

た。キャリアガスには He を用い、流量は 1 ml/min に設定した。注入口、トランスファーラインおよびイオンソース温度はそれぞれ 230、280、250°C に設定し、スプリットレスモードで試料溶液 1 µl を注入した。カラムオープン温度プログラムは、初期温度 60°C で 2 分間保持した後、310°C まで 20°C/min で昇温させ、310°C で 10 分間保持した。イオン化法は Electron Ionization (EI) 法、イオン化電圧は 70 eV とした。測定は Selected Ion Monitoring (SIM) モードにて行った。各 PAEs の定量・定性イオン等については表 1 に記した。

検量線は 0.01~1.0 µg/ml (DINP は 0.1~2.0 µg/ml) の範囲で直線を示し、実験操作ブランク試料からは DBP および DEHP が 0.01 µg/ml 以下で検出された。その為、今回は 0.01 µg/ml (DINP は 0.1 µg/ml) を定量下限とした。

C. 結果および考察

C.1. 作製した PVC シートの特徴

予備試験によって得られた PVC シートの厚み測定の結果を表 3 に示した。0.3 mm 作製条件であったが、全体的に 0.3 mm よりも厚くなる傾向を示した。しかしながら、各シートの変動係数は小さく全体の厚みのばらつきは非常に小さかった。

次に、予備試験にて作製した PVC シート中の PAEs 濃度について表 4 に示した。PVC シートの作製時の PAEs の配合割合は 28% であったが、作製後の PVC シート中の PAEs の濃度はそれよりも少し低い値となった。その変動係数は小さく、PVC シート中の PAEs は均一に分布している

と考えられた。また、練り時間の影響については、DEHP の 3 および 6 分で濃度には殆ど差は無かった。また、PVC シート作製時の PAEs 汚染の有無について、DEHP 含有シートを作製した直後に作製した DNOP 含有シートを分析したところ、GC/MS のクロマト上に定量下限以上で DEHP のピークが確認されることは無く、作製時の汚染の影響は無視できると判断された。一方、DBP については沸点が低いため、175°C ではロールで混合していく過程で揮発してしまい、シートの作製は出来なかったが、最終的には温度条件を変更することで PVC シートの作製が可能であった。

予備試験の結果を参考に、DEHP、DBP および DINP を単独、もしくは混合して含有する PVC シートを作製した。それらの作製時の条件について表 4 に記した。なお、作製したシートは全て GC/MS にて測定して値付けした (表 5)。

C.2. PVC シートから皮膚表面への PAEs 移行量

C.2.1. 皮膚表面の PAEs バックグラウンド濃度および予備試験

DEHP、DBP および DINP は家庭用品中に多く含まれており、実験室環境にも容易に存在している可能性がある。その為、移行量を試験する際に、バックグラウンド値としてそれらがどれくらい存在するか、試験中に汚染が生じないかを確認しておく必要がある。また、PAEs は PVC ポリマーと化学結合をしておらず、容易に PVC シート表面へと浮き出てくることが予想され、それが皮膚以外のどのよう

な表面でも単純移行するののかも検討する必要がある。

そこで、それらの確認のため DNOP 含有 (25%) シートを、清浄なアルミ箔表面、エタノールにより皮脂を拭き取った皮膚表面、および通常の皮膚表面の 3 条件で 15 分間接触させ移行量を測定した (図 1)。なお、本文および図では PVC シート中の PAEs 濃度を作製時の配合割合で表記する (実際の含有量は表 4 および 5 を参照)。まず、汚染の有無については、DINP は検出されず、DBP および DEHP が検出されたが、DBP については定量下限値以下であった。また、DEHP については試験全体を通してコントロール試料から低濃度で検出されたが、移行量試験の結果に影響を与える濃度ではなく、試験全体で $0.054\sim 0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。CTEPP では DBP および BeBP についてのみ皮膚表面のふき取り調査を行っているが、²⁰⁾ 今回の DEHP の値はそれらよりも 10~100 倍程度高い濃度であった。これは、PAEs の中で DEHP が最も使用されているため、³⁰⁾ そのバックグラウンド値が高くなったと考えられた。

移行試験では、アルミ箔表面には殆ど移行せず、皮脂ふき取り後の皮膚では若干増加したが、通常の皮膚とはその移行量に大きな差が認められた。その為、DNOP が単純に移行することはなく、皮膚表面の皮脂が PAEs の移行に大きく影響すると示唆された。

C.2.2. 皮膚への接触時間と移行量との関係性の検討

DEHP 含有 (28%) PVC シートを用い

て接触時間と皮膚への移行量との関係を検討した。まず、通常の日常生活を考慮して接触時間を 2 分から 30 分までとしてその移行量を調べた。その際、接触時間 4 分でいったん低下しているものの、ばらつきが大きく全体として特に差は無く、接触時間に応じた PAEs 移行量変化は認められなかった (図 2 : 左)。これは PVC 表面に浮き出てきている DEHP の量が多いため、PVC シートが皮膚に接触して直ちに、皮脂との間で平衡状態に達している可能性が考えられた。また、PVC ポリマー内部から徐々に表面へと PAEs が移行し、その後、皮膚表面へと移行するにはある程度の時間が必要と考えられるため、皮膚との接触を長時間 (60~360 分) 行ってその移行量を調べた (図 2 : 右)。その結果、短時間の試験時と同様に接触時間に応じた移行量の変化は認められなかった。

