

201035020A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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

平成 22 年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者 神野 透人

平成 23 (2011) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括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 . . . . . 1  
神野 透人

### II. 分担研究年度終了報告書

1. コンピューターケミストリを利用した家庭用品中化学物質の多経路暴露  
評価手法の開発に関する研究 . . . . . 13  
神野 透人、香川(田中) 聡子
2. 家庭用品から放散する化学物質の定量的・速度論的評価手法の開発に関  
する研究 . . . . . 30  
神野 透人、野崎 淳夫、香川(田中) 聡子
3. 家庭用品から皮膚表面へと移行する化学物質の定量的・速度論的評価手  
法の開発に関する研究 . . . . . 39  
伊佐間 和郎、河上 強志
4. 培養肺胞モデルを用いた肺障害性・吸収性の評価に関する研究 . . . . . 59  
酒井 康行、小森 喜久夫、田中 玄弥
5. 家庭用品から溶出する化学物質の経皮吸収評価手法の開発に関する研究 . . . . . 71  
杉林 堅次、藤堂 浩明
6. 暴露経路依存的な異物代謝予測手法の開発に関する研究 . . . . . 89  
埴岡 伸光、高原 佑輔、高原 有香、成松 鎮雄

7. 家庭用品に由来する室内環境化学物質の網羅的解析手法の開発に関する研究	・・・	98
— ハウスダスト中可塑剤・難燃剤リン酸トリエステル類の実態調査 —		
香川(田中) 聡子、神野 透人、古川 容子、永井 美緒		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・	134
IV. 研究成果の刊行物・別刷	・・・	135

## I. 総括研究年度終了報告書

厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)

総括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

研究代表者 神野 透人 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室長

研究要旨: 家庭用品から室内環境中へ放出される化学物質、特に準揮発性有機化合物 (SVOC) と呼ばれる沸点 260~380℃ の化学物質を主要なターゲットとして、複数の経路 (経気道、経皮及び経口) からの暴露を総合的に評価するための手法を開発・確立する目的で、1) 家庭用品から室内環境への SVOC 負荷量を迅速かつ定量的に評価し 2) 室内環境媒体 (空気及び粒子) 間の SVOC 分配を予測するための手法、3) 家庭用品への直接的な接触による SVOC 皮膚移行の評価方法、4) 経気道あるいは 5) 経皮暴露された化学物質の生物学的利用率を推定するための *in vitro* 評価手法、並びに 6) 暴露経路依存的な初回通過代謝の評価方法について一連の研究を実施した。また、対象 SVOC の選定やシミュレーションモデルの妥当性の検証に必要な実測データの収集を目的として、7) 家庭用品に由来する室内環境化学物質の網羅的な解析手法についても検討を行った。

SVOC 負荷量の評価 (1) では、Micro-Chamber/Thermal Extractor ( $\mu$ -CTE) による SVOC 放散速度の迅速な評価法を確立し、デスクマット及び人工皮革からの SVOC 放散速度を測定した。室内環境媒体間の分配に関する課題 (2) では、リン酸トリエステル類及びフタル酸エステル類について量子化学計算に基づく密度汎関数/COSMO-RS 法で物理化学的パラメータの予測を行い、実測値及び定量的構造活性相関に基づく推定値との比較を行った。SVOC の皮膚移行 (3) に関しては、フタル酸エステル類について PVC シートから皮膚への移行量を実測し、5 倍を超える個人差が存在すること、SVOC の疎水性と皮膚移行量との間に関連が認められることを明らかにした。生物学的利用率の評価 (4 及び 5) ではそれぞれ培養肺胞モデル、Side-by-Side 型拡散セルによる透過性の *in vitro* 評価を行い、その結果を基に数理モデルを構築した。初回通過代謝 (6) では、ヒト肝ミクロゾームによるフタル酸エステル類の加水分解反応について速度論的な解析を行い、種差及び個体差について考察した。また、室内環境中の SVOC の網羅的な解析 (7) ではハウスダストを介したリン酸トリエステル類の暴露について調査を行い、Tris(2-butoxyethyl) Phosphate が高濃度で検出されることを明らかにした。

このように、本研究では家庭用品から室内環境への SVOC 負荷量の評価から暴露経路依存的な生物学的利用率や初回通過代謝の評価について一連の手法を開発・確立した。今後、SVOC をはじめとする室内環境中の多種多様な化学物質に本法を適用することによって、主要な暴露経路や多経路暴露量の予測が可能になるものと期待される。

研究分担者: 野崎 淳夫 (東北文化学園大学大学院教授)、伊佐間 和郎 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部第四室長)、酒井 康行 (東京大学生産技術研究所教授)、杉林 堅次 (城西大学薬学部教授)、埴岡 伸光 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科准教授)、香川 (田中) 聡子 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部主任研究官)

研究協力者: 河上 強志 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部第四室)、小森 喜久夫 (東京大学生産技術研究所)、田中 玄弥 (東京大学生産技術研究所)、藤堂 浩明 (城西大学薬学部)、成松 鎮雄 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)、高原 佑輔 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)、高原 有香 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)、古川 容子 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部)、永井 美緒 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部)

#### A. 研究目的

EU の REACH 規則 (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) の制定 (2007.6) や化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) の改正 (2009.5) にみられるように、化学物質の審査・規制や管理等に係る諸制度は従来のハザードベースからリスクベースの評価体系へと大きな転換期を迎えている。

リスクがハザードと暴露量の積として表されることから明らかなように、暴露評価の精度はリスク評価に決定的な影響を及ぼす。したがって、評価体系の円滑な移行のためには、暴露評価の精度やスループットの向上が重要な課題となっている。また、ハザードに関する情報は国際的に共有することが

可能であるのに対し、化学物質の暴露に関しては生活習慣が大きな要因となるため、それぞれの国独自の取り組みが必要不可欠である。このような観点からも暴露シナリオの確立を含む一連の暴露評価手法の開発が喫緊の課題であると言えよう。

