

学位申請論文

In vitro アッセイ系を用いた
ゴム老化防止剤 4-メチル-または
5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾールの
代謝的相互作用に関する毒性学的研究
(Toxicology study about metabolic interaction of rubber
antioxidant 4-methyle or 5-methyle-2-
mercaptobenzimidazole using *in vitro* assays)

2021 年 11 月

黒田 幸恵

目次

緒言.....	6
第一章 ウサギ角膜由来細胞株 SIRC 細胞における 4-メチルおよび5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾールの <i>in vitro</i> 細胞毒性.....	11
第一節 概要.....	12
第二節 背景.....	13
第三節 材料と方法.....	14
第一項 化学物質.....	14
第二項 細胞毒性試験.....	14
第四節 結果と考察.....	17
第五節 小括.....	19
第二章 ゴム老化防止剤 4-メチルおよび5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾールの <i>in vitro</i> のラット肝ミクロゾームにおける代謝.....	20
第一節 概要.....	21
第二節 背景.....	22
第三節 実験材料と方法.....	24

第一項 化学物質と肝ミクロゾームの調製.....	24
第二項 <i>in vitro</i> 代謝実験と HPLC 分析	25
第四節 結果と考察.....	27
第五節 小括.....	29
第三章 ラットおよびヒト初代培養肝細胞における 4-メチルおよび 5-メチル- 2-メルカプトベンズイミダゾールの チトクローム P450 薬物代謝酵素活性に及 ぼす影響	30
第一節 概要.....	31
第二節 背景.....	33
第三節 実験材料と方法	35
第一項 被験物質	35
第二項 ラット初代肝細胞の培養	35
第三項 ヒト初代肝細胞の培養	36
第四項 EROD 活性測定	37
第五項 TS6 β 水酸化活性の測定.....	39
第六項 タンパク質定量	40

第七項	統計解析	41
第四節	結果	43
第一項	ラット初代培養肝細胞の CYP1A1/2 活性に及ぼす影響	43
第二項	ラット初代培養肝細胞の CYP3A2 活性に及ぼす影響	43
第三項	ヒト初代培養肝細胞の CYP1A1/2 活性に及ぼす影響	44
第四項	ヒト初代培養肝細胞の CYP3A4 活性に及ぼす影響	44
第五節	考察	46
第六節	小括	50
第四章	4-メチルおよび5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾールのラットの 反復経口投与後の肝臓における CYPs mRNA 発現誘導	52
第一節	概要	53
第二節	背景	54
第三節	実験材料と方法	55
第四節	結果と考察	56
第五節	小括	58
総合考察	59

総括.....	65
図表.....	70
謝辞.....	79
参考文献	80
要旨.....	90
Abstract.....	97

緒言

肝臓は人体における体内異物の代謝に重要な役割を果たしており、肝実質細胞での薬物代謝酵素の活性誘導や阻害は、体内に取り込まれた化合物の血中濃度の上昇、あるいは低下により、しばしば人体における深刻な毒性を示すことが知られている。薬物代謝は体内に取り込まれた低分子の脂溶性の高い化合物を親水性にして排出しやすくする化学反応であり、薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) は肝臓におけるほとんどの代謝に関与し、生体異物を無害な代謝物(解毒)に変換するか、またはその逆に、有毒な代謝物に変換する可能性がある。そのため、CYP の酵素誘導は肝毒性に関与し^[1]、毒性学的影響をもたらす可能性があるとの報告がある^[2]。CYP の誘導や阻害による毒性は薬物相互作用に見られる。グレープフルーツジュースに含まれるフラノクマリンは腸管および肝臓に発現する薬物代謝酵素 CYP3A4 を競合阻害することで、抗高血圧性カルシウムイオンチャネル拮抗薬フェロジピンの血中濃度を上昇させることから、過度な血圧低下が懸念されている^[3]。CYP3A4 の代謝を受ける薬剤テルフェナジンはケトコナゾールなどの CYP3A4 阻害剤により血中濃度が上昇し、不整脈を引き起こす^[4]。セント・ジョーンズ・ワート(セイヨウオトギリソウ)は CYP3A4 を誘導し、CYP3A4 の代謝を受ける免疫抑制剤シクロスポリンは血中濃度が低下

し移植手術を受けた患者は拒絶反応を引き起こすことが報告されている^[5]。分子レベルでは CYP 酵素誘導は核内受容体によって制御され、このプロセスは内因性または外因性のリガンドが特定の核内受容体/ 転写因子である芳香族炭化水素受容体 (AhR)、構成的アンドロスタン受容体 (CAR)、およびプレグナン X 受容体 (PXR) に結合することによって開始される。 AhR、PXR、および CAR は、主にそれぞれ CYP1A、CYP3A、および CYP2B ファミリーの転写を誘導し^{[6][7][8]}、解毒を媒介することに加えて、CAR、PXR および AhR はより広い範囲の生理学的機能の調節に関係しているため^{[9][10]}、肝毒性を引き起こす可能性がある^[11]。従って、CYP 誘導はヒトの健康リスクに関連する重要なイベントにおけるバイオマーカーとして機能するため、化合物の毒性評価として薬物代謝酵素活性を調べることは毒性学的に重要であると考えられる。

化学物質 2-メルカプトベンズイミダゾール (2-mercaptobenzimidazole、MBI) およびそのメチル化誘導体 4-メチル-または 5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (4-methyle-2-mercaptobenzimidazole または 5-methyle-2-mercaptobenzimidazole、4-MeMBI または 5-MeMBI) はチオウレリン構造を中心とした構造を持つ (Fig. 1)。ベンズイミダゾール核を持つ化合物は、抗菌薬、抗炎症薬、脂質レベル調節薬などの治療薬や、太陽光発電、農薬^{[12][13]}といった幅広い分野で用いられており、ベンズイミダゾールおよびその誘導体は金属老化防止剤として

使用されている^{[14][15][16]}。MBI およびそのメチル化誘導体は銅メッキ^[17]やゴム老化防止剤、銅老化防止^[18]に用いられており、近年、電子機器の小型化やブロードバンドによる大容量かつ高速通信が一般的になっていることから需要が高まっている。その一方で、MBI は生分解性の低い汚染物質としても知られており^[19]、MBI およびメチル化 MBI の幅広い使用は生物への暴露や環境中の残留物からヒトへの影響が懸念されるため、様々な毒性作用の評価が進められている^[20]。

MBI は甲状腺毒性化合物チオ尿素 (TU) およびエチレンチオ尿素 (ETU) に構造が似ており、ラットの 28 日間反復経口投与では強力な甲状腺毒性を示し、TU または ETU よりも強力な抗甲状腺効果を示した^[21]。同様に混合物メチル化 MBI (4-MeMBI:5-MeMBI=1:1 混合物、4(5)-MeMBI) は甲状腺重量の増加を示したものの 1.8 倍の増加にとどまった^[22]。ラットの 2 週間の反復経口投与においては、MBI は血清中の甲状腺ホルモン T3 および T4 濃度を低下させ、甲状腺刺激ホルモン TSH 濃度を上昇させ、甲状腺機能の低下を示した一方でメチル化 MBI は、T3、T4 および TSH 濃度に変化は見られず MBI よりも弱い毒性を示した^[23]。抗甲状腺効果を示す抗甲状腺剤は化学的にチオアミド化合物であり、薬物誘発性肝障害のいくつかの症例が報告されており、CYP 系、あるいはフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) といった代謝経路によって生成された反応性代謝物が肝毒性をもたらす可能性がある^[24]。MBI の肝毒性については、ラット

の 28 日間反復投与試験で ALP および AST などの血液生化学的な変化に伴い肝臓重量を増加させ肝障害を示した。一方、4(5)-MeMBI は肝重量を増加させ、肝肥大を引き起こしたものの、血液生化学的変化が認められないことから解毒酵素を誘発する適応的無害応答であることが示唆された^{[21][22]}。しかしながら、メチル化 MBI は FMO 活性を阻害し肝毒性を示した^[25]。MBI および 4(5)-MeMBI の代謝については、ラットへの経口単回投与においては脱硫酸化により血中および尿中に排泄され、MBI と比較して血清中の 4(5)-MeMBI は速やかに消失したことが報告されている^[26]。ラット肝ミクロゾームにおける薬物代謝酵素活性の検討では、MBI が CYP2B に誘導的に作用する以外はほとんどが阻害的であり、メチル化 MBI は FMO に阻害的である他はほとんどの薬物代謝酵素で誘導的であった。中でも 4-MeMBI は CYP1A1/2 を強力に誘導し、5-MeMBI は CYP2B1/2 を著しく誘導した^[25]。

これらの報告から、工業製品として用いられている 4(5)-MeMBI の MBI および 5-MeMBI に対する相対的に低い毒性は、4(5)-MeMBI が混合物であることから 4-MeMBI と 5-MeMBI との CYP 誘導または阻害を介した代謝的薬物間相互作用によると考えられている。しかしながら、混合物における相互作用については、現在のところ画一的な評価方法が存在しないため、個々の化学物質について研究的に調べる必要がある。このような知見を踏まえ、本研究では *in vitro* アッセ

イ系を用いることにより、MBI およびメチル化 MBI の毒性における CYP の代謝的薬物間相互作用を明らかにするため、ラットおよびヒトにおける被験物質の CYP の誘導を中心に以下に示す各項目について検討を行った。

第一章では、MBI、4-MeMBI、5-MeMBI および 4(5)-MeMBI のウサギ角膜上皮細胞株 SIRC 細胞における細胞毒性を、クリスタル・バイオレット染色性試験により調べた。

第二章では、ラット肝ミクロゾームにおける MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI の代謝について、CYPs の誘導による影響を HPLC 法で調べた。

第三章では、初代ラット肝細胞および初代ヒト肝細胞を用いて MBI または 4-MeMBI および 5-MeMBI による CYP1A1/2 および CYP3A2 または CYP3A4 の誘導を HPLC 法で調べた。

第四章では、4-MeMBI および 5-MeMBI による CYPs の mRNA の発現を Competitive RT-PCR 法で調べた。

本論文は、これらの実験手法と得られた結果を詳述し、考察を加えたものである。

第一章

ウサギ角膜由来細胞株 SIRC 細胞における

4-メチルおよび 5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾールの *in vitro* 細胞毒性

第一節 概要

2-メルカプトベンズイミダゾール (MBI) とそのメチル化誘導体である 4-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (4-MeMBI)、5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (5-MeMBI) および 4-MeMBI と 5-MeMBI の 1:1 混合物 4(5)-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (4(5)-MeMBI) はゴム老化防止剤として広く用いられるとともに、ラット *in vivo* 毒性試験において甲状腺毒性および肝毒性を示す。本研究では、MBI およびそのメチル化誘導体 (メチル化 MBI と称する) についてウサギ角膜上皮細胞株 SIRC 細胞における細胞毒性を調査した。SIRC 細胞を被験物質存在下で 72 時間培養し、クリスタル・バイオレット染色性試験を用いて細胞生存率を決定し、半数致死濃度 (LC₅₀) をそれぞれの化合物について算出した。LC₅₀ の結果からそれぞれの化合物の細胞毒性の強度は 5-MeMBI (761.5 μM) ≥ 4-MeMBI (796.3 μM) ≥ 4(5)-MeMBI (822.9 μM) > MBI (1002.9 μM) だった。メチル化 MBI は MBI と比較して高い細胞毒性を示した。これはラット *in vivo* 試験において MBI が高い甲状腺毒性および肝毒性を持つとの報告とは逆の結果だった。この結果は SIRC 細胞が肝細胞よりも薬物代謝酵素の活性が低いと考えられることにより、メチル化 MBI の低い甲状腺毒性および肝毒性は *in vivo* における速やかな解毒があることを示唆した。

第二節 背景

4-MeMBI および 5-MeMBI はチオウレリン構造を持つ MBI のメチル化誘導体であり、チオウレリン構造は甲状腺毒性および肝毒性に関連している^[27]。4(5)-MeMBI は MBI と同様にゴム老化防止剤や銅メッキとして工業的に広く用いられているため^[20]、これらの工業製品製造工程での曝露や環境中への排出によりヒトへの影響が懸念される。

MBI およびメチル化 MBI はいずれもラットにおける 28 日間経口反復投与試験により甲状腺毒性と肝毒性を示し、MBI と比較してメチル化 MBI の弱い毒性を示した^{[28][22][23]}。この毒性の違いは、薬物代謝酵素活性が関与すると考えられ、被験物質の *in vivo* ラット 8 日間反復経口投与における肝ミクロゾームを用いた CYP 誘導試験では、メチル化 MBI で CYP 活性の誘導が認められた一方で、MBI で CYP 活性の阻害が認められた^[25]。このように被験物質の毒性の違いについては CYP 代謝との関連性が指摘されているが、被験物質が本来持つ毒性か、あるいは代謝によって示した毒性かは不明である。

本研究では、ウサギ角膜由来細胞株 SIRC 細胞を用いて MBI およびメチル化 MBI の本質的な毒性効果を *in vitro* 細胞毒性により調査した。

第三節 材料と方法

第一項 化学物質

被験物質、4-MeMBI、5-MeMBI および MBI の構造は Fig.1A に示した。MBI (CAS No. 583-39-1、PubChem CID: 707035) は、富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。4-MeMBI (CAS No. 27231-33-0、PubChem CID: 3034478) は 4(5)-MeMBI を分別晶析法^[29]により分離することにより得られた。4(5)-MeMBI をメタノールで加熱溶解し、冷却により 1 次再結として 4-MeMBI 純度：85-90 %を得た。続いて 1 次再結 4-MeMBI をエタノールで加熱溶解し冷却により 2 次再結として 4-MeMBI 純度：99.5-99.8 %を得た。4-MeMBI は 2 次再結を実験に用いた。5-MeMBI (CAS No. 27231-36-3、PubChem CID: 712373) は Merck 社 (Darmstadt, Germany) から購入した。4(5)-MBI は大内新興化学工業株式会社 (東京、日本) より提供された。

第二項 細胞毒性試験

全ての被験物質の細胞毒性は、SIRC 細胞の生存率をクリスタル・バイオレット染色性試験により^[30]測定することで決定した。SIRC 細胞 (ATCC No. CCL 60: American Type Culture Collection, VA, USA) は 10 %ウシ胎児血清 (FBS, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を含む Minimum Essential Media (MEM, Thermo Fisher Scientific) を用いて 37 °C、5 % CO₂ 気相下で培養した。SIRC 細

胞は細胞毒性試験を行う前に3または4日おきに0.25% Trypsin EDTA (Thermo Fisher Scientific) を用いて継代培養を行なった。全ての被験物質はストックを400 mM/ DMSO で調製した。MBI は水 < 0.1 g/100 mL at 23.5 °C であり 6.6 mM 未満で水に可溶であるため、培地で希釈し DMSO (終濃度 \leq 0.75 %) で用いた。4(5)-MeMBI は 1000 μ M で結晶、4-MeMBI は 350 μ M で結晶、5-MeMBI は 2000 μ M で結晶がそれぞれ認められ、それ以上の濃度溶液については超音波破碎装置を用いて均一な分散液を得て実験に用いた。96well マイクロプレート (セルカルチャー96 ウェル平底、Corning Inc., NY, USA) に 0.1 mL 被験物質希釈液を調製し、0.1 mL SIRC 細胞懸濁液 (2.0×10^5 cells/ mL) を添加した。室温で 20 分間静置した後、37°C、5% CO₂ 気相下で 72 時間インキュベーションした。培養液を除去したのち仕様書に従って調製した 0.2 mL PBS(-) (ダルベッコ PBS(-)粉末、日水製薬株式会社、東京、日本) で 2 回洗浄後、メタノールに溶かした 0.4% クリスタル・バイオレット溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社) を SIRC 細胞に添加し、室温で 30 分間インキュベーションすることにより生細胞を染色した。SIRC 細胞はクリスタル・バイオレット溶液を除去後、水道水で洗浄し風乾したところに、溶出液 (50% エタノール、1% 酢酸水溶液) を 0.2 mL 添加し攪拌溶解後、マイクロプレートリーダー (Model 450、Bio-Rad Laboratories、CA、USA) を用いて 595nm 吸光度を測

定し、生細胞数を推定した。それぞれの化合物の半数致死濃度 (LC₅₀) は吸光度の減少によって log-logistic curve fitting を R software^[57]、drc パッケージ^[31]により算出した。

第四節 結果と考察

クリスタル・バイオレット染色性試験では、MBIはSIRC細胞の生存率を減少させた。200 μM 以上で生存率が低下し、 LC_{50} はおよそ1000 μM だった (Fig. 2A)。4-MeMBI、5-MeMBIおよび4(5)-MeMBIにおける細胞生存率はそれぞれ200 μM 以上で低下し、 LC_{50} は約800 μM を示した (Fig. 2B-D)。 LC_{50} の値からSIRCにおける被験物質の細胞毒性レベルは、5-MeMBI \geq 4-MeMBI \geq 4(5)-MeMBI $>$ MBIだった。

