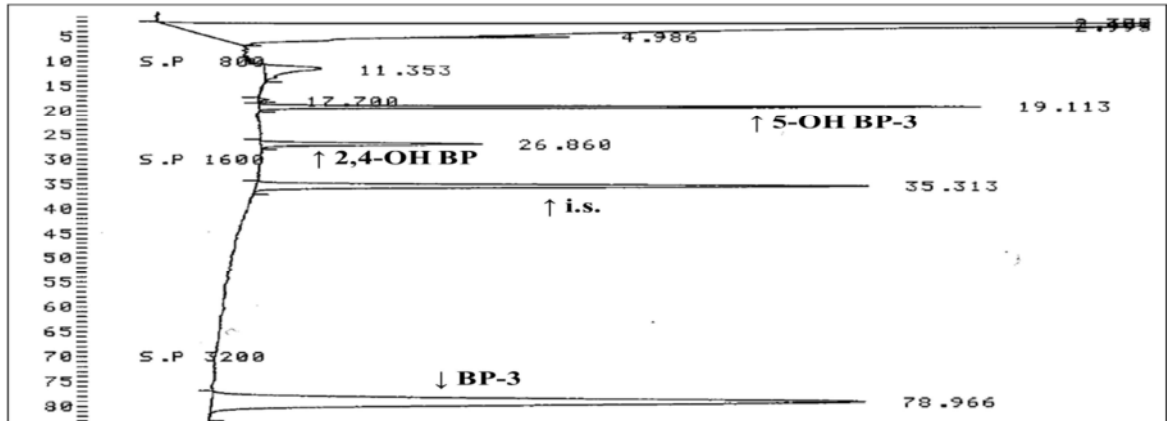


Fig. 4 HPLC chromatograms of the extracts of BP-3 incubated mixture with rat liver microsomes.

次に、今回新たに検出された RT 19.4 min、RT 11.9 min および RT 18.0 min のピークをもつ代謝物について、実験方法に記載の方法に従って、大量スケールでの肝ミクロソームとの反応を行い、これら代謝物の単離、同定を行った。その結果、HPLC で分取した試料を合成標品と $^1\text{H-NMR}$ で比較したところ、いずれも合成標品と一致したところから、それぞれの構造を支持し、RT 19.4 min は 5-OH BP-3、RT 11.9 min は 2,4,5-triOH BP、RT 18.0 min は 3-OH BP-3 と同定した (NMR データは実験方法に示す)。

第三項 BP-3 の代謝物の定量

今回見出した5種の代謝物のラット肝ミクロソームによるBP-3からの生成活性を検討するにあたり、BP-3を時間依存的、タンパク量依存的な条件下で反応させ、最適な代謝条件を検討した。

BP-3を未処置ラットの肝ミクロソームと代謝させたとき、主代謝物である5-OH BP-3と2,4-diOH BPの生成量は、タンパク質量0.8 mg、代謝時間20分まで直線的に増加した(Fig. 5)。したがって、本研究では、BP-3をタンパク質量0.4 mgのラット肝ミクロソームと代謝時間15分で反応させた。

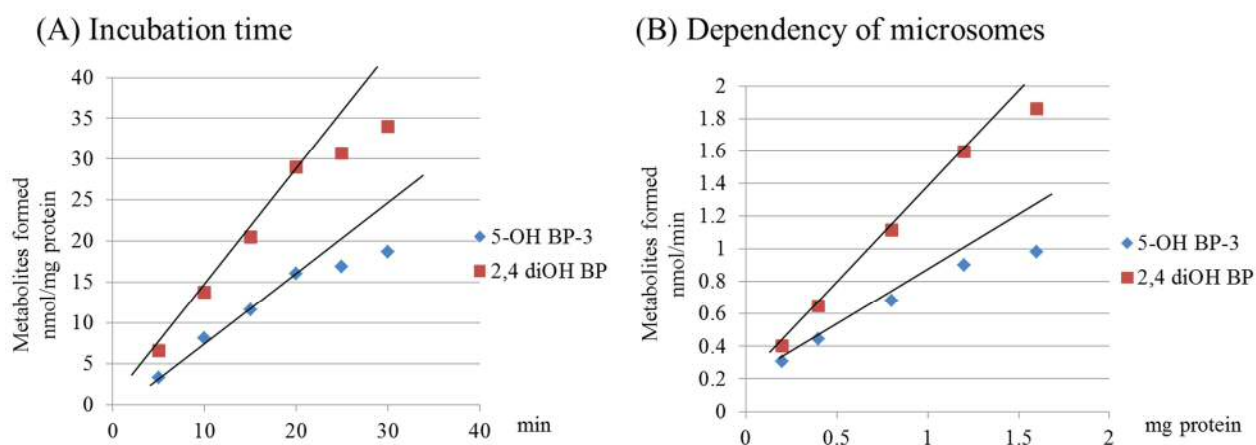


Fig. 5 Metabolism of BP-3 to 5-OH BP-3 and 2,4-diOH BP with rat liver microsomes under various conditions.

次に、どのような CYP 分子種が BP-3 の代謝に関与しているのかを検討するため、BP-3 を NADPH 存在下で未処置ラット肝ミクロソームだけではなく、PB、3-MC、Dex および Ace 前処置と反応させた。その結果、未処置ラット肝ミクロソームでは、5-OH BP-3 が 0.58 nmol/min/mg protein、2,4-diOH BP が 0.71 nmol/min/mg protein 生成された。5-OH BP-3 は未処置ラット肝ミクロソームと比較すると Dex 前処置ラット肝ミクロソームで、1.44 nmol/min/mg protein と約 2.5 倍、3-MC 前処置ラット肝ミクロソームで、1.13 nmol/min/mg protein と約 2 倍に増加した。また、2,4-diOH BP は、PB 前処置ラット肝ミクロソームで 3.75 nmol/min/mg protein と約 5.3 倍、3-MC 前処置ラット肝ミクロソームで 2.92 nmol/min/mg protein と約 4.1 倍と顕著な増加が認められた。

一方、2,4,5-triOH BP の生成活性をみたところ、PB 前処置ラット肝ミクロソームで 0.16 nmol/min/mg protein、3-MC 前処置ラット肝ミクロソームで 0.32 nmol/min/mg protein 検出された。2,3,4-triOH BP に関しては、PB 前処置ラット肝ミクロソームで 0.13 nmol/min/mg protein、3-MC 前処置ラット肝ミクロソームで 0.25 nmol/min/mg protein 検出された。

さらに、3-OH BP-3 の生成に関しては、3-MC 前処置ラット肝ミクロソームでのみ検出され、その生成量は 1.32 nmol/min/mg protein だった (Fig. 6)。

なお、PB は CYP2B および CYP2C を、3-MC は CYP1A を、Dex は CYP3A を、Ace は CYP2E をそれぞれ誘導することが知られていることから、2,4-diOH BP の生成には、CYP2B および CYP2C、5-OH BP-3 の生成には、CYP3A、2,3,4-triOH BP と 2,4,5-triOH BP との生成には CYP1A、2B および 2C、3-OH BP-3 の生成には CYP1A の関与がそれぞれ考えられる。

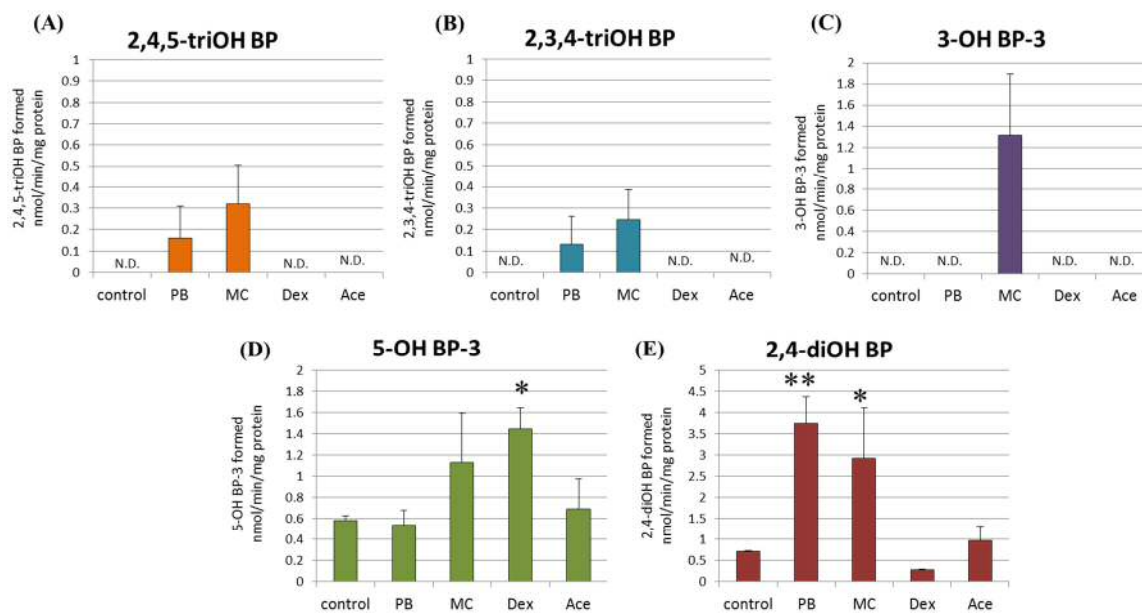


Fig. 6 Oxidase activities of liver microsomes of PB-, 3-MC-, Dex- and Ace-treated, and untreated rats toward BP-3.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.

第四項 5-OH BP-3 および 2,4-diOH BP のラット肝ミクロソームでの代謝

今回見出した代謝物である 2,4,5-triOH BP と 2,3,4-triOH BP の生成経路を明らかにするために、BP-3 のラット肝ミクロソームの代謝物である 5-OH BP-3 および 2,4-diOH BP を基質に用い、二次代謝実験を行った。

当初、5-OH BP-3 から 2,4,5-triOH BP が生成されると予想していたが、5-OH BP-3 からは、2,4,5-triOH BP の生成が確認できなかった。しかし、5-OH BP-3 から別の代謝物が検出され、この代謝物について、質量分析の結果、5-OH BP-3 に水酸基が導入された分子量+16 のピークが確認できた。本代謝物のフラグメントイオンピークは A 環に水酸基が導入していることを示唆したが、定性量が微量であったため水酸基の位置の決定には至らなかった。

これに対して、2,4-diOH BP からは、未処置および各種前処置ラット肝ミクロソームで 2,4,5-triOH BP と 2,3,4-triOH BP が代謝物として検出された。生成量は、未処置ラット肝ミクロソームで 2,4,5-triOH BP が 0.33 nmol/min/mg protein、2,3,4-triOH BP が 0.68 nmol/min/mg protein であった。また、3-MC 前処置ラット肝ミクロソームにおいて、2,3,4-triOH BP の生成量が顕著に多く 3.7 nmol/min/mg protein と未処置ラット肝ミクロソームでの約 5.4 倍であった。

以上の結果より、BP-3 は 2,4-diOH BP を経由して、2,4,5-triOH BP ならびに 2,3,4-triOH BP に代謝されることを明らかにした (Fig. 7)。

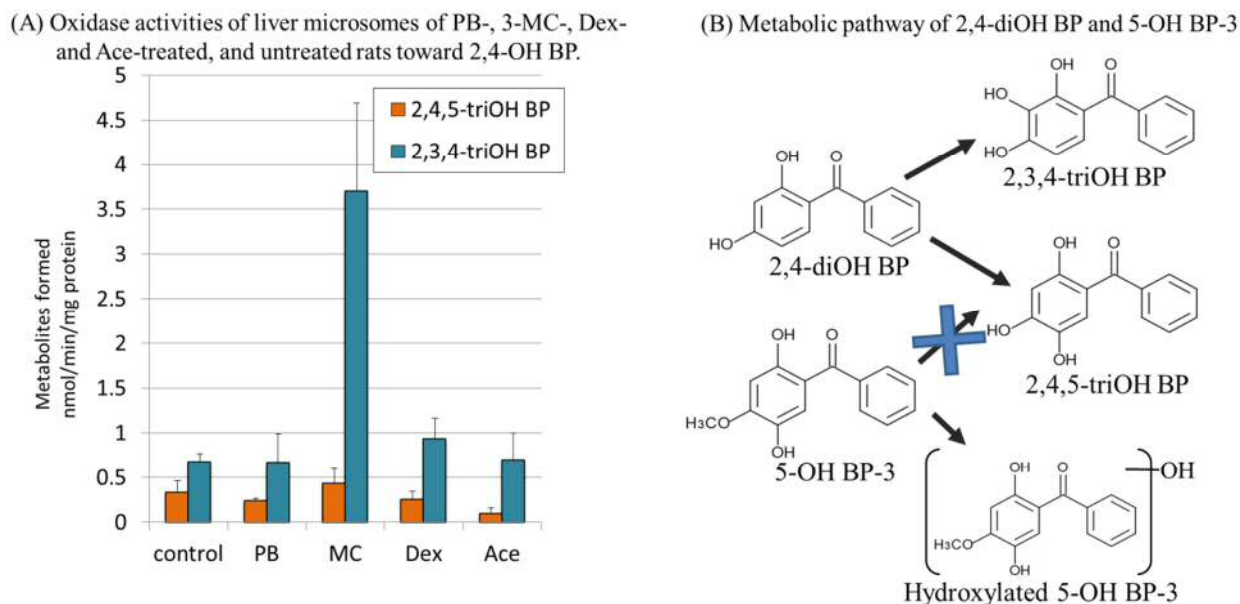


Fig. 7 Secondary metabolism of 2,4-diOH BP and 5-OH BP-3 formed from BP-3

第五項 BP-3 のラット CYP 分子種による代謝

ラット肝ミクロソームでの BP-3 の酸化的代謝反応に関与している CYP 分子種を同定する目的で、市販されている様々なラットの組換え CYP 分子種と BP-3 をラット肝ミクロソームと反応させた場合と同様の方法で代謝させた。

