

Table 1 (continued)

使用製品名/商品名 (有効成分)	採取場所	広さ (m ²)	使用時間帯	使用時間 (h)	ポンプ設置場所/ 床からの距離 (cm)	ドア・窓開閉状態	冷却器具等の使用状況	その他の使用
18 錠に効くカトリス30日錠取り5錠 (Transfuthrin)	寝室	9.9	夜間・就寝中	8	80	窓しめ	クーラー	なし
19 アースノーマット30日 (Transfuthrin)	個室なし	個室なし	個室なし	個室なし	100	窓しめ	不使用	個室なし
20 アースノーマット錠とり5錠 (Transfuthrin)	寝室	9.9	就寝中	7	50	窓しめ	不使用	なし
21 アースノーマット30日 (Transfuthrin)	自宅	9.9	就寝中	4	90	窓しめ	クーラー	なし
22 アースノーマット 錠とり5錠 (Transfuthrin)	1K	10.8	常時	24	60	窓しめ	クーラー	なし
23 錠とり3錠+4角にチョット (Transfuthrin)	寝室	13.2	就寝時	個室なし	個室なし	窓しめ	不使用	なし
24 アースノーマット30日 (Transfuthrin)	1K	個室なし	個室なし	個室なし	個室なし	個室なし	個室なし	個室なし
25 アースノーマット30日 (Transfuthrin)	リビング	39.7	就寝時	9	50	窓あき	扇風機	衣類防虫剤
26 アースノーマット30日 (Transfuthrin)	個室なし	個室なし	個室なし	個室なし	80	窓あき	不使用	個室なし
27 おすだけベープ (Transfuthrin)	寝室 (子供部屋)	8.3	就寝中	8	100	窓しめ	個室なし	個室なし
28 錠に効くカトリスお昼服用90日 (Mecofuthrin)	寝室	13.2	就寝時	8	100	窓あけ	扇風機	なし
29 どこでもベープ90日 (Mecofuthrin)	寝室	13.2	夜間・就寝中	13	120	窓・ドアしめ	クーラー	なし
30 アースノーマット30日 (Transfuthrin)	個室なし	9.9	朝~夜	7	100	窓・ドアしめ	不使用	なし
31 アースノーマット錠とり5錠 (Transfuthrin)	寝室	9.9	夜間・就寝中	12	120	窓・ドアあけ	不使用	なし
32 アースノーマット30日 (Transfuthrin)	リビング+和室	26.5	夜間	16	130	窓・ドアしめ	クーラー	衣類防虫剤
33 アースノーマット30日 (Transfuthrin)	リビング+和室	26.5	就寝中	16	130	窓・ドアあけ	扇風機	衣類防虫剤
34 水性キンチョウリキッド6.0日 (Mecofuthrin)	リビング	23.2	夜間	14	90	窓・ドアしめ	不使用	なし

Table 1 (continued)

	使用製品名/商標名 (有効成分)	採取場所	広さ (m ²)	使用時間帯	使用時間 (h)	ポンプ設置場所/ 床からの距離 (cm)	ドア・窓開け状態	冷暖房等の使用状況	その他の使用
35	蚊とりミスト4角にチュッと (Transfluthrin)	リビング	23.2	夜間	回答なし	80	窓・ドアあけ	扇風機	ハコバ
36	水性キンチョウリキッド60日 (Methofluthrin)	リビング	13.2	夜間	8	100	窓しめ	クーラー	回答なし
37	蚊に効くカトリスお部屋用60日 (Methofluthrin)	寝室	16.6	就寝中	8	100	窓しめ	クーラー	回答なし
38	アースノーマットワイド60日 (Transfluthrin)	リビング	23.2	夜間	8	100	窓しめ	換気扇	回答なし
39	おしだけバレー (Transfluthrin)	寝室(子供部屋)	9.1	就寝時	回答なし	80	窓あけ・換気扇め	クーラー	回答なし
40	アースノーマット30日 (Transfluthrin)	台所	7.5	常時	24	70	窓しめ	不使用	衣類防虫剤
41	どこでもバレー蚊取り120日 (Methofluthrin)	浴室	9.9	常時	24	90	窓しめ	不使用	なし
42	どこでもバレー蚊取り60日 (Methofluthrin)	玄関	3.3	夜間・就寝時	13.5	床	窓しめ	冷房	なし
43	どこでもバレー蚊取り120日 (Methofluthrin)	リビング	19.9	夜間・就寝時	13.5	床	窓しめ	冷房	なし
44	アースノーマット蚊とりブタ (Transfluthrin)	玄関	5.0	常時	24	90	窓しめ	不使用	虫よけ芳香剤
45	どこでもバレー蚊取り60日 (Methofluthrin)	ダイニング	13.2	就寝時	4	100	ドア・窓しめ	不使用	なし
46	どこでもバレー蚊取り60日 (Methofluthrin)	寝室	9.9	回答なし	回答なし	140	窓あけ	扇風機	なし
47	どこでもバレー蚊取り60日 (Methofluthrin)	リビング	9.9	就寝時	4	110	ドア・窓しめ	クーラー・扇風機	なし
48	アースノーマット蚊とりブタ (Transfluthrin)	リビング	13.2	夜間・就寝時	回答なし	80	ドア・窓しめ	クーラー	なし
49	アースノーマットワイド60日 (Transfluthrin)	回答なし	9.9	夜間・就寝時	回答なし	120	ドア・窓しめ	クーラー	なし
50	水性キンチョウリキッド60日 (Methofluthrin)	子供部屋	8.3	夜間・就寝時	回答なし	100	回答なし	クーラー	衣類防虫剤

