



Fig. 3

Sampling apparatus used in this study.

Table 1 Summary of the results of questionnaire survey.

	使用製品名/商品名 (有効成分)	採取場所	広さ (m <sup>2</sup> )	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	その他防虫剤等の 使用
1	蚊に効くカトリスお部屋用 90日 (Mecofluthrin)	寝室	17.4	夜間・就寝中	12	120	窓あけ	扇風機	ムシューダ
2	どこでもベープ蚊取り 60日 (Mecofluthrin)	寝室	13.2	就寝時	8	40	窓しめ	クーラー	なし
3	キンチョーリキッド 60日用 (Mecofluthrin)	リビング	17.2	夜間	9	35	窓・ドアあけ	不使用	なし
4	どこでもベープ 120日 (Mecofluthrin)	玄関・台所	23.2	夕方～朝	14	110	窓しめ (換気扇)	クーラー	なし
5	どこでもベープ蚊取り 60日 (Mecofluthrin)	寝室	9.9	就寝中	4	30	窓あけ	不使用	なし
6	蚊に効くカトリス 45日 (Transfluthrin)	寝室	9.9	就寝中	8	100	窓・ドアあけ	扇風機	なし
7	蚊に効くカトリスお部屋用 90日 (Mecofluthrin)	リビングダイニング	14.9	就寝中	8	80	窓しめ	不使用	ファブリーズ
8	どこでもベープ 60日 (Mecofluthrin)	寝室 (子供部屋)	9.9	就寝中	8	100	窓しめ	不使用	ムシューダ
9	どこでもベープ蚊取り 60日 (Mecofluthrin)	寝室	13.2	夜間・就寝中	8.5	60	窓あけ	不使用	なし
10	アースノーマット 蚊とりプタ (Transfluthrin)	リビングダイニング	19.9	夜間・就寝中	11	100	窓しめ	クーラー	なし
11	アースノーマット 蚊とりプタ (Transfluthrin)	寝室	9.9	夜間・就寝中	12	100	窓あけ	不使用	芳香剤
12	アースノーマットワイド 60日 (Transfluthrin)	リビング	26.5	夜間・就寝中	8	80	窓しめ	クーラー	なし
13	アースノーマットワイド 60日 (Transfluthrin)	リビング	26.5	夜間・就寝中	8.5	95	窓あけ	不使用	なし
14	アースノーマット 蚊とりプタ (Transfluthrin)	寝室	9.9	就寝中	7	100	窓あけ	不使用	なし
15	アースノーマット 30日 (Transfluthrin)	リビング	21.5	夜間・就寝中	10	80	窓しめ	クーラー	虫よけ
16	アースノーマット 30日 (Transfluthrin)	寝室	13.2	夜間・就寝中	8	80	窓しめ	クーラー	衣類防虫剤
17	アースノーマット 蚊とりプタ (Transfluthrin)	和室	13.2	暑時	24	30	窓しめ	不使用	なし

Table 1 (continued)

	使用薬品名/商標名 (有効成分)	採取場所	広さ (m <sup>2</sup> )	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	冷房器具等の使用状況	その他の使用
18	蚊に効くカトリス30日錠取りおた (Transfluthrin)	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 (Transfluthrin)	回答なし	回答なし	回答なし	回答なし	100	窓しめ	不使用	回答なし
20	アースノーマット錠とりプタ (Transfluthrin)	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 (Transfluthrin)	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 錠とりプタ (Transfluthrin)	1K	10.8	常時	24	60	窓しめ	クーラー	なし
23	錠とりミスト4角にチョット (Transfluthrin)	寝室	13.2	就寝時	回答なし	回答なし	窓しめ	不使用	なし
24	アースノーマット30日 (Transfluthrin)	1K	回答なし	回答なし	回答なし	回答なし	回答なし	回答なし	回答なし
25	アースノーマット30日 (Transfluthrin)	リビング	39.7	就寝時	9	50	窓あけ	扇風機	衣類防虫剤
26	アースノーマット30日 (Transfluthrin)	回答なし	回答なし	回答なし	回答なし	80	窓あけ	不使用	回答なし
27	おすだけハーブ (Transfluthrin)	寝室(子供部屋)	8.3	就寝中	8	100	窓しめ	回答なし	回答なし
28	蚊に効くカトリスお部屋用90日 (Mecfluthrin)	寝室	13.2	就寝時	8	100	窓あけ	扇風機	なし
29	どこでもハーブ90日 (Mecfluthrin)	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 (Transfluthrin)	回答なし	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プタ (Transfluthrin)	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 (Transfluthrin)	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 (Transfluthrin)	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	氷柱キンチョウリキッド6.0日 (Mecfluthrin)	リビング	23.2	夜間	14	90	窓・ドアしめ	不使用	なし

Table 1 (continued)

使用薬品名・商標名	(有効成分)	採取場所	広さ (m <sup>2</sup> )	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
35 蚊とりミスト4角にチュウキ	(Transfluthrin)	リビング	23.2	夜間	回答なし	80	窓・ドアあけ	扇風機	ハブナ
36 水性キンチョウリキッド60日	(Metofluthrin)	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	(Metofluthrin)	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 おすだけベープ	(Transfluthrin)	寝室(子供部屋)	9.1	就寝時	回答なし	80	窓あけ・窓閉め	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 どこでもベープ蚊取り120日	(Metofluthrin)	部屋	9.9	常時	24	90	窓しめ	不使用	なし
42 どこでもベープ蚊取り60日	(Metofluthrin)	玄関	3.3	夜間・就寝時	13.5	床	窓しめ	冷房	なし
43 どこでもベープ蚊取り120日	(Metofluthrin)	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プタ	(Transfluthrin)	玄関	5.0	常時	24	90	窓しめ	不使用	虫よけ芳香剤
45 どこでもベープ蚊取り60日	(Metofluthrin)	ダイニング	13.2	就寝時	4	100	ドア・窓しめ	不使用	なし
46 どこでもベープ蚊取り60日	(Metofluthrin)	寝室	9.9	回答なし	回答なし	140	窓あけ	扇風機	なし
47 どこでもベープ蚊取り60日	(Metofluthrin)	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プタ	(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	(Metofluthrin)	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