その結果、BP-3 から 2,4,5-triOH BP と 2,3,4-triOH BP の生成には、3-MC によって誘導される CYP1A1 が関与していた。しかし、2,4,5-triOH BP と 2,3,4-triOH BP の生成に関しては、他の CYP 分子種の関与は認められなかった。

3-OH BP-3 は主に 3-MC によって誘導される CYP1A1 が関与し、同様に 3-MC によって誘導させる CYP1A2 によっても一部代謝が行われた。しかし、この場合も CYP1A 以外の CYP 分子種の関与は認められなかった。

その一方、5-OH BP-3 の生成には、3-MC によって誘導される CYP1A2、Dex によって誘導される 3A1 および 3A2 が主に関与していたが、今回検討したすべての CYP 分子種の関与が認められた。

また、2,4-diOH BP では、主に PB によって誘導される CYP2C6 で代謝が行われ、3-MC によって誘導される CYP1A1 および 1A2 でも代謝された。少量ではあるが、今回検討を行った CYP 分子種の中で CYP3A 以外の CYP 分子種の関与が認められた (Fig. 8)。

今回の CYP 分子種による検討結果は、各種前処置ラット肝ミクロソームを用いた代謝の結果をほぼ支持していた。

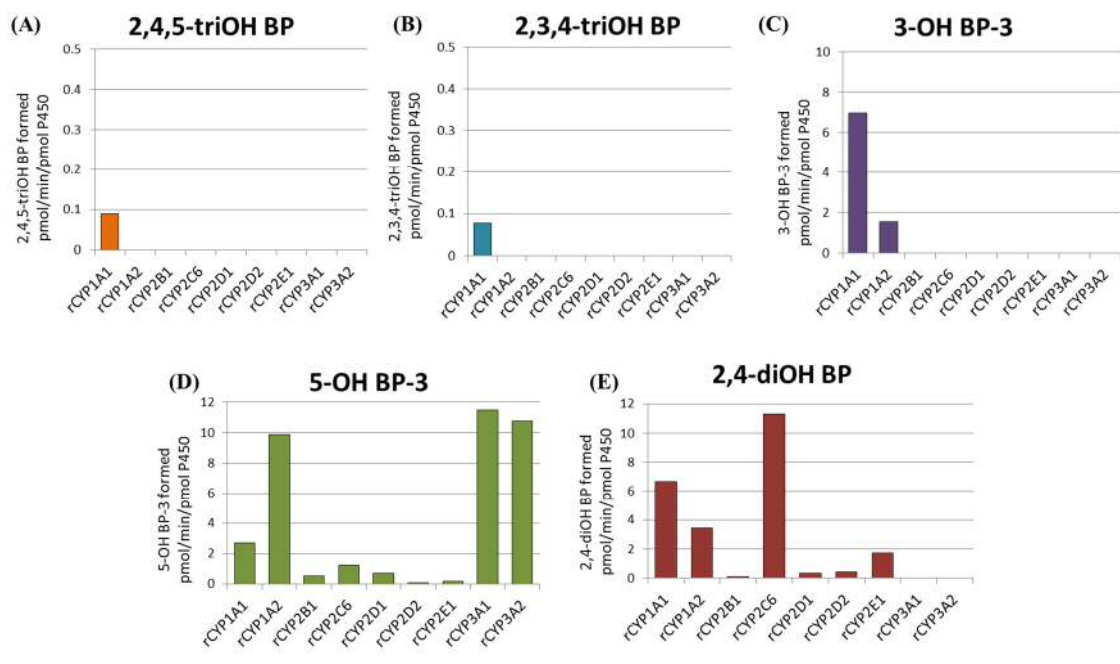


Fig. 8 Oxidase activities of rat recombinant CYP isoforms toward BP-3

第二節 BP-3 のヒトにおける代謝

第一項 BP-3 のヒト肝ミクロソームによる代謝

第一節では、5種類のBP-3の代謝物を対照にラット肝ミクロソームでの代謝について示したが、BP-3のヒト肝ミクロソームでの代謝についても調べた。今回ヒト肝ミクロソームとして、実験方法に示した50ドナーのプールド肝ミクロソームを使用した。BP-3をNADPH存在下でヒト肝ミクロソームとインキュベーションさせた結果、ラット肝ミクロソームと同様に2,4-diOH BPおよび5-OH BP-3が得られた。生成量はそれぞれ1.39 nmol/min/mg proteinおよび0.86 nmol/min/mg proteinであり、ラット肝ミクロソームよりも2,4-diOH BPは約2倍、5-OH BP-3は約1.5倍高い生成量となった (Fig. 9)。

しかし、各種前処置ラット肝ミクロソームで見られた2,4,5-triOH BP、2,3,4-triOH BPおよび3-OH BP-3はヒト肝ミクロソームの代謝物として検出することが出来なかった。

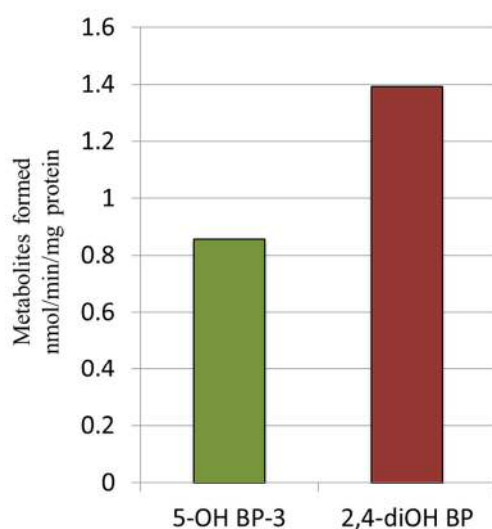


Fig. 9 Oxidase activity of pooled human liver microsomes toward BP-3

第二項 BP-3 のヒト CYP 分子種による代謝

次に、ヒト組み換え CYP 分子種を使用して BP-3 の酸化に関与する CYP 分子種の同定を試みた。2,4-diOH BP は CYP1A1, 1A2, 2B6 および 2C19 で主に生成されたが、今回検討したほとんどの CYP 分子種で代謝が行われた。5-OH BP-3 は、主に CYP1A2 で代謝され、今回検討したすべての CYP 分子種で少量ではあるが生成された。また、ヒト肝ミクロソームでは検出できなかった 2,4,5-triOH BP、2,3,4-triOH BP および 3-OH BP-3 はヒト CYP 分子種を用いた場合、少量であるが生成されることを見出した。

2,4,5-triOH BP および 2,3,4-triOH BP は主に CYP2D6 で生成され、3-OH BP-3 は、CYP1A1 のみで生成された (Fig. 10)。

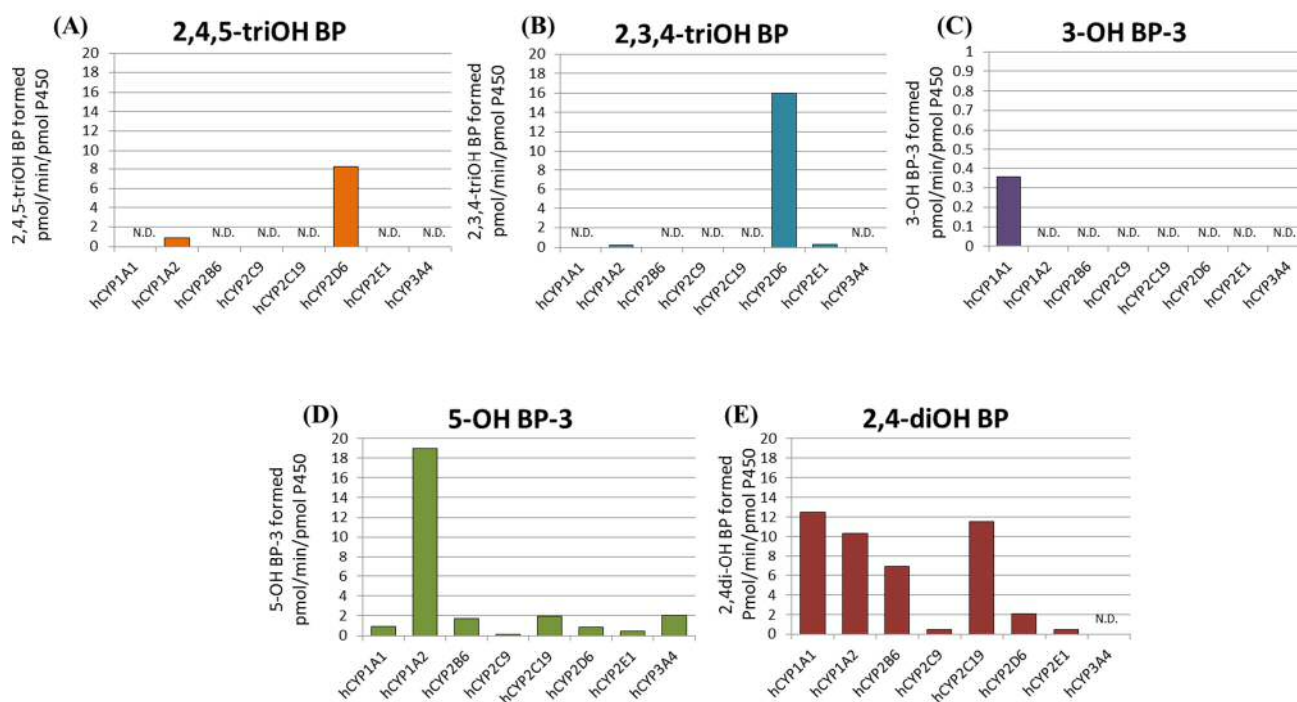


Fig. 10 Oxidase activities of human recombinant CYP isoforms toward BP-3

第三節 小括

BP-3 の代謝物として、これまで明らかにされている 2,4-diOH BP、2,3,4-triOH BP、2'-OH BP-3 以外に今回新たに 5-OH BP-3、2,4,5-triOH BP および 3-OH BP-3 を単離同定することが出来た。

未処置のラット肝ミクロソームとの反応では、2,4-diOH BP と 5-OH BP-3 が主に検出された。このうち、2,4-diOH BP は、主に CYP2C6、1A1 および 1A2 で生成され、5-OH BP-3 は、主に CYP3A1、3A2、1A1 および 1A2 で生成された。ミクロソームに含まれる構成比の比較的高い CYP 分子種で多く生成されたためにラット肝において主代謝物として検出されたと考えられる。

また、ラットに各種前処置を行い、CYP 分子種の発現を誘導させたラット肝ミクロソームを用いた場合、CYP2B および 2C を誘導する PB および CYP1A を誘導する 3-MC で 2,4-diOH BP の生成が増加した。CYP3A を誘導する Dex および CYP1A を誘導する 3-MC で 5-OH BP-3 の生成が増加した。これらの結果は、各代謝物の生成に関わっている CYP 分子種の検討結果と一致した。

2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOH BP は、少量ではあるが PB および 3-MC 前処置ラット肝ミクロソームで代謝させることによって生成された。CYP 分子種の検討結果では、2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOH BP 共に CYP1A1 で生成された。また、2,4-diOH BP を NADPH 存在下でラット肝ミクロソームを用い反応させたところ、2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOH が生成された。よって、2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOH BP は、2,4-diOH BP からさらに水酸化が進み生成されていることがわかった。5-OH BP-3 を NADPH 存在下でラット肝ミクロソームを用い反応させても 2,4,5-triOH BP の生成は確認できなかったが、5-OH BP-3 からの生成物として、別の代謝物が検出された。その代謝物を質量分析で分析した結果から 5-OH BP-3 がさらに水酸化されたものと想定された。しかし、水酸基の位置の決定には至らなかった。

3-OH BP-3 は、3-MC 前処置ラット肝ミクロソームでのみ特異的に検出された。また、ラット CYP 分子種では、CYP1A1 と 1A2 で特異的に検出され、生成に関わっている CYP 分子種は 3-MC 前処置ラット肝ミクロソームでの結果を支持していた。

2,4-diOH BP および 5-OH BP-3 は、ヒト肝ミクロソームでも主代謝物として検出され、ヒトにおける BP-3 の主代謝物となる可能性がある。また、2,4-diOH BP は、ヒト CYP 分子種の CYP1A、2B および 2C、5-OH BP-3 は CYP1A で生成された。さらに、ヒト CYP 分子種で BP-3 を反応させたところ、2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOH が生成され、共に CYP2D6 が関与していた。また、3-OH BP-3 についても CYP1A によって生成された。

