

図9. 各被験者から得られた皮膚表面へのDBP移行量とトリグリセリド量の関係性
(但し、被験者DおよびIのデータは除く)

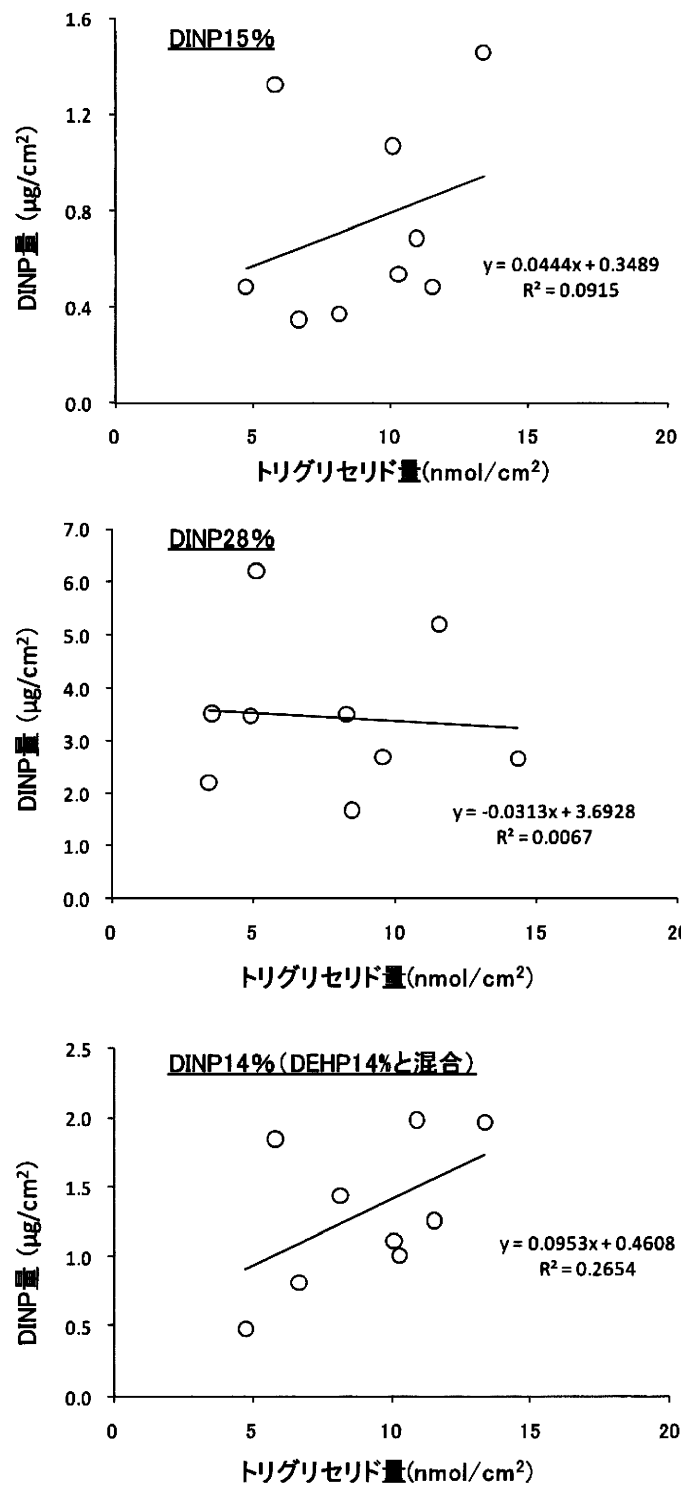


図 10. 各被験者から得られた皮膚表面への DINP 移行量とトリグリセリド量の関係性
(但し、被験者 D および I のデータは除く)

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 | 12.38 | 149 | 223 |
| DEHP | 391 | 117-81-7 | 14.92 | 149 | 167 |
| DINP | 419 | 28553-12-0 | 15.6 - 16.9 | 293 | 149 |
| DBP-d ₄ | 282 | 93952-11-5 | 12.37 | 153 | 227 |
| DEHP-d ₄ | 395 | 93951-87-2 | 14.91 | 153 | 171 |
| DNOP-d ₄ | 395 | 93952-13-7 | 15.84 | 153 | 283 |

*DBPおよびDEHP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. 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 |
| | 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 |
| | 14 (DEHP混合) | 13.4 | 0.24 | 1.8 |

*昨年度報告書より抜粋

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
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

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。平成 22 年度では、フタル酸エステル類の中のベンジルブチルフタレート（Benzyl Butyl Phthalate, BBP）に着目し、培養ヒト肺胞モデルに暴露した場合、観測される障害性・透過性・代謝等の生物学的な現象について、おおよそのメカニズムを把握した。その結果、BBP においては代謝物の生成量はモル比で 1/10 以下であり、代謝によって毒性が低減されることを考慮すれば、代謝物の生成・透過は目的のためには考慮しなくてもよいと考えられた。このメカニズムに基づき、肺胞内腔側・細胞層・血液側の三者間に動的な分配平衡が成り立つと仮定し、培養系で決定した速度論的パラメータを利用して、透過現象を簡単な数理モデルで概ね記述することができた。さらに、実肺胞と用いた肺胞モデル差異を数理モデル上で修正することで、より確からしい予測に結びつく可能性が示された。

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 22 年度では、フタル酸エステル類の中のベンジルブチルフタレート (Benzyl Butyl Phthalate, BBP) に着目し、培養ヒト肺胞モデルに暴露した場合、観測される障害性・透過性・代謝等の生物学的な現象について、おおよそのメカニズムを把握すると共に、培養肺胞モデルでのパラメータ決定を踏まえて、簡単な数理モデルを構築した。さらに、実肺胞と用いた肺胞モデル差異を数理モデル上で修正することの意義を検証した。

B. 研究方法

B-1. フタル酸エステル類とその暴露

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、細胞培養系に暴露した。

B-2. 肺胞由来細胞の培養と原体および代謝物の毒性評価 (図 1 A)

細胞には、肺胞由来ガン細胞株である A549 細胞 (肺胞の II 型上皮細胞由来) を用いた。肺障害性試験においては、12 穴のマルチウェルプレートに 1.0×10^5 cells/cm² で播種し、3 日後に培養液にフタ

ル酸エステル原体およびその代謝物を暴露した。48 時間後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-3. 培養肺胞モデルによる原体および代謝物の透過性評価 (図 1 B)