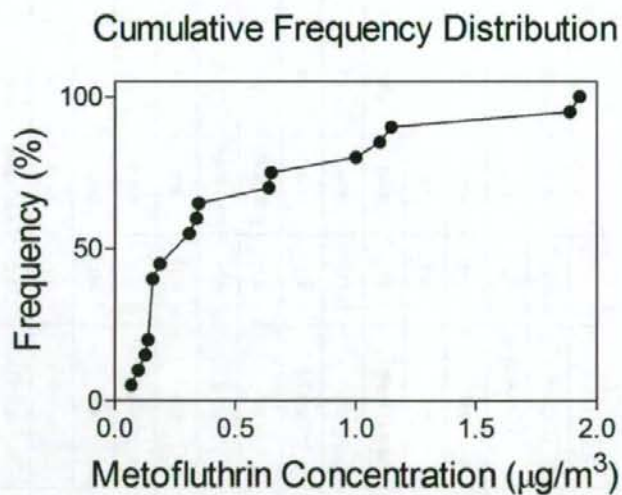
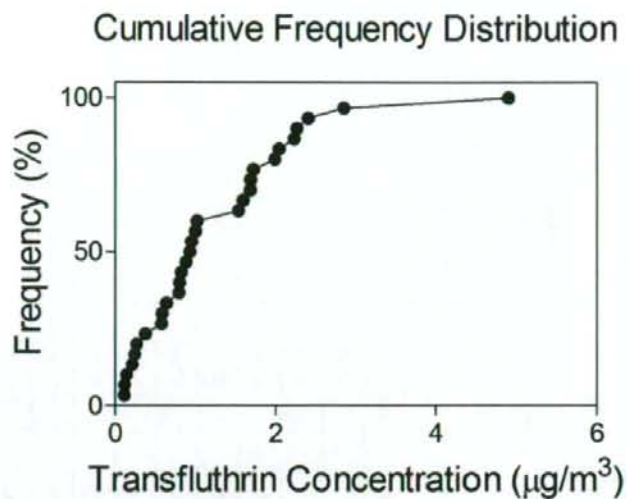


Fig. 4

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

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：一般家庭で使用される化学物質は多種多様であり、衣食住のすべてに含まれる。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。モデルバイオサイドとして、*p*-クレゾール、ダイアジノンおよびレスメトリンを選択し研究を行った。

皮膚透過性試験の結果より、*p*-クレゾールは高い皮膚透過性と皮膚貯留性が確認され、全身毒性与皮膚刺激性が懸念された。*p*-クレゾールの経皮暴露後の全身毒性をラットからヒトへの *animal scale up* 法を用いて算出した体内動態パラメータと皮膚透過パラメータを用いて予測した結果、*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 にて解析することで評価した。その結果、暴露後の *p*-クレゾールの皮膚中濃度は  $IC_{50}$  より低いため皮膚刺激性は少ないと考えられた。一方、ダイアジノンやレスメトリンは経皮吸収性および皮膚移行性ともに低いことが明らかとなった。



## A. 研究目的

一般家庭で使用されている化学物質は多種多様で、まさしく衣食住に関わるもの全てに含まれている。それら家庭内化学物質のヒトへの暴露は室外よりむしろ室内で受ける方が圧倒的に大きいと考えられる。家庭内化学物質の暴露は事故による誤飲が原因である経口暴露を除き、化学物質の揮散による気道暴露あるいは壁や床に吸着した化学物質との接触による経皮暴露が主である。

製品の生産量やその使用形態から、家庭内で問題となる暴露物質の中にバイオサイドがある。バイオサイドとは人体、動物、環境に悪影響を及ぼすおそれのある物質を指し、木材防腐剤、殺菌剤、殺虫剤、殺鼠剤、船舶塗装材等が挙げられる。特に、殺虫剤は農業において世界的にその生産性向上に貢献し、世界人口増加による食糧不足危機を回避した。また、公衆衛生においてマラリアなどの伝染病を媒介する有害生物の駆除に広く使われ、多くの人命を救ってきた<sup>1),2)</sup>。現在では、家庭内に侵入してくる害虫の駆除のために、殺虫剤は一般家庭でも広く使われるようになり、特にキンチョールに代表されるエアゾールタイプの殺虫剤の生産量は10年前から急激に増加した。それに伴い、家庭内で殺虫剤吸入事故件数も増加した。さらに、エアゾールの溶剤に用いられるケロシンは皮膚の角層との親和性が高いとの報告もあり<sup>3)</sup>、国内外で殺虫剤による暴露が不安視されている<sup>4),5)</sup>。しかし、殺虫剤に代表される家庭内化学物質の暴露評価は今までほとんど検討されず<sup>6)</sup>、総合的な暴露評価モデルの確立が必要であると思われる。皮膚暴露に関しては、皮膚刺激性試験が行われているが、殺虫剤成分の皮膚透過性を調査している研究はほとんど報告されていない。