次に、皮膚への移行量について個人差の有無を検討するために、被験者 B に対して同様に 2~30 分まで試験を行った。その結果、被験者 B では A に比べて移行量が全体的に低い傾向が認められた (図 3)。一方、接触時間に応じた DEHP 移行量の変化は被験者 A と同様に認められなかった。被験者間の移行量の差異はそれぞれの皮膚表面の環境条件、特に皮脂量が関係しているものと考えられた。

C.2.3. PAEs 含有率の異なる PVC シートからの移行量の検討

各 3 段階の PAEs 濃度の PVC シートを皮膚との接触時間を 30 分として、その移行量を検討した (図 4)。その結果、どの

PAEs についても、15%ではその他の含有率と比べて移行量が低い傾向が認められた。一方、28%と 37%ではほとんど差は無かった。この原因として、PAEs 含量28%以上ではPVCシート表面に浮き出ている PAEs の量が多く、PAEs が接触とともにすぐに移行して皮脂との間で平衡状態に達している可能性や、PVC の可塑性が向上することにより皮膚への接触がしやすくなったことなどが考えられた。

また、DEHP 含量の低い (15%) PVC シートを用いて2~30分まで皮膚に接触させその移行量を調べたところ、時間の経過に伴い皮膚表面への移行量が増加する傾向が認められた (図 5)。この2つの濃度の実験は別々の日に行っており、同一被験者であっても皮膚条件に多少の差異が生じていることを考慮しなければならないが、おそらく DEHP を 15%含有する PVC シートはその表面に DEHP があまり浮き出していないことや、高い含有率の PVC シートの方が可塑性が高く皮膚に接触しやすいことなどから、このような結果になったと推察された。

C.2.4. 2種類の PAEs を含有する PVC シートからの移行量の検討

DEHP に対して DBP および DINP を混合した PVC シートを用いて、異なる2種類の PAEs が共存する際の皮膚への移行量を接触時間 30 分で検討した (図 6)。この結果を、図 4 に示した結果と比較したいが、実験日が異なるために皮膚表面の条件が同一ではなく単純比較が出来ない。そこで、PAEs を 28%含有する PVC シートの結果を基準にして検討した。まず、

DEHP では単独配合時には 15%と 28%との移行量の差は 1.7 倍であったが、DBP との混合時ではその差は 1.5 倍、DINP とでは 1.3 倍と若干混合時の方が皮膚への移行性が上がっている結果となった。DBP では、単独配合時には 9.7 倍の差があったが、DEHP との混合時には 2.1 倍とその差が小さくなり、明らかに混合時の方が皮膚表面への移行性が高くなっていた。DINP についても同様に、単独配合時では 3.2 倍であったのに対して、DEHP との混合時には 1.9 倍とやはり混合時の方が皮膚表面への移行性が高くなった。これは、各 PAEs 濃度が低くても混合することで PAEs 総量は多くなり、そのため PVC シートの可塑性が向上し皮膚表面により接触しやすいためと考えられた。また、PVC ポリマー中の総 PAEs 濃度が高いと PVC ポリマー中から表面へと移行しやすくなり、結果として皮膚表面への移行量が増加すると推察された。

D. まとめ

本研究では PVC 製品から皮膚表面への PAEs 移行量の定量的評価手法について検討を行った。まず、皮膚表面への移行試験に用いることのできる PVC シートの作製を行い、実験に十分に用いることのできるシートを作製することが出来た。そしてそれらの PVC シートを用いて実験を行い、シートから皮膚表面に PAEs が移行すること、総 PAEs 含有率によりその移行傾向に違いが認められること、それがシートの可塑性に起因する可能性があることを明らかにした。また、PAEs の皮膚表面への移行には、PVC シート側だけでは

なく皮膚側の条件、特に皮脂が重要であることが示唆された。今後、皮脂量を測定しその値で PAEs の移行量を標準化することで、PAEs の皮膚への移行量を定量的に評価出来るものと考えている。

E. 研究発表

E.1. 論文発表

- 1) 伊佐間和郎, 家庭用品に使用される化学物質による重大製品事故 (平成 19 年度及び 20 年度), *国立衛研報*, **127**, 69-73, 2009
- 2) 伊佐間和郎・河上強志・土屋利江・松岡厚子, キャピラリー電気泳動法による家庭用品塗膜の鉛溶出量調査, *生活衛生*, **54**, 27-32, 2010
- 3) 河上強志・伊佐間和郎・中島晴信・大嶋智子・土屋利江・松岡厚子, ガスクロマトグラフィー質量分析法による水性塗料及び水性接着剤中の有機スズ化合物の分析, *薬学雑誌*, **130**, 223-235, 2010