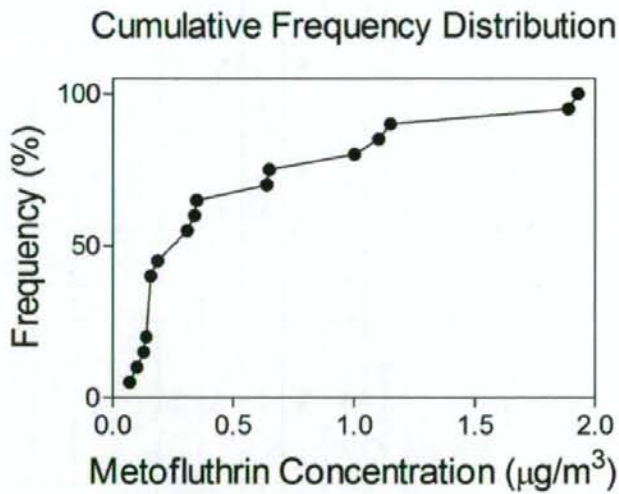
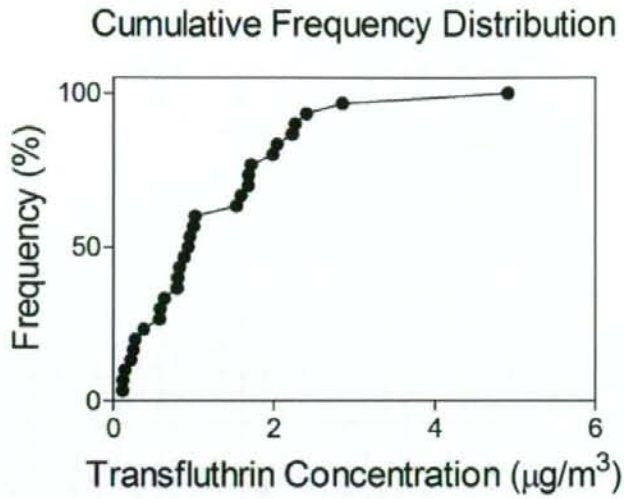


Fig. 4

Cumulative frequency distribution of the indoor air concentrations of readily vaporizable pyrethroids.

Table 2 Statistics of the indoor air concentrations of readily vaporizable pyrethroids.

	Transfluthrin	Metofluthrin
Sample Size	30	20
Mean ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	1.25	0.55
Geometric Mean ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.86	0.34
Minimum ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.11	0.07
Median ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.95	0.31
Maximum ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	4.91	1.93
95 Percentile ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	2.65	1.89

分担 研究年度終了報告書

化学物質、特に家庭内の化学物質の暴露評価手法の開発に関する研究

化学物質、特に殺虫剤の経皮暴露量に関する研究

研究分担者 杉林 堅次 城西大学 薬学部 教授

研究協力者 藤堂 浩明 城西大学 薬学部 助教

研究要旨：使用頻度の高いバイオサイド（*p*-クレゾール、ダイアジノン、レスメトリン）の経皮吸収性を動物皮膚を用いて検討した結果、*p*-クレゾールは高い経皮吸収性と皮膚貯留性を有し、ダイアジノンは経皮吸収性は低いと皮膚貯留性が確認された。一方、レスメトリンは経皮吸収性・皮膚貯留性が低く、皮膚内での代謝による分解が考えられた。

これらの結果より、高い経皮吸収性および皮膚貯留性を示す *p*-クレゾールでは全身毒性および皮膚局所毒性を、皮膚貯留性が認められたダイアジノンでは、皮膚刺激性を評価する必要があると考えられた。

そこで、本年度は、*p*-クレゾールの経皮暴露後の全身毒性を animal scale up 法を用いて算出された *p*-クレゾールのヒトの体内動態パラメータと皮膚透過パラメータから予測した。また、経皮暴露後の皮膚局所毒性については、*p*-クレゾールおよびダイアジノンをヒト真皮線維芽細胞に適用し、得られた MTT 試験結果を Emax model にて解析し評価した。

A. 研究目的

一般家庭で使用される化学物質は多種多様であり、衣食住の全てに含まれている。これら化学物質の暴露は、室外より室内の方が圧倒的に大きい。しかし、住環境で使用されている家庭用の化学物質の暴露評価モデルについては、ほとんど検討されていない。家庭内の化学物質の主な暴露経路は、化学物質の揮散による経気道暴露と床や壁に吸着した化学物質と皮膚との接触による経皮暴露が考えられる。そこで、後者について評価するため、*in vitro* 皮膚透過実験法を用いて使用頻度の高いバイオサイド（殺虫剤、消毒剤）の経皮吸収性を動物皮膚を用いて検討した。そこで、従来から当研究室で確立されている

in vitro 皮膚透過実験法を用いて、使用頻度の高いバイオサイド（殺虫剤、消毒剤）である *p*-クレゾール、ダイアジノンおよびレスメトリンの経皮吸収性について動物皮膚を用いて評価した。

本年度は、皮膚透過性が確認されていないダイアジノンについて、実験条件を体内の条件により近付けるため、レシーパーにアルブミンを添加し引き続き皮膚透過性の検討を行った。また、高い経皮吸収性と皮膚貯留性の確認された *p*-クレゾールを試験薬物とし、全身からの消失パラメータを算出するため Wistar 系雄性ラットに頸静脈投与し、並びに皮膚刺激性を評価するため、ヒト真皮線維芽細胞 (Human Dermal Fibroblast, HDF) に

種々濃度の *p*-クレゾールを適用した後、MTT 試験を行った。

B. 研究方法

B-1. 理論

B-1-1. 物質の経皮吸収性と落屑速度

物質の皮膚浸透性や皮膚透過性の定量的指標として透過係数 (permeability coefficient, *P*, cm/s) が用いられる。また、角層は部位によって異なるが、約 20 層の角質細胞層からなり、約 20 μm の厚みがある。角層は最上層から 1 日 1 層剥がれるので、角層の落屑速度は 1 μm/day、すなわち 1.2×10^{-9} cm/s である。物質の透過係数が角層落屑速度より小さい物質では、皮膚実質層を介した皮膚への浸透・透過はほとんど起こらないと考えられる。

B-1-2. 試験薬物の透過係数の算出法

各バイオサイドの皮膚透過実験において、サンプル中から試験薬物が検出された時の皮膚透過挙動の解析法は以前に報告した (平成 19 年度 総括研究報告書)。

今年度は、全サンプルから試験薬物が検出されていないバイオサイドの透過係数について解析した。試験薬物の透過係数は、皮膚透過実験での適用濃度・レシーバー容量・有効透過面積・適用時間と各試験薬物定量時の定量限界より算出される。

$$P' = \frac{C_{\min} V}{ATC_0} \quad (1)$$

ここで、*P'* は試験薬物の皮膚中線速度、*C_{min}* は各試験薬物の定量限界、*V* はレシーバー容量、*A* は有効透過面積、*T* は適用時間、*C₀* は適用濃度を示す。