本研究結果ではメチル化MBIは類似した細胞毒性を示し、MBIよりも強い細胞毒性を示した。これは、ベンゼン環にメチル基が存在するとMBI誘導体の細胞毒性が高まることを示唆している。この効果は、医薬品として使用されるベンズイミダゾール誘導体の生物活性に類似しており、ベンゼン環の5位の置換基によって増強される^{[32][33]}。MBIおよびメチル化MBIの正確な細胞毒性メカニズムは明らかではない。しかしながら、ユビキチン-プロテアソーム経路の阻害^[34]、血管新生の阻害^[35]、プロテインキナーゼの阻害^[36]、微小管の破壊^[37]、活性酸素種の生成^[38]など、いくつかの細胞毒性メカニズムが示唆される。様々な誘導体の活性中心としてベンズイミダゾール構造は同定されている。したがってMBIおよびメチル化MBIで類似した細胞毒性メカニズムが含まれている可能性がある。本研究におけるSIRC細胞におけるMBIおよびメチル化

MBI の細胞毒性の強度は、ラットでの *in vivo* 研究に基づくそれらの甲状腺毒性および肝毒性の強度と比較して細胞への、より直接的な毒性を示している。*In vivo* ラット毒性試験においてメチル化 MBI は、MBI と比較して甲状腺重量の増大および甲状腺ホルモンの生成阻害などのより弱い甲状腺毒性を示し、肝重量のわずかな増加や、薬物代謝酵素 CYP の誘導を示すことにより弱い肝毒性を示した^{[22][23][25]}。従って、メチル化 MBI の *in vivo* における低い甲状腺毒性および肝毒性は、薬物代謝酵素 CYP の誘導^[25]による速やかな解毒によるものと考えられた。SIRC 細胞は薬物代謝酵素活性が低いため、本研究結果は、被験物質の毒性が CYP の誘導による影響下にあると考えられるこれまでの仮説を支持した。

第五節 小括

ウサギ角膜由来細胞株 SIRC を用いて MBI、4-MeMBI、5-MeMBI および 4(5)-MeMBI の細胞毒性について以下のことが明らかになった。

1. LC_{50} の値から、被験物質の細胞毒性の強度は、 $5\text{-MeMBI} \geq 4\text{-MeMBI} \geq 4(5)\text{-MeMBI} > \text{MBI}$ であることを示した。
2. メチル化 MBI が類似した細胞毒性を示し、MBI よりも強い細胞毒性を示した結果は、ベンゼン環にメチル基が存在すると MBI 誘導体の細胞毒性が高まることを示唆している。
3. SIRC 細胞の薬物代謝酵素活性が低いことから、メチル化 MBI の *in vivo* における低い甲状腺毒性および肝毒性は、薬物代謝酵素の誘導によるものであるという仮説を支持した。

本章は下記の論文に発表された。

Yukie Kuroda*, Atsuko Miyajima*, Kazue Sakemi-Hoshikawa, Makoto Usami, Katsuyoshi Mitsunaga, Yasuo Ohno, Momoko Sunouchi. *In vitro* cytotoxicity of the thyrotoxic and hepatotoxic rubber antioxidant 2-mercaptobenzimidazole and its 4- or 5-methyl derivatives in rabbit corneal cells. *Fundamental Toxicological Sciences*, 7.6, (2020): 249-252. * These authors equally contributed to this work.

第二章

ゴム老化防止剤 4-メチルおよび 5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾールの

in vitro のラット肝ミクロゾームにおける代謝

第一節 概要

4-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (4-MeMBI)、5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (5-MeMBI) はゴム老化防止剤 2-メルカプトベンズイミダゾール (MBI) と同様に、広く工業材料として使用されており、ラット *in vivo* 毒性試験における弱い肝毒性は薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) の誘導によるものと考えられている。しかしながら、これら化合物が混合物として用いられた場合の CYP を介した相互作用については詳細が明らかになっていない。本研究では、雄 Sprague-Dawley ラットから調製したラット肝ミクロゾームを MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI 存在下でインキュベーションし、HPLC 法によって CYP による被験物質の代謝を解析した。非選択的 CYP 阻害剤 SKF-525A を添加した肝ミクロゾームでは全ての被験物質の代謝が低下し CYP 依存的な代謝が示唆された。続く CYP 誘導剤 β -ナフトフラボン、フェノバルビタール、イソニアジド処理したラットの肝ミクロゾームにおける被験物質の代謝は、残存 4-MeMBI 量は 5-MeMBI 量より減少し、特にフェノバルビタール処理群で顕著であった。これにより 4-MeMBI と 5-MeMBI の CYP を介した相互作用を部分的に説明することができ、5-MeMBI は CYP の誘導剤として働くことで 4-MeMBI の効率的な解毒効果を示すと考えられた。

第二節 背景

4-MeMBI、5-MeMBI、4-MeMBI と 5-MeMBI の 1:1 混合物である 4(5)-MeMBI は、メチル化されていない MBI と同様、ゴム加硫促進剤または老化防止剤として広く使われており、発がん性/ 催奇形性物質として知られるエチレンチオ尿素や抗甲状腺薬として知られるメチマゾールと構造が似ている^{[39][40]}。ラットにおける 28 日間の反復経口投与研究では、4(5)-MeMBI と MBI の両方でチオウレリン構造による甲状腺毒性を示したが、MBI だけが肝毒性であると考えられた^{[28][22]}。しかしながら、ラット肝ミクロゾームの薬物代謝酵素活性阻害効果の面から 4(5)-MeMBI もまた肝毒性があり、毒性効果における 4-MeMBI と 5-MeMBI の間での相互作用として、4(5)-MeMBI の甲状腺毒性と肝毒性はその成分それぞれの単独と同じかより弱いことが示されている^[25]。この相互作用のメカニズムとして、薬物代謝酵素活性の誘導は 4-MeMBI による 5-MeMBI の効率的解毒化か、あるいはその逆の 5-MeMBI による 4-MeMBI の効率的解毒化である可能性が考えられる。

本研究では、4-MeMBI、5-MeMBI および MBI の CYP 誘導による代謝を明らかにすることを目的とし、これらの被験物質についてラット肝ミクロゾームを用いて代謝試験を行い、CYP の誘導剤で処理されたラットの肝ミクロゾームに

より CYP の誘導による被験物質の代謝への影響を調査した。

第三節 実験材料と方法

第一項 化学物質と肝ミクロゾームの調製

4-MeMBI (CAS No. 27231-33-0) は、大内新興化学工業株式会社 (東京、日本) から提供された 4(5)-MeMBI (CAS No. 53988-10-6) を分別晶析法により分離することで得られた。5-MeMBI (CAS No. 27231-36-3) は Merck 社 (Darmstadt, Germany) から購入した。MBI (CAS No. 583-39-1) とチアベンダゾール (CAS No. 148-79-8) は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。SKF-525A (CAS No. 62-68-0) は Salford Ultrafine Chemicals and Research Ltd. (Manchester, UK) から購入した。 β -NADPH はオリエンタル酵母工業株式会社 (東京、日本) から購入した。アセトン、エタノールに可溶である被験物質 (10 mM) とチアベンダゾール (1 mM) はメタノールに溶解し試薬ストックとして調製して実験に用いた。

肝ミクロゾームは Xeno Tech, LLC (Kansas City, KS, USA) から購入した雄 Sprague-Dawley ラットから調製した肝ミクロゾームおよび CYP 誘導肝ミクロゾームを用いた。コントロール群の肝ミクロゾームとして、生理食塩水処理 (product No. R1073) またはコーンオイル処理 (R1098) したラットのプール肝ミクロゾームを使用した。CYP 誘導群の肝ミクロゾームは、CYP1A の誘導に β -ナフトフラボン処理 (R1083)、CYP3A および CYP2B の誘導にフェノバルビタ

ール処理 (R1078)、および CYP2E の誘導にイソニアジド処理したラットの肝ミクロゾーム (R1088) を使用した。

第二項 *in vitro* 代謝実験と HPLC 分析

被験物質 (10 μ M) は、100 mM のリン酸カリウム (pH 7.4)、0.33 mM β -NADPH、および肝ミクロゾーム (200 μ g タンパク質/mL) から構成された 250 μ L 反応混合液中でインキュベートされた。反応は、50 μ L 肝ミクロゾームを 37 $^{\circ}$ C でプレインキュベーションした 200 μ L 混合液に添加することで開始させた。インキュベーションタイム (20-40 分) の後、メタノール (200 μ L) を添加して反応を停止させ、さらに被験物質の HPLC 分析の内部標準として 50 μ M チアベンダゾールナトリウムを 50 μ L 添加した。反応混合液中の被験物質はチアベンダゾールを内部標準として HPLC 法により二重測定により決定した^[26]。反応液は 12,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清をフィルトレーションしサンプル得た。サンプルを HPLC (フォトダイオードアレイ UV-VIS 検出器 SPD-M6A を搭載した LC-10A、島津製作所、京都、日本) で分析した。使用カラム CAPCELL PAK C18 ODS (4.6 mm ϕ ×250 mm、資生堂、東京) は、アセトニトリル/0.01 M リン酸バッファー (pH 7.0; 15/85 v/v) と共に用いられた。を用いた。カラムオーブンの温度は 45 $^{\circ}$ C で、流速と検出波長はそれぞれ 0.5 ml/ min と 300 nm だった。被験物質 MBI お

よびメチル化 MBI の定量限界は 7.5 ng/ injection (100 μ l) だった^[23]。300 nm でのピーク保持時間は 4-MeMBI で 14.9 分、5-MeMBI で 15.8 分、MBI で 8.17 分、そしてチアベンダゾールで 21.7 分だった。

第四節 結果と考察

いずれの被験物質においても反応混合物の肝ミクロゾームにおける代謝物量はインキュベーション時間依存的に増加し、この実験条件下でこれらの代謝は量的評価が可能であることを示した (Fig. 3A)。被験物質間の代謝物量は類似しており、中心となる代謝反応が共通の構造であるチオウレリンでの脱硫酸化が関与していることを示唆している。これはラットの経口単回投与後に被験物質の脱硫酸化代謝産物が尿中に迅速に検出された代謝試験結果により支持される [26][23]。

非選択的 CYP 阻害剤 SKF-525A の添加は、すべての被験物質の代謝率を濃度依存的に減少させ、これらの代謝に CYPs が関与していることを示した (Fig. 3B)。この代謝率の減少は、 $MBI > 4\text{-MeMBI} \geq 5\text{-MeMBI}$ であったことから、4-MeMBI の代謝は 5-MeMBI よりわずかに CYPs 依存的であることが示唆された。

CYPs 誘導肝ミクロゾームを用いた被験物質の代謝試験結果では、残存 4-MeMBI 量は 5-MeMBI 量より減少し、CYP2B および CYP3A を誘導するフェノバルビタール処理群で顕著であった (Fig. 3C)。これにより 4-MeMBI と 5-MeMBI の毒性効果の相互作用を以下に示すように部分的に説明することができる。混合物 4(5)-MeMBI の代謝は、4-MeMBI により誘導された CYP1A および 5-MeMBI

により誘導された CYP2B により、5-MeMBI および 4-MeMBI のそれぞれが効率的に代謝される代謝的薬物間相互作用が示唆された。

第五節 小括

ラット肝ミクロゾーム *in vitro* 誘導試験を用いることで被験物質 MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI に関して以下のことが明らかになった。

1. MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI は時間依存的に CYPs によって代謝された。
2. 4-MeMBI および 5-MeMBI の代謝には、CYPs 1A および 2B が関与し、どちらも CYP2B に対して、より依存的であった。
3. 本結果と既報の *in vivo* 実験の結果から、4(5)-MeMBI の代謝においては、4-MeMBI により誘導された CYP1A および 5-MeMBI により誘導された CYP2B により、5-MeMBI および 4-MeMBI のそれぞれが効率的に代謝されると言う代謝的薬物間相互作用が示唆された。

本章は下記の論文に発表された。

Atsuko Miyajima *, Yukie Kuroda *, Kazue Sakemi-Hoshikawa, Makoto Usami, Mitsunaga Katsuyoshi, Tomohiko Irie, Yasuo Ohno, Momoko Sunouchi. *In vitro* metabolism of 4-methyl- and 5-methyl-2-mercaptobenzimidazole, thyrotoxic and hepatotoxic rubber antioxidants, in rat liver microsomes. *Fundamental Toxicological Sciences*, 5.3, (2018): 113-116. * These authors equally contributed to this work.

第三章

ラットおよびヒト初代培養肝細胞における

4-メチルおよび 5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾールの

チトクローム P450 薬物代謝酵素活性に及ぼす影響

第一節 概要

肝細胞を用いた薬物代謝酵素の誘導試験は、毒性試験における化学物質の相互作用の理解に重要な役割を果たす。ゴム老化防止剤 2-メルカプトベンズイミダゾール (MBI)、および 4-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (4-MeMBI) と 5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (5-MeMBI) の 1:1 混合物 (4(5)-MeMBI) は甲状腺毒性と肝毒性を示し、4(5)-MeMBI は MBI と比較して弱い肝毒性を示した。その毒性メカニズムとして薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) の誘導が関与し、これまでに CYP1A1/2 および CYP2B の誘導、CYP1A1/2 および CYP2B または CYP3A による代謝が被験物質の毒性に影響することが示唆されている^{[25][41]}。

本研究ではラット初代培養肝細胞およびヒト初代培養肝細胞を用いて、MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI の CYP1A1/2 および CYP3A2 または CYP3A4 の誘導を 7-エトキシレゾルフィン O-脱エチル化 (EROD) およびテストステロン 6 β 水酸化 (TS6 β 水酸化) の活性を指標としてそれぞれを HPLC 法によって評価した。ラット初代培養肝細胞においては、4-MeMBI および 5-MeMBI ($\geq 12.5 \mu\text{M}$) は CYP3A2 活性を阻害した。一方、4-MeMBI ($\geq 25 \mu\text{M}$) および 5-MeMBI ($\geq 100 \mu\text{M}$) のいずれも、CYP1A1/2 活性の誘導効果を示し、報告されているラット *in*

vivo 誘導試験と同様の結果を示した。比較実験として用いた白人ドナー由来のヒト初代肝細胞を用いた被験物質の誘導では個人差が認められ、ラットとは異なる結果が得られたものの、同じ試験濃度範囲で CYP の活性測定が可能であることが示された。研究結果は、ラットにおいて MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI の CYP3A2 の阻害が薬物代謝酵素による代謝的相互作用を示す可能性があることと CYP1A1/2 の誘導が代謝的薬物間相互作用には重要であることを示した。その一方で、ヒトでは、被験物質がラットで示した代謝的薬物間相互作用示す可能性が低いことを示した。さらに、イミダゾール化合物による CYP の誘導あるいは阻害を評価するに際して、ラットおよびヒト初代培養肝細胞を用いることが有用であることを示した。

第二節 背景

肝臓は生体内における代謝に重要な役割を果たし生体内異物の毒性に深く関与する。肝細胞を用いた薬物代謝酵素の誘導試験は、細胞内応答を保持することから、より完全性が高い *in vitro* 試験であり、毒性試験における化学物質の相互作用の理解に貢献する。

ゴム用老化防止剤 MBI とそのメチル化誘導体 4-MeMBI および 5-MeMBI の 1:1 の混合物 (4(5)-MeMBI) はチオウレリン構造を共通に持ち、ゴム用老化防止剤または銅メッキ被膜添加剤として工業的に幅広く利用されており、製造工程で排出された場合には環境中の暴露からヒトへの毒性が懸念されている^{[23][42][17]}。MBI および 4(5)-MeMBI のラットの反復投与試験では、MBI が肝障害などの肝毒性を示す一方で、4(5)-MeMBI では肝肥大や薬物代謝酵素の阻害効果などの弱い肝毒性を示し、その成分である 4-MeMBI、5-MeMBI それぞれ単独と同じか、より弱いことが示されている^{[22][25]}。CYP は MBI 投与ではほとんどで阻害的であり、一方、4-MeMBI、5-MeMBI および 4(5)-MeMBI 投与では誘導的であった^[25]。ラット肝ミクロゾームを MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI で処理すると、薬物代謝酵素 CYP 依存的代謝を示し、さらに CYPs 誘導剤処理により被験物質の代謝が促進された^[41]。このうち、CYP 誘導剤フェノバルビタールによって CYP2B

および CYP3A が誘導された^[43]肝ミクロゾームでは、4-MeMBI が著しく代謝されたことから CYP2B および CYP3A の誘導は被験物質の毒性に影響を及ぼすことが考えられる。また、フェノバルビタールはヒトにおいて CYP3A4 を誘導する。

本章ではラット初代肝細胞を用いて、MBI、4-MeMBI または 5-MeMBI の存在下で 48 時間および 96 時間培養し、それぞれ CYP1A1/2 の活性を表す EROD および CYP3A2 の活性を表す TS6 β 水酸化を測定することにより CYPs の誘導を調査した。さらに白人ドナー由来の培養ヒト初代肝細胞を用いて、4-MeMBI および 5-MeMBI の誘導性を CYP1A1/2 または CYP3A4 の活性によって比較代謝学的に検討した。