半透膜型培養器 (Costar 3460 (12 穴用)) 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 (通常約 10 日間) 培養した。

このように形成した培養ヒト肺胞モデルにおいて、膜上面側 (肺胞内腔側) から BBP を 0.10 -10 mM、または膜下面側 (血液側) から 33 μM -3.3 mM の濃度で 48 時間暴露した。なお、数理モデル化を全体の対象としては、計測において環境由来のコンタミネーションの可能性が低い、BBP のみを専ら対象とした。数理モデルで必要となる速度論的パラメータの取得のために、肺胞内腔側および血液側から暴露後、BBP 並びに代謝物の MBuP, MBeP の反対側への透過量を 1, 3, 6, 12, 24, 48 時間にて計測した。また必要に応じて細胞層内の蓄積量を定量した。培養液および細胞層内 BBP の定量は、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変性させた後、遠心後に HPLC に導入した。

なお、本研究では倫理的配慮を必要とする実験は行わなかった。

C. 研究結果および考察

C-1. 単層培養における毒性評価

単層培養した A549 細胞に BBP, MBuP, MBeP 48 時間の暴露した場合の用量作用関係から、細胞死を指標とした場合の EC50 値を求め、ラットの急性致死毒性 (LD50) と比較した (表 1)。また、前年度に取得した DBP 原体, DEHP, MEHP の結果も併記した。計測した全ての原体およびそれらの代謝物について、EC50 値は 100 μ M 以上であり、細胞毒性は弱いと結論できた。

BBP 原体およびその細胞内カルボキシエステラーゼによる代謝物 MBeP 及び MBuP については、動物試験ではその変化はあまり顕著でないものの、細胞系においては代謝による大幅な毒性低減が見られた。

DBP 原体及び代謝物の MBuP については、動物実験と細胞培養実験とで毒性の順位が逆転した。また、DEHP 原体および代謝物の MEHP については、細胞培養系でも動物試験でも代謝によって毒性が増大することが確かめられた。特に動物にてその増大がより顕著であったことから、*in vivo* においては体内エステラーゼの関与に注意を払うことの必要性が強く示された。

C-2. 培養肺胞モデルによる透過と代謝の評価

肺胞モデル上面 (内腔側) に 1-10 mM の BBP を暴露, 48 時間後の肺胞側・血液側の BBP 原体の濃度を図 2 に示す。十分に時間が経過した後でも、肺胞側と血液側は同濃度にならず、特に高濃度暴露で肺胞側の濃度が高くなった。このことから BBP 原体の透過は、単純に濃度差を推進力とする輸送ではなく、関与するコンパートメント間の濃度が分配平衡関係にあると仮定する方がより適切であることが明らかとなった。

肺胞内腔・細胞層内・血液側はいずれも水を主成分とはするが、例えば肺胞内腔側における界面活性成分の存在や細胞層における多量のリン脂質膜成分の存在などその組成は大きく異なり、物質の溶解濃度はそもそも平衡にならないとすることが簡単かつ妥当であると思われた。

添加した BBP 原体から 48 時間後に生成した代謝物 MBuP, MBeP の濃度を図 3 に示す。MBuP と MBeP の濃度を比較すると、MBuP 濃度が高いことから MBuP への代謝反応の方が起こりやすいことが分かった。また、今回測定した 1-10 mM の高濃度領域においては、代謝物濃度は原体濃度と比較してモル比で 1/10 以下と十分に小さかった。また、代謝によって毒性が低減されることをも加味すると、肺胞での代謝は BBP 暴露リスクを評価する上で無視できると考える。

C-3. 数理モデル構築とパラメータ決定

以上の結果から、①肺胞において、BBP の代謝は無視できる、②肺胞内腔側と血

液側の濃度は同じにならずに平衡に達する、いう二つの結果が得られた。これらを考慮に入れ、肺胞内腔側液相・細胞相・血液相の3つの相間のBBP濃度が簡単な動的分配平衡関係にあると仮定した(図4)。この場合、各コンパートメントにおける物質収支式は、各相間の順方向と逆方向のフラックスのバランスで記述できる(図4)。

この仮定の下で、単層培養およびカルチャーインサート培養した細胞にBBPを暴露し、培養液中の濃度変化を速度論的に検討し、パラメータを決定した。

まず、単層培養細胞への暴露する実験から、図4の①式の k_1 、 k_2 を決定した(図5)。すなわち、単層培養においては血液側を考える必要がなく、かつ添加直後においては、細胞内の濃度を無視できる。この仮定により、培養液添加直後のBBP濃度変化の初期の傾きから $k_1=2.47 \times 10^{-2}$ cm/hrと決定した。一方、平衡時には①式をゼロとおくことができ、 $k_2=1.59 \times 10^{-4}$ cm/hrと決定した。

次に、カルチャーインサートでの培養細胞の肺胞内腔および血液側に暴露し、両側の濃度変化を速度論的に検討し、図4の③式の k_3 および k_4 を決定した(図6)。添加直後においては血液側濃度およ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と決定した。また、平衡時には③式をゼロとおけることから、 $k_4=6.73 \times 10^{-1}$ cm/hrと決定した。

このよう決定したパラメータを用いて、改めて肺胞内腔側暴露・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(図7)。この結果、パラメータ決定に用いなかった血液側濃度変化についても、概ね記述できていることから、簡便な動的分配平衡モデルの妥当性が示唆された。

C-4. 拡張利用に向けて

培養ヒト肺胞モデルでの実験を元に構築した数理モデルを用いて動物実験データを使わずにヒト急性・慢性毒性を予測することは極めて難しく現状では科学的合理性が低いといわざるを得ない。そもそも他の臓器に関する生物学的な情報が皆無であり、これらは少なくとも適切な*in vitro*培養系の構築を待たねばならない。

より現実的な手法として、動物実験データを用い、肺胞経由での沿う取り込み量を基準としたラフな評価は、初期リスク評価としては使用できるのではないかと考えている。そのフレームを図8に示す。

ここで培養肺胞モデルでのデータと数理モデルの拡張利用を行うこととなるが、第一に注意を払うべき点は、使用している培養モデル自体の固有の問題の解決である。本年度ではあまり明らかにできなかったが、フタル酸エステル類の器壁への吸着が無視し得ないという可能性である。このような培養系辞退に内在する問題を排除して、数理モデルのパラメータを決定しておく必要がある。