そこで、本研究では家庭内化学物質の中か

ら代表的なピレスロイド系化合物やその他殺虫剤成分を選択し、従来から当研究室で確立している *in vitro* 皮膚透過実験法を用いて皮膚暴露性を評価した。化学暴露物質の皮膚透過性を評価することで、暴露物質が、どの程度の時間に吸収されるかを理解することが可能となる。したがって、皮膚透過性の高い化学物質では、全身作用(全身毒性)について、皮膚透過性の低い化学物質では皮膚局所作用(皮膚刺激性)について検討する必要がある。さらに、生体内で分解・代謝されるものに関しては、それらの皮膚透過性、蓄積性や毒性について調べる必要がある。そこで、我々は、殺虫剤として使用されている *p*-クレゾール、ダイアジノンおよびレスメトリンをモデルバイオサイドとして選択し、これらの経皮暴露後の皮膚透過性や皮膚貯留性を評価した結果について報告する。

## B. 経皮吸収について

### B-1 皮膚透過ルートについて

化学物質の皮膚透過経路には、角層の細胞間隙 (intracellular space) や細胞内 (transcellular) ルートを透過する経皮経路と付属器官を透過する経付属器官経路がある。皮膚付属器官からの化学物質の透過は毛包 (hair follicle) を介した経路が主であるが、皮膚付属器官が皮膚上で占める面積が0.1%程度であるため、定常状態における付属器官からの化学物質透過の寄与は小さいと考えられる。皮膚適用された物質は、表皮を拡散して透過した後、真皮または皮下組織に存在する毛細血管壁を透過して全身循環系に移行する。これら経皮吸収の全過程のうち、多くの物質では角層の透過過程が律速段階となる。物質の皮膚透過はほとんどが受動拡散によって進み、基剤と皮膚を介する物質の濃度勾配が物質移動の駆動力となる。また、



高分子化合物やイオン性物質などの特殊なものを除いて、適用部位のほとんどを占める角層実質部を通るルートが汗腺や毛嚢を通るルートよりも重要である<sup>7)</sup>。したがって、角層が全体的に脂溶性の高い密な膜であることを考えあわせると、脂溶性の高い物質ほど皮膚に分配しやすく、分子量の小さいものほど皮膚中を速く拡散し、それらの皮膚透過速度は大きいことが理解される。

### B-2. 皮膚の化学物質透過性

化学物質の皮膚透過性は消化管粘膜透過性などに比べきわめて低い。経皮吸収において透過バリアである角層は死んだ細胞層であるため、エネルギーを必要とする能動輸送の寄与は無く、経皮吸収過程は受動拡散過程として考える。すなわち、経皮吸収では、皮膚(角層)中に生じる化学物質の濃度勾配に従って化学物質が拡散・透過する。単位面積当たりの化学物質の皮膚透過速度( $dQ/dt$ )は、Fickの法則に従い次式により表現できる。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{C_v K D}{L} \quad (1)$$

ここで、 $C_v$ は基剤中の化学物質濃度、 $K$ は化学物質の皮膚/基剤分配係数、 $D$ は化学物質の皮膚中拡散係数、 $L$ は皮膚の厚みである。式(1)から明らかなように、化学物質の適用濃度、分配係数、皮膚中拡散係数が上がると経皮透過性は増大する。また、式(1)中で、 $KD/L$ は透過係数( $P$ )といい、線速度に相当する。 $P$ 値の解釈については研究が進んでいて、透過物質の物性がわかれば、その透過物質のおおよその $P$ 値は予測できる<sup>8,9)</sup>。

### B-3 化学物質の油水分配係数と皮膚透過性

Figure 1に示すように、化学物質の $n$ -オクタノール/水間分配係数の対数値( $\log K_{ow}$ )

の増加に伴い、単位面積あたりの透過係数 $P$ は直線的に増加する。 $K_{ow}$ がさらに大きくなり $K_{ow}$ の対数値が3、4以上となると、 $P$ 値は一定値を示すようになる。これは全体の透過係数に角層下の生きた表皮や真皮中の透過係数がきいてくるためである。

### B-4 物質の経皮吸収性と落屑速度<sup>10)</sup>

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 mm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 $1 \mu\text{m/day}$ 、すなわち $1.2 \times 10^{-9} \text{ cm/s}$ 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。

## C. 解析理論

### C-1 2層膜皮膚モデルを用いた物質の皮膚透過挙動の解析<sup>11)</sup>

モデルバイオサイドの皮膚透過性および皮膚中挙動を解析するために、stratum corneum と stripped skin からなる2層膜モデルを構築した。Figure 2に2層膜モデルの模式図を示す。

角層における位置  $x$ 、時間  $t$  の物質濃度  $C_{sc}$  は Fick の第2法則から、

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (2)$$

Viable epidermis および dermis における位置  $x$ 、時間  $t$  の物質濃度  $C_{ved}$  は、式 (3) で表される。

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (3)$$

初期条件と境界条件は以下ようになる。

$$t=0 \quad -L_{sc} < x < 0 \quad C_{sc} = C_0 \quad (4)$$

$$0 < x < L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

$$t > 0$$

$$x = -L_{sc}$$

$$C_{sc} = K_{d/sc} \cdot C_d \quad (5)$$

$$V \frac{dC_d}{dt} = AD_{sc} \frac{dC_{sc}}{dx}$$

$$x=0 \quad C_{ved} = K_{ved/sc} \cdot C_{sc}$$

および

$$D_{sc} \frac{dC_{sc}}{dx} = D_{ved} \frac{dC_{ved}}{dx}$$

$$x=L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

ここで、 $L_{sc}$  は角層の厚み、 $L_{ved}$  は生きた表皮および真皮の厚み、 $K_{d/sc}$  はドナー側から角層への分配係数、 $K_{sc/ved}$  は角層から生きた表皮への分配係数、 $C_d$  はドナー側の薬物濃度、 $C_s$  は角層のバイオサイド濃度、 $C_{ved}$  は生きた表皮および真皮の倍再度濃度、 $D_{sc}$  は角層中