第三節 実験材料と方法

第一項 被験物質

4(5)-MeMBI (CAS No. 53988-10-6) は、大内新興化学工業株式会社より入手した。4-MeMBI (CAS No. 27231-33-0) は、4(5)-MeMBI を分別晶析法により分離した。5-MeMBI (CAS No. 27231-36-3)、3-メチルコラントレン (3-MC、CAS No. 56-49-5)、およびリファンピシン (CAS No. 13292-46-1) は、Merck 社 (Darmstadt、Germany) より購入した。MBI (CAS No. 583-39-1)、オメプラゾール (CAS No. 73590-58-6)、およびデキサメタゾン (CAS No. 50-02-2) は、富士フイルム和光純薬株式会社より購入した。

第二項 ラット初代肝細胞の培養

ウイスターラット (雄、6 週齢、日本エスエルシー株式会社、静岡) から 2 段階コラゲナーゼ灌流法により肝細胞を調製した^[44]。細胞密度を 2×10^5 cells/cm² に調製したのち、24-well コラーゲンコート培養プレート (Corning® BioCoat™ Collagen I 24-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Plate、Corning Inc.、NY) に肝細胞を播種して、37 °C、5 % CO₂ にて 3 時間の前培養を行うことで培養器底面に接着させた。PBS(-) (ダルベッコ PBS(-)粉末、日水製薬株式会社、東京、

日本) で 1 回洗浄した後、各 well に設定した濃度の被験物質を含む Lanford 培地 (日水製薬株式会社、東京、日本) を 0.25 mL ずつ添加した。24 時間毎に被験物質を含む Lanford 培地で培地交換を行い、48 時間または 96 時間まで培養した。動物を用いた実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規程に従って実施した。

第三項 ヒト初代肝細胞の培養

2 人のドナー、Sau01 (白人、男性、17 歳、喫煙歴 1 日 1 箱 1 年間) および Sau06 (白人、女性、17 歳、喫煙歴なし)、それぞれに由来する 24-well プレート接着型非凍結初代ヒト肝細胞を Corning 社 (NY、USA) から購入して用いた。細胞密度は 2×10^5 cells/cm² で、Corning BioCoat™ Collagen I Microplates (Corning Inc.、NY) に接着した状態で、Lanford 培地 (日水製薬株式会社、東京、日本) で 48 時間毎に培地交換を行い、37 °C、5 % CO₂ にて一週間の予備培養を行った。前培養後、培地を除去し被験物質を含む Lanford 培地を添加し 24 時間毎に培地交換を行い、EROD 活性測定群は 48 時間まで、TS6 β 水酸化活性測定群は 48 時間または 96 時間まで培養した。

第四項 EROD 活性測定

EROD 活性は、CYP1A1/2 によって代謝される添加基質 7-エトキシレゾルフィンの代謝物であるレゾルフィンの測定値により得られた。EROD 活性により CYP1A1/2 の活性を決定するために培養肝細胞における EROD 活性を HPLC 法により測定した。被験物質存在下で 48 時間培養した細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、代謝基質である 7-エトキシレゾルフィン (8 μ M、CAS 5725-91-7、Merck、Darmstadt, Germany) およびレゾルフィンの代謝分解を阻害するジクマロール (10 μ M、CAS 66-76-2、Merck、Darmstadt, Germany) を添加して 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ にて 30 分間反応させた後、上清を試料液として採取した。上清試料液は遠心分離 (2500 rpm、10 min、4 $^{\circ}$ C) により粒子を除去した後 0.2 mL ずつ 96-well plate に分注して、翌日の測定時まで 4 $^{\circ}$ C にて保存した。

測定前に、試料液と標準液にそれぞれ β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ (Roche, Mannheim, Germany) を加え、遮光し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間の振とう反応により抱合体を分解した。標準液は加温しなかった。氷冷エタノールを加え 3 分間処理後に遠心分離 (2500 rpm、10 min、4 $^{\circ}$ C) して上清を得た。上清 50 μ L に含まれるレゾルフィンを HPLC 法により測定した。HPLC の測定条件は以下の通りである：

HPLC コントローラー/ SHIMADZU、SCL-10A-vp

HPLC ポンプ/ SHIMADZU、LC-10AS-vp

蛍光検出器/ SHIMADZU、RF-10A-xL

測定カラム/ SHISEIDO、CAPCELL PAK C18UG-120、4.6 φ x150 mm

プレカラム/ SHISEIDO、GUARD CARTRIDGE、CAPCELL C18, UG-120. 4.0 φ x10 mm

カラム温度/ 40 °C

移動相/ 20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH=7.0): CH₃CN= 87: 13

流量/ 1.0 mL/ min

注入量/ 50 μL

検出条件/ EX = 575 nm、Em = 595 nm、RANGE = 3、感度 = Med 32 倍 (SENS = 2、GAIN = 1)

溶出時間/ レゾルフィン: 3.8 min

0-5000 nM レゾルフィン濃度でスタンダードを作成し検量線を得た。

得られた検量線は以下のパラメータを用いて評価した。

CV (変動係数、%) = 標準偏差値/ 平均値×100

Accuracy (真度、%) = (理論値/ 測定値) ×100-100

FDA のガイダンスでは、真度は±15 %設定濃度、精度は±15 %CV の基準が示

されている^[45]。

測定値の真度は、10 nM 以下では 20 %以上、30 nM 以上では真度が 10 %以下を示した。CV は 3 nM で 65%を示した他は 10 nM 以上で 5 %以下となった。したがってレゾルフィン濃度 10 nM 以上で FDA の基準を満たした。

第五項 TS6 β 水酸化活性の測定

TS6 β 水酸化活性は、CYP3A2 または CYP3A4 によって代謝される添加基質テストステロンの代謝物である 6 β 水酸化テストステロンの測定値により得られた。TS6 β 水酸化活性により CYP3A2 または CYP3A4 の活性を決定するために培養細胞における TS6 β 水酸化活性を HPLC 法により測定した。被験物質存在下で 48 または 96 時間培養した細胞を PBS(-)で 2 回洗浄し、代謝基質であるテストステロン (250 μ M、CAS 58-22-0、Merck、Darmstadt、Germany) を添加して、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 雰囲気下に置いて 2 時間反応させた後、上清を採取した。採取した上清に 1 μ M 11 α -ヒドロキシプロゲステロンを含む酢酸エチルを加えミキサーで攪拌し遠心分離 (2500 rpm、10 min、4 $^{\circ}$ C) し、抽出相を採取し乾固した後、50 %メタノールに溶解し、よく攪拌して試料液を得た。試料液 100 μ L を HPLC で測定した。HPLC の測定条件は以下の通りである：

HPLC コントローラー/ SHIMADZU、LC-10A

UV 検出器/ SHIMADZU、SPD-M10Avp

測定カラム/ Chemco、CHEMCOSORB 5-ODS-H、Size ϕ 6.0x 150 mm (6A)

プレカラム/ Chemco、CHEMCOSORB 5-OD-UH、Size ϕ 4.6x 30 mm (W)

カラム温度/ 25 °C (RT)

移動相/ solution A= 10% Methanol、solution B= 90% Methanol

流量/ 1.0 mL/ min

注入量/ 100 μ L

検出/ UV = 240 nm

溶出時間/ 6 β -HTS:14.8 min, 11 α -HPG: 21.5 min

0-100 μ M 6 β 水酸化テストステロン濃度でスタンダードを作成し検量線を得た。検量線はレゾルフィンと同様に評価した。6 β 水酸化テストステロン濃度、1 μ M 以下と 50 μ M 以上では真度が 20 %以上を示した。その他の濃度では、真度は 11.2 %以下だった。CV は 1 μ M 以上の条件 25 μ M で 17.8 %、100 μ M で 17.3 %を示した他は 5 %以下だった。6 β 水酸化テストステロンでは 2.5 μ M 以上 25 μ M 以下で FDA の基準を満たした。

第六項 タンパク質定量

CYP1A1/2 および CYP3A2 または CYP3A4 の活性を算出するため誘導試験終了後に各ウェルにおける肝細胞のタンパク質の定量を行なった。0.5 mL の PBS(-)

でウェルを数回洗浄し 0.54 mL の 1 M の水酸化ナトリウム溶液を添加し一晩静置し細胞を溶解した。溶解した細胞に 90 μ L の 6 M の塩酸水溶液を添加し混和した。続いて 0.37 mL の精製水を加えて混和し終容量 1.0 mL のタンパク質定量試料とした。BCA-Protein Assay Kit (PIERCE、ThermoFisher Scientific、MA、USA) を用いて検量線試料および測定試料を調製しマイクロプレートリーダー (Model 450、Bio-Rad Laboratories、CA、USA) を用いて 562 nm 吸光度を測定しタンパク質量を算出した。

第七項 統計解析

EROD 活性値および TS6 β 水酸化活性値はレゾルフィンおよび 6 β 水酸化テストステロン測定値とタンパク質量から下記計算式により算出した。

EROD 活性値 (pmol/ mg protein/ min)

= 代謝物濃度(pmol/ well)/ well あたりタンパク質量(mg)/反応時間

TS6 β 水酸化活性値 (pmol/ mg protein/ hr)

= 代謝物濃度(pmol/ well)/ well あたりタンパク質量(mg)/ 反応時間

図に示す結果は、各濃度における活性を 0 μ M 被験物質をコントロール (100%) に基準をあらわし、平均土標準偏差で示した。群間の比較には、一元配置分散分析を行った後、ダネットの多重比較検定を行なった。 $p < 0.05$ のとき、統計学的に有意であると判定した。

第四節 結果

第一項 ラット初代培養肝細胞の CYP1A1/2 活性に及ぼす影響

CYP1A1/2 の活性は EROD 活性測定により決定した。4-MeMBI ($\geq 25 \mu\text{M}$) および 5-MeMBI ($\geq 100 \mu\text{M}$) のいずれにおいても、CYP1A1/2 活性の上昇が認められ、被験物質による誘導効果が示された (Fig. 4)。4-MeMBI は、 $200 \mu\text{M}$ で 12 倍の活性を示したが、 $400 \mu\text{M}$ では 10 倍の活性を示した (Fig. 4A)。5-MeMBI の活性は、4-MeMBI の半分程度だった (Fig. 4B)。4-MeMBI と 5-MeMBI で認められた誘導効果の差異は、この被験物質の CYP1A1/2 誘導活性がメチル基の位置に依存することを示した。MBI は CYP1A1/2 活性をわずかに低下させ弱い阻害効果を示した (Fig. 4C)。CYP1A の誘導剤である 3-MC では、濃度依存的な CYP1A1/2 活性の上昇が認められ、4-MeMBI および 5-MeMBI よりも高い活性値を示し、誘導活性の上限はさらに高いことが示唆された (Fig. 4D)。

第二項 ラット初代培養肝細胞の CYP3A2 活性に及ぼす影響

CYP3A2 の活性は TS6 β 水酸化活性の測定により決定した。既知の CYP3A2 誘導剤であるデキサメタゾンでは 48 時間処理では CYP3A2 活性に変化を及ぼさなかった一方で、96 時間処理で濃度依存的な CYP3A2 活性の誘導を示し、さらに

時間依存的誘導を示した (Fig. 5D)。4-MeMBI、5-MeMBI および MBI ($\geq 12.5 \mu\text{M}$) は CYP3A2 の阻害効果を示し、48 時間処理において CYP3A2 活性を濃度依存的に 50 %以上減少させたが、96 時間処理においては阻害の程度は小さくなり、48 時間処理と比較して誘導効果を示した (Fig. 5A、B、C)。

第三項 ヒト初代培養肝細胞の CYP1A1/2 活性に及ぼす影響

CYP1A1/2 活性は EROD 活性測定により決定した。4-MeMBI はドナーSau06 のみ 2 倍 ($200 \mu\text{M}$) の誘導が認められ (Fig. 6A)、5-MeMBI はドナーSau01 および Sau06 においてそれぞれ $400 \mu\text{M}$ および $\geq 100 \mu\text{M}$ で濃度依存的な誘導効果が認められ、ドナー間差を示した (Fig. 6B)。CYP1A1/2 の誘導剤である 3-メチルコラントレン (3-MC) およびオメプラゾール (Omeprazole) は濃度依存的な誘導効果を示し、それぞれドナーSau06 で 10-25 倍および Sau01 で 5-15 倍 ($\geq 0.2 \mu\text{M}$)、Sau06 で 4 倍および Sau01 で 25 倍 ($25 \mu\text{M}$) 活性が増加した (Fig. 6C, D)。

第四項 ヒト初代培養肝細胞の CYP3A4 活性に及ぼす影響

TS6 β 水酸化はラットでは CYP3A2 が触媒し、ヒトでは CYP3A4 が触媒することから、ヒト肝細胞での CYP3A4 活性は TS6 β 水酸化活性測定により決定した。4-MeMBI はドナーSau06 のみ CYP3A4 活性を約 4 倍に増加させ (75-100

μM 、48 時間)、その誘導性にドナー間差があることを示した (Fig. 7A)。5-MeMBI はドナーSau06 で 48 時間処理および 96 時間処理においてで活性が増加し、2.5 倍程度 ($\geq 25 \mu\text{M}$) から最大 3 倍程度 (50-200 μM) を示し、誘導効果が認められた。ドナーSau01 では 96 時間処理において 100 μM で誘導効果が認められた。これらの結果は CYP3A4 の誘導性および曝露時間依存性の効果にドナー間差があることを示唆した (Fig. 7A, B)。CYP3A4 の誘導剤であるリファンピシン (Rifampicin) では、ドナーSau01 でのみ CYP3A4 の活性増加が認められ、活性は 30 倍以上増加し、96 時間処理と比較して 48 時間処理でより高い誘導効果が認められた (Fig. 7C)。一方、ドナーSau06 においては被験物質が誘導効果を示したことは異なり、リファンピシンでは変化しなかった。

第五節 考察

ラット初代肝細胞では 4-MeMBI および 5-MeMBI による CYP1A1/2 の誘導を示し、4-MeMBI の誘導は 5-MeMBI よりも強かった。一方、MBI は CYP1A1/2 の誘導をわずかに阻害した。これらの結果は、被験物質を 8 日間経口投与したラット *in vivo* 誘導試験での EROD 活性測定とタンパク質の半定量解析により CYP1A1/2 の 4-MeMBI > 5-MeMBI の誘導効果を示すと同時に MBI では誘導効果を示さなかったという報告^[25]と一致した。ラットで報告されている MBI > 4(5)-MeMBI の急性毒性^[26]および MBI > 5-MeMBI > 4-MeMBI の甲状腺毒性は^[23]、本研究で示された肝細胞における 4-MeMBI および 5-MeMBI の CYP1A1/2 誘導効果による解毒効果の結果により強く支持され、4(5)-MeMBI の毒性に関する代謝的薬物間相互作用には、4-MeMBI および 5-MeMBI を代謝する CYP1A1/2 の 4-MeMBI による誘導が重要であると考えられた。さらに被験物質の詳細な性質として、4-MeMBI および 5-MeMBI は濃度依存的な CYP1A1/2 の誘導効果を示し、4-MeMBI では高濃度で誘導が弱まったことから、高濃度では解毒効果が減少することが考えられた。

被験物質による CYP3A2 活性に及ぼす影響については MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI のいずれの被験物質においても濃度依存的に活性阻害効果を示した。これは *in vivo* において 5-MeMBI がわずかに CYP3A2 タンパクの発現を誘導す

る^[25]という報告と異なる。この活性阻害効果は被験物質に共通していることから、被験物質の共通の構造によるものと考えられる。ラットにおいて MBI およびメチル化 MBI はいずれも脱硫酸化によって速やかに代謝されることが知られている^[23]。メチルパラチオンの脱硫酸化には CYP3A が関与し、CYP3A に付加物が認められており TS β 水酸化の活性阻害との関連性が示唆されている^[46]ため、タンパク質の発現と代謝活性が一致しなかったものと考えられた。また、被験物質による時間依存的な CYP3A2 の誘導は、速やかな脱硫酸化代謝によって阻害効果が抑制されたものと考えられた。MBI についてはタンパク質量の減少とともに活性も減少することから、遺伝子発現の阻害に関与し、4-MeMBI および 5-MeMBI よりも強い肝毒性を示したことが考えられた。

ヒト肝細胞における CYP1A1/2 の誘導は、ドナーSau06 では 200 μ M 4-MeMBI および濃度依存的な 5-MeMBI の誘導効果を示し、ラットと同様に CYP1A1/2 誘導による被験物質の代謝が促進される可能性を示した。一方、Sau01 では 400 μ M 5-MeMBI での誘導を示すにとどまり、ラットと比較して被験物質の誘導による解毒効果は弱い可能性を示した。ポジティブコントロールとして用いた 3-MC およびオメプラゾールは CYP1A1/2 の誘導剤として知られている。CYP1A1/2 の誘導は遺伝子レベルで調節され、AhR が中心的に働くとされており^{[47][48][49]}、3-MC は AhR のアゴニストとして直接働く一方で、オメプラゾールは間接的に働く^[50]。