第二に、現状の肺胞モデルは最良のものの一つではある。しかし、細胞が初代培養のものではなく、炎症性反応に関与するマクロファージの共存をも達成して

いない。これら正常ヒト肺胞と比較した場合の生物学的な差異の解決には、しばらくの時間を要しよう。これに対して、肺胞の厚さ（現状の培養系では 10 μm であるが、実際は 0.5-1.0 μm ）の問題と、閉鎖系培養であるという問題はモデル上で回避することが可能である。特に後者について実際の人体では肺内は豊富な血液で灌流されており、血液側の濃度は絶えずゼロと見なせる。試みに、単回暴露で肺胞の厚みを薄くし、血液側について zero shin 条件を仮定した場合の肺胞内腔側および血管側の濃度変化を図9に示す。構築した数理モデル上で、培養肺胞モデルの持つ限界性の一部を修正することで、より科学的な評価への結びつけることができよう。

D. 結論

本年度は、フタル酸エステル類の中のベンジルブチルフタレート (Benzyl Butyl Phthalate, BBP) に着目し、培養ヒト肺胞モデルに暴露した場合、観測される障害性・透過性・代謝等の生物学的な現象について、おおよそのメカニズムを把握した。その結果、BBP においては代謝物の生成量はモル比で 1/10 以下であり、代謝によって毒性が低減されることを考慮すれば、代謝物の生成・透過は目的のためには考慮しなくてもよいと考えられた。このメカニズムに基づき、肺胞内腔側・細胞層・血液側の三者間に動的な分配平衡が成り立つと仮定し、培養系で決定した速度論的パラメータを利用して、透過現象を簡単な数理モデルで概ね記述することができた。さらに、実肺胞と用いた

肺胞モデル差異を数理モデル上で修正することで、より確からしい予測に結びつく可能性が示された。

E. 研究発表

E-1. 論文発表

なし

E-2. 学会発表

- 1) 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年9月.
- 2) 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年12月.
- 3) 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年3月.

F. 知的所有権の取得状況

F-1. 特許取得

なし

F-2. 実用新案登録

なし

表1. フタル酸エステル原体および代謝物の肺胞上皮細胞 EC₅₀ とラット急性 LD₅₀

| 曝露物質 | EC ₅₀ 値 (A549) [mM] | Rat LD ₅₀ (Oral) [mg/kg] |
|------|-----------------------------------|--|
| DBP | 0.13 | 7499 |
| MBeP | 4.50 | 2330 |
| BBP | 0.17 | 2330 |
| MBuP | 5.50 | 4800 |
| DEHP | 1.20 | 30000 |
| MEHP | 0.56 | 1340 |

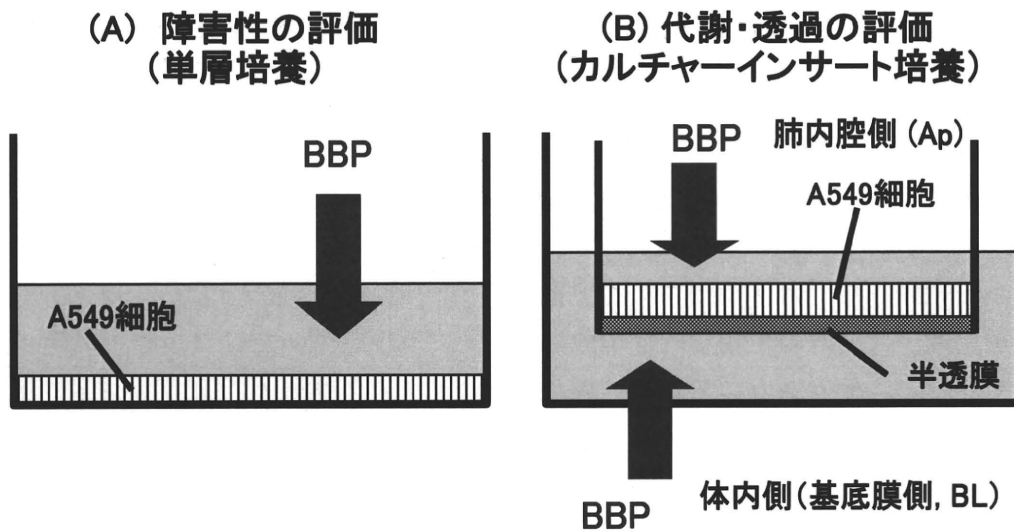


図1. ヒト肺胞上皮由来細胞を用いた肺上皮障害性(A)および代謝・透過性の評価系(B)