化学物質の人への暴露に関与する重要な環境媒体としては、大気、水道水、食品等を挙げることができる。これらの環境媒体に関しては、永年にわたる行政施策の成果として、媒体中の化学物質濃度を継続的かつ広範に調査するための全国規模の体制が構築されている。一方で、人は1日のおよそ2/3以上を「室内」で過ごすとされているものの、室内空気やハウスダスト等の媒体を介する室内環境中での化学物質暴露に関してはデータの蓄積が不十分であり、その収集体制も脆弱と言わざるを得ないのが実情である。

このような背景を踏まえ、家庭用品から室内環境中へ放散する、あるいは汗・皮脂や唾液などによって家庭用品から溶出する化学物質を迅速かつ定量的に解析して暴露濃度に関する情報を取得するとともに、吸入や経皮暴露による吸収率を適切に見積もることによって暴露量の推定精度を高め、ひいては暴露量と有害性から導かれるリスク評価の信頼性を向上させるための体系的な手法を確立することを目的として本研究課題を企図した。2年目となる今年度は、準揮発性有機化合物 (SVOC) と呼ばれる沸点 260-380℃ の化学物質を主要なターゲットとして、1) 家庭用品から放散する化学物質の定量的評価手法の開発並びに 2) 家庭用品から皮膚表面へと移行する化学物質の定量的・速度論的評価手法の開発を進め、このような化学物質の動態を規定すると考えられる物理化学

的性状に関して、3) 非経験的な量子化学計算に基づく生活環境化学物質の物理化学的パラメータ推定手法の開発を実施した。また、4) 家庭用品から放散する化学物質の吸入率評価手法の開発、5) 家庭用品から溶出する化学物質の経皮吸収率評価手法の開発に取り組み、異なる経路で同一の化学物質に暴露した場合の生体影響の等価性について異物代謝の観点から検証するために、6) 暴露経路依存的な異物代謝予測手法に関する研究も実施した。さらに、室内環境質に関する全国規模の恒常的な調査・監視体制の構築、確立に向けた取り組みとして7) 家庭用品に由来する室内環境化学物質の網羅的解析手法の開発に関する研究を進めた。

## B. 研究方法

### B-1 コンピューターケミストリを利用した家庭用品中化学物質の多経路暴露評価手法の開発に関する研究 (神野)

リン酸トリエステル類 11 化合物及びフタル酸エステル類 7 化合物について、配座空間探索プログラム CONFLEX ver. 6 により MMFF94s 力場による配座解析を行った。次に、各化合物の最安定配座について密度汎関数 (DFT) 法 (汎関数 BVP86; 基底関数 tzvp\_ahlrichs) による構造最適化並びに表面電荷の算出を行い、得られた表面電荷データを基に COSMOtherm ver. C21-0110 により熱力学物性値を推算した。また、推定精度を比較する目的で、定量的構造活性相関に基づく物性値推算法である EPI Suite (KOWWIN ver. 1.67; HenryWin ver. 3.20) 及び SPARC Online ver. 4.5 (<http://archemcalc.com/sparc/>) についても併せて検討を行った。

### B-2 家庭用品から放散する化学物質の定量的・速度論的評価手法の開発に関する研究 (神野・野崎)

Micro-Chamber/Thermal Extractor ( $\mu$ -CTE) 250i と呼ばれる小型 4 連チャンバー装置を用いて、家庭用品から放散される SVOC の定量的評価手法の確立を行った。直径 64 mm に裁断した検体を  $\mu$ -CTE250i の不活性処理ステンレス製チャンバーに入れ、室温で 1 時間 He ガスを通気した。次いで、チャンバーを 200°C に加熱し、検体から放散してチャンバーの蓋部分に吸着した SVOC を脱着させた。気化した SVOC を Tenax TA 吸着管に捕集し、加熱脱離-ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) でフタル酸エステル 4 化合物、アジピン酸エステル類 3 化合物及びリン酸トリエステル類 5 化合物を定量した

### B-3 家庭用品から皮膚表面へと移行する化学物質の定量的・速度論的評価手法の開発に関する研究 (伊佐間)

本分担研究課題については、国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会の承認 (承認番号 No.175) を得た上で実施した。当該研究所職員のボランティアを被験者とし、実験の内容等を説明した後に同意書を受領した。既知量のフタル酸エステル類を可塑剤として添加したポリ塩化ビニル (PVC) シート (1.5 cm x 1.5 cm; 2.25 cm<sup>2</sup>) を被験者の左前腕内側部分の皮膚に 30 分間密着させた後に、接触部分の皮膚表面に付着したフタル酸エステル類をエタノール含浸綿棒で拭き取った。綿棒に回収されたフタル酸エステル類をアセトンで抽出し、GC/MS で定量した。また、SVOC の皮膚移行に対する皮脂の影響について検討を行うために、対照試験として PTFE シートを貼付した皮膚由来の試料についてトリ

グリセリド含量を測定した。

#### B-4 家庭用品から放散する化学物質の吸入率評価手法の開発に関する研究 (酒井)

フタル酸エステル類 Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)、Dibutyl Phthalate (DBP) 及び Benzyl Butyl Phthalate (BBP)、並びにこれら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類 Mono-2-ethylhexyl Phthalate (MEHP)、Mono-butyl Phthalate (MBuP)、Mono-benzyl Phthalate (MBeP) を対象として、肺胞由来ガン細胞株 A549 細胞 (肺胞の II 型上皮細胞由来) に対する細胞毒性を指標として肺障害性を評価した。また、培養肺胞モデルによるフタル酸エステル類及び代謝物の透過性評価では、半透膜型培養器に A549 細胞層を形成させた培養ヒト肺胞モデルを用いて、肺胞内腔側 (細胞膜上面側) または血液側 (膜下面側) から BBP を暴露し、BBP 並びに代謝物 MBuP、MBeP の透過量及び細胞層内への蓄積量を測定して数理モデルの構築に必要な速度論的パラメーターを取得した。

#### B-5 家庭用品から溶出する化学物質の経皮吸収評価手法の開発に関する研究 (杉林)

皮膚移行性試験では Side-by-Side 型拡散セルに固定したヘアレスラット皮膚に DBP を適用し、全層皮膚 (Intact Skin) 及び角層除去皮膚 (Stripped Skin) 中の DBP 量を HPLC で測定した。ヒト皮膚及びヘアレスラット皮膚の DBP 代謝能に関する実験では皮膚ホモジネートによる DBP の加水分解を Hanes-Woolf Plot により速度論的に解析し、 $K_m$  及び  $V_{max}$  を算出した。また、DBP のヒト皮膚透過性は凍結ヒト皮膚を Side-by-Side 拡散セルに