E.2. 学会発表

- 1) 伊佐間和郎・河上強志・土屋利江・松岡厚子, 鉛含有金属製品の溶出試験方法の比較, 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会, 盛岡, 2009 年 11 月
- 2) 伊佐間和郎, 家庭用品に使用される化学物質による重大製品事故, 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会, 盛岡, 2009 年 11 月
- 3) 河上強志・伊佐間和郎・中島晴信・土屋利江・松岡厚子, 繊維製品中に含有するアゾ染料由来の芳香族アミン類の実態調査, 第 46 回全国衛生化学技術協

議会年会, 盛岡, 2009 年 11 月

- 4) 河上強志・伊佐間和郎・大嶋智子・中島晴信・土屋利江・松岡厚子, 水性塗料ならびに接着剤中の有機スズ化合物の分析, 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会, 盛岡, 2009 年 11 月
- 5) 松岡厚子・児玉幸夫・吉田緑・中嶋富士雄・伊佐間和郎・松田良枝・西川秋佳, 家庭用品に使用されるナノ材料の安全性評価, 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会, 盛岡, 2009 年 11 月
- 6) 伊佐間和郎・河上強志・土屋利江・松岡厚子, キャピラリー電気泳動法による家庭用品塗膜の鉛溶出量調査, 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月
- 7) 河上強志・伊佐間和郎・中島晴信・土屋利江・松岡厚子, 繊維製品中に含有されるアゾ染料由来の芳香族アミン類の試買調査, 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月
- 8) 松岡厚子・児玉幸夫・吉田緑・中嶋富士雄・伊佐間和郎・西川秋佳, ナノシリカおよびナノ銀の安全性評価, 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 引用文献

- 1) 金澤文子・岸玲子, 半揮発性有機化合物による室内汚染と健康への影響,

- 日衛誌, **64**, 672-682, 2009
- 2) 杉田たき子・河村葉子・谷村雅子・松田えり子・新野竜大・石橋亨・平林尚之・松木容彦・山田隆・米谷民雄, 乳幼児用軟質ポリ塩化ビニル製玩具からのフタル酸エステル曝露量の推定, *食衛誌*, **44**, 96-102, 2003
 - 3) Matsumoto M., Koizumi-Hirata M., Ema M.: Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **50**, 37-49, 2008
 - 4) Lyche J.L., Gutleb A.C., Bergman Å., Eriksen G.S., Murk A.J, Ropstad E., Saunders M., Skaare J.U.: Reproductive and developmental toxicology of phthalate, *J. Toxicol. Environ. Health, Part B*, **12**, 225-249, 2009
 - 5) Tmonari Y., Kurata Y., David R.M., Gans G., Kawasuso T., Katoh M.: Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on genital organs from juvenile common marmosets: I. Morphological and biochemical investigation in 65-week toxicity study, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, **69**, 1651-1672, 2006
 - 6) Harris C.A., Henttu P., Parker M.G., Sumpter J.P.: The Estrogenic activities of phthalate esters in vitro, *Environ. Health Perspect.*, **105**, 802-822, 1997
 - 7) Koch H.M., Bolt H.M., Preuss R., Angerer J.: New metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral dose of deuterium-labelled DEHP, *Arch. Toxicol.*, **79**, 367-376, 2005
 - 8) European Union: Directive 2005/84/EC of the European parliament and of the council of 14 December 2005, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:344:0040:0043:EN:PDF>
 - 9) 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会器具・容器包装部会, おもちゃの規格基準の改正並びに器具及び容器包装の規格基準の改正について (案), <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/06/dl/s0608-8b.pdf>
 - 10) Deisinger P.J., Perry L.G., Guest D.: In vitro percutaneous absorption of [¹⁴C]DEHP from [¹⁴C]DEHP-plasticized polyvinyl chloride film in male Fischer 344 rats, *Food Chem. Toxicol.*, **36**, 521-527, 1998
 - 11) Scott R.C., Dugard P.H., Ramsey J.D., Rhodes C.: In vitro absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin, *Environ. Health Perspect.*, **74**, 223-227, 1987
 - 12) Medeiros A.M., Devlin D.J., Keller L.H., Evaluation of skin sensitization response of dialkyl (C6-C13) phthalate esters, *Contact Dermatitis*, **41**, 287-289, 1999
 - 13) Chowdhury M.M.U., Statham B.N.: Allergic contact dermatitis from dibutyl phthalate and benzalkonium chloride in Timodine[®] cream, *Contact Dermatitis*, **46**, 57, 2002
 - 14) 今井康之・近藤あゆみ・黒羽子孝太, 接触皮膚炎におけるフタル酸エステルのアジュバンド効果, *アレルギー科*, **18**, 175-180, 2004