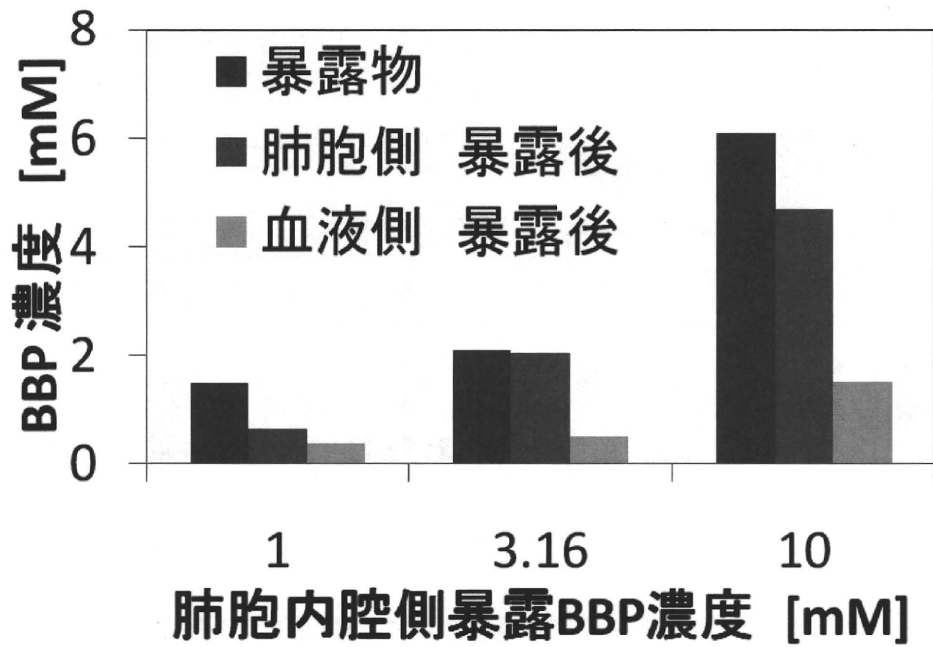


図2. 肺胞内腔側から BBP を暴露した際の 48 時間後の BBP 肺胞側・血液側濃度

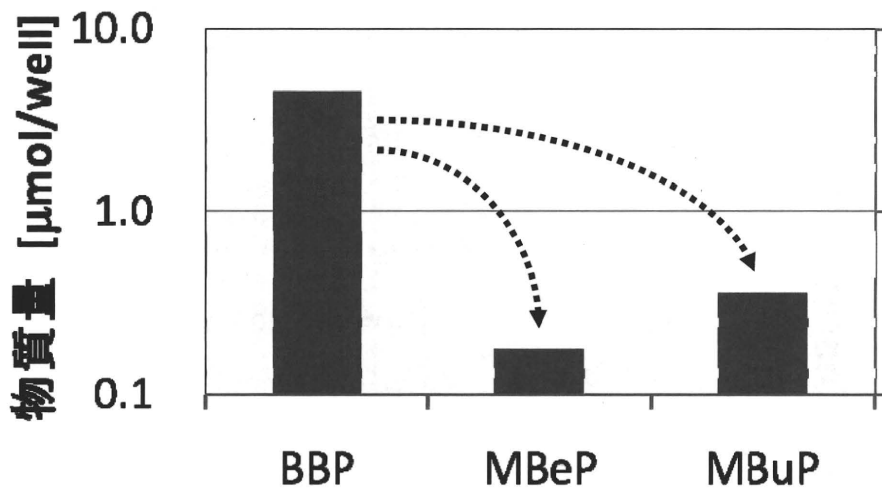


図3. BBP 添加 48 時間後の代謝物の生成

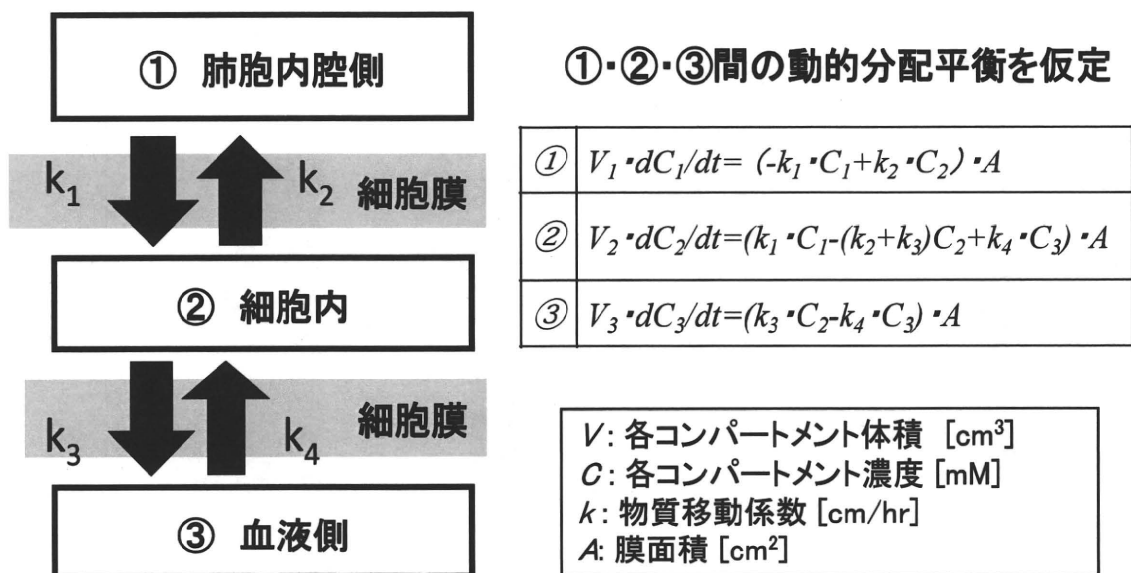


図4. 3相間の動的分配平衡を仮定する数理モデルと基礎式

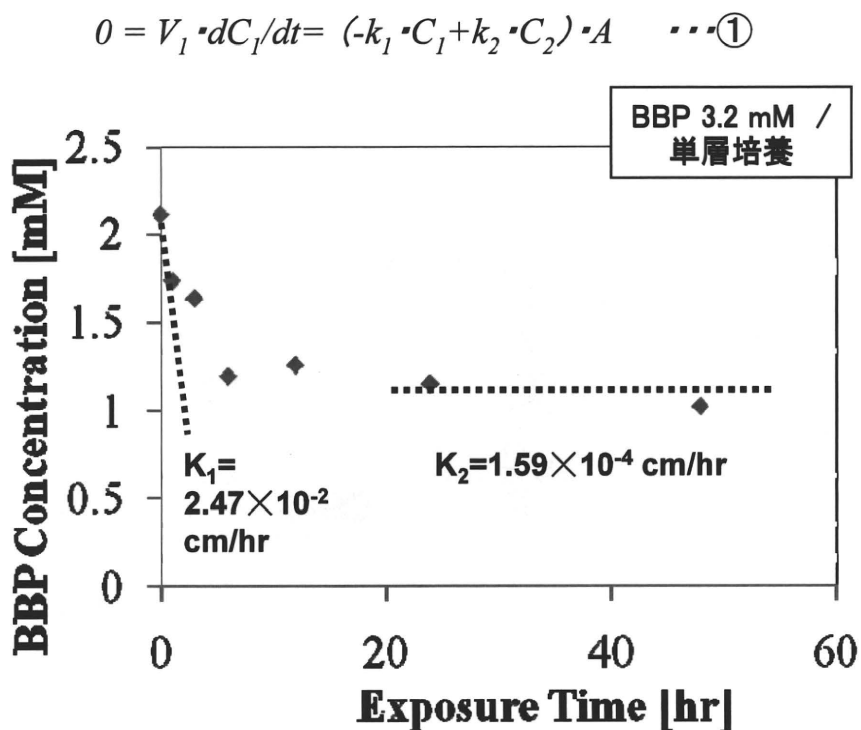


図5. 速度パラメータの決定①, 単層培養系

$$0 = V_3 \cdot dC_3/dt = (k_3 \cdot C_2 - k_4 \cdot C_3) \cdot A \quad \dots \textcircled{3}$$