の薬物拡散係数、 $D_{ved}$  は生きた表皮および真皮中のバイオサイド拡散係数、 $A$  は拡散有効面積を示す。

位置  $x$ 、時間  $t$  における  $C_{sc}$  もしくは  $C_{ved}$  は、式 (2) もしくは (3)、初期条件 (式 (4)) および境界条件 (式 (5)) によって算出される。また、薬物のレシーバー側への透過速度  $J$  は Fick の第1法則である式 (6) で表すことができる。さらに、 $J$  を積分することにより単位時間あたりの物質の累積皮膚透過量  $Q$  が求められる (式 (7))。

$$J = -D \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (6)$$

$$Q = -D \int_0^t \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{skin}} dt \quad (7)$$

また、Fick の第2法則は差分法により、式 (7)、(8) に変換できる。

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{i,j+1} - C_{i,j}) \quad (8)$$

$$\frac{d^2 C_{i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{i-1,j} - 2C_{i,j} + C_{i+1,j}) \quad (9)$$

ここで、 $C_{i,j}$  は皮膚における  $i$  番目の位置の  $j$  番目の時間の濃度を表す。 $\Delta x$  は  $x_{i+1} - x_i$  を表し、 $\Delta t$  は  $t_{j+1} - t_j$  を表す。式 (8)、(9) を式 (2) および (3) に代入すると式 (10)、(11) となる。

$$C_{sc,i,j+1} = rD_{sc} C_{sc,i-1,j} + (1 - 2rD_{sc}) C_{sc,i,j} + rD_{sc} C_{sc,i+1,j} \quad (10)$$

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved} C_{ved,i-1,j} + (1 - 2rD_{ved}) C_{ved,i,j} + rD_{ved} C_{ved,i+1,j} \quad (11)$$



ここで、 $r$  は  $\Delta t/\Delta x^2$  を示す。また、式 (6) は差分法を用いると式 (12)、式 (7) は式 (13) で表すことができる。

$$J_j = -D_{skin} \frac{C_{n+1,j} - C_{n,j}}{\Delta x} \quad (12)$$

$$Q_j = Q_{j-1} + J_j \cdot \Delta t \quad (13)$$

ここで、 $n$  は皮膚の分割数を示す。 $J_j$  を以上の方法に従って表計算ソフト Microsoft® Excel を用いて計算した。なお、今回は  $n=10$  とした。また、計算では  $D_{skin} \cdot \Delta t/\Delta x^2$  が 0.5 以下となるように  $\Delta t$  を設定した。さらに、式 (13) から  $Q_j$  を求めた。拡散係数  $D_{sc}$  と  $D_{ved}$ 、分配係数  $K_{d/sc}$  と  $K_{sc/ved}$  は累積透過量  $Q_j$  の実測値を非線形最小二乗法を用いてカーブフィッティングすることにより算出した。最小二乗法の計算では表計算ソフト Microsoft® Excel 中のソルバー機能を用いた。ソルバーの条件としては、制限時間が 100 秒、反復回数が 100 回、精度が 0.000001、交差が 5%、収束が 0.001 であり、解の検索のアルゴリズムは準ニュートン法を用いた。

### C-2. 化学物質の透過係数の算出法

化学物質の透過係数は、C-1 で記載した、Fick の拡散第 2 式に基づく差分式を用いて、最小二乗法によりカーブフィッティングさせ算出した。一方、適用したバイオサイドの皮膚透過が一定時間経過後でも認められない場合は、適用バイオサイド濃度、レシーバー容量、有効透過面積、適用時間および各バイオサイドの定量限界を用いて算出した。

$$P' = \frac{C_{min} V}{ATC_0} \quad (12)$$

ここで、 $P'$  は透過係数、 $C_{min}$  は各バイオサイドの定量限界濃度、 $V$  はレシーバー容量、 $A$  は有効透過面積、 $T$  は適用時間、 $C_0$  は適用濃度を示す。

### C-3. 全身消失パラメータの算出

静脈内投与後の  $p$ -クレゾールの動態は線形 1-コンパートメントモデル式 (13) で示される。得られた血中濃度を式 (13) に当てはめ、非線形最小二乗法 (algorithm: Damping Gauss-Newton 法)<sup>12, 13)</sup>によりカーブフィッティングし、体内動態パラメータを算出した。

$$X = X_0 e^{-Kelt} \quad (13)$$

ここで、 $X$  は体内化合物量、 $X_0$  は投与量、 $Kel$  は消失速度定数、 $t$  は時間を示す。

### C-4. 皮膚刺激性の評価

バイオサイドによる刺激性を評価するために式 (14) より dead cell number (%) を算出した。

$$\begin{aligned} \text{Dead cell number (\%)} \\ = 100 - \left( \frac{\text{absorption}_{(sample)} \times 100}{\text{absorption}_{(control)}} \right) \end{aligned} \quad (14)$$

各適用濃度より得られた dead cell number (%) から Sigmoid E max model に従う以下の (15) 式に非線形最小二乗法を用いて fitting し、各パラメータを算出した。

$$I = \frac{I_{max} \times C^\gamma}{IC_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad (15)$$

$I$  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、 $IC_{50}$  は 50% 細胞刺激性発現濃度、 $\gamma$  は形状因子を示す。