B-1-3. 全身消失パラメータの算出

p-クレゾールの全身消失パラメータを線

形 1-コンパートメントモデルを用いて解析した。

B-1-4. 皮膚刺激性の評価

p-クレゾール適用後の HDF の死細胞率を MTT 試験により求めた。この結果を Sigmoid *E_{max}* model により解析し種々パラメータを算出した。

$$I = \frac{I_{\max} \times C^{\gamma}}{IC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}} \quad (2)$$

I は死細胞率、*I_{max}* は最大細胞刺激性 (死細胞率)、*C* は適用試験薬物濃度、*IC₅₀* は 50% 細胞刺激性発現濃度、*γ* は形状因子を示す。

B-2. 試薬

クロシン、*p*-クレゾールおよびダイアジノン は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。レスメトリンは住友化学株式会社 (東京) より供与された。その他の試薬は、特級、HPLC 用または試薬グレードのものをそのまま使用した。

B-3. 皮膚透過実験

ペントバルビタール麻酔下の WBN/ILA-Ht 系雄性ヘアレスラットの腹部を清拭後、摘出しフランツ型拡散セル (有効透過面積 0.64 cm²) に挟み、表皮側にダイアジノンのクロシン溶液を適用し、真皮側にはアルブミンを 5% 添加した pH7.4 等張リン酸緩衝液 (PBS) を適用して *in vitro* 皮膚透過実験を行った。48 時間まで経時的にレシーバー側からサンプリングを行った。

B-4. 倫理面への配慮

当該研究実施機関の「動物実験の適正な実施に関する規程」を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を行った。

B-5. *p*-クレゾールの消失パラメータ算出実験

ウレタン麻酔下の Wistar 系雄性ラットに 0.1% HCO60 を添加した *p*-クレゾールの PBS 溶液を頸静脈に投与した後、経時的に同箇所より採血を行った。血中薬物濃度は定法により定量した。

B-6. ヒト真皮線維芽細胞を用いた MTT 試験

HDF を 96well のプレートに 2×10^4 cells で播種後、5% CO₂ 下で Fetal Bovine Serum の最終濃度が 10% となるよう調製した Dullbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を用いてインキュベートした。DMEM 吸引除去した後、DMEM に溶解させた種々濃度の *p*-クレゾールを適用し、3、12 時間 5% CO₂ 下でインキュベートした。各薬物を吸引除去した後、PBS 100 μ L で洗い、MTT 培地を加え 5% CO₂ 下で 3 時間インキュベートした。MTT 培地を吸引除去し、100 μ L 酸性インプロパノールで 1 時間室温、暗所にてホルマザンを抽出した。抽出したホルマザンはマイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した。

B-7. 定量法 (HPLC 分析)

ダイアジノンを用いた皮膚透過実験から得られたサンプルと皮膚中濃度測定実験より得られたホモジネート液はクロロホルムと 1:1 で混和し、遠心分離した下層 (クロロホルム層) を別のチューブに移し窒素乾固を行い、溶媒を完全に除去した後、HPLC 定量時の移動相を用いて再溶解させ 10 倍濃縮を行い、これを HPLC に 20 μ L 注入し定量を行った。また、*p*-クレゾールの消失パラメータ算出実験より得られた血液サンプルは遠心分離させた後、上清と内部標準物質を溶解させたアセトニトリルを混和させ再度遠

心分離を行った。その上清 20 μ L を HPLC に注入し定量を行った。HPLC 測定条件は以下に記す。

(HPLC 測定条件)

検出器: SHIMADZU, UV-VIS DETECTOR SPD-10A、カラム: SUPERIOREX ODS S-5 μ m 4.6 \times 250 mm (SHISEIDO)、カラム温度: 40°C、

ダイアジノン、移動相: アセトニトリル: メタノール: 水 = 6:2:2、流速: 1.2 mL/min、波長: 245 nm

p-クレゾール、移動相: アセトニトリル: 水 = 4:6、流速: 1.2 mL/min、波長: 280 nm、

B-8. 吸光度測定

HDF を用いた MTT 試験において抽出したホルマザンの吸光度をマイクロプレートリーダー (SpectraMax, Molecular Devices, Japan) を用いて波長: 570 nm で測定した。

C. 結果および考察

C-1. ダイアジノンの皮膚透過実験

ダイアジノンはアルブミンをレシーバー溶液に添加した実験においても、レシーバー溶液からは検出されなかった (Fig. 1)。算出したダイアジノンの透過係数は 3.64×10^{-10} cm/s より低いことが分かった。また、同速度は皮膚の角層落屑速度 (1×10^{-9} cm/s) より低いため、ダイアジノンは皮膚実質層を介した皮膚への浸透は起こらないと考えられる。

C-2. *p*-クレゾールの消失パラメータ算出実験

p-クレゾールを Wistar 系雄性ラットの頸静脈に投与し得られた体重あたりの消失パラメータは 9.554 mL/s/kg であった (Fig. 2)。得られた値より、Animal scale-up を行いヒト

での *p*-クレゾールの消失パラメータを計算した結果、1.422 mL/s/kg であった。

これより、実使用における *p*-クレゾールの経皮暴露時の血中濃度を算出した。条件として、日本人成人男性（体重：60 kg、体表面積： $1.6 \times 10^4 \text{ cm}^2$ ）がスプレー型殺虫剤（*p*-cresol：0.1M 含有）に体表面積の 10%を暴露したと仮定した。透過係数は健康皮膚を想定したモデルではラット intact skin を用いた実験より、また損傷皮膚を用いたモデルではラット stripped skin を用いた皮膚透過実験より算出した値を使用した。

血中濃度は健康皮膚への暴露では $3.8 \times 10^{-2} \text{ mM}$ 、損傷皮膚では $5.0 \times 10^{-2} \text{ mM}$ と算出された。

C-3. HDF を用いた MTT 試験

同実験において *p*-クレゾールの HDF への IC_{50} は 3 時間適用群で 8.0 mM、12 時間適用群では 6.1 mM であった (Fig. 3)。このことより、*p*-クレゾールは濃度・時間依存的に細胞障害性を有することが確認された。これらの値と以前に報告した *p*-クレゾール適用後の皮膚中濃度（ケロシン製剤での intact skin 群：1.3 mM, stripped skin 群：0.64 mM, PBS 製剤での intact skin：0.66 mM, stripped skin：0.62 mM）を比較すると、全ての群での皮膚中濃度はヒト真皮線維芽細胞よりも低いことが分かる。このことより、*p*-クレゾール暴露後の皮膚刺激性は真皮部においてはほとんど見られないと考えられる。また、皮膚刺激性については、真皮部より上層に位置する表皮の細胞であるヒト表皮角化細胞を用いた更なる検討が必要である。