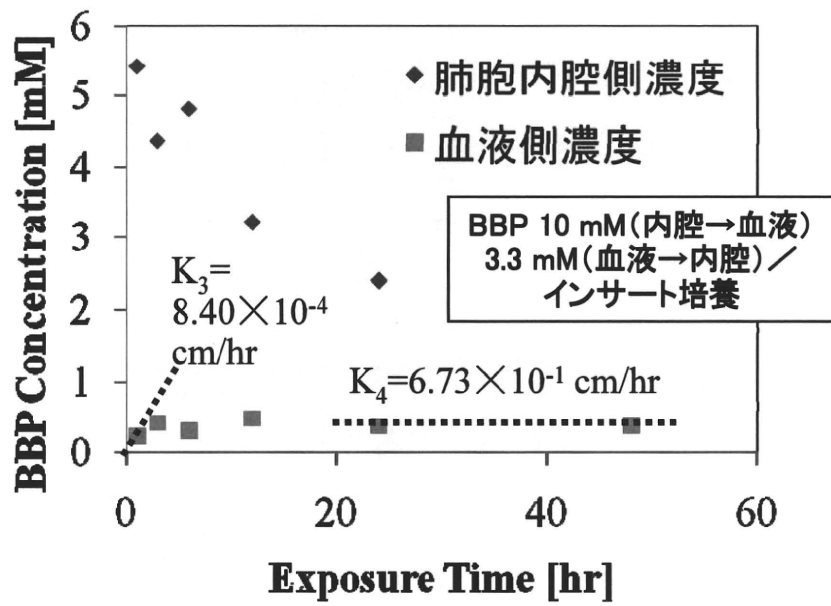


図6. 速度パラメータの決定②, カルチャーインサート系・肺胞側暴露

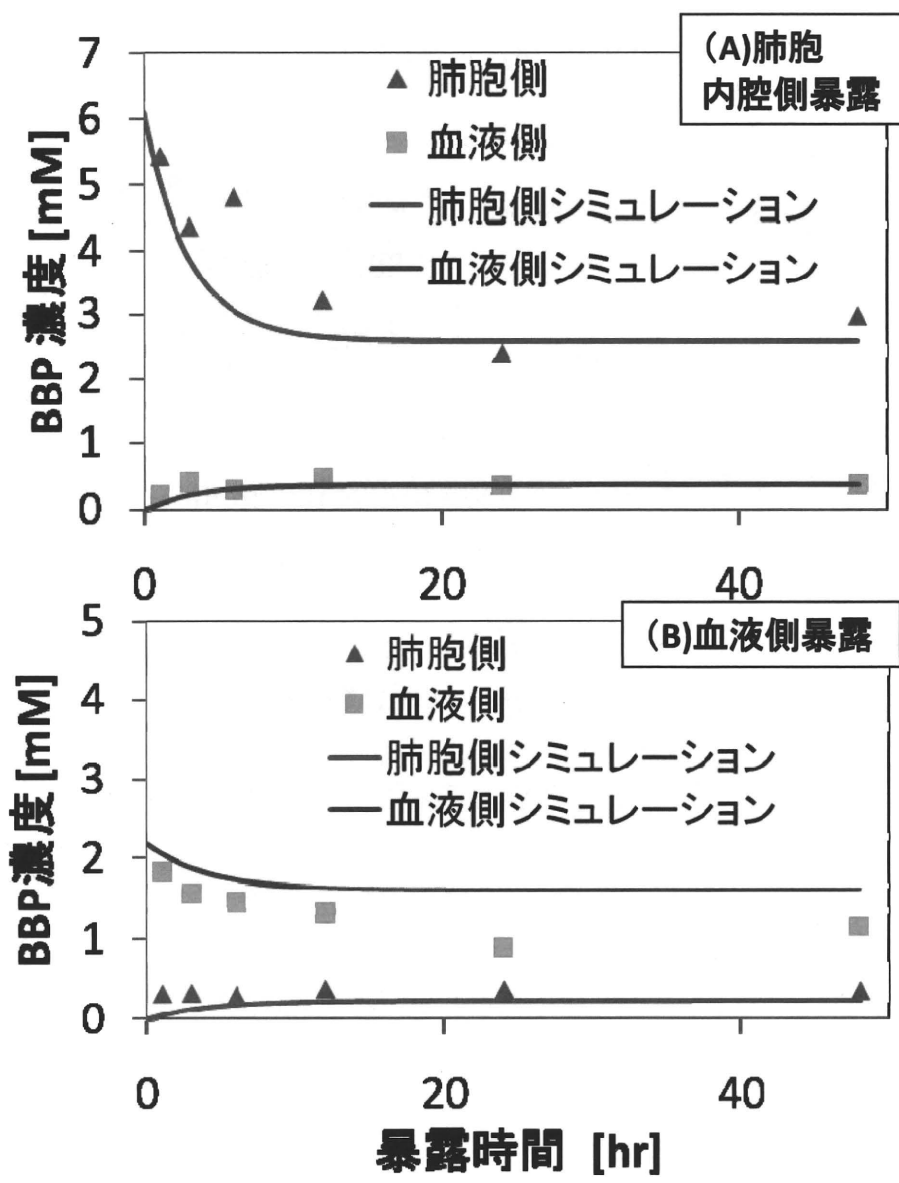


図7. 実験結果とシミュレーションの適合性. (A) 肺胞内腔側暴露条件(パラメータ決定に用いたもの), (B) 血液側暴露条件(パラメータ決定に用いていない).