以上の BP-3 の代謝実験から、Fig. 11 に示す代謝経路および関与する CYP 分子種を決定した。

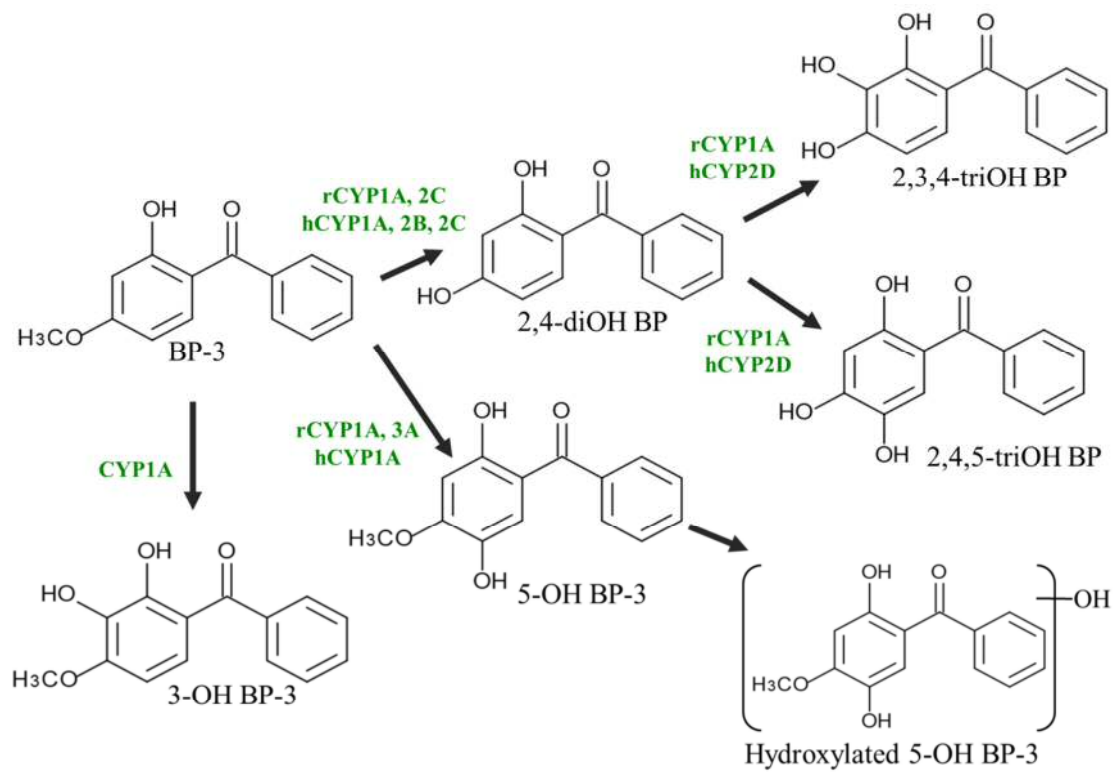


Fig. 11 Metabolic pathways of BP-3 by liver microsomes of rats and human.

第三章 BP-3 の内分泌攪乱活性への代謝的影響

第一節 BP-3 の内分泌攪乱活性への代謝的影響

第一項 緒言

各種ホルモンは内分泌腺より分泌されたのち、細胞膜上または核内に存在する受容体に結合することによってその作用を発現することが知られている。内分泌攪乱活性の重要な作用点としてステロイドホルモン受容体や甲状腺ホルモン受容体があげられており、これらの核内受容体を介したシグナル伝達への影響がその有害作用発現の原点と考えられている。核内受容体を介したシグナル伝達によって標的遺伝子の発現を制御されることが知られている。このような核内受容体を介したシグナル伝達の攪乱を検出する方法としてレポーター遺伝子アッセイは汎用されている。

ステロイドホルモン受容体や甲状腺ホルモン受容体は細胞内に入ってきたリガンドと結合し、二量体を形成したのち、各ホルモン応答配列に結合し、下流に存在する遺伝子の転写を促進する。レポーター遺伝子アッセイは各ホルモン応答性遺伝子の下流にホタルルシフェラーゼ (luciferase)、 β -galactosidase 等の通常、その細胞では発現していない酵素等の遺伝子を人為的に組み込んだプラスミドを作成し、細胞内に導入する。その結果、リガンドに応答した導入遺伝子産物の量 (酵素活性) を化学発光法によって検出し、転写活性を推定する方法である (Fig. 12)。

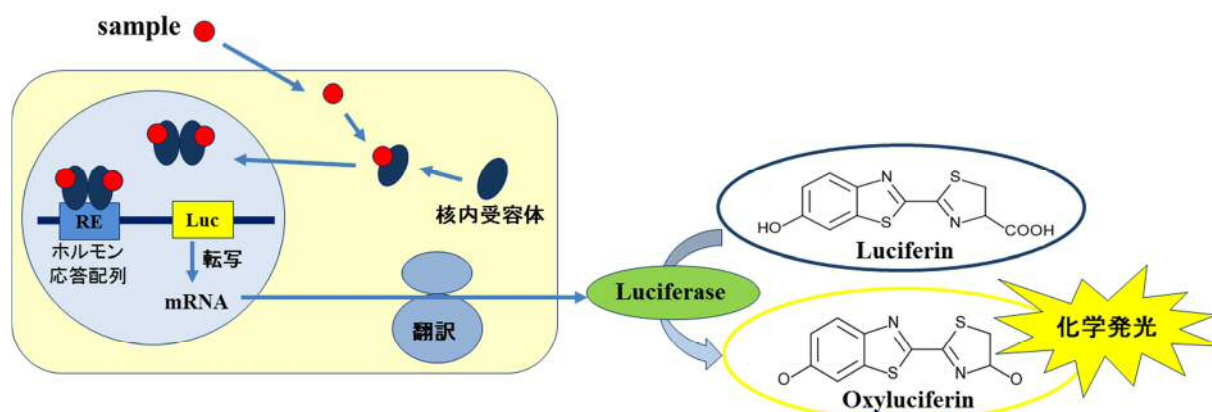


Fig. 12 Principle of luciferase reporter assay.

ステロイドホルモン受容体であるエストロゲン受容体 (ER) には ER α および ER β の二種類のサブタイプが存在する。これらは、分布している部位が異なり、ER α は女性生殖器である乳腺や子宮などに分布しており ER β は脳を中心に全身に広く分布している。ER α と β の受容体遺伝子は、97%が一致していて、リガンド結合能は、60%が共通である。機能としては、ER α は癌細胞の増殖の促進に関わり、逆に ER β は癌細胞の増殖を抑制するともいわれている。しかし、ER β のはっきりとした機能は解明されていない。

今回、内分泌攪乱活性としてエストロゲン受容体に対するアゴニスト活性およびア

ンドロゲン受容体に対するアンタゴニスト活性を取り上げ、BP-3のこれらの活性に対する代謝による影響を検討すると共に、これらの活性に対するBP-3誘導体の構造活性相関について検討した。

第二項 BP-3 代謝抽出物のエストロゲン活性

まず、BP-3 の代謝によるエストロゲン活性への影響を確認するために、未処置および各種前処理ラット肝ミクロソームを用いて、NADPH 存在下で BP-3 を反応させた代謝抽出物をレポーター遺伝子アッセイで ER α および ER β に対するアゴニスト活性を測定した。コントロールとして BP-3 自身の活性を見るために、熱処理を行いタンパク質の代謝活性能を取り除いた熱処理ラット肝ミクロソームと BP-3 を代謝させ、その抽出物を試料とした。

その結果、ER α 、ER β に対するアゴニスト活性は共に PB, 3-MC, Ace 前処置および未処置のラット肝ミクロソームにおいて、濃度依存的に BP-3 より高い活性を示した。特に PB 前処置ラット肝ミクロソームでインキュベートした代謝抽出物では、顕著に増加が認められた。その活性は PB 前処置ラット肝ミクロソーム > 3-MC 前処置ラット肝ミクロソーム > Ace 前処置ラット肝ミクロソーム > 未処置ラット肝ミクロソーム > 熱処理ラット肝ミクロソームの順であった。

一方、Dex 前処置ラット肝ミクロソームでインキュベートした代謝抽出物は、BP-3 本来の活性より低い活性となった (Fig. 13)。

これらの結果は、BP-3 は、未処理、PB、3-MC および Ace 前処置ラット肝ミクロソームによりエストロゲン活性を示す代謝物が生成されることを示唆している。しかし、Dex で処理したラット肝ミクロソームでは、主に BP-3 よりも低いエストロゲン活性を示す代謝物もしくは、エストロゲン活性を示さない代謝物が生成されることが考えられる。

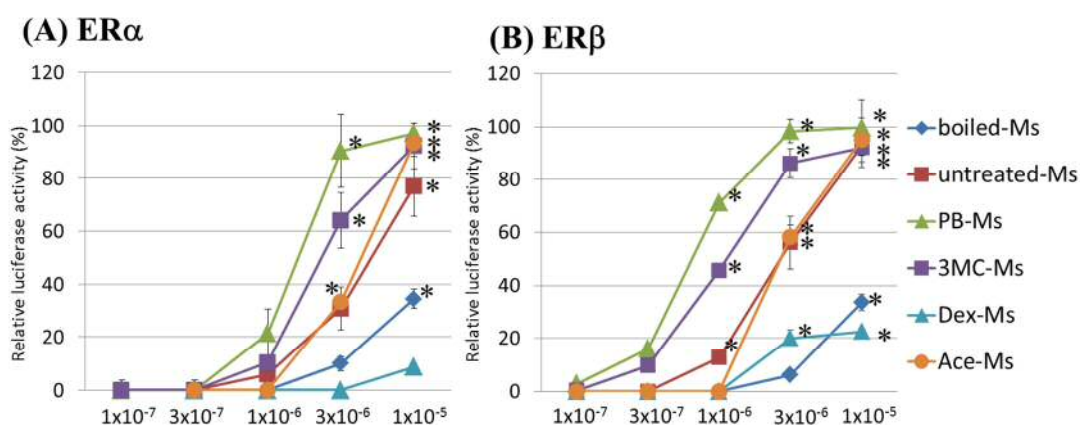


Fig. 13 Effect of metabolism by rat liver microsomes on estrogenic activity of BP-3 mediated by ER α / β .

*Significant difference ($p < 0.05$; ANOVA) from 1×10^{-9} M E2 alone.

第三項 BP-3 代謝抽出物の抗アンドロゲン活性

次に、BP-3 の代謝による抗アンドロゲン活性への影響を確認するために、未処置および各種前処理ラット肝ミクロソームを用いて、NADPH 存在下で BP-3 を反応させた代謝抽出物を用い、抗アンドロゲン活性を測定した。

エストロゲン活性の場合と同様に、コントロールとして BP-3 本来の活性を見るために、熱処理を行いタンパク質の代謝活性能を取り除いた熱処理ミクロソームと BP-3 を代謝させ、その抽出物を試料とした。

BP-3 自身が抗アンドロゲン活性を示すことから、未変化体の BP-3 が抗アンドロゲン活性を有していると考えられる。各種前処置および未処置ラット肝ミクロソームの代謝抽出物では活性が低くなった。その活性は熱処理ラット肝ミクロソーム>PB 前処置ラット肝ミクロソーム>未処置ラット肝ミクロソーム>Ace 前処置ラット肝ミクロソーム>3-MC 前処置ラット肝ミクロソームの順であった (Fig. 14)。

熱処理ラット肝ミクロソームで示す BP-3 由来の抗アンドロゲン活性は、未処置および各前処置ラット肝ミクロソームと代謝させることで活性が低下する。これは、ラット肝ミクロソームにより生成されるいずれの代謝物も抗アンドロゲン活性が BP-3 と比べ、低いことを示唆している。

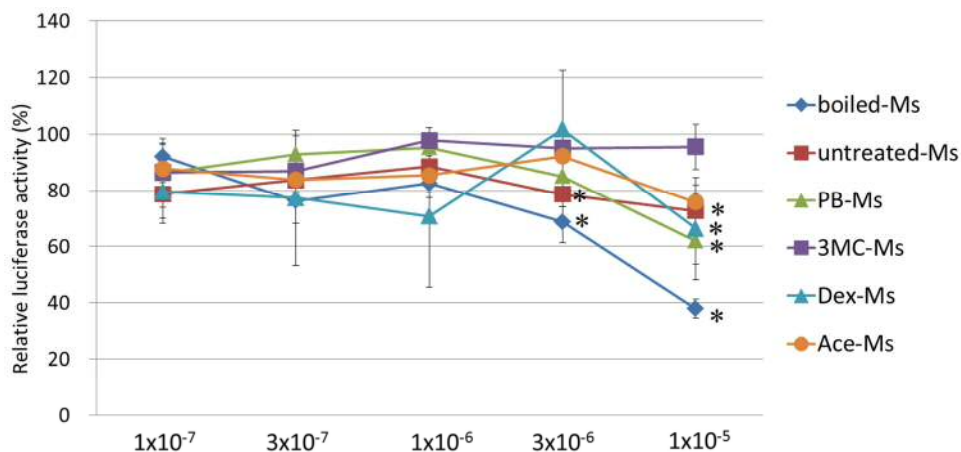


Fig. 14 Effect of metabolism by rat liver microsomes on anti-androgenic activity of BP-3 mediated by AR.

*Significant difference ($p < 0.05$; ANOVA) from 1×10^{-10} M DHT alone.