D. 結論

1. *In vitro* 皮膚透過性実験から、*p*-クレゾールは皮膚を透過するが、ダイアジノンとレスメトリンは透過しないことが明らか

かとなった。

2. *p*-クレゾールの血中濃度は細胞などに障害を与える濃度よりは低いため、全身毒性への懸念は少ないと考えられる。
3. *p*-クレゾールの皮膚中濃度は真皮部での IC_{50} より低いため、同部での皮膚刺激性は低いと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

杉林堅次(2008)紫外線防御試験法の国際的動向と紫外線防御剤の開発の課題：化粧品に用いられるナノ粒子の暴露安全性のあり方. *Fragrance Journal* 339:38-41

2. 学会発表

1) 中田圭一、藤堂浩明、辻清美、徳永裕司、杉林堅次、家庭内化学物質の経皮暴露評価：*p*-クレゾールおよび市販殺虫剤成分、日本薬学会第 128 年会、平成 20 年 3 月

2) 鈴木 貴雅、中田 圭一、藤堂 浩明、神野 透人、杉林 堅次、家庭内化学物質への経皮暴露評価、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、京都

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

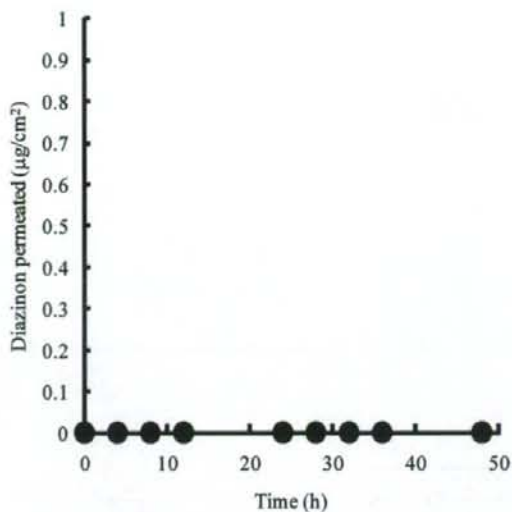


Fig. 1 Permeation profile of diazinon that permeated through hairless rat intact or stripped skin. Each value represents the mean (n = 3-4)

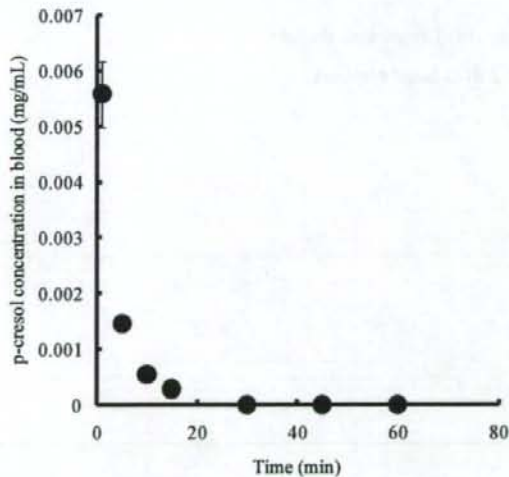


Fig. 2 *p*-cresol concentration in blood after intravenous administration. Each value represents the mean \pm S.E. (n = 3)

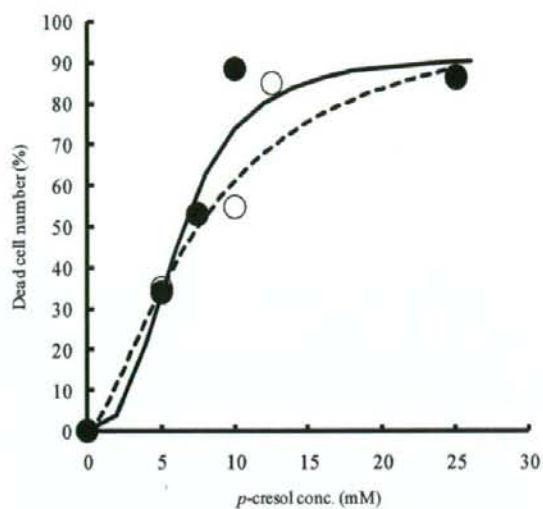


Fig. 3 Dose-response curve for percent of dead cell number in the MTT assay and *p*-cresol concentration applied (mM)

Symbols in the figure are as follows:

(●), 12 hour applied; (○), 3 hour applied; solid lines and dashed line are fitting line to Hill equation for 12 or 3 hour applied.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担 研究年度終了報告書

化学物質、特に家庭内の化学物質の暴露評価手法の開発に関する研究

ピレスロイド系殺虫剤の解毒代謝

研究分担者	香川(田中) 聡子	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部
研究代表者	神野 透人	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部
研究協力者	古川 容子	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部

研究要旨：今後広汎に使用されることが予想される常温揮散性ピレスロイド Metofluthrin をはじめとする含フッ素芳香族ピレスロイドの加水分解に関与するヒトの酵素を明らかにする目的で、ヒト Carboxylesterase (CES) 1、CES2 および CES3 を哺乳動物細胞で高発現させて得た組換えタンパク質を用いて、加水分解反応に関する検討を行った。その結果、従来より汎用されている *trans*-Permethrin 及び4種の含フッ素芳香族ピレスロイドはヒト CES1 及び CES2 によって加水分解されるが、CES3 では加水分解されないことが判明した。さらに、CES1 および CES2 の加水分解活性を比較したところ、*trans*-Permethrin に対する活性は CES1 に比べてむしろ CES2 で高かったのに対して、今回検討した4種の含フッ素芳香族ピレスロイドに対する活性はおしなべて CES1 に比べて CES2 で低く、これらピレスロイドの加水分解には CES2 に比べて CES1 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、正常ヒト組織由来の Total RNA を用いて Real-Time RT-PCR により CES1 及び CES2 の mRNA の発現レベルを定量解析して組織間で比較した結果、肝臓と同様に皮膚組織では CES1 及び CES2 がほぼ同レベルで発現していることが明らかになった。また、小腸ではこれまでの報告と同様に CES1 に比べて CES2 の発現レベルが高いことが確認されたが、肺組織では逆に CES2 に比べて CES1 が優位に発現していることが明らかになった。*Transfluthrin* 及び *Metofluthrin* は現在蚊取り製品の活性成分として一般家庭においても日常的に広く使用されているが、本研究結果から経気道暴露されたこれらピレスロイドは肺組織中で CES1 によって速やかに加水分解されると考えられる。しかし、我々は既に CES1 の遺伝子一塩基多型に由来する変異型タンパク質 (G188R) は、*trans*-Permethrin に対する加水分解活性が完全に欠失していることを明らかにしており、この多型を有するヒト集団においては経気道暴露された含フッ素芳香族ピレスロイドは肺組織で加水分解を受けることなく血中に移行することが予想される。本研究により、これらピレスロイドのリスク評価においてはその暴露経路と代謝反応に関わる CES 分子種さらに発現量のヒト個体差を考慮することが重要であることが示された。