ドナーSau06 では Sau01 においてよりも高く誘導され、一方、オメプラゾールによる CYP1A1/2 の誘導は Sau01 が Sau06 よりもより高く誘導されたことから、このような同一薬物代謝酵素における誘導経路に対する反応性の違いがドナー差となって現れたと考えられた。

CYP3A4 の誘導では、ドナーSau06 では 4-MeMBI および 5-MeMBI の誘導効果が認められ、4-MeMBI (150 μ M)における 48 時間曝露での CYP3A4 の急激な活性の減少は、この活性阻害による毒性を示す可能性がある。ポジティブコントロールとして用いた CYP3A4 の誘導剤であるリファンピシンは核内受容体 PXR に結合し、活性化された PXR は細胞質から核内に移動し二量体を形成して CYP3A4 を誘導することが知られている^[51]。Sau01 ではリファンピシンによる誘導を示した一方で SaU06 では誘導を示さなかった。従って、Sau01 および Sau06 の CYP3A4 を誘導する経路はそれぞれ異なり、これらドナー間差を示す要因の一つとして CYP3A4 の誘導経路の違いが考えられた。ヒト肝細胞では CYP3A4 の誘導を示した一方で、ラットの肝細胞では、4-MeMBI および 5-MeMBI は CYP3A2 の阻害を示したことから、種差によって被験物質の影響が異なることを明らかにした。ドナーSau01 では 5-MeMBI により CYP3A4 の誘導が認められたことから、ヒト肝細胞では被験物質の中心となる代謝産物、またはその CYP3A への影響がラットと異なると考えられた。これらのヒトにおける被験物質の誘導はラット

での誘導とは異なることから、ヒトにおいては4(5)-MeMBIの毒性に関する代謝的薬物間相互作用が起きる可能性は低いことが示唆された。

本研究で得られたラットおよびヒト初代培養肝細胞を用いた被験物質のCYPsの誘導および阻害効果は、CYPの誘導が被験物質の毒性に大きく関わる一方で、同一被験物質において、用いる誘導試験により得られる結果が異なること、ラットとヒトとで結果が異なること、さらにドナー間で結果が異なることが示されること、それぞれが毒性評価に影響を与えることが示されたことからCYPの誘導試験においてはラットおよびヒト肝細胞の両方を用いることが有用であることが示された。

第六節 小活

ラット初代培養肝細胞およびヒト初代培養肝細胞を用いて、被験物質による CYPs の誘導を調べ以下のことについて明らかにした。

1. ラット肝細胞では、4-MeMBI は CYP1A1/2 を強く誘導し、4-MeMBI および 5-MeMBI は CYP3A2 を阻害した。
2. MBI は CYP3A2 を強く阻害し、CYP1A1/2 を弱く阻害した。
3. これらの結果は、既報の *in vivo* の試験結果とは矛盾が認められず、4(5)-MeMBI の毒性に関する代謝的薬物間相互作用には、4-MeMBI および 5-MeMBI を代謝する CYP1A1/2 の 4-MeMBI による誘導が重要であると考えられた。
4. ヒト肝細胞では、ドナーに依存して、4-MeMBI および 5-MeMBI による CYP1A および CYP3A4 の弱い誘導が認められた。
5. この結果から、ヒトにおいては 4(5)-MeMBI の毒性に関する代謝的薬物間相互作用が起きる可能性は低いことが示唆された。

本章は下記の論文に発表した。

Atsuko Miyajima *, Yukie Kuroda *, Kazue Sakemi-Hoshikawa, Makoto Usami, Katsuyoshi Mitsunaga, Tomohiko Irie, Yasuo Ohno, Momoko Sunouchi. Inhibitory and

inductive effects of 4- or 5-methyl-2-mercaptobenzimidazole, thyrotoxic and hepatotoxic rubber antioxidants, on several forms of cytochrome P450 in primary cultured rat and human hepatocytes. *Toxicology reports*, 7, (2020): 979-985.

* These authors equally contributed to this work.

第四章

4-メチルおよび 5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾールのラットの

反復経口投与後の肝臓における CYPs mRNA 発現誘導

第一節 概要

4-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (4-MeMBI) および 5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (5-MeMBI) はチトクローム P450 (CYP) 分子種を誘導し、それぞれの代謝について CYP の相互作用による解毒作用が示唆されている^{[25][41][42]}。CYP の誘導は核内受容体によって遺伝子レベルで制御されているが、4-MeMBI および 5-MeMBI による CYP の誘導は遺伝子レベルで明らかにされていない。

本研究では、8 日間被験物質を反復経口投与したラットの凍結肝細胞を用いて、Competitive RT-PCR 法により、CYPs の 9 分子種について mRNA 発現を半定量し、4-MeMBI および 5-MeMBI の CYPs の誘導について遺伝子レベルで評価した。コントロール群と比較して、4-および 5-MeMBI のいずれにおいても CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP2C11、CYP2E1、CYP3A2 の mRNA 発現量は上昇した。このことから、これらの CYPs の誘導は遺伝子発現レベルで制御されていることを示した。

第二節 背景

MBI はゴム老化防止剤または金属メッキ剤として広く用いられており、そのメチル化誘導体である 4-MeMBI および 5-MeMBI の 1:1 の混合物である 4(5)-MeMBI も同様に工業的に広く用いられており、工業製品製造工程における排出物が人体に及ぼす影響が懸念されている。これまでの研究において、MBI は強い甲状腺毒性と肝毒性を示し、比較してメチル化 MBI は甲状腺毒性と弱い肝毒性を示すことが報告されている^{[28][25]}。メチル化 MBI の示す弱い肝毒性は 4-MeMBI による薬物代謝酵素 CYP1A1/2 の誘導および 5-MeMBI による CYP2B1/2 の誘導によるものであることが示唆されている^{[25][42]}。本研究ではこれらの薬物代謝酵素の誘導に関して mRNA の発現を検討した。

第三節 実験材料と方法

ウイスターラット (雄、4 週齢、日本エスエルシー株式会社、静岡)に 4-MeMBI (0.6 mmol/ kg / day)、5-MeMBI (0.6 mmol/ kg / day) をコーン油に溶解して投与量を 0.5 ml / kg / day とし、連続 8 日間強制経口投与した。投与量と投与期間は、以前の研究に基づいて選択された^[25]。二段階コラゲナーゼ法によって肝細胞を単離し凍結したサンプルを RNeasy Mini Kit (QIAGEN、Venlo、Netherlands)を用いてマニュアルに従って総 RNA を抽出し、精製した。TaKaRa RNA LA PCR Kit (AMV) ver1.1 (宝酒造、京都、日本) および Rat Cytochrome P450 Competitive RT-PCR Set (宝酒造、京都、日本) を用いてマニュアルに従って RNA 逆転写反応および PCR 反応を行ない、Competitive RT-PCR 法により CYP の 9 分子種 (CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP2C11、CYP2E1、CYP3A1、CYP3A2、CYP4A1) の遺伝子 mRNA 発現を半定量的に決定した。CYP2B1 および CYP2B2 の分別定量には制限酵素 Mun I (宝酒造、京都、日本) を用いた。なお特許の関係上プライマー配列は明らかにされていない。すべての動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物使用に関するガイドラインに従って実施された。

第四節 結果と考察

本研究において 4-および 5-MeMBI のいずれにおいても CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP2C11、CYP2E1、CYP3A2 の mRNA 発現量が上昇した。特に CYP1A2 は 4-MeMBI で 32 倍の上昇を示し、5-MeMBI の 4 倍より大きかった (Table 1、Fig. 8)。これは被験物質をラットに経口反復投与した際に誘導した EROD 活性結果とラット肝細胞を用いた誘導試験の結果が 4-MeMBI > 5-MeMBI であったという報告^{[25][42]}と一致し、被験物質が誘導する分子種が CYP1A2 であることを特定した。CYP2B1 および CYP2B2 の mRNA 発現の程度は 5-MeMBI > 4-MeMBI であり、前述した被験物質のラットの *in vivo* および *in vitro* 誘導試験の結果である 5-MeMBI > 4-MeMBI の誘導効果^{[25][41]}と一致するとともに、CYP1A2 活性の上昇と同じく CYP2B1 および CYP2B2 活性の上昇も遺伝子発現を伴うことを示した。

CYP2C11、CYP2E1 および CYP3A2 の mRNA 発現は 4-MeMBI と 5-MeMBI において同程度の増加を示した。しかしながら、これらの CYP においてラットの *in vivo* 誘導試験結果では CYP3A2 のタンパク質発現が 5-MeMBI によって誘導される他は被験物質によるこれら CYPs のタンパク質発現は同じか減少することが報告されており^[25]、遺伝子発現とは一致しなかった。

本研究結果は 4-MeMBI および 5-MeMBI による CYP1A2 および CYP2B1/2 誘

導が遺伝子レベルで発現が制御されていることを示し、これらによってラット *in vivo* 毒性試験において MBI が肝毒性を示した一方で、4(5)-MeMBI が弱い肝毒性を示したものと考えられた。

第五節 小括

Competitive RT-PCR 法を用いて mRNA の量的変化により CYP 誘導効果を調べ以下のことを明らかにした。

1. 4-MeMBI および 5-MeMBI は CYPs 1A2、2B2、2C11、2E1 および 3A2 の mRNA 発現を誘導した。
2. 特に CYP1A2 の誘導が大きく、4-MeMBI による誘導量は 5-MeMBI による誘導量の 8 倍高かった。
3. 逆に、CYP2B2 の誘導量は、5-MeMBI が 4-MeMBI の 2 倍高かった。
4. これらの結果から、*in vivo* 試験および *in vitro* 試験における、CYP の活性増加は、mRNA のレベルでの発現増加によると考えられた。

本章は下記の web 上に公開されている。

Yukie Kuroda*, Atsuko Miyajima*, Kazue Sakemi-Hoshikawa, Makoto Usami, Katsuyoshi Mitsunaga, Yasuo Ohno, and Momoko Sunouchi. Inducibility of cytochrome P450 (CYP) mRNAs by 4- or 5-methyl-2-mercaptobenzimidazole in the rat liver after repeated oral administration. *ResearchGate*, (2020).

<http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.13690.93122/3>

* These authors equally contributed to this work.

総合考察

MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI はイミダゾール環とチオウレリン構造を共通の構造として持ち、構造的によく似た化合物である。しかしながら、ラット *in vivo* 毒性試験において MBI は肝毒性を示す一方で、MBI のメチル誘導体である 4-MeMBI および 5-MeMBI を 1:1 で混合した 4(5)-MeMBI は弱い肝毒性を示すことが報告されている^{[22][25]}。本研究では、この毒性の違いについて薬物代謝酵素 CYP が深く関与していると考え、被験物質の代謝との関係について細胞毒性を検討した。次に被験物質の CYP による代謝と CYP の誘導との関係について明らかにするためにラット肝マイクロゾームを用いて検討を行った。特に毒性に影響を及ぼすと考えられる CYPs 分子種 CYP1A1/2 および CYP3A の誘導について肝細胞を用いて検討するとともに、ラットおよびヒト初代肝細胞を用いて被験物質の CYP の誘導について毒性学的に比較検討した。最後に CYP の誘導について遺伝子発現について検討を行なった。

第一章では、ウサギ角膜由来細胞株 SIRC 細胞を用いて MBI、4-MeMBI、5-MeMBI および 4(5)-MeMBI の細胞毒性を調査した。メチル化 MBI は MBI と比較して高い細胞毒性を示した。これはラット *in vivo* 試験で報告された MBI の高い甲状腺毒性および肝毒性とは逆の結果だった。LC₅₀ の結果からそれぞれの

化合物の細胞毒性の強度は 5-MeMBI (761.5 μM) \geq 4-MeMBI (796.3 μM) \geq 4(5)-MeMBI (822.9 μM) $>$ MBI (1002.9 μM) であることを示した。このメチル化 MBI が類似した細胞毒性を示し、MBI よりも強い細胞毒性を示した結果は、ベンゼン環にメチル基が存在すると MBI 誘導体の細胞毒性が高まることを示唆しており、SIRC 細胞は薬物代謝酵素活性が低いことから、メチル化 MBI の *in vivo* における低い甲状腺毒性および肝毒性は、薬物代謝酵素の誘導によるものであるという仮説を支持した。

第二章では、ラット肝マイクロゾームを用いて MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI の経時的代謝、非選択的 CYP 阻害剤 SKF-525A 処理による被験物質の代謝、 β -ナフトフラボン、フェノバルビタールおよびイソニアジドでの CYPs 誘導剤処理マイクロゾームにおける被験物質の代謝を調べた。被験物質のいずれも CYP 依存的に代謝され、CYPs 誘導肝マイクロゾームでは被験物質の代謝が促進されることを示した。特に β -ナフトフラボンによる CYP1A 誘導、フェノバルビタールによる CYP2B または CYP3A の誘導は 4-MeMBI を著しく代謝した。これにより、4(5)-MeMBI の 5-MeMBI 単独より弱い毒性^[23]は CYP1A、CYP2B または CYP3A が関与し、*in vivo* 誘導試験により報告された CYP1A および CYP2B の誘導^[25]により 4-MeMBI の解毒が促進されたものと考えられた。

第三章では、第二章で 4-MeMBI および 5-MeMBI の代謝に CYP1A1、CYP2B

または CYP3A が強く影響することが示唆されたことから、ラットおよびヒト初代肝細胞を用いて CYP1A1/2 および CYP3A2 またはヒトのアイソフォームである CYP3A4 の 4-MeMBI および 5-MeMBI による誘導について検討した。被験物質曝露量については、ラットで甲状腺毒性と肝毒性を示した被験物質投与量 0.3-0.6 mmol/ kg^[25]を参考値としている。これは、60 kg の成人に対して 2.7 g の曝露量に相当し、ゴム老化防止剤として MBI または 4(5)-MeMBI が使用される場合は、ゴム 100 g に対して MBI は 0.5-2 g の使用量となり (https://www.jp-noc.co.jp/rubber_chemicals/antioxidant_mb.html、https://www.jp-noc.co.jp/rubber_chemicals/antioxidant_mmb.html)、工業製品として製造される場面ではヒトが曝露され得る量であると考えられる。ラットが毒性を示した血清中濃度は MBI では約 113 μ M が最大値であり、4-MeMBI では約 36 μ M が最大値である^[23]。従って本研究に用いた被験物質濃度はラット *in vivo* で毒性を示す濃度を含み、細胞毒性を示さない濃度の範囲での検討となっている。

結果は、ラットおよびヒトにおいて被験物質 100 μ M 以下の低濃度で CYP1A1/2、CYP3A2 または CYP3A4 の誘導が認められた。ラットにおいては被験物質の濃度依存的な CYP1A1/2 の誘導効果を示し、CYP3A2 の阻害効果を示した。CYP1A1/2 については、反復投与試験において報告されている薬物代謝酵素の誘導試験と同様の結果を示した一方で、CYP3A2 は異なる結果を示した^[25]。こ

の CYP3A2 の阻害は、被験物質の脱硫酸化による速やかな代謝^[23]と被験物質の持つチオール基が TS β 水酸化の活性阻害と関連する^[46]ためと考えられた。これらの結果から、4(5)-MeMBI の毒性に関する代謝的薬物間相互作用には、4-MeMBI および 5-MeMBI を代謝する CYP1A1/2 の 4-MeMBI による誘導が重要であると考えられた。ヒト初代肝細胞においては、CYP1A1/2 および CYP3A4 のいずれにおいても、ラットで誘導を示す範囲内での曝露量で濃度依存的な誘導を示した。CYP1A1/2 の誘導が影響すると考えられるもののラットで示唆された被験物質の誘導による解毒効果は弱いものと考えられた。ラットとヒトでは被験物質の CYPs 誘導は異なる結果を示し、さらにヒトにおける CYP1A1/2 および CYP3A4 の誘導効果はドナー依存的であり CYP の誘導経路の違いがドナー間差となっていることを示唆した。種差およびドナー間差が CYPs の誘導に大きく影響することを示した。被験物質の *in vitro* の肝代謝は *in vitro* 肝代謝^[25]と同等の結果を示しており、このことは *in vivo* の肝代謝試験は *in vitro* に置き換えが可能であることを示している。ラット肝細胞とヒト肝細胞を用いた代謝試験での異なる結果は、ヒトへの健康被害予測として薬物代謝酵素の代謝試験はヒト肝細胞を用いることが推奨される。しかしながら、本研究結果が示すようにヒトでは CYP の発現と代謝に個人差があること、ドナー資源に限りがあることからすべての化学物質に対して同一条件下で試験をすることはできないため毒性評価のための

継続的なデータの取得が難しい。一方で、系統化されているラットは同条件下での試験が可能であり、繰り返しの試験に適しているため、ヒトの毒性予測においては、ラットとヒトの両方を補完的に併用することがヒトへの健康被害予測の精度を高めることになると考えられた。