- 15) Sato K., Imai Y., Irimura T.: Contribution of dermal macrophage trafficking in the sensitization phase of contact hypersensitivity, *J. Immunol.*, **161**, 6835-6844, 1998
- 16) Takano H., Yanagisawa R., Inoue K., Ichinose T., Sadakane K., Yoshikawa T.: Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances atopic dermatitis-like skin lesions in mice, *Environ. Health Perspect.*, **114**, 1266-1269, 2006
- 17) Niino T., Ishibashi T., Itho T., Sakai S., Ishiwata H., Yamada T., Onodera S.: Monoesters formation by hydrolysis of dialkyl phthalate migrating from polyvinyl chloride products in human saliva, *J. Health Sci.*, **47**, 318-322, 2001
- 18) 大嶋智子・野田勉, 乳幼児繊維製品のプリント部分に含まれるフタル酸エステル類の人工だ液への溶出, 第5回環境ホルモン学会研究発表会講演要旨集, 127, 2002
- 19) Niino T., Asakura T., Ishibashi T., Itoh T., Sakai S., Ishiwata T., Yamada T., Onodera S.: A simple and reproducible testing method for dialkyl phthalate migration from polyvinyl chloride products into saliva simulant, *J. Food Hyg. Soc., Japan*, **44**, 13-18, 2003
- 20) U.S. EPA.: A pilot study of children's total exposure to persistent pesticides and other persistent organic pollutants (CTEPP), <http://cfpub.epa.gov/ordpubs/nerlpubs/recordisplay.cfm?deid=61972>
- 21) 新野竜大・石橋亨・伊藤武・坂井千三・杉田たき子・石橋肇・山田隆・小野寺祐夫, ポリ塩化ビニル製玩具中の可塑剤フタル酸エステル類の分析: 1998年以降の市販品含有量調査, *日食化誌*, **8**, 194-199, 2001
- 22) 杉田たき子・平山クニ・新野竜大・石橋亨・山田隆, ポリ塩化ビニル製玩具中のフタル酸エステル含有量, *食衛誌*, **42**, 48-55, 2001
- 23) 阿部有希子・杉田たき子・和久井千世子・新野竜大・四方田千佳子・石橋肇・棚元憲一・米谷民雄, 軟質玩具の表示およびポリ塩化ビニル製品中の可塑剤の調査, *食衛誌*, **44**, 168-174, 2003
- 24) 大嶋智子・野田勉, 乳幼児繊維製品のプリント部分に含まれるフタル酸エステル類, 第39回全国衛生化学技術協議会年会講演要旨集, 182-183, 2002
- 25) 岡尚男・伊藤裕子・後藤智美・猪飼誉友・近藤文雄・松本浩・牧野恒久・中澤裕之, GCおよびGC/MSによる文具、化粧品、家庭用品等に含まれる可塑剤フタル酸及びアジピン酸エステル類の分析, *日食化誌*, **11**, 106-110, 2004
- 26) 中島晴信・陰地義樹, 市販塩化ビニル製品に使用されている可塑剤の実態調査, *大阪府立公衛研所報*, **43**, 31-37, 2005
- 27) 河村葉子・六鹿元雄・和久井千佳子・棚元憲一, ポリ塩化ビニル中のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)及びフタル酸ジイソノニル試験法, *日食化誌*, **9**, 101-106, 2002
- 28) Haishima Y. Matsuda R., Hayashi Y.,

Hasegawa C., Yagami T., Tsuchiya T.:
Risk assessment of
di(2-ethylhexyl)phthalate released from
PVC blood circuits during hemodialysis
and pump-oxygenation therapy, *Int. J.*
Pharm., **274**, 119-129, 2004

- 29) 日本薬学会, フタル酸ジ (2-エチルヘ
キシル) およびフタル酸ジイソノニ
ルの定性および定量, 衛生試験法・要
説 2005 年版, 日本薬学会編, 金原出
版, 東京, 227-228, 2006
- 30) 可塑剤工業会, 可塑剤の種類,
[http://www.kasozai.gr.jp/kurasi/kurasi03
.html](http://www.kasozai.gr.jp/kurasi/kurasi03.html)

