

Table 1 Physicochemical properties of biocides


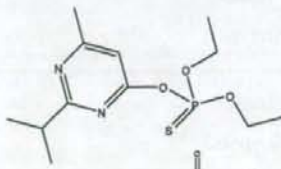
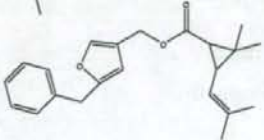
一般名	構造式	分子式 (M.W.)	m.p. (°C)	b.p. (°C)	log <i>K</i> _{o/w}
<i>p</i> -Cresol		C ₇ H ₈ O (108.1)	34.8	201.8	1.94
Diazinon		C ₁₂ H ₂₁ O ₃ N ₂ PS (304.4)	—	120	3.11
Resmethrin		C ₂₂ H ₂₆ O ₃ (338.5)	43-48	—	3.46

Table 2 Permeability coefficient of biocides through excised hairless rat skin

Biocides	Solvent	Membrane	Permeability coefficient (cm/s)
<i>p</i> -Cresol	Kerosene	Intact	$1.98 \times 10^{-5} \pm 1.42 \times 10^{-6}$
		Stripped	$2.62 \times 10^{-5} \pm 2.23 \times 10^{-6}$
	PBS	Intact	$5.30 \times 10^{-6} \pm 1.85 \times 10^{-6}$
		Stripped	$2.57 \times 10^{-5} \pm 2.86 \times 10^{-6}$
Diazinon	Kerosene	Intact	$< 3.64 \times 10^{-10}$
		Stripped	
	PBS	Intact	$< 4.37 \times 10^{-8}$
		Stripped	
Resmethrin	Kerosene		$< 3.64 \times 10^{-9}$
	PBS		---

Table 3 Skin concentration of biocides after topical application in hairless rat

Biocides	Solvent	Membrane	Donor conc. (mM)	Skin conc. (mM)
<i>p</i> -Cresol	Kerosene	Intact	100	1.3
		Stripped		6.4×10^{-1}
	PBS	Intact		6.6×10^{-1}
		Stripped		6.2×10^{-1}
Diazinon	Kerosene	Intact	0.16	7.1×10^{-3}
		Stripped		3.5×10^{-3}
	Kerosene	Intact	1.6	3.4×10^{-2}
		Stripped		2.0×10^{-2}
	PBS	Intact	0.16	2.0×10^{-3}
		Stripped		2.0×10^{-3}
Resmethrin	Kerosene	Intact	0.59	6.8×10^{-4}
		Stripped		4.9×10^{-4}
	Kerosene	Intact	5.9	3.5×10^{-3}
		Stripped		3.1×10^{-3}
	PBS	---	---	---
		---		---

Table 4 Pharmacokinetics parameters of *p*-cresol after intravenous administration in rat

X_0 (mg)	2.5
V (mL)	236.6
k_{el} (1/s)	0.0095
CL_{tot} (mL/s)	2.245
Weight (kg)	0.24

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 CES 1、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-末端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碎後、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°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°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, Tefulthrin)、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な 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示された。

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ドイロでは、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 Paraoxonase1 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.

Satoh 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關与するヒト 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