第四章では、Competitive RT-PCR 法を用いて 被験物質による CYP の誘導について mRNA の半定量的遺伝子発現解析を行った。4-MeMBI および 5-MeMBI は CYP1A2、CYP2B2、CYP2C11、CYP2E1 および CYP3A2 の遺伝子発現を誘導した。特に CYP1A2 の誘導が大きく、4-MeMBI による誘導量は 5-MeMBI による誘導量の 8 倍高かった。逆に、CYP2B2 の誘導量は、5-MeMBI が 4-MeMBI の 2 倍高かった。これらの結果から、*in vivo* 試験^[25]および *in vitro* 試験^[42]における、CYP の活性増加は、mRNA のレベルでの発現誘導によると考えられた。

以上の結果は、4-MeMBI および 5-MeMBI は、混合物 4(5)-MeMBI として用いられた場合に、肝 CYP の発現誘導により、お互いの代謝を促進することにより、甲状腺毒性および肝毒性を弱める、という代謝的薬物間相互作用を起こすと考えられ、強い毒性を持つ化学物質を混合物として用いた場合には、代謝的薬物間相互作用により毒性を弱める、という有用な現象を *in vitro* 試験系によって明らかにした。

国際的なガイドライン ICH に定められる安全性薬理試験^[52]およびトキシコキ

ネティクス^[53]においては *in vitro* 試験は毒性試験において補助的な位置にある。しかしながら、本研究において *in vitro* 試験は被験物質の毒性について詳細な作用機序を示すことができた。さらに、ヒト肝細胞を用いた誘導試験ではラットで得られた薬物代謝酵素の誘導試験と異なる結果を示し、動物試験の結果はヒトを対象とする試験の結果とほとんど一致しないとされている^[54]ため、毒性評価におけるヒト由来の材料を用いた *in vitro* 試験系の重要性を示した。分子生物学的手法を用いた *in vitro* 試験系により化学物質の詳細な毒性が明らかになり、創薬現場における安全性や効率性は格段に向上している。今後は更なる *in vitro* 試験系の発展として複数のアッセイが可能な機能的な細胞であるオルガノイド^{[55][56]}や臓器間のクロストークを再現するマイクロ流体デバイス^[57]などの開発で、種差によりふるい落とされた化合物の再評価やバイオ医薬品といった新しい化合物への毒性評価へ活用される事に加えて、動物愛護の観点からも動物実験の削減効果が期待される。

総括

SIRC 細胞を用いた細胞毒性試験では、MBI、4-MeMBI、5-MeMBI および 4(5)-MeMBI について以下のことが明らかになった。

1. LC_{50} の値から、被験物質の細胞毒性の強度は、 $5\text{-MeMBI} \geq 4\text{-MeMBI} \geq 4(5)\text{-MeMBI} > \text{MBI}$ であることを示した。
2. メチル化 MBI が類似した細胞毒性を示し、MBI よりも強い細胞毒性を示した結果は、ベンゼン環にメチル基が存在すると MBI 誘導体の細胞毒性が高まることを示唆している。
3. SIRC 細胞の薬物代謝酵素活性が低いことから、メチル化 MBI の *in vivo* における低い甲状腺毒性および肝毒性は薬物代謝酵素の誘導によるものであるという仮説を支持している。

ラットを用いた *in vitro* 誘導試験では 4-MeMBI および 5-MeMBI の毒性について以下のことが明らかになった。

1. ラット肝ミクロゾームにおいて MBI、4-MeMBI および 5-MeMBI は時間依存的に CYP によって代謝され、4-MeMBI および 5-MeMBI の代謝には、CYPs 1A および 2B が関与し、いずれも CYP2B により依存的であった。
2. ラット肝細胞では、4-MeMBI および 5-MeMBI は CYP3A2 を阻害したが、

4-MeMBI が CYP1A1/2 を強く誘導した。

3. Competitive RT-PCR 法を用いた mRNA 発現解析では、4-MeMBI および 5-MeMBI は CYPs 1A2、2B2、2C11、2E1 および 3A2 の mRNA 発現を誘導し、特に CYP1A2 の誘導が大きく、4-MeMBI による誘導量は 5-MeMBI による誘導量の 8 倍高く、逆に、CYP2B2 の誘導量は、5-MeMBI が 4-MeMBI の 2 倍高かった。
4. これらの結果から、既報の *in vivo* 試験および *in vitro* 試験における、CYP の活性増加およびタンパク質発現は、mRNA のレベルでの発現誘導によると考えられた。
5. 本結果と既報の *in vivo* 試験の結果から、4(5)-MeMBI の代謝においては、4-MeMBI により誘導された CYP1A および 5-MeMBI により誘導された CYP2B により、5-MeMBI および 4-MeMBI のそれぞれが効率的に代謝される、代謝的薬物間相互作用が示唆されると同時に、4(5)-MeMBI の毒性に関する代謝的薬物間相互作用には、4-MeMBI および 5-MeMBI を代謝する CYP1A1/2 の 4-MeMBI による誘導が重要であると考えられた。

ヒト材料を用いた *in vitro* 誘導試験では被験物質の毒性について以下のことが明らかになった。

1. ヒト肝細胞では、ドナーに依存して、4-MeMBI および 5-MeMBI による CYP1A および CYP3A4 の弱い誘導が認められた。この結果から、ヒトにおいては 4(5)-MeMBI の毒性に関する代謝的薬物間相互作用が起きる可能性は低いことが示唆された。
2. CYP の誘導は被験物質の毒性に大きく関わる一方で、同一被験物質においてタンパク質発現やCYPsの活性測定などを用いた誘導試験により結果が異なり、ラットとヒトとで同一試験で結果が異なり、さらにドナー間で結果が異なり、このそれぞれが毒性評価に影響を与えることが示されたことから、被験物質の誘導について *in vitro* 試験系を用いて評価するには本研究で示した測定項目を組み合わせること、種差およびドナー間差を考慮することや、ヒト由来材料を活用することが重要であると考えられた。

以上の *in vitro* 試験系によって、4-MeMBI および 5-MeMBI は、4(5)-MeMBI として用いられた場合において、肝 CYP の発現誘導により、お互いの代謝を促進することにより、甲状腺毒性および肝毒性を弱める、という代謝的薬物間相互作用を明らかにした。これは、強い毒性を持つ化学物質を混合物として用いた場合には、代謝的薬物間相互作用により毒性を弱める、という有用な現象である。

本論文の一部は以下に公表した。

- Yukie Kuroda*, Atsuko Miyajima*, Kazue Sakemi-Hoshikawa,
Makoto Usami, Katsuyoshi Mitsunaga, Yasuo Ohno, Momoko Sunouchi.
In vitro cytotoxicity of the thyrotoxic and hepatotoxic rubber antioxidant 2-
mercaptobenzimidazole and its 4- or 5-methyl derivatives in rabbit corneal
cells. *Fundamental Toxicological Sciences*, 7.6, (2020): 249-252.

* These authors equally contributed to this work.
- Atsuko Miyajima *, Yukie Kuroda *, Kazue Sakemi-Hoshikawa,
Makoto Usami, Mitsunaga Katsuyoshi, Tomohiko Irie, Yasuo Ohno,
Momoko Sunouchi. *In vitro* metabolism of 4-methyl-and 5-methyl-2-
mercaptobenzimidazole, thyrotoxic and hepatotoxic rubber antioxidants, in
rat liver microsomes. *Fundamental Toxicological Sciences*, 5.3, (2018): 113-
116. * These authors equally contributed to this work.
- Atsuko Miyajima *, Yukie Kuroda *, Kazue Sakemi-Hoshikawa,
Makoto Usami, Katsuyoshi Mitsunaga, Tomohiko Irie, Yasuo Ohno,

Momoko Sunouchi. Inhibitory and inductive effects of 4- or 5-methyl-2-mercaptobenzimidazole, thyrotoxic and hepatotoxic rubber antioxidants, on several forms of cytochrome P450 in primary cultured rat and human hepatocytes. *Toxicology reports*, 7, (2020): 979-985. * These authors equally contributed to this work.

- Yukie Kuroda*, Atsuko Miyajima*, Kazue Sakemi-Hoshikawa, Makoto Usami, Katsuyoshi Mitsunaga, Yasuo Ohno, and Momoko Sunouchi. Inducibility of cytochrome P450 (CYP) mRNAs by 4- or 5-methyl-2-mercaptobenzimidazole in the rat liver after repeated oral administration. *ResearchGate*, (2020). <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.13690.93122/3>

* These authors equally contributed to this work.

図表

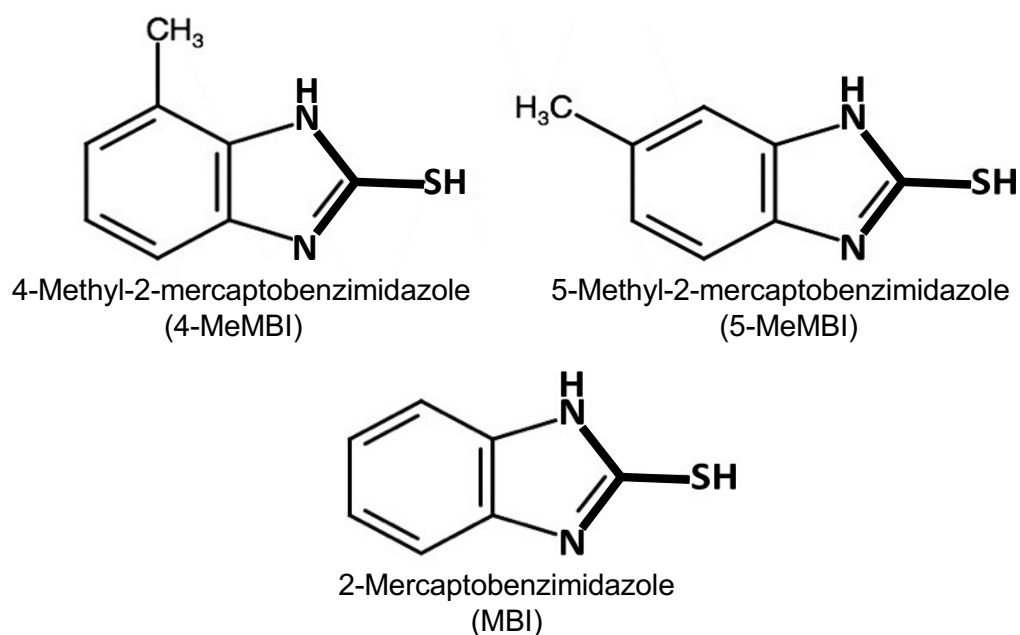


Fig. 1 4-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (4-MeMBI)、5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール (5-MeMBI) および 2-メルカプトベンズイミダゾール (MBI) の構造。4(5)-メチルメルカプトベンズイミダゾールの構造は 4-MeMBI と 5-MeMBI の 1:1 混合物であるためここでは示さない。チオウレリン構造は太線で強調している。部分的に Marvin JS [Marvin JS (19.11.0), 2019, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)] を用いて化学構造式を描画した。

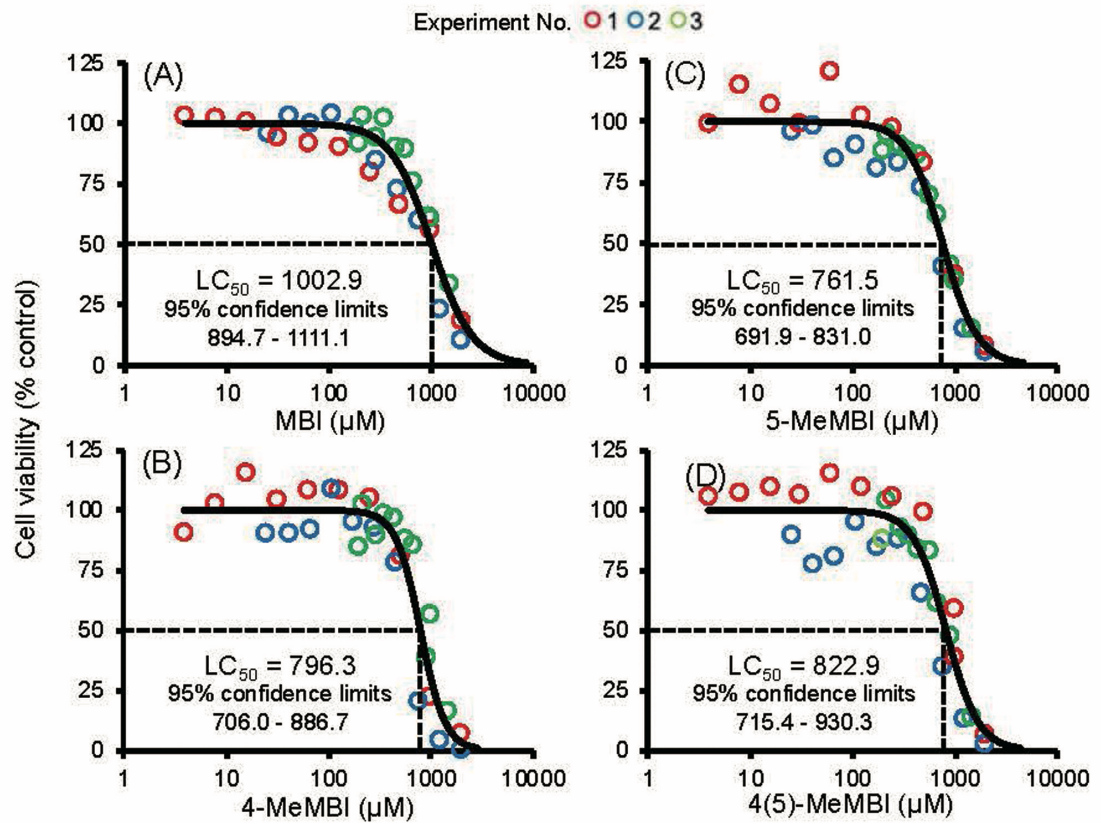


Fig.2 SIRC 細胞における MBI、4-MeMBI、5-MeMBI および 4(5)-MBI の細胞毒性。SIRC 細胞を 72 時間被験物質存在下で培養し、細胞生存率をクリスタル・バイオレット染色性試験により決定した。データは 3 回の実験を標準化したのち結合した。実験データの点(白抜き丸) は n=3 または n=4 のデータの平均を示し、3 回それぞれで異なる色で示した。半数致死濃度(LC₅₀) は 95%信頼区間において log-long curve fitting によって示した。

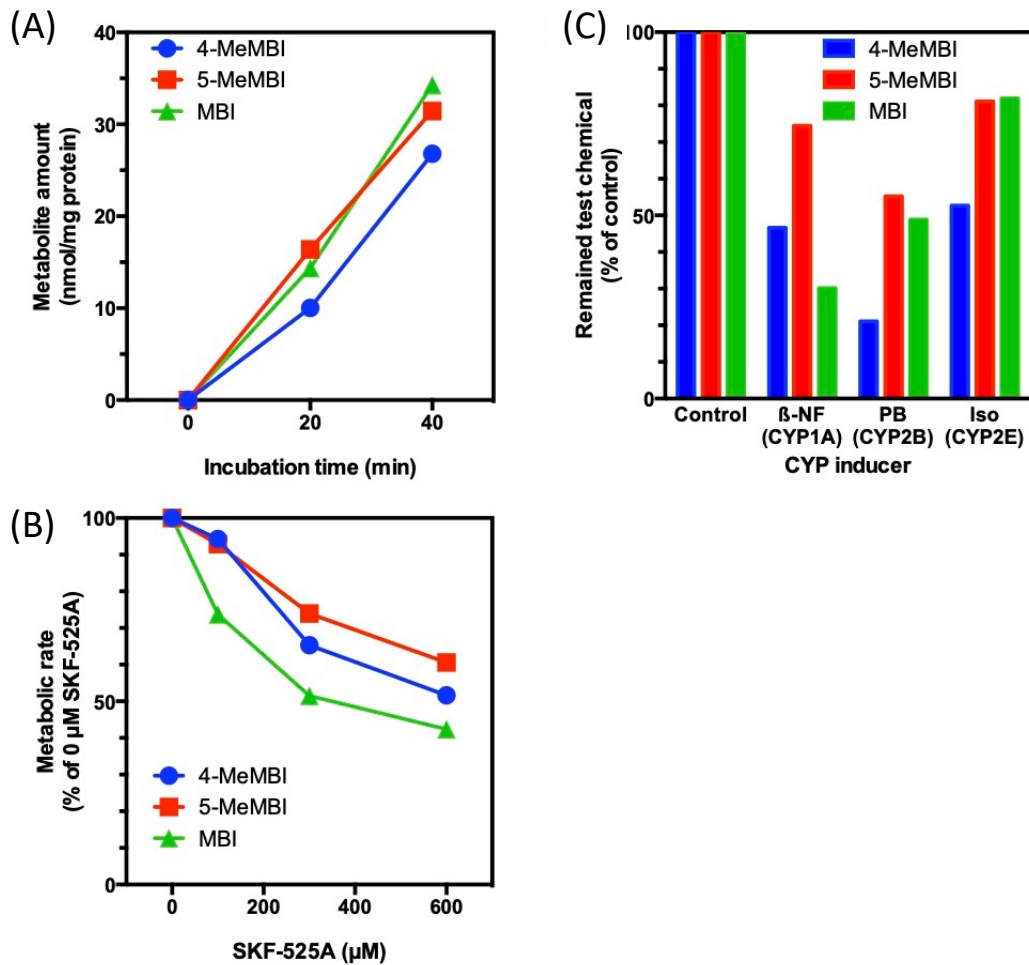


Fig. 3 ラット肝ミクロゾームにおける 4-MeMBI、5-MeMBI および MBI の代謝。(A) 被験物質の代謝の経時的変化。代謝物量は被験物質の HPLC のピークエリアにおける減少値を肝ミクロゾームタンパク質で補正し、算出した。(B) 非選択的 CYP 阻害剤 SKF-525A による被験物質代謝への影響。代謝率は被験物質の HPLC のピークエリアでの減少値から算出し、SKF-525A (0 μ M) 処理群を 100% として示した。2 回の解析による平均値で示した。(C) CYP 誘導剤処理後のラットより調製した肝ミクロゾームの CYP 代謝。CYP1A 誘導剤: β -ナフトフラボン (β -NF)、CYP2B および CYP3A 誘導剤: フェノバルビタール (PB)、CYP2E 誘導剤: イソニアジド (Iso)。被験物質の残存化合物は被験物質の HPLC のピークエリアから算出した。コントロール群の未処理ラットから得た肝ミクロゾームの値を 100% とした。反応混合物は 20 分間インキュベートし 2 回の解析の平均値により求めた。