セットし、PBS 中で 12 時間水和した後に透過実験を行った。

DEHP の皮膚中安定性は、皮膚ホモジネートに DEHP 及び MEHP を添加し、エステラーゼ阻害剤 DFP 存在下あるいは非存在下で DEHP 及び MEHP 量の経時的な変化を測定した。また、DEHP 及び MEHP の皮膚透過性試験では、Side-by-Side 型拡散セルに固定したヘアレスラット腹部皮膚の表皮側に DEHP または MEHP を適用し、真皮側に DFP 存在下あるいは非存在下で皮膚透過性を測定した。

尚、動物の飼育及び実験は当該研究実施機関の動物実験管理委員会である城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、「城西大学動物実験規定 (平成 21 年 4 月)」に従い、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。

#### B-6 暴露経路依存的な異物代謝予測手法の開発に関する研究 (埴岡)

フタル酸エステル類の加水分解活性は、酵素源にプールドヒト肝ミクロゾーム及び個人ヒト肝ミクロゾームを用いて Danschutter et al. 及び Mazzeo et al. の方法に準じて測定した。Western Blot 分析は Laemmli の方法に準じて、10% SDS-Polyacrylamide Gel 電気泳動に付した。泳動後、Towbin et al. の方法に従いタンパク質を PVDF 膜に転写し、一晚ブロッキング処理した。一次抗体としてウサギ抗ヒト CES1 抗体あるいはウサギ抗ヒト CES2 抗体を使用し、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG を用いて化学発光法により抗体と結合したバンドを検出した。フタル酸エステル類加水分解反応の速度論的解析は、GraphPad Prism Ver. 4.00 (GraphPad Software) 及び SigmaPlot v7.1.0.1 (SPSS Inc.) を用いて



Michaelis-Menten 及び Eadie-Hofstee プロットを作成し、 $S_{50}$  及び  $V_{max}$  値を算出した。*In vitro* クリアランスは  $CL_{max} (V_{max}/S_{50} \times (n-1)/n(n-1)l/n)$  とした。

B-6 家庭用品に由来する室内環境化学物質の網羅的解析手法の開発に関する研究 -ハウスダスト中可塑剤・難燃剤リン酸トリエステル類の実態調査 (香川(田中))

一般家庭 (関東近郊) の 25 軒の寝室及び居間のハウスダストを採取した。採取したダストを振動ふるいで分級し、 $63 \mu\text{m}$  以下の画分を試験に用いた。ハウスダスト試料 25 mg にアセトン 2 mL を加えて超音波抽出し GC/MS により分析を行った。ハウスダスト中 SVOC の網羅的分析では、飛行時間型 MS (TOF-MS) で測定し、ChromaTOF Version 4.23 を用いて Deconvolution 解析を行った。リン酸トリエステル類の個別定量には四重極型の MS を使用し、SIM 法による測定を行った。

### C. 研究結果

C-1 コンピューターケミストリを利用した家庭用品中化学物質の多経路暴露評価手法の開発に関する研究

CONFLEX による配座探索で得られた最安定構造を初期構造として構造最適化を行い、COSMO 計算で得られたリン酸トリエステル類及びフタル酸エステル類の表面電荷分布から COSMO-RS 法により物性値を推算した。LogPow について PhysProp データベース (Interactive PhysProp Database Demo; <http://www.syrres.com/>) に記載されている実験値と COSMO-RS 法推算値の関係をみると、

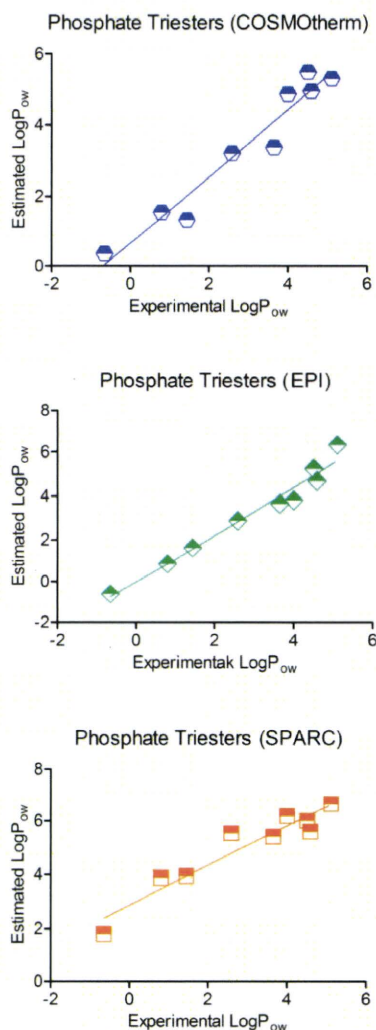


図1 COSMOtherm, EPI Suite 及び SPARC で予測したリン酸トリエステル類の  $\text{LogP}_{ow}$  値と実験値の相関

直線性 ( $r^2$  値) は 0.943 (リン酸トリエステル類)、0.991 (フタル酸エステル類) であり、構造活性相関に基づく EPI Suite (KOWEIN) や SPARC とほぼ同等の精度で  $\text{LogP}_{ow}$  値を推定することが可能であった (図 1)。一方、蒸気圧 (VP) について同様の比較を行うと、いずれの手法を用いた場合も実験値と推測値の回帰直線の傾きは 1 から大きく乖離し、SVOC の揮散性に係る推定値に関して現状では十分な精度が得られないことが明らかになった。COSMO-RS 法では VP の推定に量子化学計算で得られる Gas Phase Energy を利

用しており、複数の Conformer の存在を考慮に入れて Gas Phase Energy を計算することで VP の推定精度を向上させることが可能かもしれない。