第二節 BP-3 および各種代謝物の内分泌攪乱活性

次に、BP-3 および BP-3 の各種代謝物の個々のエストロゲン活性を調べたところ、ER α において、2,4-diOH BP が一番高い活性を示し、続いて BP-3、2,3,4-triOH BP が活性を示した。これらの活性は、濃度依存的な活性であった。また、3-OH BP-3 ではごくわずかな活性が見られるが、2,4,5-triOH BP および 5-OH BP-3 では活性は見られなかった (Fig. 15 A)。

ER β において、2,4-diOH BP が一番高い活性を示し、続いて 2,3,4-triOH BP、BP-3 が同程度の活性を示した。これらの活性も濃度依存的な活性であったが、2,4-diOH BP と比べるとかなり低い活性であった。ER α 同様に、3-OH BP-3 ではごくわずかな活性を示すが、2,4,5-triOH BP および 5-OH BP-3 では活性が見られなかった (Fig. 15B)。

BP-3 および BP-3 の各種代謝物の抗アンドロゲン活性を調べたところ、2,4-diOH BP と BP-3 が弱い抗アンドロゲン活性を示したが、他の代謝物は活性を示さなかった。なお、hydroxyflutamide (HF) を本実験での抗アンドロゲン活性のポジティブコントロールとして使用している (Fig. 15 C)。

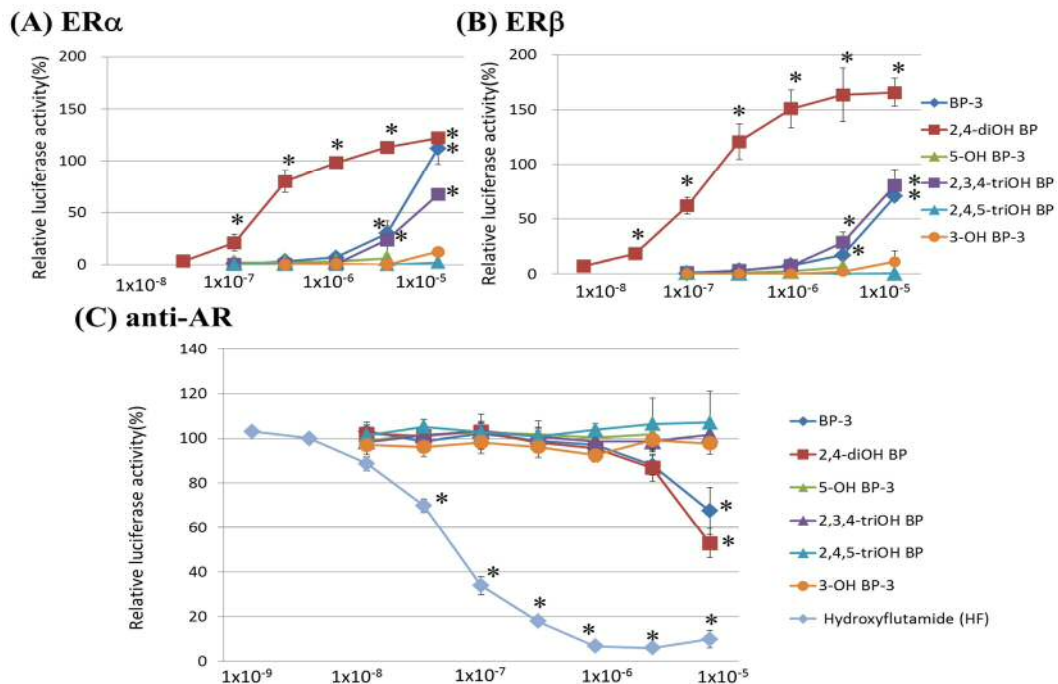


Fig. 15 Dose-response curves of estrogenic and anti-androgenic activities of BP-3 and its metabolites in the ER α -, ER β - and AR-transactivation assays.

*Significant difference ($p < 0.05$; ANOVA) from 1×10^{-9} M E2 alone in (A) and (B).

*Significant difference ($p < 0.05$; ANOVA) from 1×10^{-10} M DHT alone in (C).

第三節 BP-3 およびその誘導体の内分泌攪乱活性

第一項 BP-3 およびその誘導体のエストロゲン活性

BP-3 および 13 種の BP-3 誘導体のエストロゲン活性を REC_{20} 値で示すことで比較した (Table 1)。

その結果、 $ER\alpha$ 活性では、2,4,4'-triOH BP が最も高い活性を持ち REC_{20} 値が 3.8 ± 1.8 nM であった。次に、活性の強さは、2,2',4,4'-tetraOH BP > 2,4-diOH BP > 2,3',4-triOH BP > 3'-OH BP-3 > 2,3,4,4'-tetraOH BP > 2,2',4-triOH BP > 2,3',4,4'-tetraOH BP > BP-3 > 2,3,4-triOH BP の順であった。しかし、2'-OH BP-3、3-OH BP-3、2,4,5-triOH BP および 5-OH BP-3 は活性を示さなかった。

$ER\alpha$ 活性は、BP-3 の主代謝物である 2,4-diOH BP の REC_{20} 値が 99 ± 22 nM であり、BP-3 の REC_{20} 値が 2.2 ± 0.6 μ M であった。2,4-diOH BP は BP-3 の約 20 倍の活性を示している。これは、BP-3 を代謝させることでエストロゲン活性が上昇する原因代謝物である可能性を示唆している (Fig. 16)。

$ER\beta$ 活性においても、2,4,4'-triOH BP が最も高い活性を示し、 REC_{20} 値が 01.1 ± 0.4 nM であった。続いて、2,2',4,4'-tetraOH BP > 2,3',4-triOH BP > 2,4-diOH BP > 2,3',4,4'-tetraOH BP > 2,3,4,4'-tetraOH BP > 3'-OH BP-3 > 2,3,4-triOH BP > BP-3 の順であった。しかし、2'-OH BP-3、3-OH BP-3、2,4,5-triOH BP および 5-OH BP-3 は $ER\alpha$ 同様に活性を示さなかった。活性の強さについては、ほぼ $ER\alpha$ と同じような傾向を示した。

BP-3 の主代謝物である 2,4-diOH BP の REC_{20} 値が 33 ± 5 nM であり、BP-3 の REC_{20} 値が 3.3 ± 0.6 μ M であった。2,4-diOH BP は BP-3 の約 100 倍もの活性を示している。 $ER\beta$ 活性においても $ER\alpha$ と同様に、BP-3 を代謝させることでエストロゲン活性が上昇する原因代謝物である可能性を示唆している。

これらの化合物の $ER\alpha$ と $ER\beta$ に対する活性を比較した場合、BP-3 を除いて、いずれの活性も $ER\beta$ に対して高い傾向を示し、2,3',4-triOH BP および 2,2',4-triOH BP では 10 倍以上の高い活性を示した。

Table 1 Agonistic or antagonistic activities of BP-3 and related compounds to ER α , ER β and AR.

| Compound | Agonistic activity REC ₂₀ ^{a)} (\pm SD, μ M) | | Antagonistic activity RIC ₂₀ ^{b)} (\pm SD, μ M) |
|------------------------------|--|---------------------|---|
| | ER α | ER β | AR |
| E ₂ | 2.5 \pm 0.3 (pM) | 5.3 \pm 0.3 (pM) | - ^{d)} |
| HF | - ^{d)} | - ^{d)} | 0.018 \pm 0.005 |
| 2,4,4'-triOH BP | 0.0038 \pm 0.0018 | 0.0011 \pm 0.0004 | 0.13 \pm 0.05 |
| 2,2',4,4'-tetraOH BP | 0.050 \pm 0.008 | 0.0079 \pm 0.0018 | 0.35 \pm 0.12 |
| 2,4-diOH BP* | 0.099 \pm 0.022 | 0.033 \pm 0.005 | 4.5 \pm 1.3 |
| 2,3',4-triOH BP [†] | 0.11 \pm 0.04 | 0.011 \pm 0.007 | 0.49 \pm 0.25 |
| 3'-OH BP-3 [†] | 0.11 \pm 0.02 | 0.062 \pm 0.013 | 5.5 \pm 1.4 |
| 2,3,4,4'-tetraOH BP | 0.64 \pm 0.09 | 0.45 \pm 0.18 | 5.9 \pm 1.8 |
| 2,2',4-triOH BP [†] | 0.68 \pm 0.21 | 0.044 \pm 0.008 | 4.8 \pm 1.1 |
| 2,3',4,4'-tetraOH BP | 1.2 \pm 1.0 | 0.34 \pm 0.04 | 2.4 \pm 0.6 |
| BP-3 | 2.2 \pm 0.6 | 3.3 \pm 0.6 | 5.8 \pm 3.2 |
| 2,3,4-triOH BP* | 2.6 \pm 0.6 | 2.2 \pm 0.5 | - ^{c)} |
| 2'-OH BP-3 | - ^{c)} | - ^{c)} | 1.8 \pm 0.5 |
| 3-OH BP-3 ^{*†} | - ^{c)} | - ^{c)} | - ^{c)} |
| 2,4,5-triOH BP ^{*†} | - ^{c)} | - ^{c)} | - ^{c)} |
| 5-OH BP-3 ^{*†} | - ^{c)} | - ^{c)} | - ^{c)} |

Compounds were arranged in order of estrogenic activity towards ER α .

a) 20% relative effective concentration; concentration of test compound showing 20% of the agonistic activity of 10⁻⁹ M E₂.

b) 20% relative inhibitory concentration; concentration of test compound showing 20% of the antagonistic activity of 10⁻¹⁰ M DHT via AR.

c) No effect (REC₂₀ or RIC₂₀ > 10⁻⁵ M).

d) Not tested.

CHO cells were transiently transfected with pcDNAER α or pcDNAER β as well as pGL3-tkERE and pCMV β -Gal using FuGENE 6. Cells were treated with increasing concentrations of BP-3 and related compounds to detect ER-agonistic and AR-antagonistic activities. Firefly luciferase activity was normalized based on β -galactosidase activity. Values represent the means \pm S.D. of three independent experiments.

*shows *in vitro* metabolites in rat liver microsomes.

†shows BP-3 derivatives newly assayed in this study.

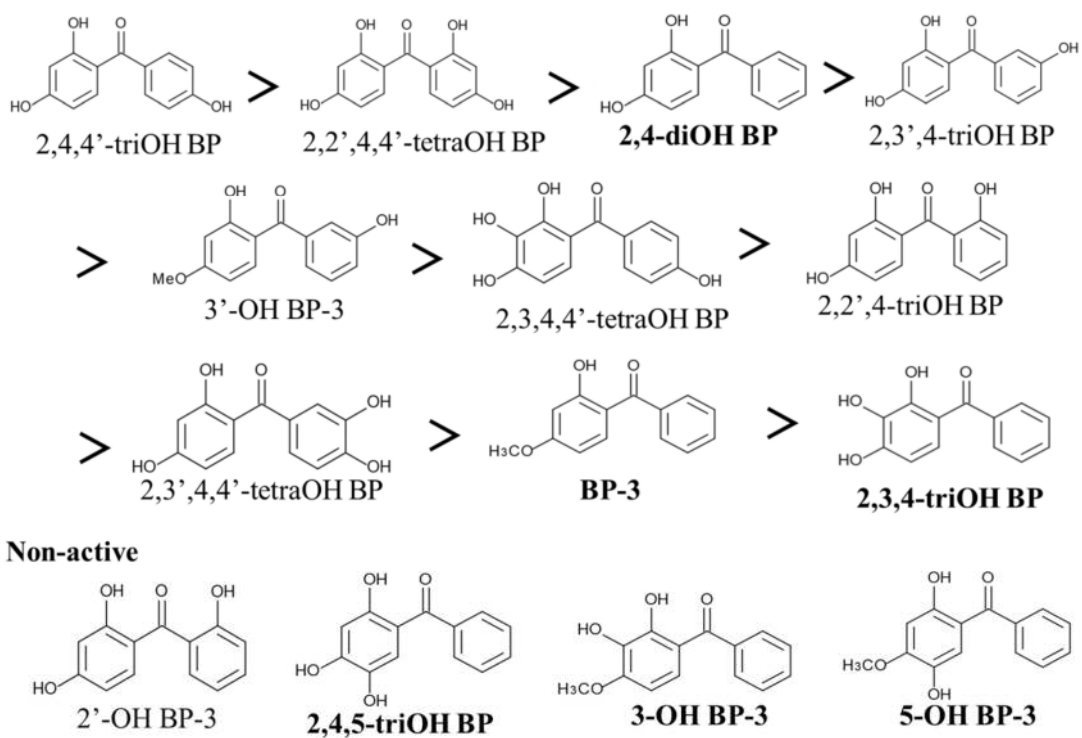


Fig. 16 ER α agonistic activities of BP-3 and its derivatives.

* Boldfaces show BP-3 metabolites found in this study.