## D 実験

### D-1. 試薬

ケロシン、 $p$ -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。

## D-2. 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、Fig. 3 に示したようなフランツ型拡散セル (有効透過面積  $0.64 \text{ cm}^2$ ) に挟み<sup>14)</sup>、表皮側に各バイオサイドの pH7.4 等張リン酸緩衝液 (PBS) またはケロシン溶液を適用し (レスメトリンは PBS への溶解度が低いためケロシンのみ適用)、真皮側には pH7.4 PBS を適用して *in vitro* 皮膚透過実験を行った。ダイアジノン適用時には、タンパクへの吸着などが懸念されたため、5% アルブミンをレシーバー溶液に添加し皮膚透過性の検討を行った。経時的にレシーバー側からサンプリングを行い、定法によりバイオサイドの皮膚透過量を測定した。P-クレゾールは 100 mM、ダイアジノンは 0.16 もしくは 16 mM、レスメトリンは 0.59 もしくは 5.9 mM を 0.5 mL 適用した。

## D-3. 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。

## D-4. 皮膚中濃度測定実験

皮膚透過実験で使用した皮膚の有効透過面積を切除、細断した。PBS を加え、氷冷下で電動ホモジナイザー (Polytron PT-MR 3000, Kinematica, Switzerland) を用いて、10,000 rpm, 3 min で、ホモジネートを作成した。作成したホモジネートは、定法により皮膚中濃度を測定した。

p-クレゾールは、ホモジネートをマイクロチューブに移し、遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) し、その上清をバイアルに集めた。一方、ダイアジノンとレスメトリン群はホモジ

ネートをバイアルに移し、同量の 2 ppm BHT 入りジクロロメタンを加え、振とうした<sup>15)</sup>。これをマイクロチューブに移し、遠心分離 (15,000 rpm, 10 sec, 4°C) した。下層のジクロロメタン層をバイアルに集めた。

## D-5. p-クレゾールの血中濃度の測定

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。採取した血液を遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) し、血漿を得た。

## D-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  $2 \times 10^4$  cells で播種後、5% CO<sub>2</sub> 下で fetal bovine serum の最終濃度が 10% となるよう調整した 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% CO<sub>2</sub> 下でインキュベートした。各薬物を吸引除去した後、PBS 100  $\mu\text{L}$  で洗い、MTT 培地を加え 5% CO<sub>2</sub> 下で 3 時間インキュベートした。MTT 培地を吸引除去し、100  $\mu\text{L}$  酸性イソプロパノールで 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。

## D-7. 定量法 (HPLC 分析)

皮膚透過実験と消失パラメータ算出実験で得られた p-クレゾールサンプルは、アセトニトリルと 1:1 で混和し、遠心分離した上清 20  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入した。同バイオサイド皮膚中濃度測定サンプルはジクロロメタン

層をそのまま注入した。また、皮膚透過実験と皮膚中濃度測定実験で得られたダイアジノンサンプルはクロロホルムと1:1で混和後、遠心分離し下層のクロロホルム層を別のチューブに移した後、窒素乾固を行いHPLC定量時の移動相を用いて再溶解させHPLCに注入した。HPLC分析に用いた移動相、検出波長は、以下の通りであった。

#### (HPLC条件)

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

*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、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。

#### D-8. バイオサイドの定量法 (GC/MS分析)

皮膚透過実験で得られたレスメトリンサンプルは、酸化防止剤BHT (2,6-Di-*t*-butyl-4-methylphenol) 入りメタノールと1:1で混和し、この混液0.5 mLに同量のジクロロメタンを加え、1分間振とう後、ジクロロメタン層をGC/MSに注入した。皮膚中濃度測定サンプルはジクロロメタン層をそのまま注入した。GC/MS分析に用いた移動相、検出波長は、以下の通りであった。

#### (GC/MS条件)

検出器：Agilent 6890N, 5973inert、カラム：HP-5MS (30 m  $\times$  0.25 mm ID、膜厚0.25  $\mu\text{m}$ )、注入方式：パルスドスプリットレス、2  $\mu\text{L}$ 、注入口温度：280°C、イオン源温度：230°C、四重極温度：150°C、カラム温度：50°C (2分)、40°C/分 $\rightarrow$ 170°C、6°C/分 $\rightarrow$ 300°C (2分)、内部標準物質：クリセン-d12、移動相：He (カラム流量1 mL/分)、検出法：選択イオ

ン検出、モニターイオン (m/z)：レスメトリン (123, 171)、クリセン-d12 (240, 223) なお、GC/MSによる測定は神奈川県衛生研究所の辻清美先生にお願いした。

## E. 結果及び考察

### E-1. 皮膚透過実験

角層を有する全層膜 (intact skin) を介する *p*-クレゾールの透過性はケロシン基剤を用いた方が、pH7.4 PBSを基剤として用いた場合と比較して高い値を示した。一方、角層を除去した皮膚 (stripped skin) を介した *p*-クレゾールの透過性は基剤の種類によらず同程度であった (Fig. 4)。これらを速度論解析した結果、基剤としてケロシンを用いた場合の  $K_{sc}$  および  $D_{sc}$  はそれぞれ、73、 $1.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、であり  $K_{ved}$  および  $D_{ved}$  はそれぞれ、3.1、 $5.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  であった。一方、PBSを基剤として用いた場合の  $K_{sc}$  および  $D_{sc}$  はそれぞれ、7.4、 $1.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、であり  $K_{ved}$  および  $D_{ved}$  はそれぞれ、2.8、 $6.3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  であった。これらの結果より、ケロシン基剤は、*p*-クレゾールの角層への分配性を著しく増加させることが分かった。