A. 研究目的

シックハウス症候群のような室内環境化学物質に起因すると考えられる疾患に社会的な関心がよせられているが、その発症機序の詳細に関しては未解明の部分が多い。建築基準法の改正による防蟻剤としての Chlorpyrifos の使用禁止に伴い、代替殺虫剤としてピレスロイド系殺虫剤の使用量が増加する傾向にある。特にこの数年間に常温揮散性のピレスロイド剤を活性成分とする殺虫剤/防虫剤が次々に開発され、これらピレスロイド剤に高濃度に暴露される可能性も否定できない。そこで本研究では、今後広汎に使用されることが予想される常温揮散性ピレスロイド Metofluthrin をはじめとする含フッ素芳香族ピレスロイドの加水分解に関与するヒトの酵素を明らかにする目的で、Carboxylesterase (CES) 1、CES2 および CES3 を哺乳動物細胞で高発現させて得た組換えタンパク質を用いて、加水分解反応に関する検討を行った。

B. 研究方法

B.1 ヒト CES1、CES2 及び CES3 の Gateway TOPO[®] クローニング

正常ヒト肝臓由来の mRNA (BioChain Institute Inc. CA USA) から SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen Japan) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として CES1、CES2、及び CES3 の CDS を特異的に増幅させる Primer Pair を用いて、Pfx DNA Polymerase (Invitrogen Japan) による PCR でそれぞれの cDNA を増幅した。なお、Forward Primer には Directional TOPO 組換え反応のための配列として 5'末端側に CACC 配列を付加し

た。PCR の条件として Primer 濃度は 200 nM (CES1)、または 400 nM (CES2, CES3) とした。また、PCR の温度サイクルは 94°C ; 2 分の後、94°C ; 15 秒、64°C ; 30 秒、68°C ; 2 分を 25 回繰り返す、最後に 68°C ; 7 分を付加した。得られた PCR Fragment を pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングした。また、タンパク質発現確認の目的で組換えタンパク質を V5-epitope C-末融合タンパク質として発現させるために、pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングした cDNA を鋳型として、終止コドン部分を除いた Reverse Primer を用いて cDNA を増幅し、同様にクローニングした。クローニングに用いた Primer の塩基配列を Table 1 に示す。

なお、それぞれのプラスミドについて ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan Ltd. Tokyo, Japan) を用いて塩基配列を確認した。Sequencing 反応に用いた Primer の塩基配列を Table 2 に示す。

B.2 HEK293 細胞を用いるヒト CES 発現系の構築

pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングした各酵素の cDNA を Gateway LR 反応で哺乳動物細胞発現ベクター・pcDNA-DEST40 にサブクローニングした。得られたプラスミド構築物を HEK293 細胞に Lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen Japan) を用いてトランスフェクションして 48 時間後に細胞を回収した。回収した細胞は氷冷下で超音波処理破砕後、9,000 × g で 10 分間遠心分離し、その上清 (Whole Cell Lysate) を酵素反応に用いた。

B.3 ウェスタンブロット法による CES タンパク質の検出

CES 遺伝子を導入した HEK293 細胞の CES タンパク質の相対的な発現量を調べるために、Whole Cell Lysate について各 CES 分子種を抗 V5 抗体を用いるウェスタンブロット法で検出した。まず、CES 遺伝子を導入した HEK293 細胞の Whole Cell Lysate、を SDS-Polyacrylamide Gel 電気泳動 (10% レディーゲル、Bio-Rad Laboratories, Inc) によって分離し、Polyvinylidene Difluoride (PVDF) 膜 (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) に転写した。膜はスキムミルクを用いてブロッッキング処理した後に、抗 V5-HRP 抗体 (Invitrogen Japan、抗体希釈倍率: 1/5000) で 1 時間インキュベーションした。その後、Enhanced Chemiluminescence-Plus 試薬 (GE Healthcare Bio-Sciences KK, Tokyo, Japan) と反応させた後に Typhoon 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare Bio-Sciences KK) でシグナルを検出し、ImageQuant ソフトウェア (GE Healthcare Bio-Sciences KK) を用いて画像解析を行い、シグナル強度を定量した。

B.4 *trans*-Permethrin 及び 4 種含フッ素芳香族ピレスロイドに対する加水分解活性の測定

B.4.1 代謝物分析法の確立

5 種ピレスロイドとその代謝物を HPLC によって分離・定量する方法を確立した。HPLC 装置の構成として、島津製作所 (株) 製の送液ポンプ (LC-10AD)、オートインジェクター (SIL-10A)、カラムオーブン (CTO-10A)、紫外外部吸光検出器 (SPD-10AV UV-VIS detector) を用いた。酵素反応終了

後の上清 (100 μ l) を HPLC 分析用カラム (4.6 \times 250 mm XBridgeTM Shield RP column (18.5 μ m) (Nihon Waters KK, Tokyo, Japan) に注入し、40 $^{\circ}$ C で分離した。溶離液として 0.1% Formic acid / Water と 0.1% Formic acid / Acetonitrile の混合液を用いるアイソクラティック分析とし、その混合比は Transfluthrin 代謝物分析の場合は、70:30 (v/v)、Profluthrin 及び Tefluthrin 代謝物分析の場合は 62:38 (v/v)、Metofluthrin 代謝物分析の場合は 70:30 (v/v)、*trans*-Permethrin 代謝物分析の場合は 55:45 (v/v) とした。流速は 1.0 ml/min とした。紫外外部検出器の測定波長は 210 nm とした。