第二項 BP-3 およびその誘導体の抗アンドロゲン活性

次に、BP-3 および 13 種の BP-3 誘導体の抗アンドロゲン活性を RIC₂₀ 値で示した (Table 1)。

BP-3 および BP-3 誘導体の抗アンドロゲン活性もエストロゲン活性と同様に 2,4,4'-triOH BP で RIC₂₀ 値が $0.13 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 最も強い活性を示した。BP-3 誘導体の抗アンドロゲン活性の強さは、2,2',4,4'-tetraOH BP > 2,3',4-triOH BP > 2'-OH BP-3 > 2,3',4,4'-tetraOH BP > 2,4-diOH BP > 2,2',4-triOH BP > 3'-OH BP-3 > BP-3 > 2,3,4,4'-tetraOH BP の順であった。しかし、2,3,4-triOH BP、3-OH BP-3、2,4,5-triOH BP および 5-OH BP-3 は、活性を示さなかった。抗アンドロゲン活性は、エストロゲン活性と似た傾向を示したが、BP-3 の主代謝物であり、強いエストロゲン活性を示していた 2,4-diOH BP の RIC₂₀ 値が $4.5 \pm 1.3 \mu\text{M}$ であり、BP-3 の RIC₂₀ 値が $5.8 \pm 3.2 \mu\text{M}$ とあまり差がなかった。

第四節 小括

BP-3をNADPH存在下でラット肝ミクロソームと代謝させた代謝抽出物を用いエストロゲン活性を測定した結果、エストロゲン活性は代謝前であるBP-3の活性よりも代謝させた代謝抽出物でより高い活性を示した。代謝抽出物は特にPB前処置ラット肝ミクロソームで顕著な活性増加が見られ、次に3-MC前処置ラット肝ミクロソームにおいても強い活性増加が確認された。また、Ace前処置ラット肝ミクロソームでは、未処置ラット肝ミクロソームとほぼ同様の活性を示した。対照的に、Dex前処置ラット肝ミクロソームでは、活性の増加が確認されず、むしろ、BP-3本来の活性に比べ、低い活性となった。

この結果より、もともと低い活性しか持っていなかったBP-3のような化合物もしくは本来活性を持っていない化合物であっても、代謝されることによって活性が増加する可能性があるということが示唆された。

抗アンドロゲン活性に関しては、BP-3を代謝させることにより、BP-3本来の抗アンドロゲン活性よりも活性が減少した。この結果は、いずれの前処置ラット肝ミクロソームで代謝させた代謝抽出物であっても同じ傾向であったが、PB前処置ラット肝ミクロソームの代謝抽出物では、BP-3本来の活性に次いで、弱い抗アンドロゲン活性を示した。

BP-3およびその誘導体のER α 活性は、特に2,4,4'-triOH BPが高い活性を示した。次に2,2',4,4'-tetraOH BP > 2,4-diOH BP > 2,3',4-triOH BP > 3'-OH BP-3 > 2,3,4,4'-tetraOH BP > 2,2',4-triOH BP > 2,3',4,4'-tetraOH BP > BP-3 > 2,3,4-triOH BPの順であった。しかし、2'-OH BP-3、3-OH BP-3、2,4,5-triOH BP、5-OH BP-3は、活性を示さなかった。ER β 活性においても2,4,4'-triOH BPが最も高い活性を示し、続いて、2,2',4,4'-tetraOH BP > 2,3',4-triOH BP > 2,4-diOH BP > 2,3',4,4'-tetraOH BP > 2,3,4,4'-tetraOH BP > 3'-OH BP-3 > 2,3,4-triOH BP > BP-3の順であった。しかし、2'-OH BP-3、3-OH BP-3、2,4,5-triOH BPおよび5-OH BP-3は、活性を示さなかった。

これらの活性の強さからエストロゲン活性に対する構造活性相関を次のように考えた。強いエストロゲン活性を示しているBP-3誘導体をみると、2,4,4'-triOH BPや2,2',4,4'-tetraOH BP、2,4-diOH BP、2,3',4-triOH BPのように4位が脱メチル化し、水酸基になっていることが多いことから、BP-3の誘導体が強いエストロゲン活性を示すためには4位の水酸基が重要であると考えられる。しかし、4位が水酸基となっても2,3,4-triOH BPや2,4,5-triOH BPのように4位の水酸基の隣である3位もしくは5位がさらに水酸化されることによってエストロゲン活性は、著しく活性が弱まるか、活性を示さなくなっている。さらにB環 (Fig. 17 右側のベンゼン環) に水酸基が付くと活性が増加している。ただし、2位もしくは2'位についている水酸基については、カルボニル基と水素結合しており、その構造は固定され、水酸基としての働きが低くなっていると考えられる。そのため、3'-OH BP-3は、弱くエストロゲン活性を示しているが2'-OH BP-3はエストロゲン活性を示さなか

ったと考えられる。次に、BP-3 の 3 位や 5 位に水酸基が入った 3-OH BP-3 や 5-OH BP-3 の場合、BP-3 で示していた活性が著しく低下した。これらの理由としては、4 位の水酸基が 3 位もしくは 5 位の水酸基とキノイドを形成しするためであると考えられる。抗アンドロゲン活性もエストロゲン活性と同様に 2,4,4'-triOH BP が最も強い活性を示し、2,2',4,4'-tetraOH BP > 2,3',4-triOH BP > 2'-OH BP-3 > 2,3',4,4'-tetraOH BP > 2,4-diOH BP > 2,2',4-triOH BP > 3'-OH BP-3 > BP-3 > 2,3,4,4'-tetraOH BP の順であった。しかし、2,3,4-triOH BP、3-OH BP-3、2,4,5-triOH BP、5-OH BP-3 は、活性を示さなかった。抗アンドロゲン活性の構造活性相関も BP-3 誘導体においては、エストロゲン活性の構造活性相関と類似していた (Fig. 17)。

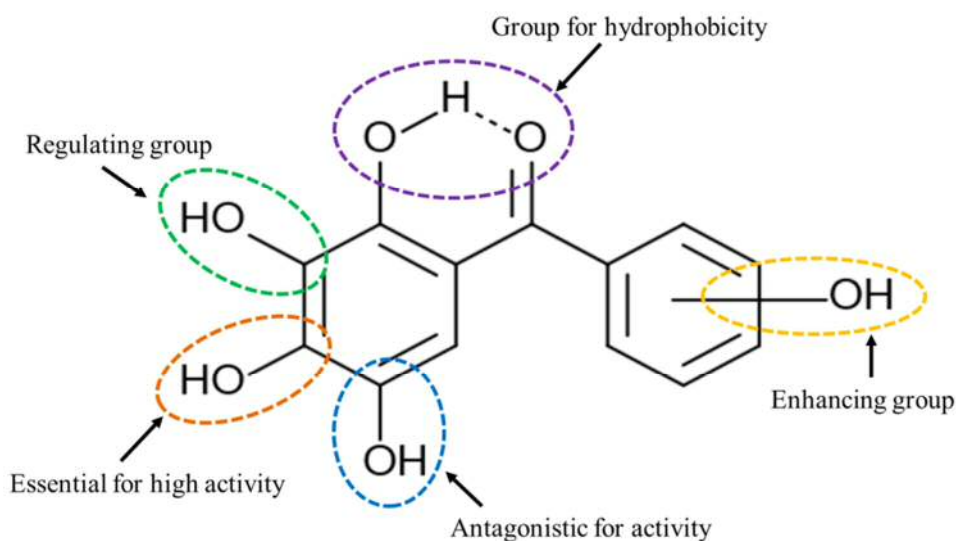


Fig. 17 Structural requirements of BP-3 and related compounds for estrogenic and anti-androgenic activities.

第四章 総括

紫外線吸収剤として汎用されている BP-3 は、ラットでの経口投与および経皮投与により、2,4-diOH BP、2'-OH BP-3、2,3,4-triOH BP に代謝されることが報告されている (Okereke et al., 1993; 1994; Jeon et al. 2008)。また、これらの代謝物はラット初代肝細胞での代謝実験においても確認されている (Nakagawa and Suzuki 2002)。今回は、Okereke らや他のグループが報告している 2'-OH BP-3 は検出されなかった。これらの報告は、すべて *in vivo* での報告となっており、*in vitro* での代謝を報告している Van Liempd ら (2007) は、 β -ナフトフラボン前処置ラットの肝ミクロソームで 2,4-diOH BP 以外に 2 つの代謝物が得られたと報告している。それらは、BP-3 のモノヒドロキシル化された代謝物であるとしているが、ヒドロキシル基の位置を決定するには至っておらず、2'-OH BP-3 が検出できていない可能性がある。本研究において各種前処置ラット肝ミクロソームを用いた代謝実験で、2'-OH BP-3 が検出できなかったことは、*in vivo* と *in vitro* における差であるように考えられるが詳細は明らかではない。

今回のヒトおよびラット *in vitro* 実験において、2,4-diOH BP と合わせて今回新たに BP-3 の 5 位水酸化体である 5-OH BP-3 が主代謝物の一つとして検出された。さらに本研究では、5-OH BP-3 の他にも新規代謝物として、3-OH BP-3 および 2,4,5-triOH BP を合成標品と比較することにより同定した。2,4-diOH BP は、主にラット CYP 分子種では CYP2C および 1A で、ヒト CYP 分子種では CYP1A、2B および 2C で生成され、5-OH BP-3 は、主にラット CYP 分子種では CYP3A および 1A で生成され、ヒト CYP 分子種では CYP1A で多く生成された。また、2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOH BP 共にラット CYP1A1 およびヒト CYP1A2、2D6 で生成された。3-OH BP-3 は、3-MC 前処置ラット肝ミクロソームでのみ特異的に検出された。また、ラット CYP 分子種では、CYP1A で特異的に検出され、ヒト CYP 分子種でも CYP1A が関与した。

ラット CYP 分子種による BP-3 の代謝では、いずれの代謝に関しても CYP1A の関与が認められた。CYP1A は多環芳香族炭化水素のように平面性を有する化合物の代謝に多く関与している。BP-3 は、カルボニル基と 2 位の水酸基が水素結合することで構造が固定されたため、CYP1A による代謝が広く行われたと考えられる。2,4-diOH BP は CYP1A 以外にも CYP2C で代謝が行われた。CYP2C は tolbutamide や phenytoin、warfarin のようにカルボニル基を有する化合物の代謝に多く関与することが報告されており (Lewis, 1998)、BP-3 もカルボニル基を有しているため、2,4-diOH BP の代謝に CYP2C が関与したものと考えられる。5-OH BP-3 に関しては、CYP3A の関与も認められた。CYP3A は幅広い化合物の代謝に関与しており、5-OH BP-3 に代謝されることで BP-3 に比べて分子のかさ高さが増え、比較的分子の大きな化合物を代謝する CYP3A4 が関与したと考えられる。また、ヒトにおいては、おおむねラットと同様の CYP 要求性が見られた。特に CYP1A に関しては、種差が少ないとされており、本研究においても CYP1A に関しては、大きな種差は見られず、ラット、ヒ

ト共に BP-3 の代謝に広く関与した。しかし、2,4-diOH BP は、CYP1A、2C 以外に CYP2B でも生成され、5-OH BP-3 は、ラットでみられた CYP3A の関与が見られなかった。また、2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOH BP の生成に関与する CYP 分子種がラットでは CYP1A1 のみで行われていたが、ヒトでは CYP1A の他に CYP2D6 の関与が見られた。この原因として、CYP2B、2D および 3A には、種差が存在することが知られており、BP-3 の代謝に関与する CYP 要求性の違いとして現れたと考えられる。

2,4-diOH BP を NADPH 存在下でラット肝ミクロソームを用い反応させたところ 2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOH BP が生成された。よって、2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOH BP は、2,4-diOH BP からさらに水酸化が進み生成されていることがわかった。しかし、5-OH BP-3 を NADPH 存在下でラット肝ミクロソームを用い反応させても 2,4,5-triOH BP の生成は確認できなかった。5-OH BP-3 からの生成物として、別の代謝物が検出された。その代謝物を質量分析で分析した結果、5-OH BP-3 の分子量+16 のピークが確認でき、5-OH BP-3 がさらに水酸化されたものと想定された。しかし、水酸基の位置の決定には至らなかった。

ヒト *in vitro* 実験においても、ラット同様、主に 2,4-diOH BP および 5-OH BP-3 に代謝されることを示した。しかし、3-OH BP-3、2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOHBP に関しては、CYP 分子種で検討した場合にのみ検出された。ヒト肝ミクロソームでも生成されていると考えられるが、HPLC の検出限界以下であったと考えられる。なお、ヒトに BP-3 を経皮投与した場合、その尿から BP-3 とともに 2,4-diOH BP が検出されており、個人差はあるが BP-3 と同量程度の 2,4-diOH BP が検出されるという報告もある (Gonzalez et al., 2008)。このことから、BP-3 のこの代謝経路はヒト体内で活発に起こっていることを示唆している。

紫外線吸収剤である BP-3 は、皮膚塗布し使用されることが多いため、皮膚における代謝の影響も考える必要がある。しかし、ラット皮膚に BP-3 を塗布すると尿中から BP-3 および代謝物が排泄されることから、BP-3 皮膚から体内へ吸収されると考えられるが、皮膚における BP-3 の代謝の報告はなく、本研究においても行っていない。肝臓に比べ極めて少ない量ではあるが皮膚にも CYP 分子種が存在しており、ヒト皮膚には、CYP1A1 も知られている (Oesch et al., 2007; Svensson, 2009)。特に CYP1A1 は BP-3 の代謝に広く関与していることから、皮膚 CYP1A1 も BP-3 の代謝に影響を及ぼす可能性は否定できない。しかし、皮膚での CYP の存在量や BP-3 の皮膚浸透性を考えると、本研究で示した肝臓における代謝の影響が大きいと考える。