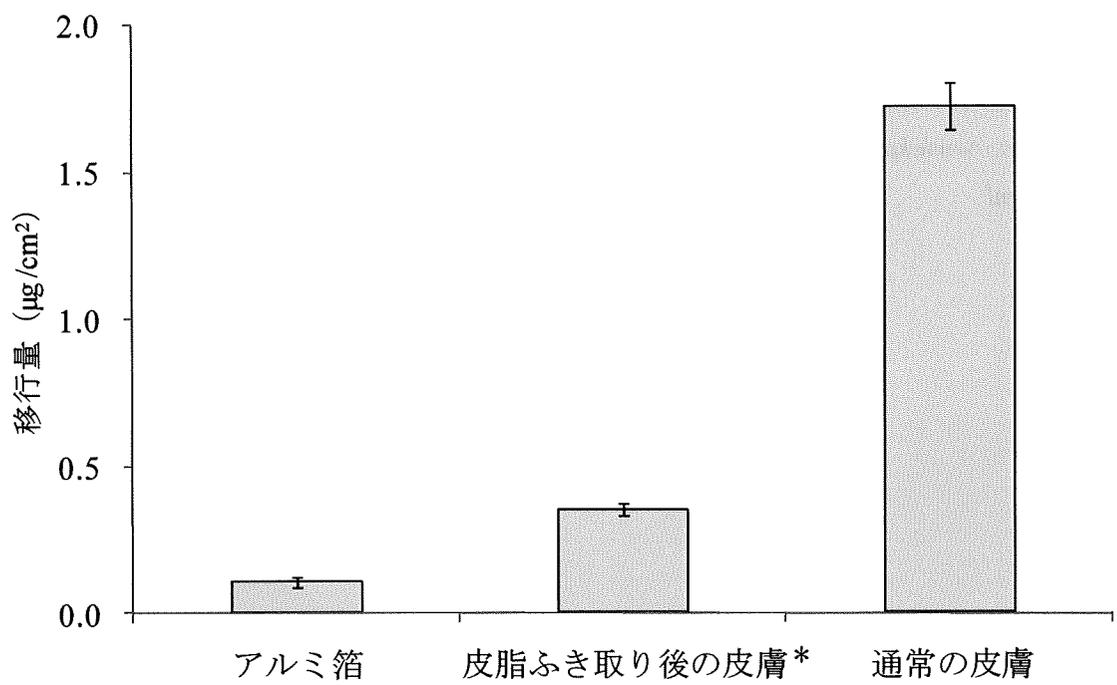


図1. DNOP含有 (25%) PVCシートからのDNOP移行量 (予備試験)
(n=3、15分、平均値±標準偏差、被験者A)

*エタノールを用いて皮脂を拭き取った皮膚表面

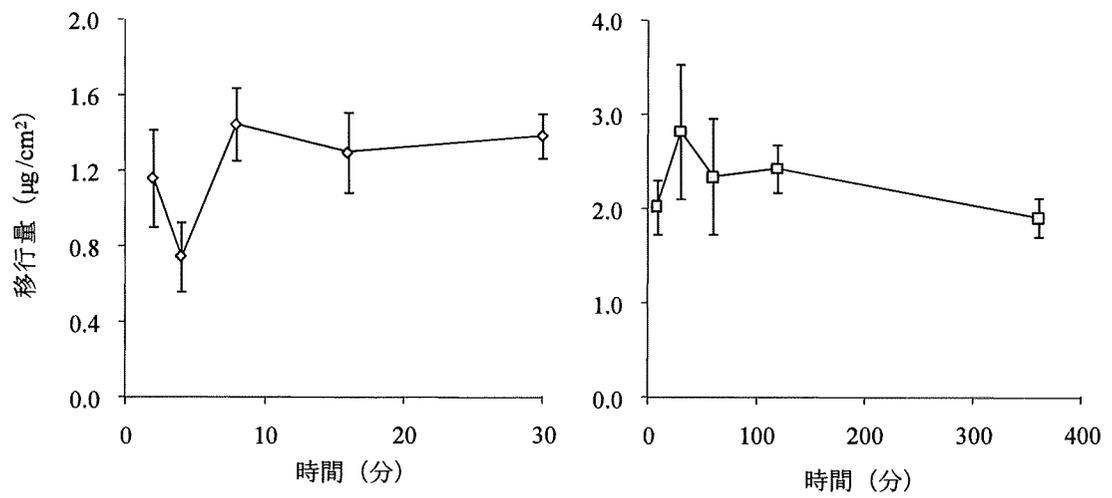


図2. DEHP含有 (28%) PVCシートと皮膚表面との接触時間に伴うDEHP移行量の推移
 (左: 2-30分、右: 8-360分、両者で実験日が異なる)
 (n=3、平均値±標準偏差、被験者A)

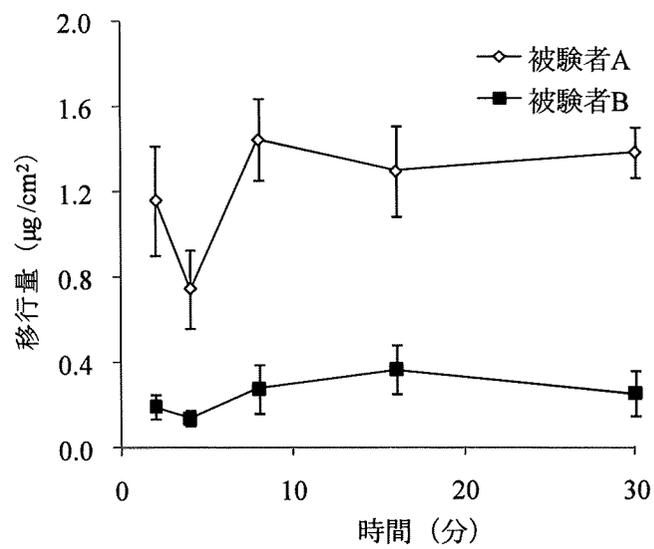


図3. 被験者の違いによるDEHP含有 (28%) PVCシートから皮膚表面へのDEHP移行量の比較 (n=3、平均値±標準偏差)