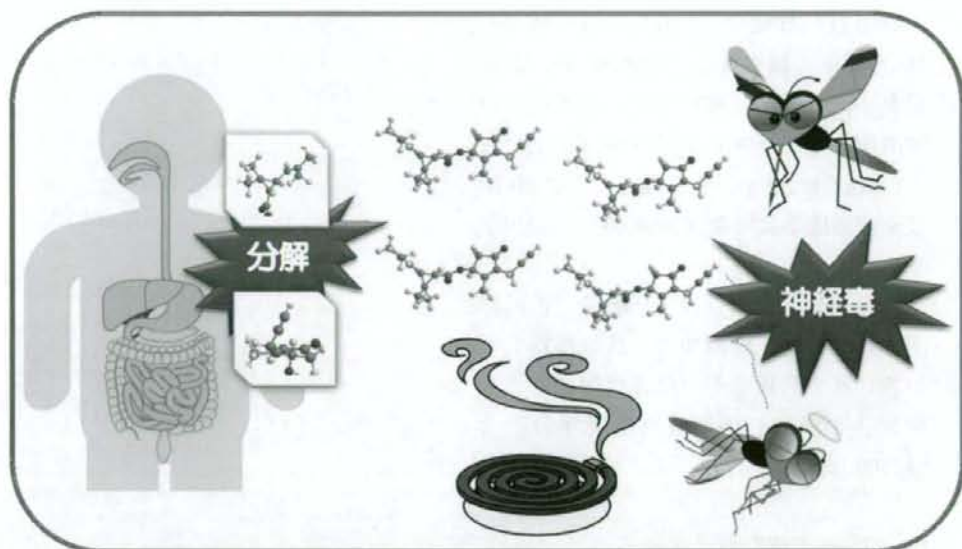
なし

H.2 実用新案登録

なし

H.3 その他

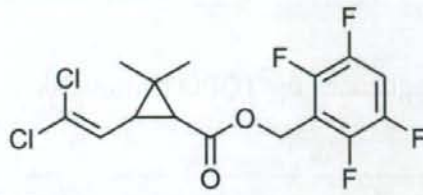
平成 20 年度室内環境学会総会にてポスター賞受賞



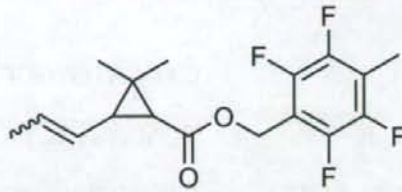
Schema 1

Mechanism of selective toxicity of pyrethroids between mammals and insects.

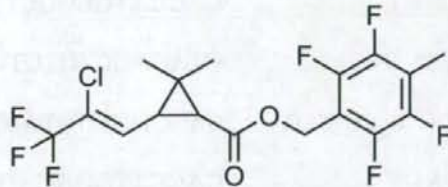
Transfluthrin



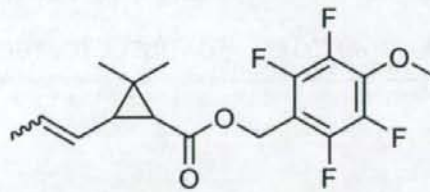
Profluthrin



Tefluthrin



Metofluthrin



trans-Permethrin

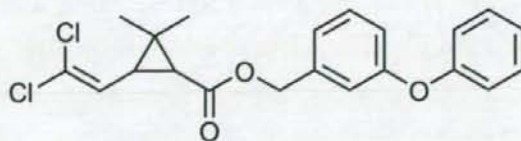


Fig. 1

Chemical structure of pyrethroid insecticides examined in this study.

Table 1 Primer sequences for TOPO Cloning®.

Reactions	Primer Name	Sequences (5' ---- 3')
Topo cloning		
	CES1_F	CACCATGTGGCTCCGTGC
	CES1_R	TCACAGCTCTATGTGTTCTGTCTGG
	CES1_R_del_TGG	CAGCTCTATGTGTTCTGTCTGGG
	CES2_F	CACCATGCGGCTGCACAG
	CES2_R	CTACAGCTCTGTGTGTCTCTCTTCAG
	CES2_R_del_TAG	CAGCTCTGTGTGTCTCTCTTCAGG
	CES3_F	CACCATGGAGAGAGCAGTGAGAGT
	CES3_R	TCAGAGGTCCTCCTGGGCC
	CES3_R_del_TGA	GAGGTCCTCCTGGGCCTTC

Table 2 Primer sequence for sequencing reaction.