ダイアジノンおよびレスメトリンのラット皮膚透過性は、角層を有する全層膜 (intact skin) および角層を除去した皮膚 (stripped skin) どちらを介しても、ケロシン基剤およびpH7.4リン酸緩衝液 (PBS) を基剤の両方でダイアジノンの皮膚透過性は観察されなかった (data not shown)。これは、ダイアジノンおよびレスメトリンの *n*-オクタノール/水分係数が高く (Table 1)、皮膚中に貯留している可能性が考えられた。そこで、レシーバー液中への脂溶性物質の溶解度を上げるために4%アルブミン水溶液<sup>16)</sup>を用いて、同様な検討を行った。しかしながら、レシーバー溶液にダイアジノン、レスメトリンは確



認められなかった (data not shown)。そこで、式 (12) を用いて、両バイオサイドの透過係数を算出した結果、ダイアジノンが  $3.64 \times 10^{-10}$  cm/s 以下、レスメトリンが  $3.64 \times 10^{-9}$  cm/s 以下となることが推測された (Table 2)。この値は、角層剥離速度以下であることが分かった。これらの結果より、両バイオサイドは、真皮下部に移行しないか、皮膚上部に分配分布することで、皮膚中に高濃度貯留していることが示唆され、皮膚中濃度を測定する必要があると思われた。

## E-2. 皮膚中濃度

Table 3 に皮膚透過試験後の *p*-クレゾールの皮膚中濃度を調べた結果を示す。*p*-クレゾールの皮膚中濃度は、intact skin では、クロシン基剤を用いたときは 1.3 mM、PBS 基剤を用いたときの皮膚中濃度は 0.66 mM (適用量の 0.6%) であり、クロシンを基剤に用いた方が 2.0 倍高かった ( $P < 0.01$ )。一方、stripped skin に適用した場合は、クロシン基剤を用いたときは 0.64 mM、PBS 基剤を用いたときは 0.62 mM であり、油基剤と水基剤間で違いが見られなかった。これらの結果は、透過実験の結果と一致しており、皮膚中濃度の違いは、角層への *p*-クレゾールの分配性をクロシン基剤が著しく増加させたことによると考えられた。

ダイアジノンを 0.16 mM 適用した時の皮膚中濃度は、intact skin において、クロシン基剤もしくは PBS 基剤を用いた場合、それぞれ 7.1 (適用量の 4.4%) および 7.2  $\mu$ M (適用量の 4.5%) であった。さらに、16 mM のダイアジノンを皮膚に適用した場合は、34 (適用量の 0.2%) および 20  $\mu$ M (適用量の 0.1%) であった。一方、stripped skin に 0.16 mM のダイアジノンを適用した場合は、クロシン基剤を用いた場合は、7.2  $\mu$ M (適用量の

4.5%)、PBS 溶液を用いた場合は 6.3  $\mu$ M (適用量の 3.9%) であった。これらの結果より、ダイアジノンの皮膚移行性は低いことが分かった。

クロシン基剤にて調製した 0.2 mg/mL レスメトリン溶液を皮膚に適用した後の皮膚中濃度を調べた。Intact および stripped skin に適用した時の皮膚中濃度はそれぞれ 0.49  $\mu$ M、0.68  $\mu$ M であった。しかしながら、皮膚中に移行したレスメトリン量は適用したレスメトリン量の 1% にも相当しなかった。この結果から、レスメトリンは、皮内でエステラーゼにより代謝された可能性が考えられた。したがって、レスメトリン代謝物の皮膚透過性、皮膚中濃度や皮膚刺激性について検討する必要が考えられた。

皮膚に適用された化学物質による刺激性は、基本的にはその物質が持つポテンシャルとその作用部位への送達性によって決定される。本報告で用いたクロシン基剤は、*p*-クレゾールの皮膚への高い分配性を示し、低濃度の物質をも皮膚へ浸透しやすくなる可能性を示した。したがって、高い皮膚透過性の認められた *p*-クレゾールでは、全身毒性および皮膚刺激性について評価する必要があることが、分かった。

## E-3. *p*-クレゾールの消失パラメータ算出実験

*p*-クレゾールは高い皮膚透過性を示すことが明らかとなったため (Fig. 4)、経皮暴露した *p*-クレゾールが全身循環系へ移行する可能性が考えられた。そこで、*p*-クレゾールを Wistar 系雄性ラットの頸静脈に投与し消失速度定数を算出した。算出した結果を Table 4 に示す。算出した消失速度定数は、9.554 mL/s/kg であった。得られた値を用いた animal scale-up よりヒトの *p*-クレゾールの消



失パラメータを推測した結果<sup>17)</sup>、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： $1.6 \times 10^4$  cm<sup>2</sup>）がスプレー型殺虫剤（*p*-クレゾール：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  $3.8 \times 10^{-2}$  mM、損傷皮膚では  $5.0 \times 10^{-2}$  mM と、算出された。皮膚暴露量の推定には、対象とする化学物質が rins-off 製品であるか、leave-on 製品であるのかが重要となる。*p*-クレゾールの全身暴露後の血中濃度を予測した結果から推測すると、*p*-クレゾールの rinse-off 製剤では急性毒性はほとんどみられないが、leave-on 製剤では急性毒性を生じる可能性が考えられた。また、皮膚透過性の認められなかった、ダイアジノンとレスメトリンでは、全身循環系への移行が考えられないため、全身毒性はないと考えられた。

#### E-4. HDF を用いた MTT 試験

Figure 5 に3時間および12時間適用時の Emax model 解析結果を示す。

$IC_{50}$  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。この結果より、*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 *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。