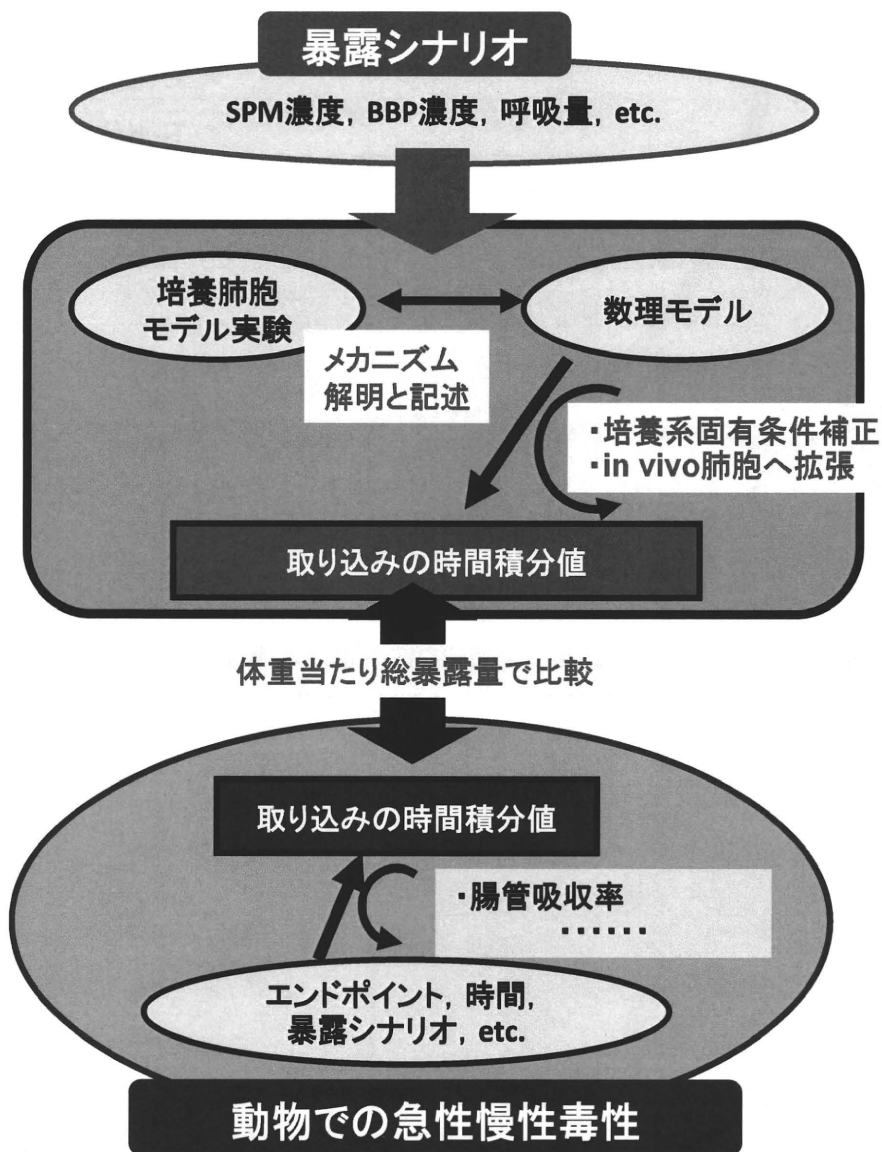


図8. 培養ヒト肺胞モデルとそこで構築された数理モデルとを用いた体内取り込み量の時間積分値予測およびその動物実験との比較

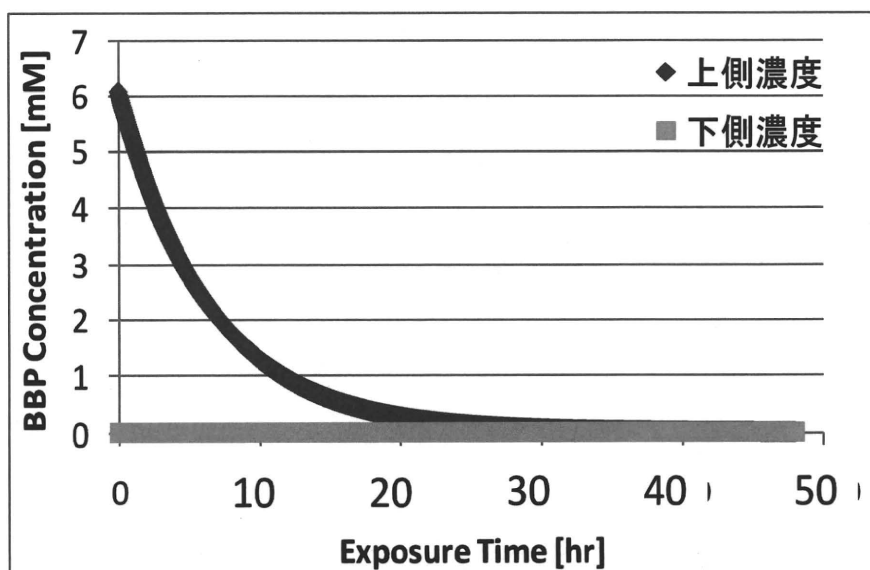


図9. 肺腔内腔側への単回暴露において、肺腔を薄く・血液側濃度を絶えずゼロとした時の肺腔および血液側濃度の推移

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

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

研究分担者：杉林 堅次 城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学講座 教授

研究協力者：藤堂 浩明 城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学講座 助教

研究要旨：フタル酸エステル類はプラスチックの可塑剤などに使用され、人体への皮膚暴露が考えられる。本研究では、フタル酸エステル類からフタル酸ジブチルおよびフタル酸ジエチルヘキシルを選択し、ヒトおよびヘアレスラット皮膚透過性並びに皮膚貯留性を評価した。

フタル酸ジブチルは皮膚中のエステラーゼにより代謝を受け、モノ体となることが確認されたが、モノ体からフタル酸への代謝は受けず、皮膚中ではモノ体として存在することが分かった。また、エステラーゼの代謝能は、ヒト皮膚よりもヘアレスラット皮膚で高くなる結果となった。すなわち、フタル酸ジブチルを皮膚に適用すると、本物質は皮膚に分配した後、速やかに代謝され、モノ体となり皮膚を透過することが明らかとなった。一方、フタル酸ジエチルヘキシル適用後のフタル酸ジエチルヘキシルおよびそのモノ体のヘアレスラット皮膚透過性は認められなかった。

これらの結果から、フタル酸ジブチルはその角質細胞への安全性評価と代謝物の皮膚局所（角質細胞および繊維芽細胞）および全身での安全性評価を、また、フタル酸ジエチルヘキシルは角質細胞への安全性評価のみを行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

フタル酸エステル類はプラスチックの可塑剤などに使用されているばかりか、家庭内でも皮膚に触れることが想定される家具、カーペットや建材などにも多数含まれており、皮膚暴露が懸念される。

フタル酸エステル類の多くは低分子（分子量 500 Da 以下）で脂溶性が高く（ $\text{Clog}P$ が正の値）、皮膚への高い分配性が予想される。化学物質の皮膚刺激性は、皮膚中濃度と暴露時間により決まる。ま

た、皮膚中濃度は、化学物質の皮膚透過性と強く関係する。したがって、化学物質の経皮暴露後の安全性を評価するためには、皮膚透過性や皮膚中濃度の測定が非常に重要となる。