Reactions	Primer Name	Sequences (5' ---- 3')
Sequencing		
	M13_F	GTAAAACGACGGCCAG
	M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC
	CES1_F_515	TGGGCATCTGGGGATTCTT
	CES1_F_1146	GAAGTCCTATCCCCTTGTTTGC
	CES1_R_624	AAAGCTGGCAATGTTGTCCTG
	CES1_R_1215	TCCTCCTAAGTATTTCTCAGTGGC
	CES2_F_545	CCATGTCTGAGGACTGCCTGTA
	CES2_F_1264	GATACCCAGAAGGAAATGGACAG
	CES2_R_623	ACCATCACCGGCAGGTTAGA
	CES2_R_1359	CAGCAGGTCACCAAATGTAGGA
	CES3_F_500	CCTATGGGGATGTGGTCGTG
	CES3_F_1152	CCCTGAGATGATGCCACC
	CES3_R_620	CGCAAAGCAGCTACCACATCTA
	CES3_R_1213	TGGCTTGTGCGTCCGAGT



Fig. 2

The protein expression of human CESs in HEK293 cells.

Immunoblot analysis of whole cell lysates from HEK293 cells transiently transfected with hCES1(1), hCES2(2) and hCES3(3) using anti-V5 antibody.

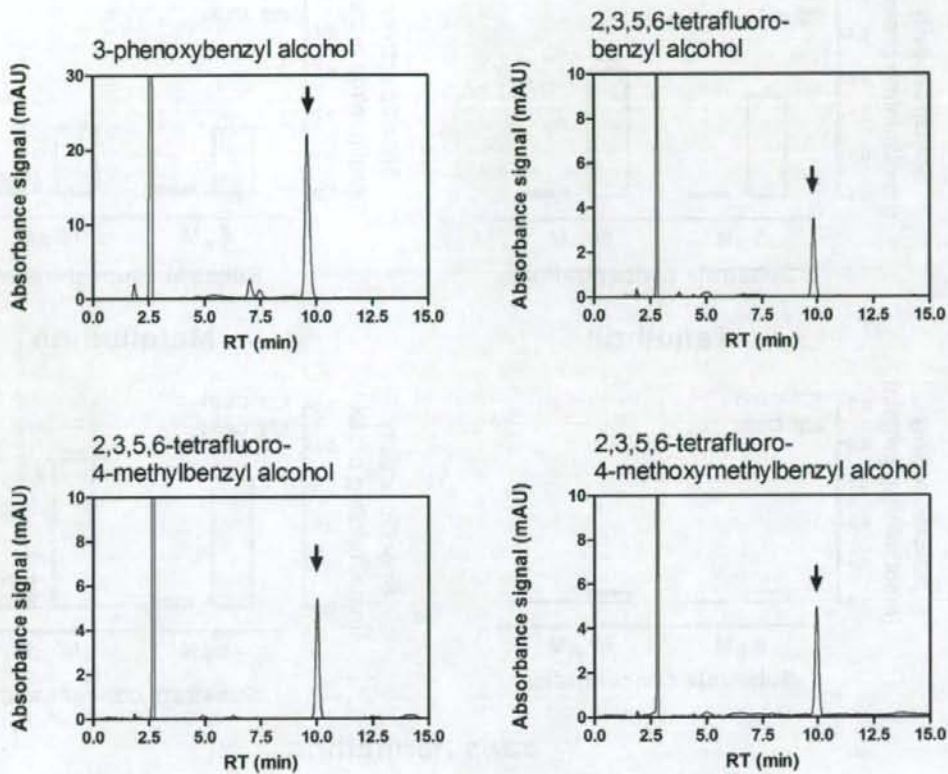


Fig. 3

HPLC chromatograms of each standard of pyrethroid metabolites.