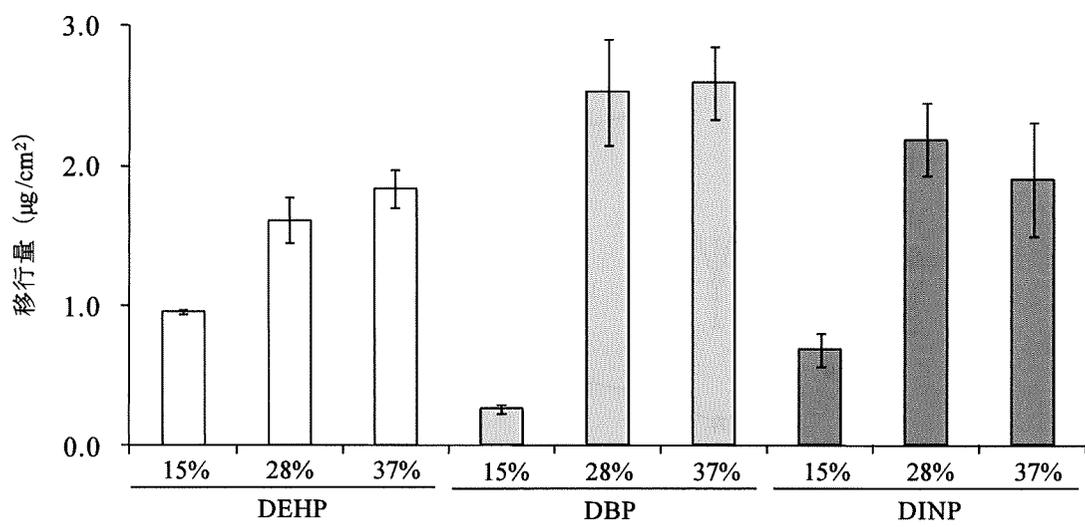


図4. 異なるPAEs含有率のPVCシートからの皮膚表面へのPAEs移行量
(n=3、30分、平均値±標準偏差、被験者A、DINPのみ実験日が異なる)

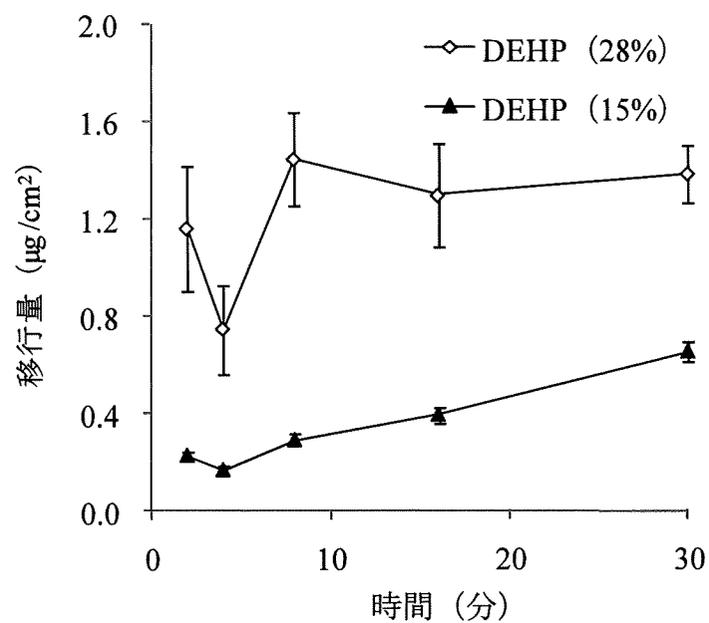


図5. 異なるDEHP含有率のPVCシートから皮膚表面へのDEHP移行量の比較
(n=3、平均値±標準偏差、被験者A、各濃度で実験日が異なる)

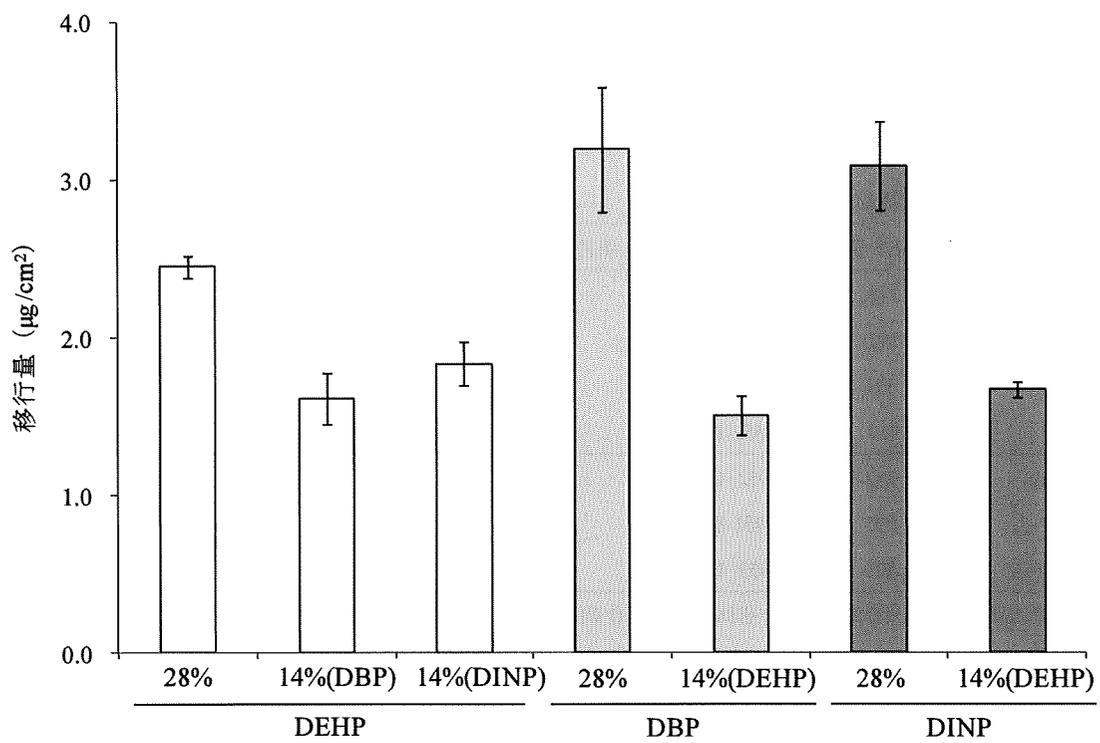


図6. 2種類のPAEsを含有するPVCシートからの皮膚表面へのPAEs移行量
(n=3、30分、平均値±標準偏差、被験者A)

表 1. 対象PAEsとGC/MS条件

PAEs	分子量	Cas. No.	保持時間(分)	定量イオン(m/z)	定性イオン(m/z)
DBP	278	84-74-2	11.68	149	223
DEHP	391	117-81-7	14.24	149	167
DNOP	391	117-84-0	15.04	149	279
DINP	419	28553-12-0	15-16	293	149
DBP-d ₄	282	93952-11-5	11.68	153	227
DEHP-d ₄	395	93951-87-2	14.24	153	171
DNOP-d ₄	395	93952-13-7	15.04	153	283

*DBP、DEHPおよびDNOPはそれぞれの重水素化物を、DINPはDNOP-d₄を内部標準物質として用いて定量した

表 2. 予備試験PVCシート厚み測定結果 (n=12)

PVCシートの種類	練り時間 (分)	平均	最大	最小	中央値	標準偏差	CV (%)
DEHP (化成品)	3.0	0.360	0.385	0.333	0.362	0.017	4.7
DEHP (試薬)	3.0	0.353	0.363	0.339	0.353	0.007	2.0
DEHP (試薬)	6.0	0.331	0.345	0.318	0.331	0.009	2.8
DNOP (試薬)	3.0	0.323	0.336	0.310	0.324	0.010	3.2

* 単位 : mm

表 3. 予備試験PVCシート分析結果 (%) (n=5)

PVCシートの種類	練り時間(分)	平均	最大	最小	中央値	標準偏差	CV (%)
DEHP (化成品)	3.0	25	26	25	26	0.57	2.3
DEHP (試薬)	3.0	26	27	25	26	0.62	2.4
DEHP (試薬)	6.0	26	26	25	26	0.40	1.6
DNOP (試薬)	3.0	25	26	24	25	0.49	2.0

表 4. 実験に供試したPVCシートのPAEs配合割合および作製条件

使用材料	DEHP (%)			DBP (%)			DINP (%)			DEHP/DBP (%)		DEHP/DINP (%)	
	15	28	37	15	28	37	15	28	37	14/14	14/14		
PVCポリマー (g)	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	
フタル酸エステル類 (g)	27	60	90									30	
DBP				27	60	90						30	
DINP							27	60	90			30	
安定剤 (g)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	
ロール温度 (°C)	183	178	169	180	165	160	184	178	166	170	170	180	

*作製条件：厚み：0.3mm、練り時間3分

表 5. 皮膚表面への移行試験に用いたPVCシート中のPAEs濃度 (n=3)

PAEs	作製時の割合 (%)	平均 (%)	標準偏差	CV(%)
DBP	15	11.9	0.47	3.9
	28	24.5	0.58	2.4
	37	33.6	0.55	1.6
	14 (DEHP混合)	11.4	0.18	1.6
DEHP	15	12.3	0.22	1.8
	28	23.5	0.14	0.6
	37	33.6	1.96	5.8
	14 (DBP混合)	12.5	0.13	1.0
	14 (DINP混合)	12.3	0.54	4.4
DINP	15	13.1	0.16	1.2
	28	26.1	0.72	2.8
	37	38.0	0.97	2.6
	14 (DEHP混合)	13.4	0.24	1.8

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

家庭用品に由来する化学物質の多経路暴露評価手法の開発に関する研究

肺吸入率の評価手法の開発に関する研究

研究分担者	酒井 康行	東京大学	生産技術研究所	物質・環境系	教授
研究協力者	小森 喜久夫	東京大学	生産技術研究所	物質・環境系	助教
研究協力者	田中 玄弥	東京大学	生産技術研究所	物質・環境系	