### C-2 家庭用品から放散する化学物質の定量的・速度論的評価手法の開発に関する研究

$\mu$ -CTE による SVOC 放散試験法を確立するために、まずフタル酸エステル 4 化合物、アジピン酸エステル類 3 化合物、リン酸トリエステル類 5 化合物の合計 12 種類の SVOC について、200℃の加熱脱着によるチャンバーからの回収率について検討を行った。その結果、いずれの SVOC についても回収率は 80% 以上であり、不活性処理チャンバーから良好に回収されることが明らかになった。そこで、 $\mu$ -CTE 法によりデスクマット 8 製品及び合成皮革 12 製品からの SVOC 放散速度を測定した結果、デスクマット 5 製品と合成皮革 6 製品で  $10 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$  を超える DEHP の放散がみられ、最も高い製品の DEHP 放散速度はそれぞれ 250、 $140 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$  であった (図 2)。また、その他の SVOC 成分として Dioctyl

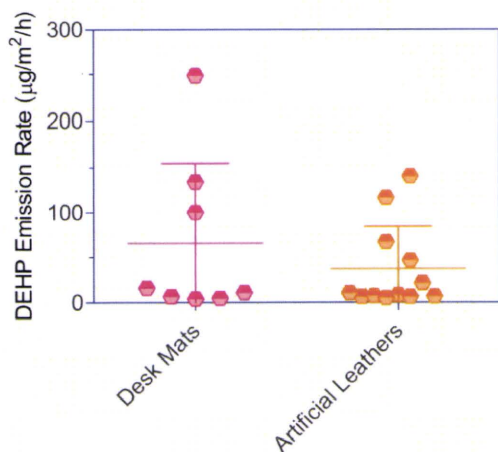


図 2 デスクマット及び人工皮革からの DEHP 放散速度

Adipate や Triphenyl Phosphate が検出された。さらに、室温での放散ガス中の VOC 成分として Butylated Hydroxytoluene、2-Butoxyethanol、1-(2-Butoxyethoxy) ethanol、Cyclohexanone、N,N-Dimethylformamide などの化合物が同定され、 $\mu$ -CTE 法が家庭用品からの SVOC 及び VOC の放散を同時に評価できる優れた手法であることが実証された。

### C-3 家庭用品から皮膚表面へと移行する化学物質の定量的・速度論的評価手法の開発に関する研究

バックグラウンドとして、11 名の全ての被験者で PVDF シートを貼付したコントロール試料中から DEHP が  $0.013\text{-}0.11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の範囲で検出され、さらに 1 名の被験者からは DBP が高い濃度 ( $0.14\text{-}0.48 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) で検出された。

2 種類のフタル酸エステル類を混合した PVC シートから皮膚表面への移行量について検討を行った結果、DEHP と DBP あるいは DEHP と DINP の移行量にはいずれも相関が認められた。回帰直線の傾きと混合シート中の存在比との比較から、皮膚表面への移行し易さは  $\text{DINP} > \text{DEHP} > \text{DBP}$  の順であり、 $\text{Log}P_{\text{ow}}$  値の傾向 (それぞれ 8.8、7.6、4.7) と概ね一致することが明らかになった。

PVC シートから皮膚表面へのフタル酸エステルの移行量については性別あるいは年齢による明白な傾向は認められなかったが、著しく移行量の多い被験者が 2 名存在した。皮膚表面のトリグリセリド量 (全被験者の平均値  $9.3 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ ) に年齢や性別に依存する差異はなく、2 名の被験者の高移行量を説明できるような違いも認められなかった。これに関してはトリグリセリドを構成する脂肪

酸の差異や皮脂中のトリグリセリド以外の成分、例えばワックスエステル類やスクワレン等も含めて検討を進める必要があると考えられる。

#### C-4 家庭用品から放散する化学物質の吸入率評価手法の開発に関する研究

A549 細胞に対する細胞毒性を指標としてフタル酸エステル類 (DEHP、DBP、BBP、MEHP、MBuP、MBeP) の肺障害性を評価した結果、いずれも EC<sub>50</sub> 値は 100 μM 以上であり、細胞毒性/肺障害性は比較的弱いことが明らかになった。BBP の細胞毒性は代謝物である MBeP 及び MBuP よりも強いに対し、DEHP ではカルボキシルエステラーゼによる加水分解生成物である MEHP の細胞毒性の方が強く、代謝によって肺障害性が増大することが観察された。

次に、培養肺胞モデルにおける BBP の代謝及び透過性について評価を行い、その結果を基に肺胞内腔側液相・細胞相・血液相の3つの相間の動的分配平衡モデルを構築した



- ①  $V_1 \cdot dC_1/dt = (-k_1 \cdot C_1 + k_2 \cdot C_2) \cdot A$
- ②  $V_2 \cdot dC_2/dt = (k_1 \cdot C_1 - (k_2 + k_3)C_2 + k_4 \cdot C_3) \cdot A$
- ③  $V_3 \cdot dC_3/dt = (k_3 \cdot C_2 + k_4 \cdot C_3) \cdot A$

V: 各コンパートメント体積 [cm<sup>3</sup>]  
 C: 各コンパートメント中の濃度 [mM]  
 k: 物質移動係数 [cm/hr]  
 A: 膜面積 [cm<sup>2</sup>]

図3 肺胞内腔側液相・細胞相・血液相間の動的分配平衡モデル

(図3)。単層培養系における培地中 BBP 濃度の初期変化の傾きから  $k_1$  ( $2.47 \times 10^{-2}$  cm/hr) を決定し、①式で平衡時に  $dC_1/dt = 0$  となることから  $k_2$  ( $1.59 \times 10^{-4}$  cm/hr) を決定した。さらに、培養肺胞モデルの肺胞内腔側及び血液側に BBP を暴露した場合の濃度変化を速度論的に検討し、添加直後においては血液側濃度及び細胞内濃度を無視することができることから、 $k_3$  ( $8.40 \times 10^{-4}$  cm/hr) を決定し、平衡時に③式で  $dC_1/dt = 0$  となることから  $k_4$  ( $6.73 \times 10^{-1}$  cm/hr) を決定した。このよう決定したパラメーターを用いて肺胞内腔側暴露・血液側暴露の2つの暴露条件における肺胞内腔側・血液側の濃度時間変化をシミュレーションし、実測値との一致を評価した。その結果、パラメーターの決定に使用しなかった血液側濃度の変化についても概ね良好に記述できることから、本研究で確立した簡便な動的分配平衡モデルの妥当性が示唆された。

