

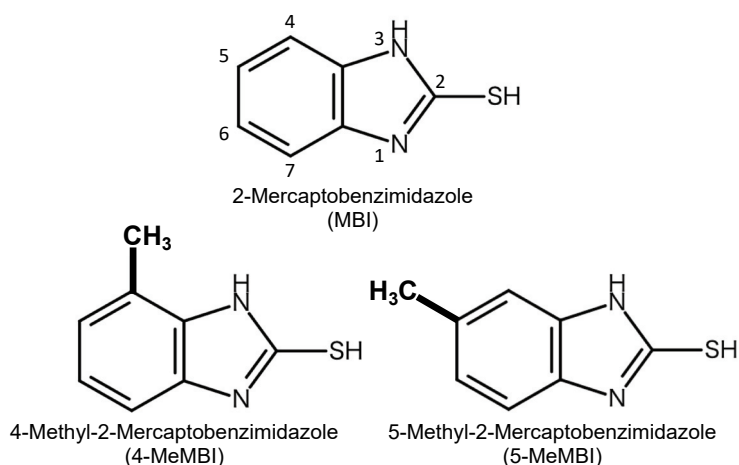
氏名(本籍)	黒田幸恵(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第441号
学位授与年月日	令和3年11月22日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	<i>In vitro</i> アッセイ系を用いたゴム老化防止剤4-メチル-または5-メチル-2-メルカプトベンズイミダゾールの代謝的相互作用に関する毒性学的研究
論文審査委員	(主査) 滝沢達也 (副査) 折戸謙介 坂上元栄

## 論文内容の要旨

### 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、そのチオウレア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 (LC<sub>50</sub>) 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。(Kuroda Y\*, Miyajima A\*, Sakemi-Hoshikawa K, Usami M, Mitsunaga K, Ohno Y, Sunouchi M. *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*. 2020, \* These authors equally contributed to this work.)

### 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  $\beta$ -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。(Miyajima A\*, Kuroda Y\*, Sakemi-Hoshikawa K, Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Ohno Y, Sunouchi M. *In vitro* metabolism of 4-methyl- and 5-methyl-2-mercaptobenzimidazole, thyrotoxic and hepatotoxic rubber antioxidants, in rat liver microsomes. *Fundamental Toxicological Sciences*. 2018, \* These authors equally contributed to this work.)

### 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 $\beta$ -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。

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。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

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。(Miyajima A \*, Kuroda Y \*, Sakemi-Hoshikawa K, Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Ohno Y, Sunouchi M. 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*. 2020. \* These authors equally contributed to this work.)

## 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 誘導効果を検討するために、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 Competitive RT-PCR 法を用いて調べた。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。(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. \* These authors equally contributed to this work.)

## 6. 総括

本研究では、*in vitro* 実験系を用いて、4-MeMBI および 5-MeMBI の細胞毒性、肝 CYP による代謝、そして肝 CYP の誘導を調べた。その結果、4-MeMBI、5-MeMBI および MBI の細胞毒性の強さは Methyl-MBIs > MBI だった。これは *in vivo* で報告されている毒性とは逆だった。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、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。

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 論文内容

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-MeMBI または 5-MeMBI) はチオウレリン構造をもち、ゴム老化防止剤として工業的に汎用されている。ラットの反復毒性試験では、MBI は甲状腺毒性及び肝毒性を示すが、4-MeMBI と 5-MeMBI の 1:1 混合物 4(5)-MeMBI の甲状腺毒性及び肝毒性は減弱することが知られている。4(5)-MeMBI の MBI に対する相対的に低い毒性は、混合物である 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推測されている。しかしながら、混合物における相互作用については、現在まで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。このような背景から、本論文では、*in vitro* アッセイ系を用いてメチル化 MBI の代謝的薬物間相互作用を検討している。