全身循環系へ移行した *p*-クレゾールの細胞毒性について今回は検討していないが、*p*-クレゾールの血中濃度および HDF を用いた Emax model の解析結果より、健康皮膚もしくは損傷皮膚を介した場合には、全身暴露後の毒性は認められないと考えることができた。

#### F. 結論

1. バイオサイドの経皮暴露際の毒性発現部位の予測には、透過実験を行い透過係数の算出が有用である。透過係数が角層落屑速度よりはるかに大きい場合は経皮暴露した後、皮膚を浸透し全身循環に達する可能性がある。この際に毒性が懸念されるのは皮膚局所での刺激性と全身循環到達後の全身毒性・血中での毒性の発現である。

また、透過係数が落屑速度と同様もしくはそれ以下の場合は、皮膚への実質層を介した浸透はほとんど起きないもしくは、皮内に貯留していると考えられる。したがって、皮膚局所での毒性について検討する必要がある。

2. *In vitro* 皮膚透過性実験から、*p*-クレゾールは皮膚を透過し全身循環に達する可能性があるが、ダイアジノンとレスメトリンは皮膚を透過しないことが明らかとなった。

3. 特に、rinse-off 製剤であれば、推定した

ヒトの最大血中濃度からみて、ダイアジノンとレスメトリンの全身毒性はないと考えられた。

4. *p*-クレゾールの rinse-off 製剤では全身毒性はほとんどみられないが、leave-on 製剤では全身毒性の可能性があると思われた。
5. *p*-クレゾールとダイアジノンの基剤から皮膚への分配率は比較的高い（それぞれ 0.6、0.2%）が、Hill 式による解析から、皮膚刺激性はほとんど見られないことが示唆された。

#### 参考文献

- 1) 宮本純之 編集、新しい農薬の科学—食と環境の安全をめざして—、廣川書店、東京、1993
- 2) Luty S., Latuszynska J., Halliop J., Tochman A., Obuchowska D., Przylepa E., Korczak E., Toxicity of dermally applied alpha-cypermethrin in rats, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 5, 109-116 (1998).
- 3) Hieda Y., Tsujino Y., Xue Y., Takatama K., Fujihara J., Kimura K., Dekio S., Skin analysis following dermal exposure to kerosene in rats: the effects of postmortem exposure and fire, *Int. J. Legal Med.*, 118, 41-46 (2004).
- 4) Lu C., Barr D. B., Pearson M., Bartell S., Bravo R., A longitudinal approach to assessing urban and suburban children's exposure to pyrethroid pesticides, *Environ. Health Perspect.*, 114, 1419-1423 (2006).

5) Leng G., Berger-PreiB E., Levsen K., Ranft K., Sugiri D., Hadnagy W., Idel H., Pyrethroids used indoor-ambient monitoring of pyrethroids following a pest control operation, *Int. J. Hyg. Environ.-Health*, 208, 193-199 (2005).

6) Nielsen J. B., Percutaneous penetration through slightly damaged skin, *Arch. Dermatol. Res.*, 296, 560-567 (2005).

Ref#001 B. W. Barry, *Dermatological Formulations*, Marcel Dekker, New York (1983), 95-126.

7) R. J. Scheuplein, Mechanism of percutaneous absorption I. Routes of penetration and the influence of solubility, *J. Invest. Dermatol.*, 45, 334-347 (1965).

8) Watanabe, T., Hasegawa, T., Takahashi, H., Ishibashi, T., Takayama, K., Sugibayashi, K.: Utility of three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin permeation of drugs. *Altern. Animal Test. Experiment.*, 8: 1-14, 2001.

9) Morimoto, Y., Hatanaka, T., Sugibayashi, K., Omiya, H.: Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin, *J Pharm Pharmacol.*, 44: 634-639, 1992.

10) 杉林堅次、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曝露と安全性問題のあり方、FRAGRANCE JOURNAL 36, p38-41

11) N. Hada, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Sugibayashi, Cultured skin loaded



with tetracycline HCl and chloramphenicol as dermal delivery system: mathematical evaluation of the cultured skin containing antibiotics. *J Control Release* 108(2-3) (2005) 341-350.

12) 山岡清, 谷川原俊介, マイコンによる薬物速度論入門, 南江堂, 東京, 1983: 91-112

13) K. Yamaoka, S. Tanigawara, T. Nakagawa, T. Uno, A pharmacokinetics analysis program (MULTI) for microcomputer, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 1981: 4: 879-885

14) Y. Obata, K. Takayama, Y. Maitani, Y. Machida, T. Nagai, Effect of pretreatment of skin with cyclic monoterpenes on permeation of diclofenac in hairless rat. *Biol Pharm Bull* 16(3) (1993) 312-314.

15) Bouchard M., Carrier G., Bronet R. C., Dumas P., Noisel N., Biological monitoring of exposure to organophosphorus insecticides in a greenhouse workers, *Ann. Occup. Hyg.*, 50, 505-515 (2006).

16) Scott R. C., Ramsey J. D., Comparison of the in vivo and in vitro percutaneous absorption of a lipophilic molecule (cypermethrin, a pyrethroid insecticide), *J. Invest. Dermatol.*, 89, 142-146 (1987).

17) H. Tang, A. Hussain, M. Leal, M. Mayersohn, E. Fluhler, *Drug Metab Dispos* 35, 1886-1893 (2007).

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 杉林堅次(2007):3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた薬物の皮膚透過性および皮膚刺激性評価 動物実験代替法確立に向けて. *薬剤学* 67:89-95.

2)杉林堅次(2007):化粧品分野における動物実験代替法の現状と課題:培養細胞を用いた皮膚刺激性評価. *Fragrance Journal* 327.24-26

3)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 秀人、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



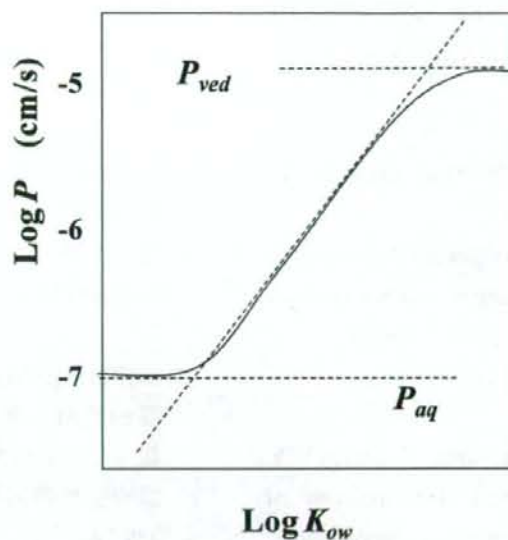


Fig. 2 Relationship between  $\log P$  and  $\log K_{o/w}$ .

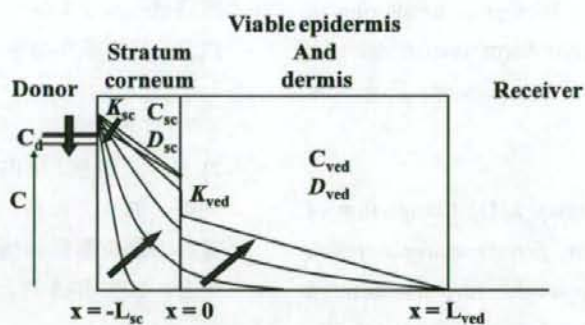


Fig. 2 A typical concentration-distance profile of *p*-cresol in the hairless rat skin permeation experiment (two-layered diffusion model).

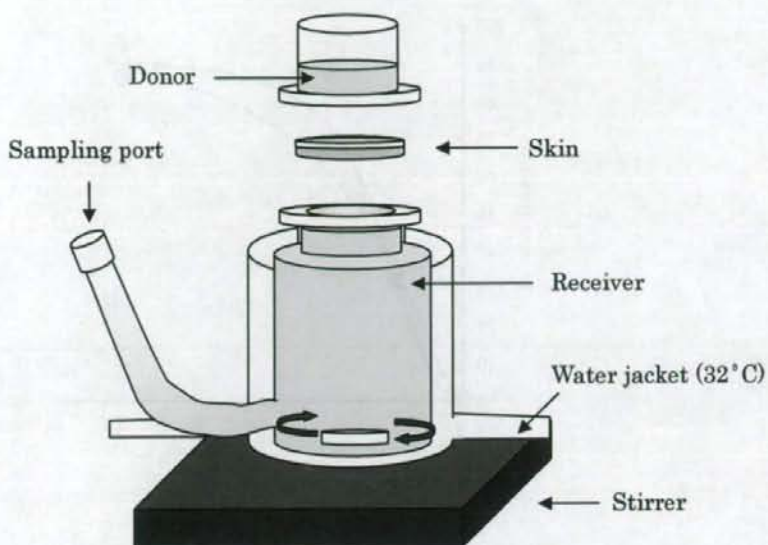


Fig.3 Experimental set-up for *in vitro* skin permeation

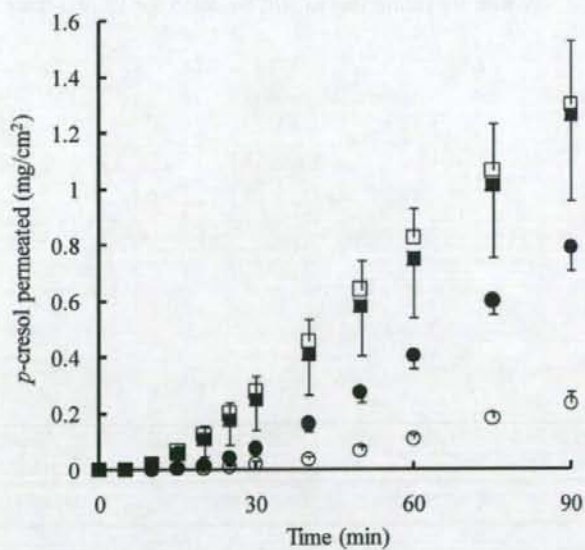


Fig.4 Permeation profile of *p*-cresol that permeated through hairless rat skin. Symbols: (●), Kerosene-intact skin; (○), PBS-intact skin; (■), Kerosene-stripped skin; (□), PBS-stripped skin. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3-4)



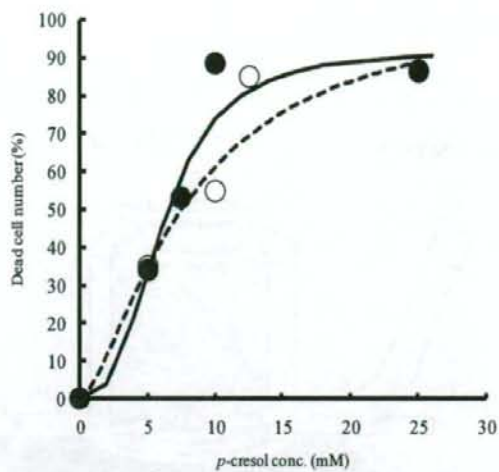


Fig. 5 Dose-response curve for percent of dead cell number in the MTT assay and *p*-cresol concentration applied (mM)

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.