B.4.2 酵素反応

酵素反応終了後の上清の一部を用いて 5 種ピレスロイドとその代謝物を HPLC によって分離・定量することによって酵素活性を求めた。

DMSO に溶解した *trans*-Permethrin 及び 4 種含フッ素芳香族ピレスロイドを 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に添加したものを酵素反応とした。基質の最終濃度はそれぞれ 5、50 μ M とした。なお、基質を溶解するために用いる溶媒の酵素反応溶液中での最終濃度は 0.2% 以下とした。ガラス試験管に分注した酵素反応溶液に Whole Cell Lysate を添加し 37 $^{\circ}$ C の水浴中で一定時間インキュベーションすることによって酵素反応を進行させた。酵素反応は氷冷した Acetonitrile を反応溶液と等量添加することによって停止した。反応停止後 30 分間氷中に静置した後に 3000 rpm で 15 分間遠心分離し、その上清を HPLC 分析に供した。なお、加水分解反応測定において基質が添加

量の 12.5%を超えないように酵素反応時間を選定した。

反応溶液の一部について HPLC 分析を行い、CES による主要代謝産物として検出される 2,3,5,6-Tetrafluorobenzyl alcohol (Transfluthrin)、2,3,5,6-Tetrafluoro-4-methylbenzyl alcohol (Profluthrin, Tefulthri)、2,3,5,6-Tetrafluoro-4-methoxymethylbenzyl alcohol (Metofluthrin) 及び 3-Phenoxybenzyl alcohol (*trans*-Permethrin) を定量することによって、加水分解活性を求め、その活性値を Western blot 法により検出・定量した各 CES タンパク質の発現量 (Fig. 2) で補正した。

B.5 ヒト組織中 CESs 発現量の定量的な解析

ヒト正常肝臓、肺、小腸及び皮膚由来の Total RNA (n=5、BioChain Institute, Inc., CA, USA, Table 3) を鋳型として High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems Japan Ltd.) を用いて逆転写反応によって cDNA を合成した。

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Japan Ltd.) と TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems Japan Ltd.) を用い、PRISM 7000 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Japan Ltd.) によって CES1 及び CES2 mRNA の発現量の定量的な解析を行った。

なお、それぞれの mRNA の発現量の定量的な解析に必要な標準化を行う目的で、内在性コントロール遺伝子として β -Actin (Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Housekeeping Gene, Applied Biosystems Japan Ltd.) 及び PPIA (Peptidylprolyl

Isomerase A; Cyclophilin A, Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Housekeeping Gene, Applied Biosystems Japan Ltd.) を定量した。

B.6 統計的解析手法

結果は平均値 \pm 標準誤差として示した。結果の解析は Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。多重検定として Dunnett's 検定を伴う一元配置分散分析 (one-way analysis of variance; ANOVA) を実施し、P 値が 0.01 未満の場合有意差ありと判定した。

C. 研究結果

C.1 ヒト Carboxylesterase のクローニング及びタンパク質の発現

ヒト正常肝臓由来の mRNA より RT-PCR 法で CES (CES1、CES2 及び CES3) 遺伝子の cDNA を pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングしてその塩基配列を調べた。その結果、得られたクローンは GenBank に登録されているそれぞれのリファレンスシーケンスと完全に一致する配列を持つことが確認された (CES1 : NM_001025195 (29-APR-2008)、CES2 : NM_003869 (29-APR-2008)、CES3 : NM_024922 (13-APR-2008))。

目的とする cDNA を Gateway LR 反応で哺乳動物細胞発現ベクターにサブクローニングし、HEK293 細胞にトランスフェクションしてそれぞれの CES タンパク質を V5-epitope C-末融合タンパク質として一過性に発現させた。発現ベクターをトランスフェクションして 48 時間後に細胞を回収し、CES1、CES2 及び CES3 をそれぞれ導

入した HEK293 細胞の Whole Cell Lysate について CES タンパク質の発現レベルをウェスタンブロット法によって調べた。その結果、CES1、CES2 及び CES3 タンパク質はいずれも単一のバンドとして検出された (Fig. 2)。これら検出されたバンドについて画像解析を行いシグナル強度を定量し、その値を活性値補正に用いた。

C.2 *trans*-Permethrin 及び 4 種含フッ素芳香族ピレスロイドの加水分解生成物分析法の確立

trans-Permethrin の加水分解生成物である 3-Phenoxy-benzyl alcohol (PB-OH) 及び 3-(2,2-Dichloro-vinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (DCCA)、また、PB-OH の酸化生成物として検出される可能性のある 3-Phenoxybenzaldehyde (PB-CHO) 及び 3-Phenoxybenzoic acid (PB-COOH) を HPLC により分離・定量する方法を確立した。この分析条件下では、*trans*-Permethrin の加水分解生成物、及びその代謝産物として生成する可能性のある 3-Phenoxybenzyl alcohol、*trans*-3-(2,2-Dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid、3-Phenoxybenzoic acid、3-Phenoxybenzaldehyde はそれぞれ 9.6 分、11.2 分、12.5 分、18.5 分に溶出された。CES1 を一過性に発現させた HEK293 細胞の Whole Cell Lysate と *trans*-Permethrin との反応溶液を HPLC 分析した結果、代謝産物として 3-Phenoxybenzyl alcohol 及び *trans*-3-(2,2-Dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid が検出され、3-Phenoxybenzoic acid、

3-Phenoxybenzaldehyde は検出されなかったことから、基質として添加した *trans*-Permethrin は一過性に発現させた CES1 タンパク質を含む Whole Cell Lysate によって加水分解を受けるが、その後の酸化反応は本反応条件においては進行しないと考えられる。従って、本条件で 3-Phenoxybenzyl alcohol を定量することによって、CES タンパク質による加水分解活性を測定した。3-Phenoxybenzyl alcohol の定量下限値は 2.5 pmol/assay とした。