3-phenoxybenzyl alcohol; a metabolite of trans-permethrin,

2,3,5,6-tetrafluoro benzyl alcohol; a metabolite of transfluthrin,

2,3,5,6-tetrafluoro-4-methylbenzyl alcohol; a metabolite of profluthrin and tefluthrin,

2,3,5,6-tetrafluoro-4-methoxymethylbenzyl alcohol; a metabolite of metofluthrin

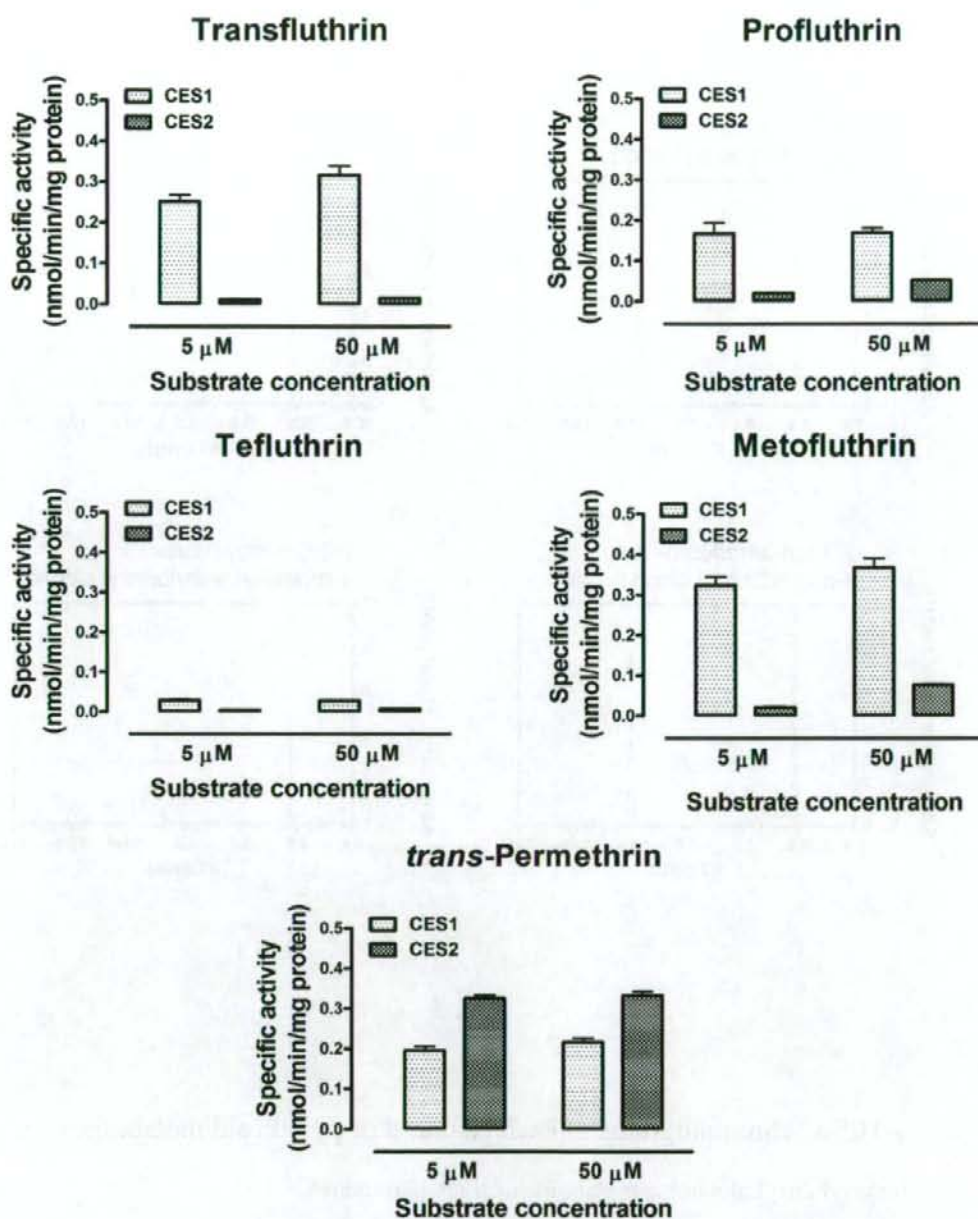


Fig. 4

Hydrolysis of fluorine-containing aromatic pyrethroids by human carboxylesterases.