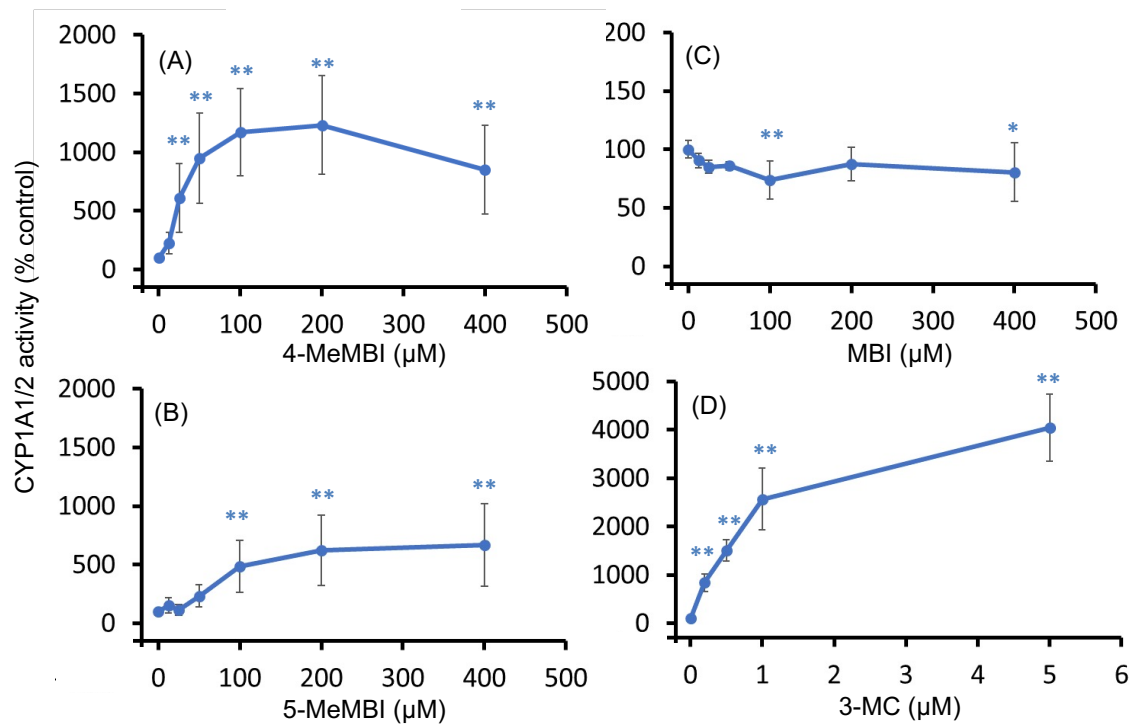


Fig. 4 ラット初代培養肝細胞の CYP1A1/2 活性における 4-MeMBI または 5-MeMBI の影響。被験物質存在下でラット肝細胞を 48 時間培養した。CYP1A1/2 活性は HPLC 法を用いて 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化 (EROD) 活性によって決定した。データは 3 回の解析結果をそれぞれ標準化し、平均±標準偏差 (n=3-18) で示した。Control (0 μM) における平均活性は 1.97 pmol/ 10⁶ cells/min だった。

: Control (0 μM) に対する有意差を示す(, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$) 。

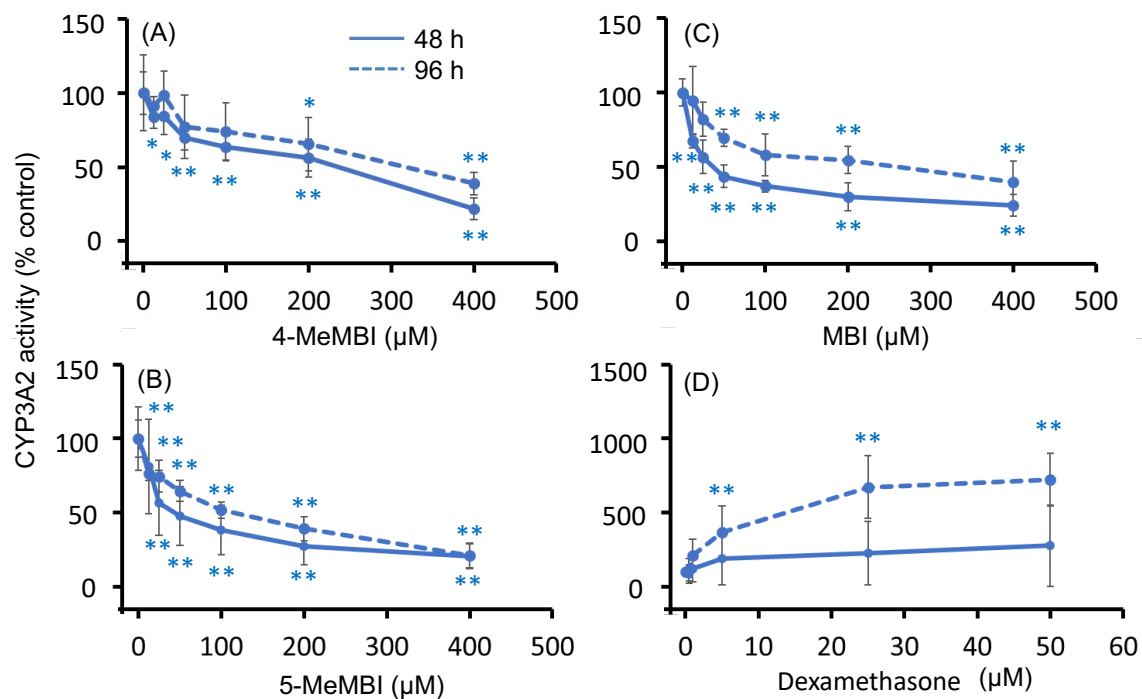


Fig. 5 ラット初代培養肝細胞のCYP3A2活性における4-MeMBIまたは5-MeMBIの影響。被験物質存在下で48時間(実線)または96時間(破線)、ラット肝細胞を培養した。肝細胞のCYP3A2活性はHPLC法を用いてテストステロン6 β 水酸化(TS6 β H)活性によって決定した。データは3回の解析結果それぞれを標準化し、平均値 \pm 標準偏差(n=3-12)で示した。Control(0 μ M)における平均活性は16.04 pmol/10⁶ cells/minだった。

: Control(0 μ M)に対する有意差を示す(, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。

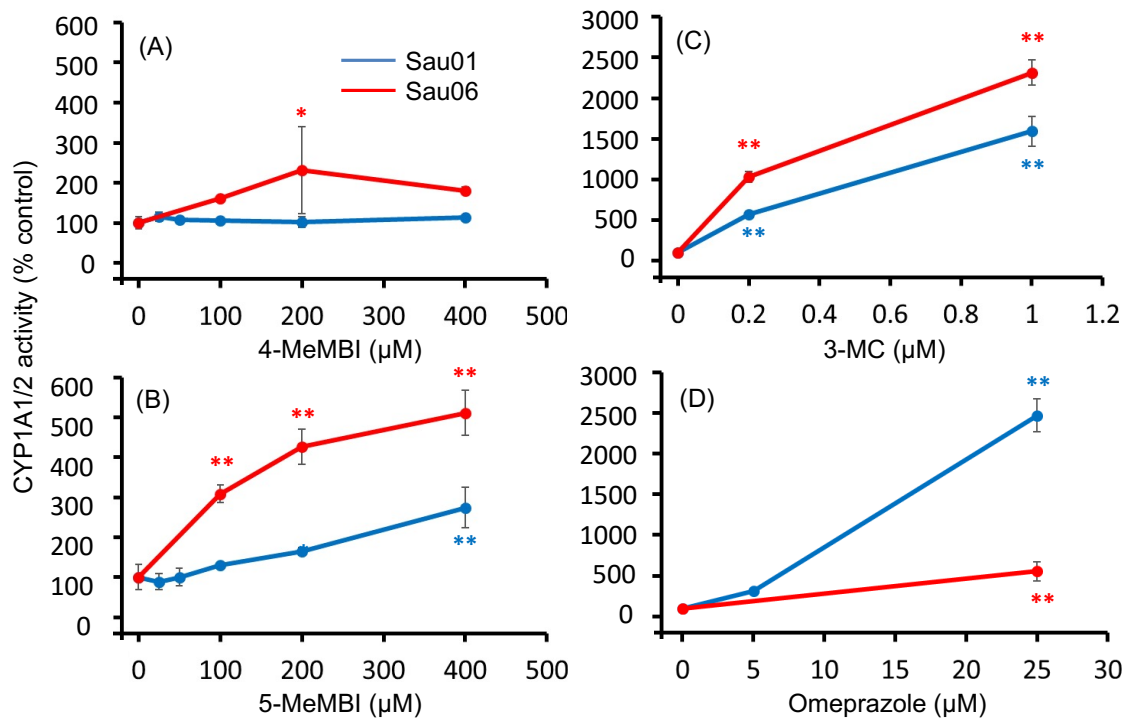


Fig. 6 ヒト初代培養肝細胞の CYP1A1/2 における 4 または 5-MeMBI の影響。ヒト初代培養肝細胞は白人のドナー (Sau01 は 17 才、男性、喫煙歴あり、青線；Sau06 は 17 才、女性、喫煙歴なし、赤線) によるもので、被験物質存在下で 48 または 96 時間培養した。CYP1A1/2 活性は HPLC 法を用いて 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化 (EROD) 活性によって決定した。平均値±標準偏差 (n=3)。Control (0 μM) の平均の活性は 0.06 pmol/ 10⁶ cells/ min だった。
: Control (0 μM) に対する有意差を示す (, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。

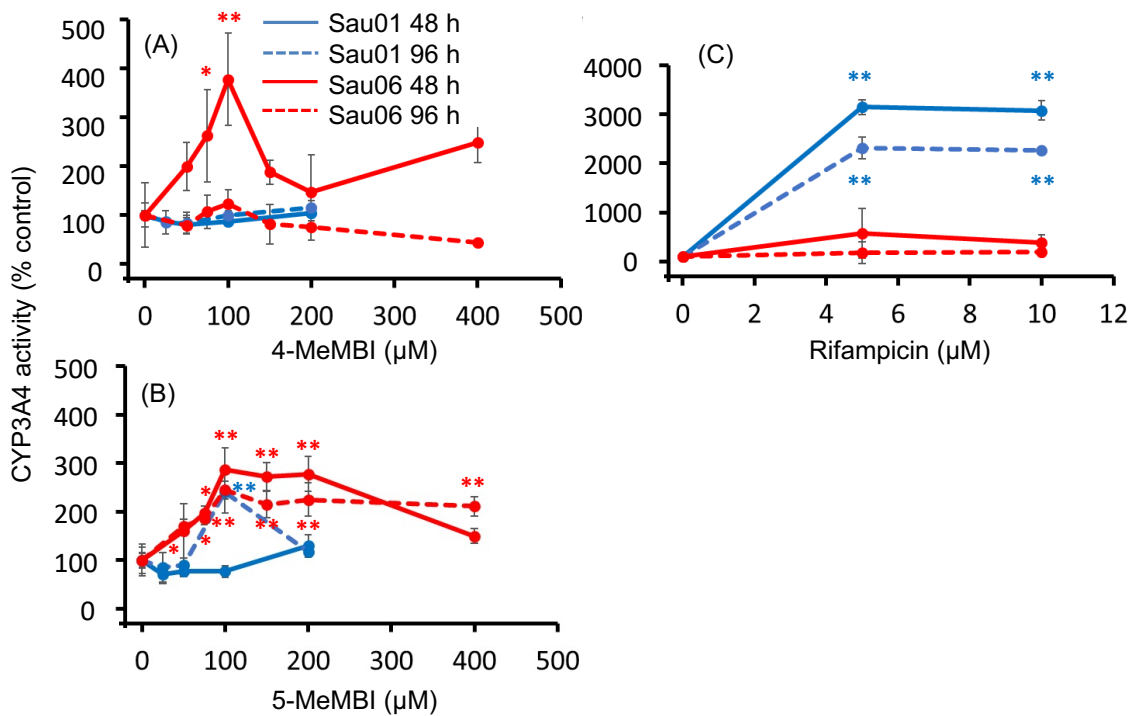


Fig. 7 ヒト初代培養肝細胞の CYP3A4 における 4 または 5-MeMBI の影響。ヒト初代培養肝細胞は白人ドナー (Sau01 は 17 才、男性、喫煙歴あり、青線 ; Sau06 は 17 才、女性、喫煙歴なし。赤線) 由来であり、被験物質存在下で 48 または 96 時間培養した。肝細胞の CYP3A4 活性は HPLC 法を用いてテストステロン 6β 水酸化 (TS6βH) 活性によって決定した。細胞資源の希少性から Sau01 の 400 μM での測定は実施しなかった。平均値±標準偏差 (n=3) で示した。Control (0 μM) の平均の活性は 6.32 pmol/ 10⁶ cells/ min だった。

: Control (0 μM)に対する有意差を示す (, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。

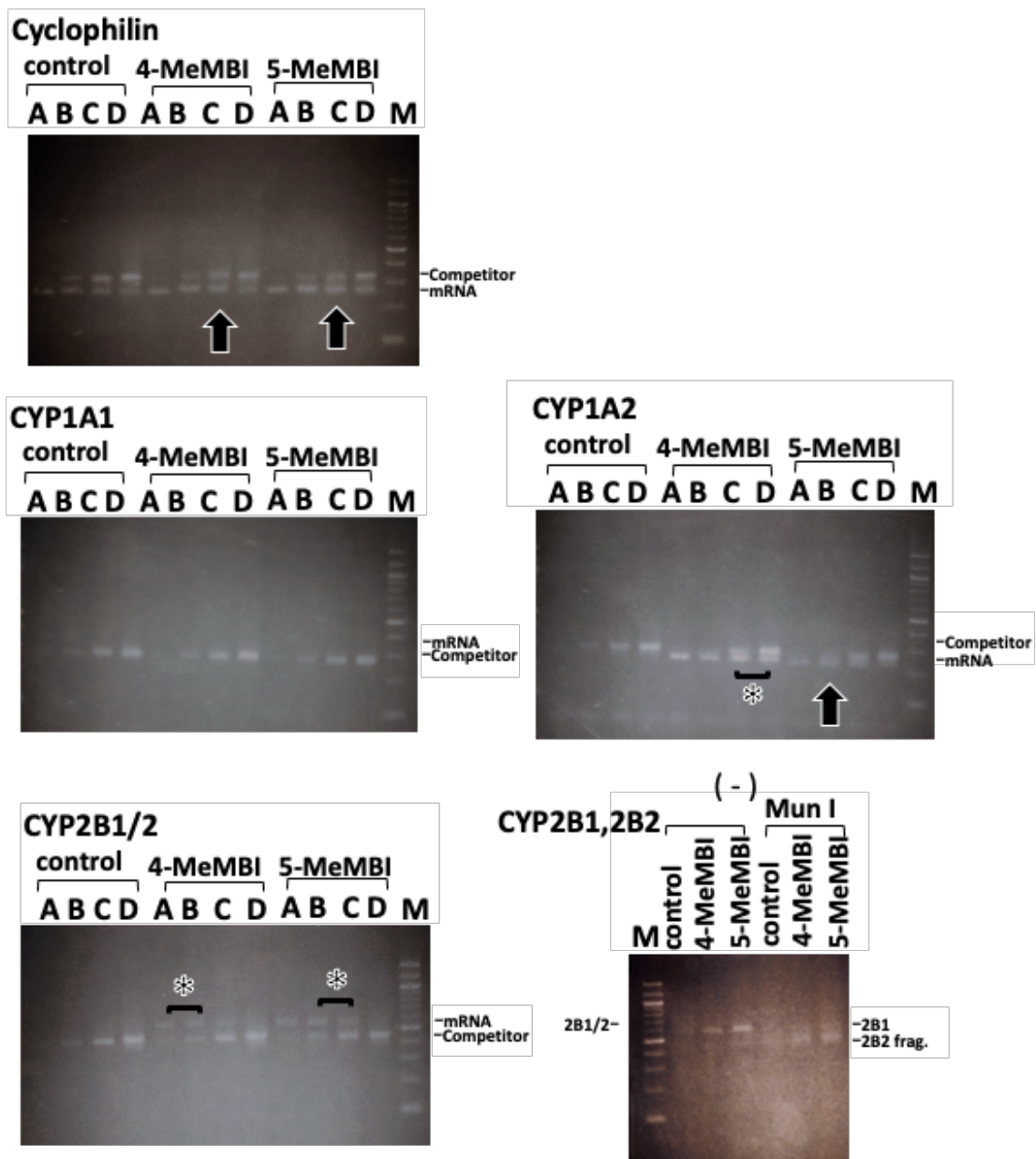


Fig. 8 代表的な CYPs mRNA の RT-PCR 産物電気泳動画像。A-D は 4 段階の連続希釈を示す。M は DNA ラダーマーカを示す。矢印は希釈した Competitive RNA と試験 RNA のバンドの強度が同程度のものを示す。*印は希釈列中間値のバンドの強度となることを指し示している。Mun I 処理は CYP2B1 と 2B2 をそれぞれのフラグメントで区別する。4-MMBI と 5-MMBI はそれぞれ 4-MeMBI と 5-MeMBI を示す。Cyclophilin はクオリティコントロールに用いた。