一昨年度の報告では、フタル酸ジブチルはヘアレスラット腹部皮膚を透過せず、代謝物であるフタル酸モノブチルとして透過することを報告した。しかしながら、ヒト皮膚とラット皮膚では、皮膚中のエステラーゼ活性が異なることが報告され

ていることから、本年度ではヒト皮膚およびヘアレスラット中でのフタル酸ジブチルの代謝を評価した後、フタル酸ジブチルのヒト皮膚を介した透過性を評価した。また、今年度から新たにフタル酸ジエチルヘキシルを皮膚透過性の観点から分類し、フタル酸エステル類の経皮暴露後の安全性について評価した。さらに、フタル酸エステルを含む様々な化学物質の皮膚中濃度を予測するため、2層に分けた皮膚中の平均化学物質濃度を皮膚透過性試験から得られたパラメータから算出する方法の確立を試みた。

B. 研究方法

B-1. 化学物質の分類と毒性評価

化学物質は皮膚透過性の観点より3種類に分類し、それぞれに適した毒性評価を確立した。Figure 1に化学物質の皮膚透過性と毒性評価方法を示す。

Type Aは基剤から皮膚に分配しない化学物質で、これは皮膚を介して体内に移行しないと考え、経皮暴露しても安全であるとする。

Type Bは皮膚に貯留し、経皮暴露すると皮膚刺激性が懸念される化学物質で、これは、皮膚刺激性の評価が必須であると考えた。

Type Cは高い皮膚透過性を示す化学物質であるため、皮膚刺激性に加えて、血中移行後に全身の各臓器での障害評価が必須であると考えた。

B-2. 毒性評価における化学物質の分類定義

Figure 1に示した分類は化学物質の皮

膚透過性に基づいている。皮膚透過性を評価するために、皮膚透過係数 P すなわち化学物質の皮膚への流入速度を算出する。化学物質が皮膚に暴露されると、化学物質は Fick の拡散則に従い皮膚を流入・透過する。ここで、単位面積当たりの累積皮膚透過量 Q (mol/cm²) は、式(1)で示すことができる。

$$Q = \frac{DKC_v}{L} \left(t - \frac{L^2}{6D} \right) - \frac{2KC_v L}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{L^2}\right) \quad (1)$$

ここで、 D 、 K 、 C_v 、および L は皮膚バリアー中拡散係数 (cm²/s)、皮膚バリアー/基剤分配係数 (無次元)、化学物質基剤中濃度 (mol/mL) および皮膚バリアーの厚み (cm) である。また、式(1)を微分し皮膚透過速度 (mol/cm²/s) を表すと式(2)のようになる。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DKC_v}{L} \left[1 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp\left\{-\frac{Dn^2\pi^2 t}{L^2}\right\} \right] \quad (2)$$

式(2)は定常状態では右辺第二項がゼロになり、次式に簡略化できる。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DKC_v}{L} = PC_v \quad (3)$$

式(3)より透過係数 P (cm/s) は算出される。

また、皮膚の最外層に存在する角層は、部位によって異なるが、約20層の角質細胞からなり、約20 μmの厚みがある。角層は最外層から一日一層剥がれ落ちる(落屑する)ので、角層落屑速度は1 μm/day、すなわち約 1×10^{-9} cm/s と算出することができる。

経皮暴露した化学物質の分類は化学物質の透過係数 P と角層落屑速度との比較により行い、透過係数が角層落屑速度以下の化学物質は皮膚を介した体内への吸収はほとんどないと考えた。Table 1 に毒性評価における化学物質の分類定義を記す。

B-3. 2層拡散モデルによる皮膚中濃度の算出

2層膜拡散モデルにおいては、全体の透過係数 P_{tot} は角層の透過係数 P_{sc} と生きた表皮・真皮の透過係数 P_{ved} を用いて以下のように示される。

$$\frac{1}{P_{tot}} = \frac{1}{P_{sc}} + \frac{1}{P_{ved}} \quad (4)$$

また、これら透過係数の逆数 $1/P_{tot}$ 、 $1/P_{sc}$ 、 $1/P_{ved}$ は透過抵抗 R_{tot} 、 R_{sc} 、 R_{ved} となるので

$$R_{tot} = R_{sc} + R_{ved} \quad (5)$$

となる。さらに、図 2 の角層 (sc) と生きた表皮・真皮 (ved) 界面での point a、b、c において、ab と bc の比は R_{sc} と R_{ved} の比で示されることになる。すなわち point b での薬物濃度は次式で表すことができる。

$$C_b = K_{sc} C_v \frac{R_{ved}}{R_{tot}} \quad (6)$$

(6) 式を用いることにより、単位面積あたりの角層中の薬物量 M_{sc} は次式のように表すことができる。

$$M_{sc} = \frac{K_{sc} C_v L_{sc} \left(1 + \frac{R_{ved}}{R_{tot}} \right)}{2} \quad (7)$$

また、角層から表皮・真皮への分配係数は K_{sc} と K_{ved} の定義から K_{ved}/K_{sc} と表す

ことができる。したがって、単位面積当たりの生きた表皮と真皮 (ved) 中の薬物 M_{ved} は次式のように表すことができる。

$$M_{ved} = \frac{K_{ved} C_v L_{ved} \frac{R_{ved}}{R_{tot}}}{2} \quad (8)$$

最終的に単位面積あたりの皮膚中の薬物量 M_{tot} は次のように示すことができる。

$$M_{tot} = \frac{C_v}{2} \left\{ K_{sc} L_{sc} \left(1 + \frac{R_{ved}}{R_{tot}} \right) + K_{ved} L_{ved} \frac{R_{ved}}{R_{tot}} \right\} \quad (9)$$

(9) 式を皮膚の厚さ (L_{tot}) で除し、さらに R を透過係数 P で示すと、定常状態時の皮膚中濃度は、

$$\bar{C}_{ss} = \frac{C_v}{2L_{tot}} \left\{ K_{sc} L_{sc} \left(1 + \frac{P_{tot}}{P_{ved}} \right) + K_{ved} L_{ved} \frac{P_{tot}}{P_{ved}} \right\} \quad (10)$$

となる。以上より、分配係数 K 、透過係数 P を full-thickness skin と stripped skin 透過実験から求めれば、皮膚中濃度を予測することが可能となると考えた。