Profluthrin の加水分解生成物である 2,3,5,6-Tetrafluoro-4-methylbenzylalcohol を分離定量する方を確立した。Profluthrin の加水分解反応生成物である 2,3,5,6-Tetrafluoro-4-methylbenzylalcohol の標準品は 10.1 分に溶出された (Fig. 3)。また、CES1 を一過性に発現させた HEK293 細胞の Whole Cell Lysate と Profluthrin との反応溶液を HPLC 分析した結果、2,3,5,6-Tetrafluoro-4-methylbenzylalcohol の他に Profluthrin から加水分解反応によって生じる 2,2-Dimethyl-3-(1-propenyl)cyclopropane carboxylic acid であることが予想されるピークが 11.5 分に検出された。従って、2,3,5,6-Tetrafluoro-4-methylbenzylalcohol を定量することによって、CES タンパク質による加水分解活性を測定した。2,3,5,6-Tetrafluoro-4-methylbenzylalcohol の定量下限値は 10 pmol/assay とした。同様に、Transfluthrin の加水分解生成物である 2,3,5,6-Tetrafluoro-benzylalcohol (Retention Time; 9.8 分) Metofluthrin の加水分解生成物である 2,3,5,6-Tetrafluoro-4-methoxymethylbenzylalcohol (Retention Time; 10.0 分) Tefluthrin の加水分解生成物である

2,3,5,6-Tetrafluoro-4-methylbenzylalcohol

(Retention Time; 10.0 分)を定量することによって各ピレスロイドの加水分解活性を測定した (Fig. 3)。

C.3 *trans*-Permethrin 及び 4 種含フッ素芳香族ピレスロイドの加水分解に関与するヒト Carboxylesterase

CES 遺伝子を導入しない HEK293 細胞には本研究で検討対象とした 5 種ピレスロイドに対する加水分解活性は検出されなかった。

trans-Permethrin 及び 4 種の含フッ素芳香族ピレスロイドを基質として各 CES 分子種の加水分解活性を測定した結果を Fig. 4 に示す。ヒト CES1、CES2 および CES3 をそれぞれ高発現させた HEK293 細胞の Whole Cell Lysate を用いて、これら 5 種ピレスロイド剤に対する加水分解活性を測定したところ、CES1 及び CES2 に加水分解活性が認められたが、CES3 には活性は認められなかった。

trans-Permethrin に対する加水分解活性は、CES1 および CES2 共に認められ、タンパク質発現量で補正した比活性は CES1 に比べて CES2 において高かった (Fig. 4)。

一方、4 種の含フッ素芳香族ピレスロイドに対する加水分解活性に関して検討した結果、CES1 および CES2 に活性が認められたものの、その比活性には CES1 と CES2 において著しい違いが認められ、CES1 に比べて CES2 の加水分解活性は低いことが判明した (Fig. 4)。以上の結果から、4 種の含フッ素芳香族ピレスロイドの加水分解には CES2 に比べて CES1 が重要な役割を果たしていると考えられる。

C.4 ヒトにおける組織特異的 Carboxylesterase の発現

ヒト正常組織由来の Total RNA を用いて Real-Time RT-PCR により CES1 及び CES2 の mRNA の発現レベルを定量解析した。BioChain 社より購入したヒト正常組織 (肝臓、肺、皮膚、小腸それぞれ 5 donor) 由来の Total RNA に関する検体情報を Table 3 に示す。各 Total RNA より逆転写反応によって合成した cDNA を鋳型に PCR を行った際の増幅曲線を Fig. 5 に示す。予備実験の結果、発現量の最も高いことが判明したサンプル由来の cDNA を標準検体として段階希釈して検量線を作成し、相対的な発現量を求めた。各組織中の発現レベルは Housekeeping Gene として定量した β -Actin 及び PPIA 遺伝子で標準化した値と比較した (Fig. 6)。その結果、肝臓と同様に皮膚組織では CES1 及び CES2 がほぼ同レベルで発現していることが明らかになった。また、小腸ではこれまでの報告と同様に CES1 に比べて CES2 の発現レベルが高いことが確認されたが、肺組織では逆に CES2 に比べて CES1 が優位に発現していることが明らかになった。

D. 考察

ピレスロイド系殺虫剤は室内環境中で広範に使用されているが、「天然の除虫菊由来のピレトリン類似化合物」である点が強調され、その安全性については十分に議論がなされていないのが現状である。また、ヒトではラットのような実験動物とは異なり血清中で加水分解を受けにくいなど、ピレスロイド系殺虫剤の代謝に関する動物種差

(Crow et al., 2007) や、また、ヒトにおいてもある種のピレスロイド系殺虫剤の体内半減期に 5 倍程度の個体差がみられるという報告 (Ross et al., 2006) 等があるが、それに関与する要因については不明であり、感受性の個体差を分子レベルで解析した研究は皆無である。

2004 年に、ピレスロイド系殺虫剤の加水分解に関与する酵素がマウスから単離され、CES2 ファミリーに属する酵素であることが明らかにされた (Stok et al., 2004)。この酵素はヒトの CES2 とも高い相同性をもつ (Identity 71%, Similarity 82%) ことから、ヒトでも CES2 がピレスロイド系殺虫剤の加水分解を触媒する可能性が高いことがしめされた。

そこで、本研究では、ピレスロイド系殺虫剤の加水分解に関わる CES 分子種を特定する目的で、ヒト CES 遺伝子をクローニングし、哺乳動物細胞で発現させた組換えたんぱく質を用いて、ピレスロイド系殺虫剤の加水分解反応について検討をおこなった。その結果、従来より使用されている代表的な I 型ピレスロイド系殺虫剤である *trans*-Permethrin は、ヒト CES1 及び CES2 によって加水分解を受けるが、今後家庭室内でも汎用されることが予想される Profluthrin は、ヒト CES1 によって *trans*-Permethrin と同様に加水分解を受けるものの、CES2 によっては極めて加水分解を受けにくいことが判明した。2007 年に Crow らも、主に CES2 を発現しているヒト小腸マイクロソーム画分において、*trans*-Permethrin は速やかに加水分解されるのに対して、同じ I 型ピレスロイド系殺虫剤である Bioresmethrin や II 型ピレスロイド

系殺虫剤である Deltamethrin は極めて加水分解を受けにくいことを報告している (Crow et al., 2007)。このような CES による加水分解反応における基質特異性の違いが、これまでに明らかになっている酵素タンパク質の構造特性 (Hosokawa and Satoh, 2006; Hosokawa, 2008) で明確に説明できるものではないが、いずれにしても CES の基質特異性がピレスロイド系殺虫剤の解毒代謝に影響することが予想される。