本論文は 4 章から構成されている。1 章では、ウサギ角膜由来細胞株 SIRC 細胞を用いて 4-MeMBI、5-MeMBI および MBI の細胞毒性を調べている。その結果、メチル化-MBI による毒性が代謝により変化することを示した。2 章では、ラット肝ミクロゾームを用いて、4-MeMBI および 5-MeMBI の代謝を HPLC 法により調べている。その結果、メチル化-MBI は CYP1A および 2B により代謝されることを示した。3 章では、ラットとヒトの肝細胞を用いて代謝的薬物間相互作用を検討し、メチル化-MBI による CYP の誘導には種差及びドナー間差が大きいことを示した。4 章では、メチル化-MBI による CYP の誘導は mRNA レベルでの発現誘導であることを示した。

本研究の成果は、メチル化-MBI (4-MeMBI および 5-MeMBI) は混合物として用いられた場合、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や肝毒性を弱める代謝的薬物間相互作用を起こすことを明らかにしたものである。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ことがある、という有用な現象の根拠を明らかにしたものであり、獣医学、毒性学分野に貢献する有用な知見である。

### 2. 論文審査

#### 1) テーマの立て方

申請者は、化学物質が混合物として暴露された時に生じる毒性について、代謝的薬物間相互作用により毒性の増強や減弱が起こり得ることに注目し、混合物として工業的に汎用されている化学物質メチル化-MBI、4(5)-MeMBI の代謝的薬物間相互作用について、様々な *in vitro* アッセイ系により検証しようとしており、明確なテーマが設定され、検討項目が整理されて示されている。

#### 2) 研究の背景

MBI およびそのメチル化誘導体 (4-MeMBI または 5-MeMBI) はチオウレリン構造をもち、ゴム老

化（酸化）防止剤として工業的に汎用されている。ラットを用いた反復毒性試験では、MBI は甲状腺毒性及び肝毒性を示すが、メチル化誘導体の混合物(4-MeMBI と 5-MeMBI の 1:1 混合物、4(5)-MeMBI) の甲状腺毒性及び肝毒性は減弱することが知られている。4(5)-MeMBI の MBI に対して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推測されている。しかしながら、混合物における相互作用については、現在まで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。このような背景から、申請者は本論文のテーマ設定に至り、先行研究の知見を整理し、目的と関連づけて解析している。

### 3) 研究の方法

4(5)-MeMBI の代謝的薬物間相互作用を検討するために、ウサギ角膜由来細胞株、ラット肝マイクロゾーム、ラットおよびヒト肝細胞を用いて、クリスタル・バイオレット染色試験による細胞毒性、HPLC 法を用いた被験物資の代謝と被験物質による CYP の誘導、Competitive RT-PCR 法による *CYPs* mRNA 量の定量など様々な手法を用いて検討している。

### 4) 研究の結果

1 章では、SIRC 細胞を用いてメチル化-MBI による毒性が代謝により変化することを示した。2 章では、ラット肝マイクロゾームを用いて、メチル化-MBI は CYP 誘導により代謝促進されることを示した。3 章では、ラットとヒトの肝細胞を用いて、ラットでは CYP1A/2 の誘導が重要であること、さらに CYP の誘導には種差及びドナー間差が大きいことを示した。4 章では、メチル化-MBI による CYP の誘導は mRNA レベルであることを示した。いずれも十分なデータを得て、解析している。

### 5) 考察と結論

*In vitro* アッセイ系により、4-MeMBI および 5-MeMBI が混合物として用いられた場合、CYP の発現誘導によりお互いの代謝を促進する代謝的薬物間相互作用を起こすことを明らかにした。この結果は *in vivo* で報告されていた混合物 4(5)-MeMBI の甲状腺毒性や肝毒性が MBI と比べて相対的に低く、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ことがある、という有用な現象の根拠を明らかにしたものであり、獣医学、毒性学分野に貢献する有用な知見である。

### 6) 参考論文

適切な参考文献が必要な数だけ引用されている。

### 3. 審査結果

本論文の内容と発表会での質疑に対する適切な回答を考慮すると、博士としての専門知識を十分に有することが認められ、本研究は獣医学上及び毒性学上意義ある業績として高く評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するに相応しいと判定した。