Table 1 4-MeMBI または 5-MeMBI を反復経口投与したラット肝における CYP mRNA 量

CYP species	mRNA (10^5 copies/ng total RNA)				
	Control	4-MeMBI		5-MeMBI	
CYP1A1	<1	<1	[n.a.]	<1	[n.a.]
CYP1A2	<1	32	[>32]	4	[>4]
CYP2B1	<1	0.3	[>0.3]	0.6	[>0.6]
CYP2B2	<1	1.7	[>1.7]	3.4	[>3.4]
CYP2C11	16	32	[2]	32	[2]
CYP2E1	2	4	[2]	4	[2]
CYP3A1	8	8	[1]	8	[1]
CYP3A2	<1	4	[>4]	8	[>4]
CYP4A1	<1	<1	[n.a.]	<1	[n.a.]

カギカッコ内の数値はコントロールに対する誘導倍率を示す。n.a.は不検出を示す。被験物質は 0.6 mmol/ kg/ day で 8 日間の強制経口投与を行った。

謝辞

本研究論文をまとめるにあたり懇切なご指導とご高閲を賜りました麻布大学獣医学部動物応用科学科教授 滝沢達也先生に深甚なる謝意を表します。また、論文提出に際し有益なご助言を賜りました麻布大学獣医学部獣医学科教授 折戸謙介先生、麻布大学獣医学部獣医学科教授 坂上元栄先生に心より感謝いたします。

本研究結果のデータ分析とそのまとめにおいて、終始ご指導いただきました国立医薬品食品衛生研究所医療機器部第二室室長 宮島敦子先生、麻布大学客員教授 宇佐見誠先生にはひとかたならぬお世話になりましたこと、心より御礼申し上げます。

本研究論文をまとめる機会を与えて下さった木原記念横浜生命科学振興財団理事長 大野泰雄先生、東邦大学薬学部薬学科講師 満長克祥先生、国立医薬品食品衛生研究所 簾内桃子先生、干川和枝さんに深謝いたします。著者の所属研究室である薬理部第三室においては、前室長（現 崇城大学生物生命学部応用生命科学科教授）石田誠一先生、堀内新一郎先生、長年秘書を勤めてこられました奈木照子さんには、たくさんの激励と有益なご助言をいただきましたこと、感謝申し上げます。本当にありがとうございました。

最後にいつも私を見守り、支えてくれる母 育恵、祖母 美智子に感謝します。

参考文献

1. Frontiers | Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes | Pharmacology.
2. Bernasconi, C. *et al.* Validation of in vitro methods for human cytochrome P450 enzyme induction: Outcome of a multi-laboratory study. *Toxicol. Vitro.* **60**, 212–228 (2019).
3. Bailey, D. G. *et al.* Grapefruit-felodipine interaction: Effect of unprocessed fruit and probable active ingredients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **68**, 468–477 (2000).
4. Honig, P. K. *et al.* Terfenadine-Ketoconazole Interaction: Pharmacokinetic and Electrocardiographic Consequences. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **269**, 1513–1518 (1993).
5. Zhou, S., Chan, E., Pan, S. Q., Huang, M. & Lee, E. J. D. Pharmacokinetic interactions of drugs with St John's wort. *Journal of Psychopharmacology* vol. 18 262–276 (2004).
6. Liguori, M. J. *et al.* AhR activation underlies the CYP1A autoinduction by A-998679 in rats. *Front. Genet.* **3**, 213 (2012).
7. Goodwin, B., Redinbo, M. R. & Kliewer, S. A. Regulation of CYP3A gene

- transcription by the pregnane X receptor. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* vol. 42 1–23 (2002).
8. Goettel, M. *et al.* Comparative studies on the effects of sodium phenobarbital and two other constitutive androstane receptor (CAR) activators on induction of cytochrome P450 enzymes and replicative DNA synthesis in cultured hepatocytes from wild type and CAR knockout rats. *Toxicology* **433–434**, (2020).
 9. Kretschmer, X. C. & Baldwin, W. S. CAR and PXR: Xenosensors of endocrine disrupters? *Chemico-Biological Interactions* vol. 155 111–128 (2005).
 10. Wall, R. J. *et al.* Novel 2-amino-isoflavones exhibit aryl hydrocarbon receptor agonist or antagonist activity in a species/cell-specific context. *Toxicology* **297**, 26–33 (2012).
 11. Woolbright, B. L. & Jaeschke, H. Xenobiotic and Endobiotic Mediated Interactions Between the Cytochrome P450 System and the Inflammatory Response in the Liver. in *Advances in Pharmacology* vol. 74 131–161 (Academic Press Inc., 2015).
 12. Horak, E., Kassal, P. & Murković Steinberg, I. Benzimidazole as a structural unit in fluorescent chemical sensors: the hidden properties of a multifunctional heterocyclic scaffold. *Supramol. Chem.* **30**, 838–857 (2018).

13. Ermler, S., Scholze, M. & Kortenkamp, A. Seven benzimidazole pesticides combined at sub-threshold levels induce micronuclei in vitro. *Mutagenesis* **28**, 417–426 (2013).
14. Mousavi, M., Safarizadeh, H. & Khosravan, A. A new cluster model based descriptor for structure-inhibition relationships: A study of the effects of benzimidazole, aniline and their derivatives on iron corrosion. *Corros. Sci.* **65**, 249–258 (2012).
15. Gutiérrez, E., Rodríguez, J. A., Cruz-Borbolla, J., Alvarado-Rodríguez, J. G. & Thangarasu, P. Development of a predictive model for corrosion inhibition of carbon steel by imidazole and benzimidazole derivatives. *Corros. Sci.* **108**, 23–35 (2016).
16. Marinescu, M. Recent advances in the use of benzimidazoles as corrosion inhibitors. *BMC Chemistry* vol. 13 (2019).
17. [Analysis of organic additives in copper-plating brightener by high performance liquid chromatography] - PubMed.
18. Finšgar, M. 2-Mercaptobenzimidazole as a copper corrosion inhibitor: Part I. Long-term immersion, 3D-profilometry, and electrochemistry. *Corros. Sci.* **72**, 82–89 (2013).

19. Rastegarzadeh, S. & Barkat Rezaei, Z. Environmental assessment of 2-mercaptobenzimidazole based on the surface plasmon resonance band of gold nanoparticles. *Environ. Monit. Assess.* **185**, 9037–9042 (2013).
20. Teng, Y., Zou, L., Huang, M. & Chen, Y. Molecular interaction mechanism between 2-mercaptobenzimidazole and copper-zinc superoxide dismutase. *PLoS One* **9**, e106003 (2014).
21. Kawasaki, Y. *et al.* Toxicity study of a rubber antioxidant, 2-mercaptobenzimidazole, by repeated oral administration to rats. *J. Toxicol. Sci.* **23**, 53–68 (1998).
22. Saitoh, M. *et al.* Toxicity study of a rubber antioxidant, mixture of 2-mercaptomethylbenzimidazoles, by repeated oral administration to rats. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 777–87 (1999).
23. Sakemi, K., Ito, R., Umemura, T., Ohno, Y. & Tsuda, M. Comparative toxicokinetic/toxicodynamic study of rubber antioxidants, 2-mercaptobenzimidazole and its methyl substituted derivatives, by repeated oral administration in rats. *Arch. Toxicol.* **76**, 682–691 (2002).
24. Heidari, R., Niknahad, H., Jamshidzadeh, A., Eghbal, M. A. & Abdoli, N. An overview on the proposed mechanisms of antithyroid drugs-induced liver injury.

- Adv. Pharm. Bull.* **5**, 1–11 (2015).
25. Miyajima, A. *et al.* Thyrotoxic rubber antioxidants, 2-mercaptobenzimidazole and its methyl derivatives, cause both inhibition and induction of drug-metabolizing activity in rat liver microsomes after repeated oral administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **492**, 116–120 (2017).
26. Sakemi, K., Usami, M., Mitsunaga, K., Ohno, Y. & Tsuda, M. Comparative toxicokinetic study of rubber antioxidants, 2-mercaptobenzimidazole and 2-mercaptomethylbenzimidazole, by single oral administration in rats. *J. Toxicol. Sci.* **24**, 399–405 (1999).
27. Heidari, R., Niknahad, H., Jamshidzadeh, A., Eghbal, M. A. & Abdoli, N. An overview on the proposed mechanisms of antithyroid drugs-induced liver injury. *Adv. Pharm. Bull.* **5**, 1–11 (2015).
28. KAWASAKI, Y. *et al.* Toxicity study of a rubber antioxidant, 2-mercaptobenzimidazole, by repeated oral administration to rats. *J. Toxicol. Sci.* **23**, 53–68 (1998).
29. Isama, K., Momma, J., Masa-aki, K. & Nakamura, A. Structure-activity relationships for skin sensitization potential of 2-mercaptobenzimidazole and its methyl derivatives. *undefined* (1998).

30. Feoktistova, M., Geserick, P. & Leverkus, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, 343–346 (2016).
31. Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. & Gerhard, D. Dose-response analysis using R. *PLoS One* **10**, e0146021 (2015).
32. Naaz, F. *et al.* Molecular modeling, synthesis, antibacterial and cytotoxicity evaluation of sulfonamide derivatives of benzimidazole, indazole, benzothiazole and thiazole. *Bioorganic Med. Chem.* **26**, 3414–3428 (2018).
33. Shimomura, I. *et al.* Drug library screen reveals benzimidazole derivatives as selective cytotoxic agents for KRAS-mutant lung cancer. *Cancer Lett.* **451**, 11–22 (2019).
34. Dogra, N. & Mukhopadhyay, T. Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway by methyl N-(6-phenylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate leads to a potent cytotoxic effect in tumor cells: A novel antiproliferative agent with a potential therapeutic implication. *J. Biol. Chem.* **287**, 30625–30640 (2012).
35. Ranganatha, V. L. *et al.* Synthesis, angiopreventive activity, and in vivo tumor inhibition of novel benzophenone-benzimidazole analogs. *Life Sci.* **93**, 904–911 (2013).

36. Singla, P., Luxami, V. & Paul, K. Benzimidazole-biologically attractive scaffold for protein kinase inhibitors. *RSC Advances* vol. 4 12422–12440 (2014).
37. Lai, S. R., Castello, S. A., Robinson, A. C. & Koehler, J. W. In vitro anti-tubulin effects of mebendazole and fenbendazole on canine glioma cells. *Vet. Comp. Oncol.* **15**, 1445–1454 (2017).
38. Prosser, K. E., Chang, S. W., Saraci, F., Le, P. H. & Walsby, C. J. Anticancer copper pyridine benzimidazole complexes: ROS generation, biomolecule interactions, and cytotoxicity. *J. Inorg. Biochem.* **167**, 89–99 (2017).
39. *IARC Annual Report 1974.*
40. Paynter, O. E., Burin, G. J., Jaeger, R. B. & Gregorio, C. A. Goitrogens and thyroid follicular cell neoplasia: Evidence for a threshold process. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **8**, 102–119 (1988).
41. Miyajima, A. *et al.* In vitro metabolism of 4-methyl- and 5-methyl-2-mercaptobenzimidazole, thyrotoxic and hepatotoxic rubber antioxidants, in rat liver microsomes. *Fundam. Toxicol. Sci.* **5**, 113–116 (2018).
42. Miyajima, A. *et al.* Inhibitory and inductive effects of 4- or 5-methyl-2-mercaptobenzimidazole, thyrotoxic and hepatotoxic rubber antioxidants, on several forms of cytochrome P450 in primary cultured rat and human

- hepatocytes. *Toxicol. Reports* **7**, 979–985 (2020).
43. Haines, C. *et al.* Comparison of the hepatic and thyroid gland effects of sodium phenobarbital in wild type and constitutive androstane receptor (CAR) knockout rats and pregnenolone-16 α -carbonitrile in wild type and pregnane X receptor (PXR) knockout rats. *Toxicology* **400–401**, 20–27 (2018).
44. Moldéus, P., Högberg, J. & Orrenius, S. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol.* **52**, 60–71 (1978).
45. Fda & Cder. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding Recommendations. (2018).
46. Kyle, P. B., Smith, S. V., Baker, R. C. & Kramer, R. E. Mass spectrometric detection of CYP450 adducts following oxidative desulfuration of methyl parathion. *J. Appl. Toxicol.* **33**, 644–651 (2013).
47. Brauze, D. & Malejka-Giganti, D. A novel 4 S [3H]beta-naphthoflavone-binding protein in liver cytosol of female Sprague-Dawley rats treated with aryl hydrocarbon receptor agonists. *Biochem. J.* **347 Pt 3**, 787–95 (2000).
48. Daujat, M. *et al.* Omeprazole, an inducer of human CYP1A1 and 1A2, is not a ligand for the Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 820–5 (1992).

49. Yoshinari, K. *et al.* Omeprazole transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 expression through the common regulatory region containing multiple xenobiotic-responsive elements. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 139–145 (2008).
50. Backlund, M. & Ingelman-Sundberg, M. Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Cell. Signal.* **17**, 39–48 (2005).
51. Kliewer, S. A., Goodwin, B. & Willson, T. M. The nuclear pregnane X receptor: A key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr. Rev.* **23**, 687–702 (2002).
52. 安全性薬理試験ガイドライン.
53. トキシコキネティクス（毒性試験における全身的曝露の評価）に関するガイドランス.
54. Perel, P. *et al.* Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: Systematic review. *Br. Med. J.* **334**, 197–200 (2007).
55. Lauschke, V. M. Toxicogenomics of drug induced liver injury—from mechanistic understanding to early prediction. *Drug Metabolism Reviews* (2021)
doi:10.1080/03602532.2021.1894571.
56. Messina, A., Luce, E., Hussein, M. & Dubart-Kupperschmitt, A. Pluripotent-Stem-Cell-Derived Hepatic Cells: Hepatocytes and Organoids for Liver Therapy and Regeneration. *Cells* **9**, 420 (2020).

57. Mittal, R. *et al.* Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications. *Journal of Cellular Physiology* vol. 234 8352–8380 (2019).
58. R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- URL <https://www.R-project.org/>.