ヒト組織における CES の発現には組織特異性があることが報告されており、CES1 が肝臓や肺など比較的多くの組織に発現していること、小腸及び皮膚では CES1 に比べてむしろ CES2 の発現量が高く、CES1 の活性は低いことが報告されている (Imai, 2007)。本研究において常温揮散性である Profluthrin は CES1 によって加水分解されることが明らかになり、経気道暴露された場合には比較的速やかに肺組織で加水分解されると考えられるが、経口あるいは経皮暴露された場合には加水分解による解毒代謝は受けにくいことが予想される。また、我々は既に CES1 の一塩基多型に起因する異型酵素 (G188R) には *trans*-Permethrin の加水分解活性がほとんど認められないことを明らかにしており、その場合には肺組織中でも加水分解を受けずに血中に移行する可能性がある。本研究において、これらピレスロイドのリスク評価においてはその暴露経路と代謝反応に関わる CES 分子種さらに発現量のヒト個体差を考慮することが重要であることが示された。

E. 結論

本研究では、今後さらに広汎に使用され

ることが予想されるピレスロイド系殺虫剤の加水分解すなわち解毒代謝に関わる生体内要因として Carboxylesterase が重要な役割を果たすこと、I 型ピレスロイド系殺虫剤である Trans-Permethrin と常温揮散性ピレスロイド系殺虫剤である Metofluthrin を含む含フッ素芳香族ピレスロイドでは、関与する Carboxylesterase の分子種が異なることが明らかになった。CES で代謝される環境化学物質については反応に関わる CES 分子種とその暴露経路を考慮したリスク評価が必要であると考えられる。

今後は加水分解に関与する Paraoxonase I 及び Butyrylcholinesterase 等の酵素にも着目し、ヒトと実験動物間の機能的な差異を明らかにすると共に、ヒトの個体差に関して分子レベルで解明することがピレスロイド系殺虫剤をはじめとするエステル型の環境化学物質の有害性評価に不可欠であると考えられる。

F. 引用文献

Crow JA, Borazjani A, Potter PM, Ross MK (2007) Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol Appl Pharmacol* 221:1-12.

Hosokawa M (2008) Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules* 13: 412-431.

Imai T (2007) Hydrolysis by carboxylesterase and disposition of prodrug with ester moiety. *Yakugaku Zasshi*

127:611-619.

Marsh S, Xiao M, Yu J, Ahluwalia R, Minton M, Freimuth RR, Kwok PY, McLeod HL (2004) Pharmacogenomic assessment of carboxylesterases 1 and 2. *Genomics* 84:661-668.

Ross MK, Borazjani A, Edwards CC, Potter PM (2006) Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochem Pharmacol* 71:657-669.

Sato T, Hosokawa M (2006) Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem Biol Interact* 162:195-211.

Stok JE, Huang H, Jones PD, Wheelock CE, Morisseau C, Hammock BD (2004) Identification, expression, and purification of a pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase from mouse liver microsomes. *J Biol Chem* 279:29863-29839.

G. 研究発表

G.1 論文発表

なし

G.2 学会発表

神野透人、香川(田中)聡子、古川容子、辻 清美、林 留美子、田中博子、大河原 晋、安藤正典、西村哲治：常温揮散性ピレスロイドの経気道暴露評価に関する研究 フォーラム 2008:衛生薬学・環境トキシコロジー (2008.10)

香川（田中）聡子、神野透人、古川容子、大河原晋、安藤正典、西村哲治、埴岡伸光、成松鎮雄：含フッ素芳香族ピレスロイドの加水分解に関与するヒト Carboxylesterase に関する研究 フォーラム 2008:衛生薬学・環境トキシコロジー (2008.10)

香川（田中）聡子、古川容子、辻 清美、林 留美子、田中博子、大河原 晋、安藤正典、西村哲治、神野透人：室内空气中常温揮散性ピレスロイド Transfluthrin および Metofluthrin の実態調査 平成 20 年度室内環境学会総会 (2008.10)

神野透人、香川（田中）聡子、古川容子、西村哲治、埴岡伸光、成松鎮雄：ピレスロイド系殺虫剤の解毒代謝に関する研究 平成 20 年度室内環境学会総会 (2008.10)

H. 知的所有権の取得状況

H.1 特許取得

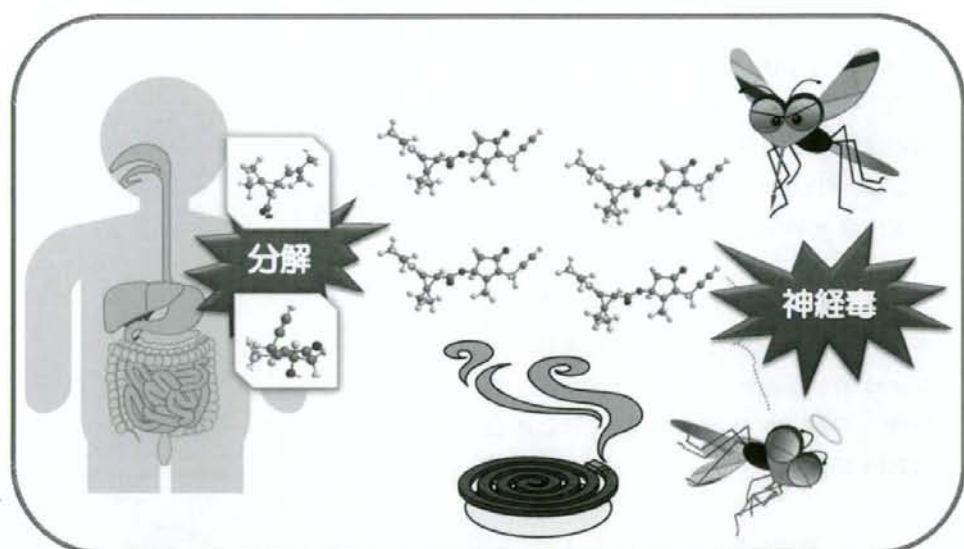
なし

H.2 実用新案登録

なし

H.3 その他

平成 20 年度室内環境学会総会にてポスター賞受賞



Schema 1

Mechanism of selective toxicity of pyrethroids between mammals and insects.