BP-3 の毒性としては、弱いエストロゲン活性が報告されている (Suzuki et al., 2005; Molina-Molina et al., 2008)。しかし、BP-3 は体内に吸収されるとの報告もあり、BP-3 本来の毒性だけでなく、体内で代謝された後、それらの代謝物の毒性も考慮し使用しなければいけない。本研究では、BP-3 の代謝を深く精査すると共に、BP-3 の毒性の一つである内分泌攪乱活性への代謝による影響を調べた。

BP-3 の内分泌攪乱活性への代謝による影響について、本研究ではエストロゲン活性および抗アンドロゲン活性について検討した。BP-3 を NADPH 存在下でラット肝ミクロソーム

ムと代謝させた代謝抽出物を用いエストロゲン活性を測定した結果、エストロゲン活性は代謝前である BP-3 の活性よりも代謝させた代謝抽出物でより高い活性を示した。代謝抽出物は特に PB 前処置ラット肝マイクロソームで顕著な活性増加が見られ、次に 3-MC 前処置ラット肝マイクロソームにおいても強い活性増加が認められた。また、Ace 前処置ラット肝マイクロソームでは、未処置ラット肝マイクロソームとほぼ同様の活性を示した。対照的に、Dex 前処置ラット肝マイクロソームでは、活性の増加は認められず、むしろ、BP-3 本来の活性に比べ、低い活性となった。PB 前処置ラット肝マイクロソームや 3-MC 前処置ラット肝マイクロソームで生成される代謝物を見ると、2,4-diOH BP が他に比べ多く生成されていることがわかる。また、Ace 前処置ラット肝マイクロソームでは未処置ラット肝マイクロソームとほぼ同量の 2,4-diOH BP が生成されており、Dex 前処置ラット肝マイクロソームでは、未処置ラット肝マイクロソームと比べても 2,4-diOH BP の生成量が少なかった。さらに、Dex 前処置ラット肝マイクロソームで代謝させた結果では、エストロゲン活性を示さない 5-OH BP-3 が他と比べ多く生成された。この結果より、BP-3 におけるエストロゲン活性の代謝的影響には、BP-3 より強いエストロゲン活性を示す 2,4-diOH BP が大きく寄与していることが推測できる。また、Dex 前処置ラット肝マイクロソームの代謝抽出物でエストロゲン活性が減少した理由としては、2,4-diOH BP の生成量が少なく、エストロゲン活性を示さない 5-OH BP-3 の生成量が多かったことに起因していると考えられる。しかし、それだけでは活性が大きく減少することが考えにくいとため、エストロゲン活性を示さない他の代謝物が多く生成されている可能性も示唆される。

次に、BP-3 および BP-3 代謝物のエストロゲン活性を比較すると ER α 活性は、BP-3 の主代謝物である 2,4-diOH BP の REC₂₀ 値が 99 ± 22 nM であり、BP-3 の REC₂₀ 値が 2.2 ± 0.6 μ M であった。2,4-diOH BP は BP-3 の約 20 倍の活性を示している。また、2,3,4-triOH BP の REC₂₀ 値は 2.6 ± 0.6 μ M とほぼ BP-3 と同等の活性を示した。3-OH BP-3、2,4,5-triOH BP、5-OH BP-3 は、活性を示さなかった。ER β 活性では、2,4-diOH BP の REC₂₀ 値が 33 ± 0.5 nM であり、BP-3 の REC₂₀ 値が 3.3 ± 0.6 μ M であった。2,4-diOH BP は BP-3 の約 100 倍もの活性を示している。2,3,4-triOH BP の REC₂₀ 値は 2.2 ± 0.5 μ M であり BP-3 とほぼ同等の活性を示していた。3-OH BP-3、2,4,5-triOH BP および 5-OH BP-3 は、活性を示さなかった。ER α と ER β に対する活性を比較した場合、ER β の活性が ER α の活性に比べ、2,3',4-triOH BP で 10 倍、2,2',4-triOH BP では 15 倍と ER β に対して高い活性が見られた。

一方、抗アンドロゲン活性に関しては、BP-3 を代謝させることにより、BP-3 本来の抗アンドロゲン活性よりも活性が減少した。この結果は、どの前処置ラット肝マイクロソームで代謝させた代謝抽出物であっても同じ傾向であったが、PB 前処置ラット肝マイクロソームの代謝抽出物では、BP-3 の次に弱い抗アンドロゲン活性を示した。抗アンドロゲン活性では、BP-3 の主代謝物であり、強いエストロゲン活性を示していた 2,4-diOH BP の RIC₂₀ 値が 4.5 ± 1.3 μ M であり、BP-3 の RIC₂₀ 値が 5.8 ± 3.2 μ M とあまり差が見られなかった。さらに、2,3,4-triOH BP、3-OH BP-3、2,4,5-triOH BP および 5-OH BP-3 は、活性を示さなか

った。この結果より、抗アンドロゲン活性が代謝することにより活性を下げた理由としては、2,4-diOH BP は BP-3 より高い活性を示すものの、RIC₂₀ 値の差が小さく、さらに、代謝物のほとんどが抗アンドロゲン活性を示さなかったため、BP-3 は代謝されることにより、活性が減少したと考えられる。PB 前処置ラット肝ミクロソームで比較的高い抗アンドロゲン活性を示していたのは、代謝物である 2,4-diOH BP が未処置ラット肝ミクロソームに比べ、多く生成されていたからであると考えられる。

以上、本研究で得られた代謝経路および代謝に関わる CYP 分子種、各代謝物のエストロゲン、抗アンドロゲン活性の強さを Fig. 18 に示した。

各 BP-3 誘導体のエストロゲンおよび抗アンドロゲン活性を検討したことにより、構造活性相関についてある程度の考察をすることが出来た。その中でも、2,4,4'-triOH BP が非常に強いエストロゲン活性および抗アンドロゲン活性を示したことが特筆される。しかしながら、本研究において、2,4,4'-triOH BP を BP-3 あるいは 2,4-diOH BP の代謝物として見出すことが出来なかった。さらに、本研究において B 環が水酸化された化合物を一切見出せなかった。もし、BP-3 の代謝において B 環の水酸化が起こった場合、内分泌攪乱活性への影響が大きく変わったと予想される。

本研究において、BP-3 の代謝活性変動を念頭に、BP-3 の肝ミクロソームによる代謝後の代謝抽出物あるいは個々の代謝物の活性を測定し、BP-3 の固有の活性と比較した。その結果、2,4-diOH BP が生成されることによりエストロゲン活性が増加することを明らかにすることが出来た。また、ヒトにおいても 2,4-diOH BP が BP-3 の代謝物として検出されている。本事実、今回ラットで示したエストロゲン活性の代謝的活性化がヒトにおいても進行していることを示唆している。BP-3 はそれ自身も弱い活性を示すが、強い活性を示す 2,4-diOH BP に代謝されることで、Fig. 2 で示した代謝的活性化の一員であることを示した。今回示したように、もともと低い活性しか持っていなかった化合物もしくは本来活性を持っていない化合物であっても、代謝されることによって活性が増加する可能性があるという事実を提示出来た。

最後に、今回示したエストロゲン活性の結果は、*in vivo* レベルで考えるには、実際の使用量より高い濃度と考えられる。しかし、BP-3 は、日常的に長期的に使用する製品に含まれており、BP-3 単独ではなく、他の紫外線吸収剤と組み合わせて使用されている成分である。その相乗的もしくは相加的効果の可能性を考えなければならない。また、紫外線吸収剤だけではなく、我々は、日常生活を送るうえで様々な化学物質に触れており、その中には内分泌攪乱作用が報告されている物質も多く含まれる。このようなことから BP-3 および BP-3 代謝物の長期的影響を考えなければならない。

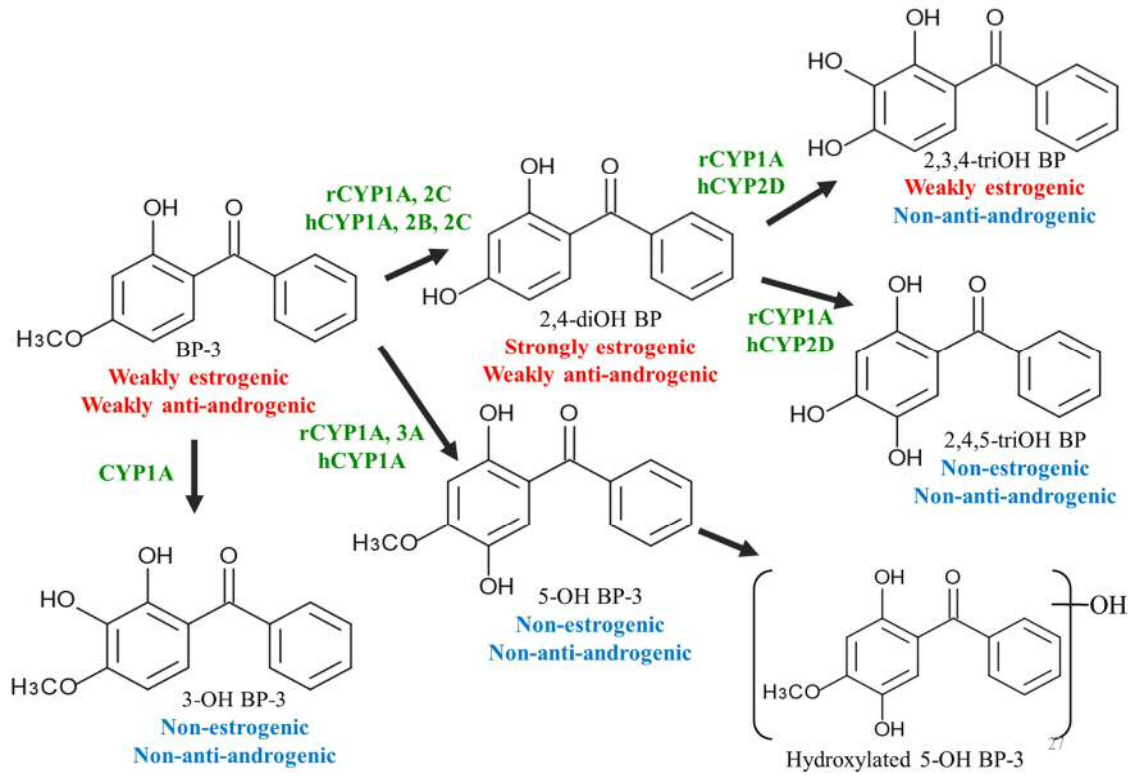


Fig. 18 Metabolic transformations of BP-3 by the liver microsomal enzyme systems of rats and humans, and their effects on the estrogenic and anti-androgenic activities.

実験の部

試薬

17 β -Estradiol (E2; >97% pure)、5 α -dihydrotestosterone (DHT; 95% pure)、hydroxyflutamide (HF; >99% pure)、phenobarbital (98% pure)、dexamethasone (98% pure)、acetone (99.8% pure)、dimethyl sulfoxide (DMSO; 生化学用; >99.5%)、methanol (MeOH; 高速液体クロマトグラフ用; >99.7%) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Wako; Osaka, Japan) より購入した。3-Methylcholanthrene (98% pure) は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。

今回使用した 14 種類の BP-3 誘導体については、Table 2 に示す。

5-OH BP-3、2,4,5-triOH BP、3'-OH BP-3 および 2,3',4-triOH BP は Kamino et al. (2008)、3-OH BP-3 は Klemm et al. (1959)、2,2',4-triOH BP は Doriguetto et al. (2007) の方法に従って、共同研究者である浦丸直人博士が合成したものを使用した。

Pooled human liver microsomes (Lot No. 88114; 50 donor pool; 20 mg/ml in 250mM sucrose) and human と rat recombinant CYP isoforms は BD Gentest (Woburn, MA, USA) より購入した。なお、プールドヒト肝ミクロソームの酵素活性は Table 3 に示した。

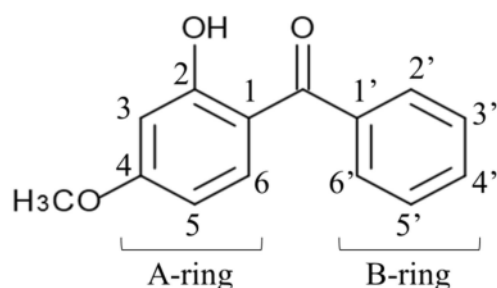
Dulbecco's modified Eagle's medium plus Ham's F-12 nutrient mixture (D-MEM/F-12) と penicillin-streptomycin solution (antibiotics) は GIBCO-BRL (Rockville, MD, USA) より購入した。

Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells は Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。

Fetal bovine serum (FBS) と charcoal-dextran-treated FBS (CD-FBS) は Hyclone (Logan, UT, USA) より購入した。

Table 2 Source, purity and HPLC retention time of BP-3 and related compounds used in this study.

| <i>Compound</i> | <i>Source</i> | <i>Purity (%)</i> | <i>Abbreviation</i> | <i>RT (min)*</i> |
|--------------------------------------|---------------|-------------------|----------------------|------------------|
| 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone | TCI | >98.0% | 2,3,4,4'-tetraOH BP | 5.3 |
| 2,3',4,4'-tetrahydroxybenzophenone | TCI | >98.0% | 2,3',4,4'-tetraOH BP | 6.0 |
| 2,3'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone | - | 89.1% | 3'-OH BP-3 | 6.3 |
| 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone | TCI | >95.0% | 2,2',4,4'tetraOH BP | 8.4 |
| 2,4,4'-trihydroxybenzophenone | TCI | >98.0% | 2,4,4'-triOH BP | 10.5 |
| 2,3',4-trihydroxybenzophenone | - | 98.7% | 2,3',4-triOH BP | 10.9 |
| 2,4,5-trihydroxybenzophenone | - | 96.4% | 2,4,5-triOH BP | 11.9 |
| 2,2',4-trihydroxybenzophenone | - | 93.2% | 2,2'4-triOH BP | 12.2 |
| 2,3,4-trihydroxybenzophenone | Wako | >98.0% | 2,3,4-triOH BP | 13.3 |
| 2,3-dihydroxy-4-methoxybenzophenone | - | 95.2% | 3-OH BP-3 | 18.0 |
| 2,5-dihydroxy-4-methoxybenzophenone | - | 98.9% | 5-OH BP-3 | 19.4 |
| 2,4-dihydroxybenzophenone | Wako | >98.0% | 2,4-diOH BP | 27.3 |
| 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone | Sigma | >98.0% | 2'-OH BP-3 | 34.5 |
| 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone | Wako | >98.0% | BP-3 | 84.7 |



Compounds are arranged in order of HPLC retention time.