Table 3 Information for human tissue samples for mRNA expression analysis.

Tissue	Age(years)	Sex	Lot No. ¹⁾
Liver	27	Male	A602007
	25	Male	A602008
	28	Male	A602009
	26	Male	A602010
	23	Male	A602011
Lung	24	Male	A509146
	27	Male	A509229
	29	Male	A509252
	24	Male	A807178
	24	Male	A807179
Skin	44	Male	A603413
	41	Male	A711139
	46	Female	A712006
	35	Female	A712007
	40	Female	A911206
Small-Intestine	24	Male	A606105
	26	Male	A607025
	29	Male	A607026
	28	Male	A607027
	28	Male	A607028

¹⁾ Total RNA from human adult normal tissues purchased from BioChain Institute, Inc. CA, USA.

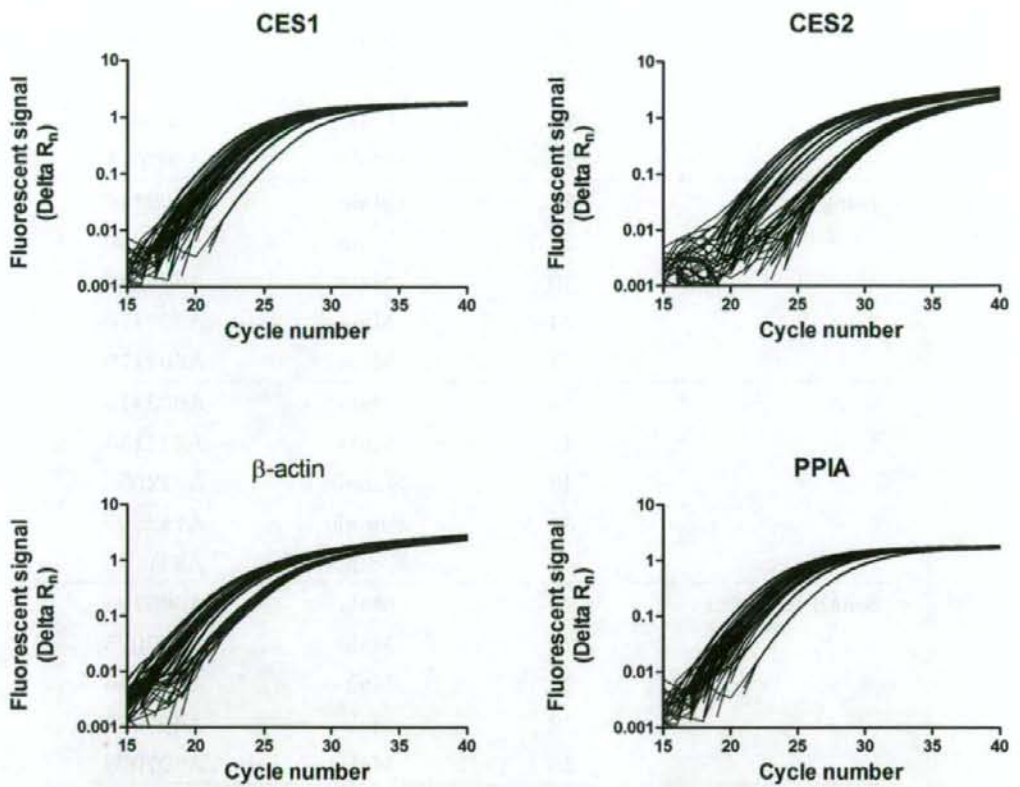


Fig. 5

Real-time kinetics of gene-specific TaqMan® real-time RT-PCR.