B-4. 試薬

フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸モノブチル (MBP)、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)、フタル酸モノエチルヘキシル (MEHP) およびエステルゼ阻害剤であるフルオロリン酸ジイソプロピル (DFP)、除タンパク剤であるトリクロロ酢酸 (TCA) は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。各パラベン類 (パラヒドロキシ安息香酸メチル (MP)、パラヒドロキシ安息香酸エチル (EP)、パラヒドロキシ安息香酸 *n*-プロピル (PP)、パラヒドロキシ安息香酸 *n*-ブチル (BP)) は東京化成株式会社 (東京) より購入した。その他の試薬は、特級、

HPLC用または試薬グレードのものを精製せず使用した。

B-5. 実験動物

凍結ヒト皮膚は(株)ケーエーシー(京都、日本)、雄性ヘアレスラット

(WBM/ILA-Ht、体重 200-250 g)は城西大学生命科学センター(埼玉、日本)または石川実験動物研究所(埼玉、日本)から購入した。

B-6. 倫理面への配慮

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験を行った。

B-7. フタル酸ジブチルの皮膚移行性試験

Figure 4に示した side-by-side 拡散セルにヘアレスラット摘出皮膚をセットし、0.72 mMに調製したフタル酸ジブチルのPBS溶液を3 mL適用し、12時間経過後にフタル酸ジブチルの皮膚移行性を調べた。12時間経過後に、適用したフタル酸ジブチルをすべて回収し、角層側をPBSで数回洗浄した後、全層皮膚(intact skin)およびセロファンテープで角層を除去した皮膚(stripped skin)中のフタル酸ジブチルの量を測定した。皮膚中量は、ハサミで適用部位を切り取り細断した後、PBSを加え氷冷下で電動ホモジナイザーを用いて、ホモジナイズし4%皮膚ホモジネートを作成した。得られた皮膚ホモ

ジネート 200 μ Lに同量のPBSを加え、サンプルとした。得られたサンプル 100 μ Lに内部標準物質を含有したアセトニトリルを同量混和し、攪拌後、遠心分離(15,000 rpm, 5 min, 4°C)によって除タンパク後、HPLCを用いて定量した。

B-8. フタル酸ジブチルのヒト皮膚およびヘアレスラット皮膚での代謝能の違い： K_m および V_{max} の算出

凍結ヒト皮膚およびヘアレスラット腹部摘出皮膚を用いてフタル酸ジブチルの皮膚中代謝性を評価した。皮膚をはさみで細断後、氷冷下にて電動ホモジナイザー(Polytron PT-MR 3000, Kinematica, Lucerne, Switzerland)を用いてホモジナイズ(12,000 rpm, 5 min)し、それぞれ10%皮膚ホモジネートを調製した。ヒト皮膚では、PBSに溶解させた7.5、10、15、20、30、40 μ Mのフタル酸ジブチル9.5 mLに上記皮膚ホモジネート0.5 mLを添加し、32°Cで経時的にサンプリングを行い、フタル酸モノブチルの生成速度を算出し、Hanes-Woolf plotを用いて K_m および V_{max} を算出した。また、ヘアレスラット皮膚では、同じく調製したフタル酸ジブチル9.75 mLに皮膚ホモジネート0.5 mLを添加し、 K_m および V_{max} を算出した。得られたサンプル100 μ Lに内部標準物質を含有したアセトニトリルを同量混和し、攪拌後、遠心分離(15,000 rpm, 5 min, 4°C)によって除タンパク後、HPLCを用いて定量した。

B-9. フタル酸ジブチルのヒト皮膚透過性

凍結ヒト皮膚は、32°C で 2 時間かけて解凍し、side-by-side 拡散セルにセットし、pH7.4 PBS で 12 時間水和した後、透過実験を行った。PBS で 0.72 mM に調製したフタル酸ジブチルを皮膚に適用し、経時的にサンプリングを行い、その皮膚透過性を評価した。得られたサンプル 100 μ L に内部標準物質を含有したアセトニトリルを同量混和し、攪拌後、遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) によって除タンパク後、HPLC を用いて定量した。

B-10. フタル酸ジエチルヘキシル並びにフタル酸モノエチルヘキシルの一斉定量

フタル酸ジエチルヘキシル並びにフタル酸モノエチルヘキシルの同時定量条件は、吸収波長 280nm、グラジエント法を用い、移動相は A 層に CH_3CN 、B 層に 0.5% phosphoric acid を用い、流速 1.0 mL/min で測定開始 4 min まで 7:3 の混合比で、次に 8 min まで混合比 10:0 とし、15 min で再び混合比を 7:3 とした。また、内部標準物質として nonyl 4-hydroxybenzoate を用いた。カラム温度は 40°C とした。

B-11. フタル酸ジエチルヘキシルの皮膚中安定性

0.13 μ M に調製したフタル酸ジエチルヘキシルおよびフタル酸モノエチルヘキシル 9.0 mL に上記皮膚ホモジネート 1.0 mL を添加し (最終皮膚ホモジネートは 0.25% に調製)、経時的に HPLC を用いてフタル酸ジエチルヘキシルおよびフタル

酸モノエチルヘキシルの濃度を定量した。解析は 0 時間のフタル酸ジエチルヘキシルの濃度を 100% とし各時間のフタル酸ジエチルヘキシル減少率を求めた。また、エステラーゼによる代謝を確認するためにエステラーゼの阻害剤である DFP を使用し、同様の実験を行った。

B-12. フタル酸ジエチルヘキシル並びにフタル酸モノエチルヘキシルのヘアレスラット腹部皮膚透過性試験

ヘアレスラット腹部皮膚は、ペンタバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, *i.p.*) でヘアレスラットの腹部皮膚を剃毛後、清拭しはさみを用いて摘出した。また、損傷皮膚を想定した stripped skin ではセロハンテープ (セロテープ®, ニチバン株式会社, 埼玉) を使用し、角層を完全に除去するためテープストリッピングを 20 回行った。真皮側の脂肪等を除去後、pH7.4 リン酸緩衝液 (PBS) または DFP を入れた 5 mL マイクロチューブで 30 min インキュベートし、side-by-side 型拡散セルに挟み、表皮側に 0.26 μ M のフタル酸ジエチルヘキシルまたは 1.43 mM のフタル酸モノエチルヘキシルの PBS 溶液を、真皮側に PBS または DFP 溶液を適用し、これらの皮膚透過性を測定した。経時的にサンプリングを行い、得られたサンプル 100 μ L に内部標準物質を含有したアセトニトリルを同量混和し、攪拌後、遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) によって除タンパク後、HPLC を用いて定量した。