#### C-5 家庭用品から溶出する化学物質の経皮吸収評価手法の開発に関する研究

ヘアレスラット皮膚を用いて DBP の皮膚移行性を検討した結果、Intact Skin 及び Stripped Skin のいずれの場合も代謝物である MBP のみが皮膚中で検出され、エステラーゼ阻害剤 DFP 共存下では DBP のみが Intact Skin から検出された。これらの結果から、DBP は皮膚に移行した後に速やかに MBP に代謝され、皮膚を透過することが示唆された。次に、皮膚での DBP 代謝に関する種差について検討するために、ヘアレスラット及びヒト皮膚ホモジネートによる DBP の加水分解について速度論的に解析した結果、

ヒト皮膚の  $K_m$ 、 $V_{max}$  及び  $V_{max}/K_m$  はそれぞれ

26.2  $\mu\text{mol/mL}$ 、 $5.2 \times 10^{-2} \mu\text{mol/min/mg protein}$ 、 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mL/min/mg protein}$ 、ヘアレスラット皮膚ではそれぞれ 14.7  $\mu\text{mol/mL}$ 、 $2.1 \times 10^{-1} \mu\text{mol/min/mg protein}$ 、 $1.5 \times 10^{-2} \text{ mL/min/mg protein}$  であった。これらの結果から、ヒト皮膚とヘアレスラット皮膚ではエステラーゼの質的あるいは量的に大きく異なり、ヘアレスラット皮膚ではヒト皮膚よりも DBP が速やかに代謝され MBP となることが明らかになった。また、ヒト皮膚 (Intact Skin 及び Stripped Skin) の DBP 透過性に関しては、ヘアレスラット皮膚の場合と同様に DBP は Intact Skin を透過せず、皮内での代謝により生じる MBP として皮膚を透過することが明らかになった。

さらに、DEHP についても同様に皮膚中での安定性並びに透過性について検討を行った結果、DEHP は皮膚ホモジネートにより代謝されて MEHP を生じること、ヘアレスラット皮膚の透過性では Intact Skin、Stripped Skin 及び DFP 処理 Stripped Skin のいずれを用いた場合にも DEHP は皮膚を透過しないことが明らかになった。代謝物である MEHP については、DFP 処理の有無に関わらず Stripped Skin のみで皮膚透過が観察され、透過係数は約  $3.6 - 3.9 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$  であった。

#### C-6 暴露経路依存的な異物代謝予測手法の開発に関する研究

プールド及び個人ヒト肝ミクロゾームを酵素源にしてフタル酸エステル類加水分解活性を速度論的に解析した。その結果、DBP、BBP 及び DEHP のいずれの加水分解反応についても Eadie-Hofstee プロットがフック型の曲線となり、アロステリックな挙動を示すことが明らかになった。また、いずれの肝ミ

クロゾームにおいても DEHP の加水分解反応の  $S_{50}$  値及び  $V_{\text{max}}$  値は DBP や BBP のそれぞれ約 1/10、約 1/30-45 であり、DEHP は加水分解酵素に対する基質親和性は高いものの、他のフタル酸エステル類に比べて代謝されにくい傾向があると言える。

一方、DBP から MBP 及び BBP から MBzP への加水分解反応の  $V_{\text{max}}$  値は DEHP 及び BBP から MBP への加水分解反応よりも高く、DBP と BBP は比較的速やかに加水分解されるものと考えられる。また、BBP の加水分解反応には 2 つの経路が存在するが、ヒト肝ミクロゾームではラットとは異なって MBzP への経路が優先的に進行することが明らかになった。従って、ヒトとラットでは MBP と MBzP のフタル酸モノエステル体の生成比が異なるために BBP の毒性発現の程度に種差が生じる可能性があり、ラットのデータをヒトへ外挿する際にこの点を十分に考慮する必要がある。また、代謝能の個人差に関して、ヒト肝ミクロゾームによるフタル酸エステル類の加水分解反応には  $S_{50}$  値及び  $V_{\text{max}}$  値にそれぞれ 1.9 及び 1.6 倍の個人差が認められることが明らかになった。

#### C-7 家庭用品に由来する室内環境化学物質の網羅的解析手法の開発に関する研究

GC/TOF-MS によりハウスダス中の SVOC を網羅的に分析し、Deconvolution 解析を行った結果、24 検体すべてから DEHP が検出され、2 検体を除く 22 検体については暫定的に同定された物質の中で最高濃度であった。可塑剤・難燃剤として使用されるリン酸トリエステル類に関しても高頻度で検出され、中でも TBEP が最高濃度で検出される検体も存在した。

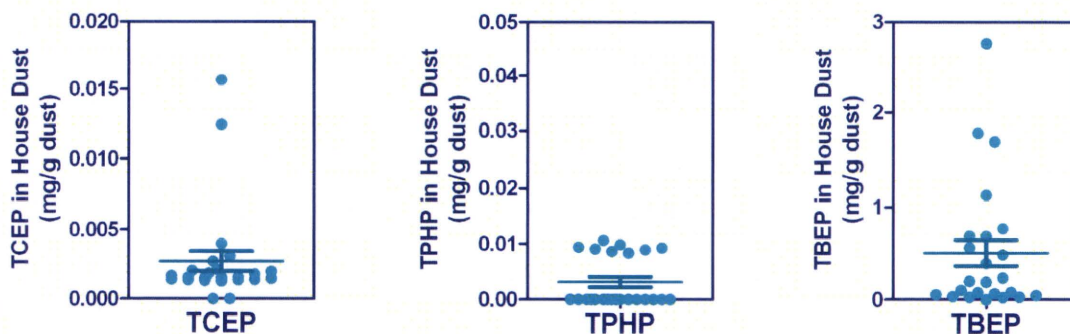


図4 ハウスダスト中のリン酸トリエステル類濃度

四重極型 MS で SIM 法によるリン酸トリエステル類の個別定量を行った結果、ハウスダスト中のリン酸トリエステル類濃度の中央値及び最大値はそれぞれ TCEP; 0.0015 mg/g dust、0.016 mg/g dust、TBEP; 0.19 mg/g dust、2.8 mg/g Dust、TPHP; ND、0.011 mg/g dust であった。尚、測定を行った試料では、TMP、TEP、TPP、TBP、TCIPP、TDCPP、TEHP 及び TCP は定量下限値未満であった。