研究要旨： 経気道で暴露されたフタル酸エステル類の肺障害性及び肺胞透過性を、半透膜型培養器を用いた肺胞上皮細胞株の *in vitro* 培養系でのデータから評価するための手法確立を目的とした。3種のフタル酸エステルについての原体およびモノ体の毒性評価から、生体内代謝によって生成されるモノ体の毒性と原体とのモル濃度当りの毒性は、物質によってその強弱が異なった。また、肺胞上皮モデルの上面（肺胞内腔側）から BBP を添加した場合、下面（体内側）への透過は 1/10-1/100 程度と極めて小さかったことから、細胞内での代謝の寄与が示唆された。一方、ガス状および粒子状暴露での透過量評価を目的とした新たなデバイスを作成した。さらに、埃の経気道的暴露というシナリオの再現のため、物質を予めシリカ微粒子に吸着させ、それを細胞層に接触暴露する方法を提案した。

A. 研究目的

環境中化学物質のヒトへのハザード評価について、従来は専ら動物試験が行われてきている。しかしながら、動物愛護推進といった社会的背景や、より正確なメカニズムに基づいた科学的予測の希求といった学問的背景とから、培養ヒト細胞と数理モデルとの組み合わせによる予測手法の格段の発展が求められる。もしこのような体系が構築されれば、動物とヒトとの種差に関する問題の抜本的解決も可能となる。

本分担研究では、家庭用品として多くの人口が暴露されている低揮発性化学物

質の代表例として、プラスチック製品の可塑剤として含まれるフタル酸エステル類を対象とした。これらのケミカルについては、経皮膚および経気道的暴露が想定されるが、その暴露経路ごとのハザードは未だ明確でない。そこで本分担研究では、経気道的暴露について、ヒト肺胞上皮細胞モデル系で得られる毒性発現メカニズムおよび定量的要領作用関係・透過率等に関する情報に基づいた予測手法の提案を最終的な目的としている。

平成 21 年度では、まず、三種の代表的なフタル酸エステル類の原体および生体内のカルボキシエステラーゼによる代謝

の結果容易に生じるモノエステル類について、毒性評価を行った。また、考え得るフタル酸エステル類の人への2つの暴露シナリオ—揮発部分のガス相での暴露と、埃等に吸着したものが肺胞に到達し、肺胞内液相に溶解することによる暴露、の両者に対応可能な新たな評価デバイスの作成を行った。

B. 研究方法

B.1 液中培養での原体・モノ体の48時間暴露での用量作用関係

今回対象としているフタル酸エステル類である Diethylhexyl Phthalate (DEHP)、Dibutyl Phthalate (DBP)、Benzyl Butyl Phthalate (BBP)それぞれの原体、および、これら原体が組織中のカルボキシエステラーゼによって代謝された結果生成するモノエステルである Monoethylhexyl Phthalate (MEHP)、Monobutyl Phthalate (MBuP)、Monobenzyl Phthalate (MBeP)を対象とした。肺障害性評価のためには、これらの純物質を DMSO に溶解後、DMSO の最終濃度が 0.5% (V/V)となるように培養液で希釈して、予め1日間培養しておいた細胞に暴露した。

細胞には、肺胞由来ガン細胞株である A549 細胞(肺胞の II 型上皮細胞と類似)を用いた。これを培養したマルチウェルプレートに上記6種のフタル酸エステル類を48時間暴露し、その細胞生存率を細胞内 Acid Phosphates 活性を指標とした AP アッセイによって計測することにより、用量作用関係を取得した。

B.2 半透膜培養における経上皮電気抵

抗の変化

半透膜型培養器(Costar 3460 (12 穴))に、A549 細胞を 1.0×10^5 cells/cm²の密度で播種した後、培養液を膜下面・上面両方に加えて培養し、細胞層を形成させた。Costar のマニュアルに従い、膜上面には 0.5 mL、膜下面には 1.5 mL の培養液を添加して培養した。上皮層の形成は経上皮電気抵抗測定値(TEER)を Millicell-ERS (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) で測定した。細胞が均一な層を形成したことが形態学的に確認され、かつ抵抗値が一定 ($45-50 \Omega \cdot \text{cm}^2$)となるまで培養を継続した。

B.3 膜型培養器を用いた上皮障害性・透過量の評価

B.2 のように形成した A549 細胞からなるモデル肺胞上皮に対して、膜上面側(肺胞内腔側)に、BBP を 0.1 -10.0 mM の濃度で48時間曝露し、その後、生存率及びBBP の下部への透過量を計測した。生存率は AP アッセイにて、透過量は GC-MS にて、それぞれ計測した。GC-MS への導入前には、培養液にまずアセトニトリルを添加してタンパク質を十分に变性させた後、さらにヘキサンを添加し、ヘキサン層にフタル酸エステル類を移行させた。

B.4 吸着担体としてのシリカ粒子

埃のモデル物質として 1 μm のシリカ粒子(扶桑化学工業株式会社, SP-1B)の利用を検討した。粒子濃度が 0.03-3.00 mg/cm² となるように微粒子を培地に懸濁させた液体を曝露し、生存率を AP ア