Wako; Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) TCI; Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., (Tokyo, Japan) Sigma; Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), -; synthesized in this study.

* RT (min) shows the HPLC retention time.

Table 3 Enzyme activities of 50-donor pooled human liver microsomes (HLMs) used in this study.

| Enzyme Measured | Assay | Enzyme activity [in pmol/(mg x min)] |
|---------------------------|--|---|
| Total P450 | Omura and Sato | 360 pmol/mg |
| OR | Cytochrome c Reductase | 240 |
| Cytochrome b ₅ | Spectrophotometric | 470 pmol/mg |
| CYP1A2 | Phenacetin O-deethylase | 540 |
| CYP2A6 | Coumarin 7-hydroxylase | 1200 |
| CYP2B6 | (S)-Mephenytoin N-demethylase | 41 |
| CYP2C8 | Paclitaxel 6a-hydroxylase | 240 |
| CYP2C9 | Diclofenac 4'-hydroxylase | 2900 |
| CYP2C19 | (S)-Mephenytoin 4'-hydroxylase | 55 |
| CYP2D6 | Bufuralol 1'-hydroxylase (The amount of activity inhibited by 1 mM quinidine) | 81 |
| CYP2E1 | Chlorzoxazone 6-hydroxylase | 2500 |
| CYP3A4 | Testosterone 6b-hydroxylase | 5700 |
| CYP4A11 | Lauric acid 12-hydroxylase | 1100 |
| FMO | Methyl p-Tolyl Sulfide Oxidase | 1200 |
| UGT1A1 | Estradiol 3-Glucuronidation | 1300 |
| UGT1A4 | Trifluoperazine Glucuronidation | 730 |
| UGT1A6 | Serotonin Glucuronidation | 10000 |
| UGT1A9 | Propofol Glucuronidation | 3300 |
| UGT2B7 | AZT Glucuronidation | 580 |

実験動物

Sprague-Dawley (SD) 系、オス、SPF ラット (210-230g) は Japan SLC, Inc. (Sizuoka, Japan) より購入した。動物は温度 22±2℃、湿度 55±10%、12 時間の明暗サイクルの環境に設定した日本薬科大学の動物実験室で飼育された。また、standard pellet diet MM-3 (Funabashi Farm, Funabashi, Japan)、水は自由摂取とした。なお、動物実験は、日本薬科大学動物倫理規定に従って行った。

ラット肝ミクロソーム作成

Slc : SD ラットをそれぞれ以下のように前処置した。

Phenobarbital (PB ; 生理食塩水に 80 mg/ml 溶解), 1 日 1 回 3 日間, 80 mg/kg, i.p. 投与
3-Methylcholanthrene (3-MC; パナセートに 25 mg/ml 溶解), 1 日 1 回 3 日間, 25 mg/kg, 経口投与

Dexamethasone (Dex ; パナセートに 20 mg/ml で溶解), 1 日 1 回 3 日間, 100 mg/kg, 経口投与

Acetone (Ace ; 60 % 溶液), 1 日 1 回 1 日間, 4.8 g/kg, 経口投与

各種前処置ラットおよび未処置ラットを屠殺し、肝臓を摘出した。肝臓は、1.15 % KCl の中で Potter-Elvehjem homogenizer を用いてホモジナイズし、9000 xg、20 分遠心分離し、その上清を 10500 xg、60 分超遠心することにより、生じた沈殿物を肝重量の 2 倍量の 1.15 % KCl で懸濁させ、再度 10500 xg、60 分超遠心を行い、その沈殿物を肝重量の等量の 1.15 % KCl で懸濁させたものを各種肝ミクロソームとして用いた。

ラットおよびヒト肝ミクロソームでの代謝反応

| | |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| 反応組成 | |
| Benzophenone-3 | 100 nmol |
| liver microsomes | 20 μ l (0.4 mg protein) |
| NADPH | 1 μ mol |
| 0.1M Na-K, phosphate buffer (pH 7.4) | |
| <hr/> | |
| Total volume | 1 ml |

上記反応液を好氣的条件下 37°C 15 分間インキュベーションした後、内部標準物質としての 10 nmol のアミルパラベンおよび酢酸エチルを加え、振とう後、遠心分離をした。酢酸エチル層を減圧乾固後、その残渣を 0.1 ml の MeOH で溶かし、HPLC サンプルとした。

ラットおよびヒト CYP 分子種での代謝反応

| 反応組成 | |
|-------------------------------------|-------------|
| Benzophenone-3 | 100 nmol |
| CYP isoform | 40 pmol |
| NADPH | 1 μ mol |
| 0.1M Na-K,phosphate buffer (pH 7.4) | |
| <hr/> | |
| Total volume | 1 ml |

上記反応液を好氣的条件下 37°C 15 分間インキュベーション後、内部標準物質としての 10nmol アミルパラベンおよび酢酸エチルを加え、振とう後、遠心分離をした。酢酸エチル層を減圧乾固後、その残渣を 100 μ l の MeOH で溶かし、HPLC サンプルとした。HPLC サンプルは標準物質の RT と比べることにより定量した。

HPLC の検出感度としては、2,4-diOH BP、5-OH BP-3、3-OH BP-3、2,3,4-triOH BP および 2,4,5-triOH BP は、0.1-20 nmol/sample の範囲においてで直線性を示した。また、検出限界としては、0.1 nmol/min/mg protein であった。

HPLC 測定条件

HITACHI UV-DETECTOR L-7400, HPLC-Pump L-7110 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)

Column : SISHEIDO C₁₈ UG120 5 μ m 4.6mm ϕ ×250mm (Shiseido Co. Ltd., Tokyo, Japan)

Mobile phase : Methanol : 0.1%CH₃COOH = 1:1

Flow rate : 1 ml/min

Detection : UV 254 nm

各種化合物の保持時間は Table 1 に示す。

代謝物の分離精製

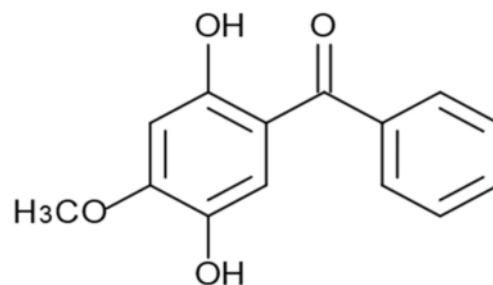
| 反応組成 | |
|------------------------------------|----------------------|
| Benzophenone-3 | 5 μ mol |
| Slc:SD rat liver microsomes | 1 ml (20 mg protein) |
| NADPH | 50 μ mol |
| Glucose-6-phosphate | 250 μ mol |
| Glucose-6-phosphate dehydrogenase | 50 unit |
| 0.1M Na-K,phosphate buffer (pH7.4) | |
| <hr/> | |
| Total volume | 75 ml |

大量スケールでの 15 分間代謝後、HPLC を用い分取した。NMR は重クロロホルムに溶解して測定した。

5-OH BP-3

¹H-NMR spectrum of 5-OH BP-3 in CDCl₃.

- 3.96 (3H, s, OMe)
- 6.55 (1H, s, H-3)
- 7.10 (1H, s, H-6)
- 7.48 (2H, t, J=7.3Hz, H-10, 12)
- 7.56 (1H, tt, j=7.0, 1.6Hz, H-11)
- 7.63 (2H, dd, j=7.3, 1.4Hz, H-9,13)
- 12.5 (1H, s, chelated OH)



¹H-NMR spectrum of RT BP-3 metabolite (RT 19.4 min) in CDCl₃.

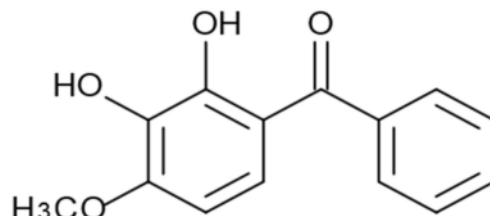
- 3.97 (3H, s, OMe)
- 6.55 (1H, s, H-3)
- 7.10 (1H, s, H-6)
- 7.48-7.64 (5H, multiplet, H-9-13)
- 12.48 (1H, s, OH)

Fig. 19 ¹H-NMR data of 5-OH BP-3 and BP-3 metabolite (RT 19.4 min).

3-OH BP-3

¹H-NMR spectrum of 3-OH BP-3 in CDCl₃.

- 3.98 (3H, s, OMe)
- 6.49 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-5)
- 7.19 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-6)
- 7.50 (2H, t, J = 7.4 Hz, H-10, 12)
- 7.58 (1H, t, J = 7.4 Hz, H-11)
- 7.66 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-9, 13)
- 12.35 (1H, s, chelated OH)



¹H-NMR spectrum of BP-3 metabolite (RT 18.0 min) in CDCl₃.

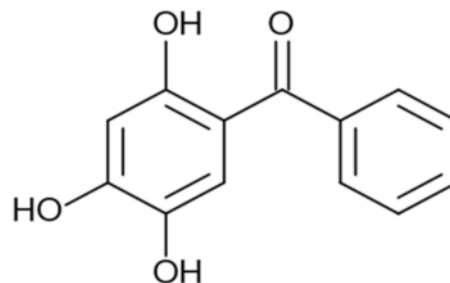
- 3.98 (3H, s, OMe)
- 6.49 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-5)
- 7.19 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-6)
- 7.51 (2H, t, J = 7.4 Hz, H-10, 12)
- 7.58 (1H, t, J = 7.4 Hz, H-11)
- 7.67 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-9, 13)

Fig. 20 ¹H-NMR data of 3-OH BP-3 and BP-3 metabolite (RT 18.0 min).

2,4,5-triOH BP

¹H-NMR spectrum of 2,4,5-triOH BP in CDCl₃.

- 6.58 (1H, s, H-3)
- 7.07 (1H, s, H-6)
- 7.49 (2H, t, H-10, 12)
- 7.57 (1H, t, H-11)
- 7.62 (2H, dd, H-9, 13)
- 8.08 (1H, br, OH)
- 8.10 (1H, br, OH)
- 12.34 (1H, br, OH)



¹H-NMR spectrum of BP-3 metabolite (RT 13.3 min) in CDCl₃.

- 6.58 (1H, s, H-3)
- 7.06 (1H, s, H-6)
- 7.49-7.63 (5H, m, H)
- 12.34 (1H, br, OH)

Fig. 21 ¹H-NMR data of 2,4,5-triOH BP and BP-3 metabolite (RT 13.3 min).