#### D. 考察

家庭用品から室内環境中に放出される化学物質の主な暴露経路として、室内空気の吸入によるガス状あるいは (浮遊) 粒子状物質の経気道暴露や家庭用品への直接的な接触による経皮暴露に加え、ある種の化学物質ではハウスダストの摂食による経口暴露が大きな比重を占めることが明らかにされつつある。また、新たな暴露形態として、室内空气中化学物質の皮膚への分配/吸着による経皮吸収の可能性があることも報告されている。家庭用品に由来する多種多様な化学物質の室内環境媒体への移行は、溶解度や蒸気圧、ヘンリー定数、オクタノール/水分分配係数 ( $\text{Log}P_{\text{ow}}$ )、オクタノール/空気分配係数 ( $K_{\text{oa}}$ ) など、その化学物質の物理化学的な特性に大きく依存する。一例として、平衡状態

におけるハウスダストと室内空気間の SVOC の分配に関して、

$$K_{\text{dg}} = \frac{f_{\text{om\_dust}} \times K_{\text{oa}}}{\rho_{\text{dust}}}$$

の関係が成立することが知られている (Weschler and Nazaroff, 2010)。ただし、ここで  $K_{\text{dg}}$  はダスト-空気分配係数 (Dust-Air Partition Coefficient)、 $f_{\text{om\_dust}}$  はハウスダスト中の有機物の体積比、 $\rho_{\text{dust}}$  はハウスダストの密度である。したがって、上述した物理化学的なパラメーターを適切に推定することで、室内環境媒体間の分配の予測、すなわち主要な暴露媒体・経路の同定が可能になると考えられる。そこで、本研究では量子化学計算に基づく COSMO-RS 法の SVOC への適用可能性について検討を行い、少なくとも  $\text{Log}P_{\text{ow}}$  に関しては定量的構造活性相関 (QSAR) に基づく EPI Suite (ver. 4.00) や SPARC (ver. 4.5) に匹敵する精度で予測可能であることを明らかにした。QSAR 法と比較した COSMO-RS 法の利点として配座異性体を考慮できる点や混合物にも適用できる点を挙げることができる。今後、本法による物理化学的パラメーターの推算をさらに多くの室内環境化学物質に適用することにより、その有用性を明らかにできるものと期待される。

一方、“室内環境中の分布”とともに SVOC の暴露量を規定する重要な要因である”家庭用品からの負荷量”に関して、本研究では  $\mu$ -CTE によるハイスループットな方法を確立した。SVOC 放散速度の定量的な評価方法として、建築材料については既にマイクロチャンバー法 (JIS A 1904:2008) が策定されており、さらに小型化された「チャンバー内吸着-加熱脱着法」についても検討が進められている。これらの方法では、ガラス製チャンバーに吸着した SVOC を加熱脱着させるために He ガス配管を備えたオープンが別途必要となる。これに対して、 $\mu$ -CTE では放散・吸着と加熱脱着を同一のチャンバーで行えるため、多検体の同時処理が可能である。SVOC 放散速度の評価については、樹脂が多用される自動車の車室内空気質に関する分野でも精力的に研究が行われている。今後は当該分野の研究者とも情報交換・共同研究を進め、 $\mu$ -CTE 法と JIS A 1904 法やチャンバー内吸着-加熱脱着法による測定結果との比較を行い、 $\mu$ -CTE 法の有用性を検証する予定である。

本研究では、家庭用品への直接的な接触による経皮暴露を想定し、製品から皮膚表面への移行量/移行速度の評価法についても検討を進めている。今年度の最も興味ある結果として、PVC シートから皮膚表面へのフタル酸エステル類の移行に関して 5 倍を超える個人差が観察された。この顕著な個人差はグリセロール量として測定したトリグリセリド量の差異では十分に説明することができず、皮脂の質的/量的な個人差や性差、年齢差との SVOC 移行性との関連について検討を行う必要があると考えられる。

暴露経路依存的な生体への取込に関して、

SVOC の吸入暴露を想定した培養肺胞モデルによる代謝及び透過性の評価を行い、肺胞内腔側液相・細胞相・血液相の3つの相間の動的分配平衡モデルにより記述できることを明らかにした。経皮吸収では、拡散セルによる *in vitro* 評価の結果を基に、透過性と貯留性を指標とする SVOC の分類を進めた。また、2 層膜拡散モデルによる皮膚透過性の解析により皮膚中濃度の予測が可能であることを明らかにした。さらに、これらの生体への取込率に関する *in vitro* 評価系を開発する過程で、改めて異物代謝酵素の重要性がクローズアップされた。例えば、DBP は加水分解による代謝物 MBP として皮膚を透過することから、異物代謝酵素活性が律速となって見かけの透過速度が決定される可能性が考えられる。一般に、不死化した細胞株では、あるいは初代培養細胞でさえも、異物代謝のような分化機能は *in vivo* と比較して減衰あるいは喪失している例が多い。したがって、今後の展望として、肺や皮膚における初回通過代謝を反映できる *in vitro* 評価系の確立が重要な課題になると考えられる。

以上のように、本研究では家庭用品から室内環境への SVOC 負荷量を推定し、室内環境媒体間の分配予測に必要な物性値を推算するための手法として  $\mu$ -CTE 放散試験並びに DFT/COSMO-RS 法を提示した。さらに、初回通過代謝も含めた暴露経路依存的な生物学的利用率を予測するため経気道暴露モデル及び経皮暴露モデルの構築を行った。今後、SVOC をはじめとする室内環境中の多種多様な化学物質に本法を適用することによって、主要な暴露経路や多経路暴露量の予測が可能になるものと期待される。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