要旨

1. はじめに

化学物質による毒性は、その生体内における代謝により大きく影響される。すなわち、化学物質は代謝されることにより、毒性が弱まる解毒、または毒性が強まる活性化を受ける。一方、肝臓に量的に最も多く存在し、基質特異性が低いために、多種類の化学物質の代謝に関与する酵素であるチトクローム P450(CYP)は、化学物質によりその活性が誘導または阻害されることがある。誘導または阻害された CYP が他の化学物質の代謝に関与する場合には、その化学物質の毒性が影響を受ける代謝的薬物間相互作用が起こる可能性がある。したがって、化学物質の毒性評価においては、CYP を誘導または阻害する作用および代謝的薬物間相互作用を考慮した毒性学的評価が必要である。しかしながら、代謝的薬物間相互作用については、現在のところ画一的な評価方法は存在しないため、個々の化学物質について研究的に調べる必要がある。

本研究におけるメチル化-2-メルカプトベンズイミダゾールとは、2-メルカプトベンズイミダゾール(2-mercaptobenzimidazole、MBI)の 4 位または 5 位のメチル化誘導体である 4-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール(4-methyle-2-mercaptobenzimidazole、4-MeMBI)および 5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾール(5-methyle-2-mercaptobenzimidazole、5-MeMBI)である。工業的に用いられる

4-MeMBI および 5-MeMBI の 1 対 1 混合物を 4(5)-MeMBI と略称し、これらのメチル化 MBI を総称する場合は Methyl-MBIs と略称する。

4(5)-MeMBI および MBI はゴム用老化防止剤などとして工業的に幅広く利用されており、生分解性の低い環境汚染物質として知られている。そのため、ヒトの健康への影響が懸念されることから、様々な毒性学的研究が行われている。

Methyl-MBIs および MBI は、そのチオウレリン構造による強い甲状腺毒性を有することが、ラットを用いて明らかにされている。ラットを用いた反復および単回投与試験では 4(5)-MeMBI の毒性は MBI よりも弱く、甲状腺毒性を示すペルオキシダーゼ阻害活性もまた、4-および 5-MeMBI は MBI よりも弱かった。4-MeMBI は最も弱かった。甲状腺重量を指標とした毒性評価では 5-MeMBI 単独よりも混合物 4(5)-MeMBI で弱い毒性を示し、混合物内の被験物質における相互作用により毒性が減弱した可能性が示唆された。一方、肝肥大を指標とした肝毒性については 4-MeMBI または 5-MeMBI と 4(5)-MeMBI との間に差は認められず、肝臓における作用が関与するものと考えられた。反復投与による肝 CYP の活性およびタンパク量への影響を調べた報告では、4-MeMBI は CYP1A を、5-MeMBI は CYP2B をそれぞれ強く誘導したが、4(5)-MeMBI では 4-MeMBI と 5-MeMBI とによる相加作用は認められなかった。これらの報告から、4(5)-MeMBI の相対的に低い毒性は、4-MeMBI と 5-MeMBI との CYP 誘導または阻害を介し

た代謝的薬物間相互作用によると考えられているものの、現在のところ画一的な評価方法は存在しないため、個々の化学物質について研究的に調べる必要がある。

本研究では、4-MeMBI および 5-MeMBI による代謝的薬物間相互作用を明らかにすることを目的とした。ウサギ角膜由来細胞株 SIRC 細胞を用いて Methyl-MBIs および MBI の細胞毒性を調べた。続いて、ラット肝ミクロゾーム、ラットおよびヒト初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 実験系により、4-MeMBI および 5-MeMBI について、CYP による代謝、CYP の誘導を調べた。これらの *in vitro* 実験系では、*in vivo* 実験に比べて、解析および評価が容易な結果が得られることが期待される。

2. ウサギ角膜由来細胞株 SIRC 細胞における MBI、4-MeMBI、5-MeMBI および 4(5)-MeMBI の細胞毒性

SIRC 細胞における MBI、4-MeMBI、5-MeMBI および 4(5)-MeMBI の細胞毒性をクリスタル・バイオレット染色性試験により検討した。細胞生存率から半数致死濃度 (LC₅₀) を算出した結果、細胞毒性の強度は 5-MeMBI \geq 4-MeMBI \geq 4(5)-MeMBI $>$ MBI であることを明らかにした。Methyl-MBIs は類似した細胞毒性を示し、MBI よりも強い細胞毒性を示したことから、ベンゼン環にメチル

基が存在すると MBI 誘導体の細胞毒性が高まることを示唆している。さらに、SIRC 細胞は薬物代謝酵素活性が低いことから、*in vivo* における Methyl-MBIs の低い甲状腺毒性および肝毒性は薬物代謝酵素の誘導によるものであるという仮説を支持した。

3. ラット肝における4-MeMBI、5-MeMBIおよびMBIの代謝

ラット肝ミクロゾームにおける4-MeMBI、5-MeMBIおよびMBIについて、CYPによる代謝量をHPLC法により調べた。その結果、4-MeMBI、5-MeMBIおよびMBIは、時間依存的にCYPにより代謝されることが明らかになった。

CYP1A誘導剤 β -ナフトフラボン、CYP2B 誘導剤フェノバルビタールおよびCYP2E誘導剤イソニアジド処理した肝ミクロゾームを用いた実験から、4-MeMBIおよび5-MeMBIの代謝には、CYPs 1Aおよび2Bが関与し、いずれもCYP2Bにより依存的であることが明らかになった。以上の本結果および報告されている*in vivo*実験の結果から、4(5)-MeMBIの代謝においては、4-MeMBIにより誘導されたCYP1Aおよび5-MeMBIにより誘導されたCYP2Bにより、5-MeMBIおよび4-MeMBIのそれぞれが効率的に代謝される、代謝的薬物間相互作用が示唆された。

4. ラットおよびヒト初代培養肝細胞における 4-MeMBI、5-MeMBI および MBI の CYP 活性に及ぼす影響

CYP の誘導による 4(5)-MeMBI における代謝的薬物間相互作用をさらに調べるために、ラット初代培養肝細胞およびヒト初代培養肝細胞を用いて、CYP の誘導を調べた。CYP として *in vivo* 実験で誘導が確認されていないが肝における発現量が多く代謝的薬物間相互作用にしばしば関与することが知られている CYP3A2/4、および *in vivo* 実験で 4-MeMBI による強い誘導が認められる CYP1A1/2 を選択した。ラットまたはヒトの肝細胞を 4-MeMBI、5-MeMBI または MBI の存在下で 48 または 96 時間培養し、HPLC 法を用いて testosterone の 6- β -ヒドロキシ化の測定による CYP3A2/4 活性、および 7-ethoxyresorufin の O-脱エチル化の測定による CYP1A1/2 活性を調べた。

肝細胞では、4-MeMBI および 5-MeMBI は CYP3A2 を阻害したが、4-MeMBI が CYP1A1/2 を強く誘導した。MBI は CYP3A2 を強く阻害し、CYP1A1/2 を弱く阻害した。これらの結果には、報告されている *in vivo* の実験結果とは矛盾が認められず、4(5)-MeMBI の毒性に関する代謝的薬物間相互作用には、4-MeMBI および 5-MeMBI を代謝する CYP1A1/2 の 4-MeMBI による誘導が重要であると考えられた。

ヒト肝細胞では、ドナーに依存して、4-MeMBI および 5-MeMBI による CYP1A

およびCYP3A4の弱い誘導が認められた。これらの結果から、ヒトにおいては4(5)-MeMBIの毒性に関する代謝的薬物間相互作用が起きる可能性は低いことが示唆された。

5. ラット肝細胞における4-MeMBIおよび5-MeMBIのCYP mRNA誘導作用

mRNAレベルでCYP誘導効果を調べるために、4-MeMBIおよび5-MeMBIを8日間連続経口投与したラットにおけるCYP mRNAの変化率を調べた。その結果、4-MeMBIおよび5-MeMBIはCYPs 1A2、2B2、2C11、2E1および3A2のmRNA発現を誘導した。特にCYP1A2の誘導が大きく、4-MeMBIによる誘導量は5-MeMBIによる誘導量の8倍高かった。逆に、CYP2B2の誘導量は、5-MeMBIが4-MeMBIの2倍高かった。これらの結果から、*in vivo*実験および*in vitro*実験における、CYPの活性増加は、mRNAのレベルでの発現誘導によると考えられた。

6. 総括

本研究では、*in vitro* 実験系を用いて、4-MeMBI および 5-MeMBI の肝 CYP による代謝、肝 CYP の誘導を調べた。その結果、4-MeMBI および 5-MeMBI は、CYPs 1A および 2B により代謝されること、CYP1A 活性を誘導することを示し

た。さらに、4-MeMBI および 5-MeMBI による CYPs の活性誘導は mRNA レベルでの発現誘導であることを示した。これらの結果から、4-MeMBI および 5-MeMBI は、4(5)-MeMBI として用いられた場合に、肝 CYP の発現誘導により、お互いの代謝を促進することにより、甲状腺毒性および肝毒性を弱める、という代謝的薬物間相互作用を起こすと考えられた。これは、強い毒性を持つ化学物質を混合物として用いた場合には、代謝的薬物間相互作用により毒性を弱める、という有用な現象である。

Abstract

1. Introduction

The toxicity of chemical substances is greatly affected by their metabolism in the body. That is, chemical substances undergo detoxification, which weakens their toxicity, or activation, which increases their toxicity, when they are metabolized. On the other hand, cytochrome P450 (CYP), the enzyme that is quantitatively most abundant in the liver and is involved in the metabolism of many kinds of chemicals due to its low substrate specificity, can be induced or inhibited by chemicals. If the induced or inhibited CYPs are involved in the metabolism of other chemicals, a metabolic drug-drug interaction may occur in which the toxicity of the chemicals are affected. Therefore, toxicological evaluation of chemical substances should consider the effects of inducing or inhibiting CYPs and metabolic drug-drug interactions. However, currently there is no uniform method for evaluating metabolic drug-drug interactions, it is necessary to study each chemical substance individually.

Methylated-2-mercaptobenzimidazole in this study refers to 4-methyl-2-mercaptobenzimidazole (4-methyle-2-mercaptobenzimidazole, 4-MeMBI) and 5-methyl-2-mercaptobenzimidazole (5-methyle-2-mercaptobenzimidazole, 5-MeMBI), which are methylated derivatives of 2-mercaptobenzimidazole (2-

mercaptobenzimidazole, MBI) at position 4 or 5. The industrially used 1:1 mixture of 4-MeMBI and 5-MeMBI is abbreviated as 4(5)-MeMBI, and when these methylated MBIs are collectively referred to as Methyl-MBIs.

4(5)-MeMBI and MBI are widely used industrially as anti-aging agents for rubber and are known to be environmental pollutants with low biodegradability. Therefore, various toxicological studies have been carried out due to concerns about their effects on human health.

By using rats, Methyl-MBIs and MBIs have been shown to have strong thyroid toxicity due to their thiourea structure. In repeated and single-dose oral administration studies in rats, the toxicity of 4(5)-MeMBI was weaker than that of MBI, and the peroxidase inhibitory activity, which indicates thyroid toxicity, was also weaker for 4- and 5-MeMBI than for MBI. 4-MeMBI was the weakest in these. Toxicity test using thyroid weight as an indicator showed weaker toxicity with the mixture 4(5)-MeMBI than with 5-MeMBI alone, suggesting that the toxicity may have been attenuated by the interaction of the test compounds in the mixture. On the other hand, no difference was observed between 4-MeMBI or 5-MeMBI and 4(5)-MeMBI in hepatotoxicity as an indicator of hepatomegaly, which was thought to be related to their effects in the liver. In a report on the effects of repeated administration on the activity and protein levels of

hepatic CYPs, 4-MeMBI and 5-MeMBI strongly induced CYP1A and CYP2B, respectively, but 4(5)-MeMBI had no additive effects on 4-MeMBI and 5-MeMBI. Although these reports suggest that the relatively low toxicity of 4(5)-MeMBI is due to metabolic drug-drug interactions between 4-MeMBI and 5-MeMBI via CYP induction or inhibition, there is currently no uniform method of evaluation, so individual chemicals need to be studied. In this study, we aimed to clarify the metabolic drug-drug interactions induced by 4-MeMBI and 5-MeMBI. We investigated the cytotoxicity of Methyl-MBIs and MBIs using the rabbit cornea-derived cell line SIRC cells. Then, metabolism by CYPs and induction of CYPs were examined for 4-MeMBI and 5-MeMBI by *in vitro* assays using rat liver microsomes and primary cultured rat and human hepatocytes. These *in vitro* assays are expected to provide results that are easier to analyze and evaluate than *in vivo* tests.

2. Cytotoxicity of 4-methyl- and 5-methyl-2-mercaptobenzimidazole in SIRC cells

The cytotoxicity of MBI and Methyl-MBIs in SIRC were detected by the crystal violet staining assay. The half lethal concentration (LC_{50}) was calculated from cell viability, and the intensity of cytotoxicity was found to be $5\text{-MeMBI} \geq 4\text{-MeMBI} \geq 4(5)\text{-MeMBI} > \text{MBI}$. Methyl-MBIs showed similar cytotoxicity and were more potent

than MBIs, suggesting that the presence of a methyl group on the benzene ring increases the cytotoxicity of MBI derivatives. In addition, SIRC cells have low drug-metabolizing enzyme activity, supporting the hypothesis that the low thyroid toxicity and hepatotoxicity of Methyl-MBIs *in vivo* are due to the induction of drug-metabolizing enzymes.

3. Metabolism of 4-MeMBI, 5-MeMBI and MBI in rat liver

The metabolism of 4-MeMBI, 5-MeMBI, and MBI by CYP in rat liver microsomes was investigated by HPLC method. The results showed that 4-MeMBI, 5-MeMBI, and MBI were metabolized by CYPs in a time-dependent manner. From the metabolic assay using liver microsomes treated with β -naphthoflavone, a CYP1A inducer, phenobarbital, a CYP2B inducer, and isoniazid, a CYP2E inducer, showed that 4-MeMBI and 5-MeMBI were metabolized by CYPs-dependent manner. CYPs 1A and 2B were involved in the metabolism of 4-MBI and 5-MeMBI, and both were more dependent on CYP2B. These results and the results of reported *in vivo* experiments suggest a metabolic drug-drug interaction in the metabolism of 4(5)-MeMBI, in which 5-MeMBI and 4-MeMBI are efficiently metabolized by CYP1A induced by 4-MeMBI and CYP2B induced by 5-MeMBI, respectively.

4. Effect of 4-MeMBI, 5-MeMBI and MBI on CYP activity in rats and human primary cultured hepatocytes

To further investigate the metabolic drug-drug interactions in 4(5)-MeMBI by induction of CYPs, we evaluated the induction of CYPs in primary cultured rat and human hepatocytes. As selected CYPs of CYP3A2/4 induction has not been confirmed *in vivo* tests but is known to be frequently involved in metabolic drug-drug interactions, and that of CYP1A1/2, which were strongly induced by 4-MeMBI in *in vivo* tests. Rat or human hepatocytes were cultured for 48 or 96 hours in the presence of 4-MeMBI, 5-MeMBI, or MBI. And then, the activity of CYP3A2/4 activity was determined by measuring 6 β -hydroxylation of testosterone and that of CYP1A by CYP1A1/2 activity by measuring O-deethylation of 7-ethoxyresorufin using the HPLC method.

In rat hepatocytes, 4-MeMBI and 5-MeMBI inhibited CYP3A2, while 4-MeMBI strongly induced CYP1A1/2. MBI strongly inhibited CYP3A2 and weakly inhibited CYP1A1/2. These results were consistent with the reported *in vivo* tests results, suggesting that the induction by 4-MeMBI of CYP1A1/2, which metabolizes 4-MeMBI and 5-MeMBI, is important for the metabolic drug-drug interaction regarding the toxicity of 4(5)-MeMBI.

In human hepatocytes, weak induction of CYP1A and CYP3A4 by 4-MeMBI and 5-MeMBI was observed in a donor-dependent manner. These results suggest that metabolic drug-drug interactions related to the toxicity of 4(5)-MeMBI are unlikely to occur in humans.

5. Induction of CYPs mRNA by 4-MeMBI and 5-MeMBI in rat hepatocytes

(additional data)

To investigate the effect of CYPs induction at the mRNA level, the rate of change of CYPs mRNA in rat's oral administration with 4-MeMBI and 5-MeMBI for 8 consecutive days was evaluated using the Competitive RT-PCR. The results showed that 4-MeMBI and 5-MeMBI induced the mRNA expression of CYPs 1A2, 2B2, 2C11, 2E1, and 3A2. The induction of CYP1A2 was particularly large, and the amount of induction by 4-MeMBI was eight times higher than that by 5-MeMBI. Conversely, the induction of CYP2B2 by 5-MeMBI was 2-fold higher than that by 4-MeMBI. These results suggest that the increased activity of CYPs in *in vivo* and *in vitro* experiments is due to the induction of expression at the mRNA level.

6. Conclusion

In this study, we investigated the cytotoxicity of 4-MeMBI and 5-MeMBI, their metabolism by CYPs, and their induction of CYPs in liver using *in vitro* assays. The results showed that the strength of cytotoxicity of 4-MeMBI, 5-MeMBI and MBI was Methyl-MBIs > MBI which is opposite to the toxicity reported *in vivo*. 4-MeMBI and 5-MeMBI were shown to be metabolized by CYPs 1A and 2B and to induce CYP1A activity. Furthermore, we showed that the induction of CYPs activity by 4-MeMBI and 5-MeMBI was the mRNA level. These results suggest that 4-MeMBI and 5-MeMBI, when used as a mixture 4(5)-MeMBI, cause a metabolic drug-drug interaction that weakens thyroid toxicity and hepatotoxicity by promoting each other's metabolism through induction of CYPs. This is a useful phenomenon in that when highly toxic chemicals are used as a mixture, the toxicity is weakened by the metabolic drug-drug interaction of these chemicals.