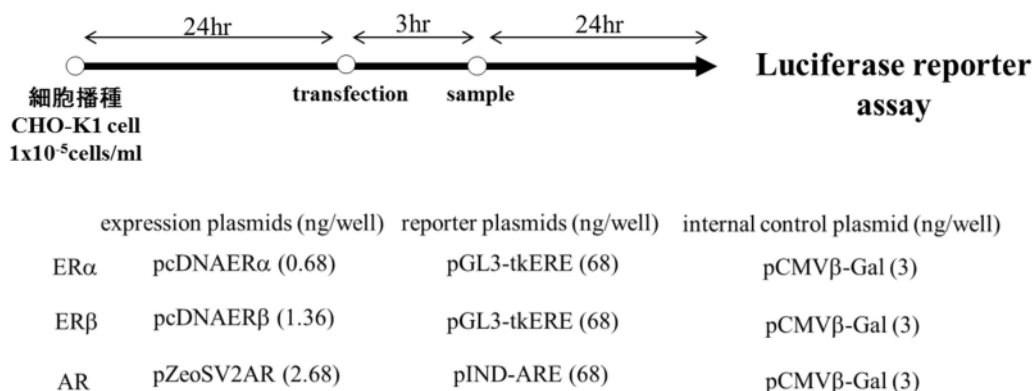
アッセイ用代謝抽出試料の作成

| 反応組成 | |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Benzophenone-3 | 1 μ mol |
| rat liver microsomes | 200 μ l (4 mg protein) |
| NADPH | 10 μ mol |
| 0.1M Na-K, phosphate buffer (pH 7.4) | |
| Total volume | 10 ml |

各種前処置ラット肝ミクロソームを用い、上記の反応組成で、37度、15分間インキュベートした後、酢酸エチルで抽出、減圧乾固後、その残渣を 10^{-2} M の濃度となるように 0.1ml の DMSO で溶かし、エストロゲンおよび抗アンドロゲン活性測定用試料とした。また、熱処理ラット肝ミクロソームは、未処置のラット肝ミクロソームを 100°C、10分間処理したものを使用した。

ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

Luminometer ; Luminskan Ascent (Thermo Fisher scientific Inc, Waltham, MA, USA)



CHO-K1 cell を 96well マイクロプレート (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) に播種し、24時間後、上記各種プラスミドを FuGENE 6 Transfection Reagent を用いて導入する。3時間インキュベーション後、最終 DMSO 濃度が 0.1%になるよう調節した試料を加え、24時間インキュベーションする。24時間後、phosphate-buffered saline (pH 7.4) で洗浄、lysis buffer を 50 ml/well 加え、細胞を溶解させる。その後、Luciferase Assay System (Promega)を使用し、化学発光強度を測定した。

β-Galactosidase activity assay

β-galactosidase substrate solution (0.2 mM 4-MUG, 1 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% BSA, 10 mM Na-phosphate buffer, pH 7.0) を 100ml/well 加え、37°Cで 30 分間インキュベーションする。30 分後、stop solution (100 mM glycine-NaOH, pH 10.3)を 100ml 加え、460/355 nm で吸光度を測定する。

今回使用したアッセイ系の陽性対象物質の活性を Fig. 22 に示す。

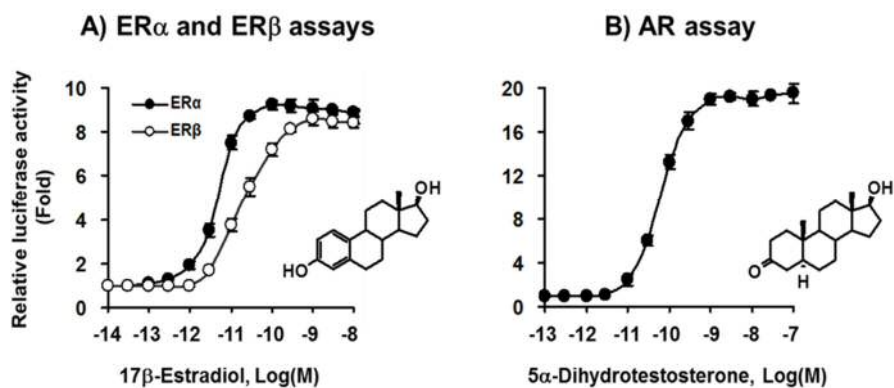
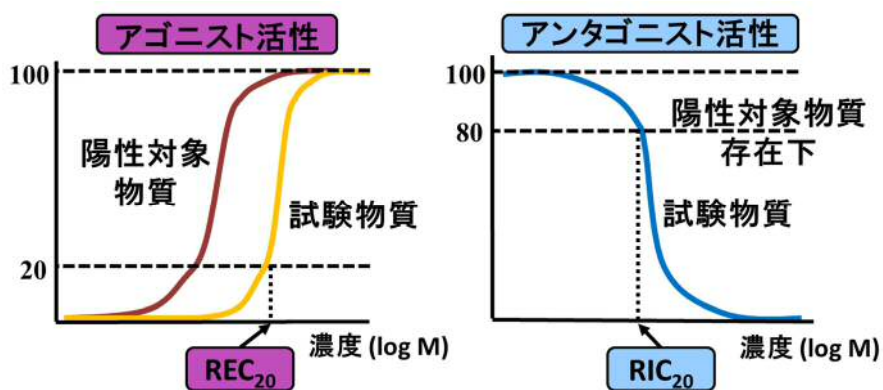


Fig. 22 Dose-response curves for E₂ and DHT in the ERα-, ERβ- and AR-transactivation assays.

アゴニスト活性およびアンタゴニスト活性評価指標

エストロゲン活性はエストラジオール (E₂) 1x10⁻⁹M の活性を 100%としたときの 20%の活性を REC₂₀ とし、アンタゴニスト活性はジヒドロテストステロン (DHT) 1x10⁻¹⁰M を 100%としたとき 20%活性が落ちたときの濃度を RIC₂₀ とし、REC₂₀あるいは RIC₂₀が 10⁻⁵M 以下である試験物質を陽性と判断した。



統計処理

ラット肝ミクロソームを使用した代謝活性については、個々のラットから採取した肝ミクロソームを使用し n=4 で行った。Means ± standard deviation (SD) で示した。統計処理には、analysis of variance (ANOVA) を使用した。

ER α 、 β に対するアゴニスト活性および AR に対するアンタゴニスト活性は、個々の 3 回の実験より means ± SD を算出した。対照群 (0.1%DMSO 単独) に対する統計処理は ANOVA を使用した。

引用文献

Bluthgen, N., Zucchi, S., Fent, K., 2012. Effect of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263, 184-194.

Brand, R.M., Spalding, M., Mueller, C., 2002. Sunscreens can increase dermal penetration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 40, 827-832.

Doriguetto, A.C., Martins, F.T., Ellena, J., Salloum, R., dos Santos, M.H., Moreira, M.E.C., Schneedorf, J.M., Nagem, T.J. 2007. 2,2',4-Trihydroxybenzophenone: Crystal structure, and anti-inflammatory and antioxidant activities. *Chem. Biodiver.* 4, 488-499.

Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2013, Multi-residue method for trace level determination of UV filters in fish based on pressurized liquid extraction and liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *J. Chromatogr A.* 19, 93-101.

Gonzalez H., Farbrot A., Larkö O., Wennberg A.M., 2006. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. *Br. J. Dermatol.* 154, 337-340

Gonzalez, H., Jacobson, C.E., Wennberg, A.M., Larkö, O., Farbrot, A., 2008. Solid-phase extraction and reverse-phase HPLC: application to study the urinary excretion pattern of benzophenone-3 and its metabolite 2,4-dihydroxybenzophenone in human urine. *Anal. Chem. Insights.* 30, 1-7.

Janjua, N.R., Mogensen, B., Andersson, A.-M., Petersen, J.H., Henriksen, M., Skakkebek, N.E., Wulf, H.C., 2004. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene)camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *J. Invest. Dermatol.* 123, 57-61.

Jeon, H.-K., Sarma, S.N., Kim, Y.-J., Ryu, J.-C., 2008. Toxicokinetics and metabolism of benzophenone-type UV filters in rats. *Toxicology* 248, 89-95.

Kamino, S., Ichikawa, H., Wada, S., Horio, Y., Usami, Y., Yamaguchi, T., Koda, T., Harada, A., Shimanuki, K., Arimoto, M., Doi, M., Fujita, Y. 2008. Design and synthesis of regioisomerically pure unsymmetrical xanthene derivatives for staining live cells and their photochemical properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 4380-4384.

Kitamura, S., Sugihara, K., Sanoh, S., Fujimoto, N., Ohta, S., 2008, Metabolic activation of proestrogens in the environment by cytochrome P450 system. *J. Health Sci.* 54, 343-355.

Klemm, L.H., Wolbert, H.J., Ho, B.T., 1959. Benzoylation of 2,6-dimethoxyphenol. *J. Org. Chem.*, 24, 952-954.

Kojima, H., Iida, M., Katsura, E., Kanetoshi, A., Hori, Y., Kobayashi, K., 2003. Effects of a diphenyl ether-type herbicide, chlornitrofen, and its amino derivative on androgen and estrogen receptor activities. *Environ. Health Perspect.* 111, 497-502.

Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niyama, K., Kobayashi, K., 2004. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ. Health Perspect.* 112, 524-531.

Krause M., Klit A., Blomberg Jensen M., Søbørg T., Frederiksen H., Schlumpf M., Lichtensteiger W., Skakkebaek N.E., Drzewiecki K.T., 2012. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *Int. J. Androl.* 35, 424-436.

Kumar R., Zakharov M.N., Khan S.H., Miki R., Jang H., Toraldo G., Singh R., Bhasin S., Jasuja R., 2011. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J. Amino. Acids.* 2011: 812540. doi: 10.4061/2011/812540

Liao, C., and Kannan, K., 2014. Widespread occurrence of benzophenone-type UV light filters in personal care products from China and the United States: An assessment of human exposure. *Environ Sci. Technol.* 48, 4103-4109.

Leon Z., Chisvert A., Tarazona I., Salvador A., 2010. Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 831-843.

Lewis D.F., 1998. The CYP2 family: models, mutants and interactions. *Xenobiotica* 28, 617-661.

Molina-Molina, J.-M., Escande, A., Pillon, A., Gomez, E., Pakdel, F., Cavailles, V., Olea, N., Ait-Assa, S., Balaguer, P., 2008. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 384-395.

Nakagawa, Y., Suzuki, T., 2002. Metabolism of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in isolated rat hepatocytes and xenoestrogenic effects of its metabolites on MCF-7 human breast cancer cells. *Chem. Biol. Inter.* 139, 115-128.

Oesch F., Fabian E., Oesch-Bartlomowicz B., Werner C., Landsiedel R., 2007. Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metab. Rev.* 39, 659-698.

Ohta, R., Takagi, A., Ohmukai, H., Marumo, H., Ono, A., Matsushima, Y., Inoue, T., Ono, H., Kanno, J., 2012. Ovariectomized mouse uterotrophic assay of 36 chemicals. *J. Toxicol. Sci.* 37, 879-889.

Okereke, C.S., Kadry, A.M., Abdel-Rahman, M.S., Davis, R.A., Friedman, M.A., 1993. Metabolism of benzophenone-3 in rats. *Drug Metab. Dispos.* 21, 788-791.

Okereke, C.S., Abdel-Rahman, M.S., Friedman, M.A., 1994. Disposition of benzophenone-3 after dermal administration in male rats. *Toxicol. Lett.* 73, 113-122.

Okereke, C.S., Barat, S.A., Abdel-Rahman, M.S., 1995. Safety evaluation of benzophenone-3 after dermal administration in rats. *Toxicol. Lett.* 80, 61-67.

Schauder, S., Ippen, H., 1997. Contact and photocontact sensitivity to sunscreens. Review of a 15 year experience and of the literature. *Contact Dermatitis* 37, 221-232.

Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W., 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* 109, 239-244.

Shanle, E.K., Xu, W., 2011. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 6-19.

Suzuki, T., Kiatmura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., Ohta, S., 2005. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 9-17.

Svensson C.K., 2009. Biotransformation of Drugs in Human Skin. *Drug Metab. Dispos.* 37, 247–253.

Van Liempd, S.M., Kool, J., Meerman, J.H., Irth, H., Vermeulen, N.P., 2007. Metabolic profiling of endocrine-disrupting compounds by on-line cytochrome P450 bioreaction coupled to on-line receptor affinity screening. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1825-1832.

Wang, L., Kannan, K., 2013. Characteristic profiles of benzophenone-3 and its derivatives in urine of children and adults from the United States and China. *Environ. Sci. Technol.* 47, 12532-12538.

Watanabe, Y., Kojima, H., Takeuchi, S., Uramaru, N., Ohta, S., Kitamura, S., 2013. Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptor α and β and androgen receptor. *Food Chem. Toxicol.* 57, 227-234.

Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Sawaki, M., Imatanaka, N., Shinoda, K., Takatsuki, M., 2003. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* 183, 93-115.

Zhang, Z., Ren, N., Li, Y.-F., Kunisue, T., Gao, D., Kannan, K., 2011. Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3909-3916.

学位論文の基礎となった原著

Watanabe Y., Kojima H., Takeuchi S., Uramaru N., Sanoh S., Sugihara K., Kitamura S., Ohta S. (2014) Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes and its effect on endocrine-disrupting activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、幅広い見地からのご指導、ご鞭撻を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究院 太田 茂教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました日本薬科大学 北村繁幸教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言を頂きました広島大学大学院医歯薬保健学研究院 樫木 修教授ならびに古武弥一郎准教授に深く感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なご助言とご校閲を頂きました広島大学大学院医歯薬保健学研究院 小澤孝一郎教授、松尾裕彰教授、湯元良子助教に深く感謝いたします。

本研究を進行するにあたり、有益なご助言、ご指導いただきました広島国際大学 杉原数美教授、広島大学大学院医歯薬保健学研究院 佐能正剛助教に厚く御礼申し上げます。

代謝物の合成にあたり、ご協力いただきました日本薬科大学 浦丸直人講師に心より感謝申し上げます。

エストロゲン活性および抗アンドロゲン活性の測定に関し、ご指導、ご助言いただきました北海道立衛生研究所 小島弘幸主幹および武内伸治主査に心より深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、数多くのご協力を頂きました広島大学大学院医歯薬保健学研究院 生体機能分子動態学研究室の皆様および日本薬科大学 健康生命科学分野の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、素晴らしい研究環境を与え、支えて頂きました日本薬科大学に感謝申し上げます。