- 1) Hanioka, N., Tanabe, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nagaoka, K., Naito, S., Koeda, A. and Narimatsu, S.: Functional characterization of human and cynomolgus monkey UDP-glucuronosyltransferase 1A1 enzymes. *Life Sci.*, **87**, 261-268, 2010
- 2) Hanioka, N., Yamamoto, M., Tanaka-Kagawa, T., Jinno H. and Narimatsu, S.: Functional characterization of human cytochrome P450 2E1 allelic variants: in vitro metabolism of benzene and toluene by recombinant enzymes expressed in yeast cells. *Arch. Toxicol.*, **84**, 363-371, 2010
- 3) Kawakami, T., Isama, K., Matsuoka, A.: Analysis of phthalic acid diesters, monoester, and other plasticizers in polyvinyl chloride household products in Japan. *T. Environ. Sci. Health Part A*, in press
- 4) Sugibayashi, K., Todo, H., Oshizaka, T. and Owada, Y.: Mathematical model to predict skin concentration of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative. *Pharm. Res.*, **27**, 134-142, 2010

### F-2. 学会発表

- 1) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 西村 哲治: 計算化学による半揮発性有機化合物の室内環境動態予測に関する研究. フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシ

コロジュー (2010.9)

- 2) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 古川 容子, 埴岡 伸光, 西村 哲治, 成松 鎮雄, 神野 透人: リン酸エステル系可塑剤・難燃剤の TRP イオンチャネルに対する影響. フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジュー (2010.9)
- 3) 田邊 奈都子, 埴岡 伸光, 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 小枝 暁子, 内藤 真策, 成松 鎮雄: ヒト及びカニクイザル UGT1A10 の cDNA クローニングと酵素機能解析. 第 49 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (2010.11)
- 4) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 西村 哲治: フラックス発生量測定法による大形木製家具から放散されるアルデヒド類の定量的評価手法に関する研究. 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
- 5) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 西村 哲治: フラックス発生量測定法による大形木製家具から放散される VOC の定量的評価手法に関する研究. 第47回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
- 6) 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 神野 透人, 西村 哲治: 大形チャンバー法を用いた大形木製家具からのアルデヒド類及び VOC の放散に関する研究. 第47回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
- 7) Jinno H., Furukawa Y., Tanaka-Kagawa T. and Nishimura T.: Screening of Flame Retardants in Textiles by DART-TOFMS. The 2nd Korea-Japan Symposium on Environmental Chemistry (2010.11)
- 8) Tanaka-Kagawa T. Jinno H., Furukawa Y. and Nishimura T.: Field Survey on the Phthalates in House Dust and Residential Air. The 2nd Korea-Japan Symposium on Environmental Chemistry (2010.11)

- 9) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 西村 哲治: 大形家具から放散されるアルデヒド類及び揮発性有機化合物のフラックス発生量測定法による予測. 平成 22 年度室内環境学会学術大会 (2010.12)
- 10) 古川 容子, 香川(田中) 聡子, 田中 研次, 神野 透人, 西村 哲治: 機能カーテンから放散される揮発性有機化合物—GC/TOFMS による網羅的解析. 平成 22 年度室内環境学会学術大会 (2010.12)
- 11) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 西村 哲治: 家庭用品からの準揮発性有機化合物の放散に関する研究. 日本薬学会第 131 年会 (2011.3)
- 12) 河上 強志, 伊佐間 和郎, 松岡 厚子: 一般家庭用品中のフタル酸ジエステル類およびモノエステル類の実態調査. 第 19 回環境化学討論会. (2010.6)
- 13) Kawakami, T., Isama, K. and Matsuoka, A.: Phthalic acid diesters and monoesters in household products in Japan. 30th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. Dioxin 2010 (2010.9)
- 14) 河上 強志, 伊佐間 和郎, 松岡 厚子: 家庭用品中のフタル酸エステル類の含有量調査. 日本環境化学会第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
- 15) 田中 玄弥, 小森 喜久夫, 藤井 隆夫, 古川 容子, 神野 透人, 酒井 康行: 培養ヒト肺胞上皮モデルを用いたフタル酸エステル類代謝・透過・毒性. 化学工学会第 42 回秋季大会 (2010.9)
- 16) 田中 玄弥, 小森 喜久夫, 藤井 隆夫, 神野 透人, 酒井 康行: 培養ヒト肺胞上皮モデルを用いた半揮発性有機化合物の肺障害と吸収予測. 日本動物実験代替法学会第 23 回大会 (2010.12)
- 17) 田中 玄弥, 小森 喜久夫, 藤井 隆夫, 神野 透人, 酒井 康行: 培養肺胞内モデルを用いたフタル酸エステル類のリスク予測. 化学工学会第 76 年会 (2011.3)
- 18) 押坂 勇志, 藤堂 浩明, 杉林 堅次: 表皮から真皮および真皮から表皮への薬物透過の差異に関する研究. 日本薬剤学会第 25 年会 (2010.5)
- 19) 押坂 勇志, 藤堂 浩明, 杉林 堅次: 薬物の物理化学的性質を用いた皮膚中濃度の予測. 日本薬学会第 131 年会 (2011.3)
- 20) 高原 佑輔, 埴岡 伸光, 香川(田中) 聡子, 神野 透人, 成松 鎮雄: フタル酸ジエステル類の代謝に関与するカルボキシエステルゼ分子種. 第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会 (2010.5)
- 21) 高原 佑輔, 埴岡 伸光, 香川(田中) 聡子, 神野 透人, 成松 鎮雄: フタル酸ジエステル類のヒト肝ミクロゾームにおける加水分解反応. フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010.9)
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)
- G-1. 特許取得  
なし
- G-2. 実用新案登録  
なし



## II. 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

コンピューターケミストリを利用した家庭用品中化学物質の  
多経路暴露評価手法の開発に関する研究

研究分担者 神野 透人 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室長  
研究協力者 香川 (田中) 聡子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官

研究要旨: 家庭用品に由来する準揮発性有機化合物 (SVOC) の経路依存的な暴露量を推定する上で、室内環境中での SVOC の挙動、すなわち生活環境暴露媒体間の移行速度あるいは平衡濃度を適切に評価することが重要である。そこで、本研究では SVOC の分布に大きな影響を及ぼすと考えられる水-Octanol 分配係数 (LogPow)、蒸気圧、Henry 定数等の熱力学物性値の推定手法を確立する目的で、非経験的な量子化学計算に基づく COSMO-RS 法の適用可能性について検討を行った。リン酸トリエステル類 11 物質及びフタル酸エステル類 7 物質の計 18 物質について COSMO-RS 法並びに構造活性相関 (EPI Suite 及び SPARC ver. 4.5) よる物性値の推算を行った。その結果、LogPow に関しては実験値と COSMO-RS 法推算値との間に良好な相関性が認められたものの、蒸気圧に関しては特にリン酸トリエステル類で実験値との間に大きな乖離がみられる化合物が存在した。本研究の結果から、非経験的な手法である COSMO-RS 法は構造活性相関に基づく EPI Suite 等の手法の補完法として有用であると考えられる。

A. 研究目的

室内環境中の化学物質、特に可塑剤フタル酸エステル類等の準揮発性有機化合物 (Semi-volatile Organic Compound, SVOC) は室内空気中にガス状及び粒子状で存在するばかりではなく、その多くの部分がハウスダストに付着して存在しており、呼吸に伴う経気道暴露の他にハウスダストの摂食による経口暴露が懸念されている。また、経気道暴露に関しても、存在形態 (ガス状及び粒子状) あるいは粒子径に依存して暴露部位 (鼻腔、気管及び肺) や生物学的利用率が大

きく異なることが予想される。したがって、家庭用品に由来する化学物質の主要な暴露経路を推定するためには、生活環境中での SVOC の挙動、すなわち暴露媒体間の移行速度あるいは平衡濃度を適切に評価することが重要であると考えられる。そこで、本研究では家庭用品に由来する生活環境化学物質として可塑剤フタル酸エステル類及び難燃剤/可塑剤リン酸トリエステル類に着目し、これらの SVOC の熱力学物性値を非経験的に推定する一連の手法を確立する目的で、COSMO-RS 法 (Conductor like Screening

Model for Realistic Solvents) の適用可能性について検討を行った。

## B. 実験方法

### B-1 配座探索及び量子化学計算

リン酸トリエステル類 11 物質 (Trimethyl Phosphate, Triethyl Phosphate, Tributyl Phosphate, Tris(2-chloroethyl) Phosphate, Tris(1-chloro-2-propyl) Phosphate, Tris(1,3-dichloro-2-propyl) Phosphate, Triphenyl Phosphate, Cresyl Diphenyl Phosphate, Tricresyl Phosphate, Trixylenyl Phosphate, Tris(isopropylphenyl) Phosphate) 及びフタル酸エステル類 7 物質 (Dimethyl Phthalate, Diethyl Phthalate, Dibutyl Phthalate, Diisobutyl Phthalate, Benzyl Butyl Phthalate, Di-n-hexyl Phthalate, Bis(2-ethylhexyl) Phthalate) の 3 次元分子構造を ChmeBio3D Ultra ver. 12 (CambridgeSoft) を用いて作成した。この 3 次元座標データ (MDL-MOL 形式) を初期構造として、配座探索プログラム CONFLEX ver. 6 により 1 ないし 3 kcal/mol 以内のエネルギー範囲の配座空間を探索し、最安定構造を取得した。

密度汎関数 (DFT) 法による量子化学計算には PQSMol ver. 1.2-20-win 及び PQS ab initio ver. 3.3 (Parallel Quantum Solutions) を使用し、汎関数 BVP86、基底関数 tzvp\_ahlrichs により構造最適化及び表面電荷の算出を行った。

### B-2 熱力学物性値の推算

COSMO-RS 法による熱力学物性値の算出には COSMOtherm ver. C21\_0111 (COSMOlogic) を使用した。併せて、定量的構造活性相関による物性値の推算についても、EPI Suite ver.4 及び SPARC Online (<http://archemcalc.com/sparc/>) を利用して検討を行った。

## C. 結果と考察

CONFLEX による配座探索で得られた最安定構造を初期構造として構造最適化を行った。COSMO 計算で得られたリン酸トリエステル類及びフタル酸エステル類の表面電荷分布をそれぞれ図 1 及び図 2 に示した。また、リン酸トリエステル類の物性値について、PhysProp データベース (Interactive PhysProp Database Demo; <http://www.syrres.com/>) に収載されている実験値並びに COSMO-RS 法、EPI-Suite、SPARC による推算値をそれぞれ表 1、表 2、表 3、表 4 にまとめた。同様にフタル酸エステル類物性値の実験値並びに推算値を表 5～表 8 に示した。

LogPow について実験値と COSMO-RS 法推算値の関係をみると、直線性 ( $r^2$  値) は 0.943 (リン酸トリエステル類, 図 3)、0.9905 (フタル酸エステル類, 図 4) であり、構造活性相関を基にした EPI Suite (KOWEIN) (それぞれ  $r^2 = 0.9693$ 、 $0.9814$ ) や SPARC (それぞれ  $r^2 = 0.9075$ 、 $0.9910$ ) とほぼ同等の精度で LogPow 値を推定できることが明らかになった。

一方、図 5 及び図 6 に示したように蒸気圧 (VP) について同様の比較を行うと、フタル酸エステル類ではいずれの手法でも直線性はほぼ同等であるのに対し (COSMO-RS, 0.8712; EPI Suite (MPBPVP), 0.830; SPARC, 0.9185)、リン酸トリエステル類については COSMO-RS 法の直線性は著しく劣っていた ( $r^2 = 0.6714$ , 図 6)。これは Tris(2-chloroethyl) Phosphate の実験値と推定値の差異が極めて大きいことに起因しており、この点については配座異性体の有無の確認等も含めて今後の検討課題である。

#### D. 結論

リン酸トリエステル類 11 物質及びフタル酸エステル類 7 物質の計 18 物質について COSMO-RS 法並びに構造活性相関 (EPI Suite 及び SPARC ver. 4.5) による物性値の推算を行った。その結果、LogPow に関しては実験値と COSMO-RS 法推算値との間に良好な相関性が認められたものの、蒸気圧に関しては特にリン酸トリエステル類で実験値との間に大きな乖離がみられる化合物が存在した。本研究の結果から、非経験的な手法である COSMO-RS 法は構造活性相関に基づく EPI Suite 等の手法の補完法として有用であると考えられる。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 神野透人, 香川 (田中) 聡子, 古川容子, 西村哲治: 計算化学による半揮発性有機化合物の室内環境動態予測に関する研究.フォーラム 2010:衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010年9月.

#### G.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし