

B-13.2 層拡散モデルを用いた平均皮膚中濃度の算出

ヘアレスラット摘出皮膚を直ちに 32°C の水を循環させた Franz 型拡散セルに挟み、真皮側に DFP (2.7 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) を溶解した PBS を 30 分適用し、その後に DFP を取り除いてパラベン類の透過実験を行った。角層側には、パラベン類を溶解させた (MP 10 mM、EP 5 mM、PP 1 mM、BP 0.5 mM) PBS 0.5 mL を、真皮側に DFP (0.54 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) を溶解した PBS を適用し、パラベン類の皮膚透過実験を行った。実験中、真皮側溶液はマグネットスターラーで攪拌した。経時的に真皮側から溶液を 400 μL 採取し、同量の PBS を戻した。得られたサンプル溶液のパラベン類濃度は HPLC を用いて測定した。

抽出率の算出は以下の通りに行った。DFP 処理後の皮膚をはさみで細断し、PBS に溶解したパラベン類溶液を 1 mL 加え、電動ホモジナイザー (12000 rpm, 5 min, 4°C) (Polytron PT-MR 3000, Kinematica, Switzerland) にてホモジナイズした。その後、32°C、1 hr、インキュベートした。そこに、16%トリクロロ酢酸/PBS 溶液を 1 mL 加え 15 min 攪拌し、遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 4°C) 後、上清を HPLC を用いて測定した。その後、PBS 抽出液を別の容器に移し、ホモジナイズした皮膚にクロロホルム 1 mL を加え、15 min 攪拌して再び抽出した。そして、遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 4°C) し、抽出液を別の容器に移した。抽出液を蒸発・乾固させ、アセトニトリルで再溶解させたものを HPLC を用いて

測定した。抽出した濃度を適用した濃度で除して抽出率を算出した。

皮膚中濃度は以下のように求めた。In vitro 皮膚透過実験終了後、ドナー溶液を回収し、皮膚を PBS 1 mL で 2 回洗浄した。その後、皮膚を拡散セルから取り外し有効透過面積 (1.77 cm^2) で切り取り、冷凍保存した。冷凍保存した皮膚をハサミで細断し、PBS を 1 mL 加え、電動ホモジナイザー (12000 rpm, 5 min, 4°C) にてホモジナイズした。その後 PBS に溶解させたトリクロロ酢酸 16% 溶液を 1 mL 加え 15 min 攪拌し、遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 4°C) 後、上清を HPLC を用いて測定した。その後は抽出率算出方法と同様に抽出した。皮膚中濃度は HPLC で定量したパラベン類量を皮膚重量で除し、抽出率を考慮したものを実測膜中濃度とした。

B-14. パラベン類の定量

採取した試料溶液は、内部標準物質を溶かした同容量のアセトニトリルを加え、ミキサーで混合後、遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を HPLC に注入した。HPLC のシステムは、Pump : LC-10AD (Shimadzu, , Japan) , Chromatopac : C-R6A (Shimadzu, , Japan) , UV detector : SPD-6A (Shimadzu, , Japan) , System controller : SCL-6B (Shimadzu, , Japan) , Auto injector : SIL-7A (Shimadzu, , Japan) を用いた。定量条件として、Column は Lichrospher® 100-18e, 4 mm×250 mm (MARCK, Darmstadt, Germany) を使い、Column

温度は 40 °C に保った。Mobile phase は、0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile = 75 : 25 (MP and EP)、0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile = 55 : 45 (PP and BP) を用い、流速 1 mL / min で流した。Injection volume は 20 μ L とし、UV 260 nm で定量を行った。

C. 研究結果

C-1. フタル酸ジブチルの皮膚移行性の結果

Figure 5 にフタル酸ジブチルをヘアレスラット摘出皮膚に適用した後の、フタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチルの皮内分布を調べた結果を示す。健常皮膚である intact skin および角層損傷皮膚である stripped skin のいずれの皮膚からも代謝物であるフタル酸モノブチルのみが認められ、フタル酸ジブチルは皮膚中に認められなかった。一方、エステラーゼ代謝阻害剤である DFP 処理を施した皮膚ではフタル酸ジブチルが intact skin からのみ認められ、フタル酸モノブチルは認められなかった。この結果より、フタル酸ジブチルは皮膚に移行した後、速やかにフタル酸モノブチルに代謝され、フタル酸モノブチルとして皮膚を透過すると考えられた。また、DFP 処理した stripped skin 中にフタル酸ジブチルが認められなかったことから、角層と生きた表皮の界面で、フタル酸ジブチルが代謝され、フタル酸モノブチルとして皮内を透過すると考えられた。なお、これらの結果は、昨年度報告した、フタル酸ジブチルの皮膚透過性試験結果から推測された結果と一致した。

C-2. 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中での代謝能の違い

フタル酸ジブチルが皮膚に存在するエステラーゼにより代謝され、フタル酸モノブチルとして皮膚を透過することを明らかにしたが、ヘアレスラット皮膚とヒト皮膚では、エステラーゼ活性に違いがあるとの報告から、ヒト摘出皮膚を用いてフタル酸ジブチルの代謝速度を調べた。その結果、ヒト摘出皮膚では、 K_m 、 V_{max} および K_m/V_{max} がそれぞれ 26.2 μ mol/mL、 5.2×10^{-2} μ mol/min/mg protein および 2.0×10^{-3} min/mg protein となり、ヘアレスラット皮膚では 14.7 μ mol/mL、 2.1×10^{-1} μ mol/min/mg protein および 1.5×10^{-2} min/mg protein となった。この結果から、ヒト皮膚とヘアレスラット皮膚とは、エステラーゼ酵素の親和性や量が大きく異なり、ヘアレスラット皮膚ではヒト皮膚よりも皮膚中でフタル酸ジブチルが早く代謝されモノブチルとなることが示唆された。

C-3. フタル酸ジブチルのヒト皮膚透過性結果

Figure 6 にフタル酸ジブチルをヒト摘出健常皮膚 (intact skin) および角層除去皮膚 (stripped skin) に適用した時の、フタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチルの皮膚透過性を調べた結果を示す。フタル酸ジブチルは intact skin を透過せず、皮内で代謝されてフタル酸モノブチルとして透過することが分かった。また、同様の結果が stripped skin でも認められた。さらに、intact skin および stripped

skin を介したフタル酸モノブチルの透過量は、同程度であった。

フタル酸ジブチルの透過性は、本検討からは認められなかったが、フタル酸ジブチルの HPLC の最小検出感度、適用濃度およびレシーバー量から算出したフタル酸ジブチルの intact skin および stripped skin を介した透過係数はそれぞれ、約 2.6×10^{-10} cm/s と約 5.1×10^{-10} cm/s であった。

ジブチル体がモノ体に代謝されて皮膚を透過する結果は、ヘアレスラット皮膚を用いた昨年度の結果と一致した。

C-4. 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結果

Figure 7 に HPLC を用いた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したクロマトグラムを示す。本実験装置並びに測定条件で、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は一斉定量できた。また、この測定条件での最小定量感度は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は、それぞれ 0.005 μ M および 0.001 μ M であった。

C-5. フタル酸ジエチルヘキシルの皮膚中安定性試験結果

Figure 8 にフタル酸ジエチルヘキシルの皮膚内代謝試験結果を示す。フタル酸ジエチルヘキシルは皮膚ホモジネート中で代謝し、フタル酸モノエチルヘキシルが生成されることが認められた。これらの結果より、フタル酸ジエチルヘキシルは

皮膚内で、エステラーゼにより代謝されモノ体を生成することがわかった。

C-6. 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結果

Figure 9 にフタル酸ジエチルヘキシルをヘアレスラット皮膚に適用した後の、フタル酸ジエチルヘキシル (Fig.9 a) およびそのモノ体 (Fig.9 b) の透過を調べた結果を示す。ヘアレスラット皮膚透過性は、intact skin、DFP 処理 intact skin、stripped skin および DFP 処理 stripped skin を用いて評価した。いずれの膜でも、フタル酸ジエチルヘキシルおよびそのモノ体の透過は認められなかった。そこで、フタル酸ジエチルヘキシルの HPLC の最小検出感度、適用濃度およびレシーバー量から算出した intact skin および stripped skin を介した透過係数は、約 1.1×10^{-10} cm/s と、約 1.4×10^{-10} cm/s であった。

次に、代謝物であるフタル酸モノエチルヘキシル適用後の、フタル酸モノエチルヘキシルの皮膚透過性を調べた。Figure 10 にその結果を示す。ヘアレスラット皮膚透過性は、intact skin、DFP 処理 intact skin、stripped skin および DFP 処理 stripped skin を用いて評価した。

モノ体の透過性は、intact skin、DFP 処理 intact skin では認められなかったものの、stripped skin および DFP 処理 stripped skin を介した透過性は確認することができた。これらの結果から、モノ体の HPLC の最小検出感度、適用濃度お

よびレシーバー量から算出した intact skin を介した透過係数は約 4.8×10^{-11} cm/s であり、実験値より得られた stripped skin および DFP 処理を施した stripped skin を介した透過係数は約 3.9×10^{-8} cm/s および約 3.6×10^{-8} cm/s であった。

C-7. パラベン類の皮膚透過性と皮膚中濃度

Figure 11a に、パラベン類の in vitro 累積ヘアレスラット皮膚透過量を示す。縦軸は同様に raw data を適用濃度で除して求めた normalized data を示す。透過性は、パラベン類の脂溶性が高くなるにつれて大きくなった。Figure 11b に in vitro 皮膚透過実験後の皮膚中濃度の実測値 (normalized data) を示す。透過の順と同様に、パラベン類の K_o/w が高くなるにつれて適用濃度に対する皮膚中濃度の割合が増加した。

C-8. 2層拡散モデルを用いた平均皮膚中濃度

皮膚を角層と生きた表皮・真皮からなる2層膜モデルと考え、パラベン類の皮膚透過データを Fick の拡散則に基づく差分式を用いた非線形最小二乗法で解析し基剤 (水溶液) から角層、さらには角層から生きた表皮・真皮への分配係数を算出し、これら分配係数と角層・生きた表皮・真皮の厚みから皮膚中濃度を算出した。そして、算出したパラベン類の皮膚中濃度の理論値と実測値の比較を行った。その結果を Fig. 12 に示す。2層膜モデルを用いて予測した皮膚中濃度の理論値と実

測値 (normalized data) の関係を示す。理論値と実測値は 1 対 1 の相関を得た。このことから、皮膚透過性を2層膜モデルで解析することにより、皮膚中濃度を精度よく予測することが可能であると示唆された。

以上、皮膚のような角層バリアーとそれ以下の生きた表皮と真皮のバリアーからなる皮膚では、2層膜モデルによって膜透過性から膜中濃度を予測することが可能であることが示唆された。ヒト皮膚でもヘアレスラットと同様に予測することができると思われる。

D. 考察・結論

フタル酸ジブチルのヒト皮膚透過性は、前年度のヘアレスラット皮膚での報告と同様、皮膚に分配し、速やかに皮膚内のエステラーゼにより代謝され、モノブチル体として皮膚を透過することが分かった。ヒト皮膚を介したジブチル体の intact skin および stripped skin を介した透過係数はそれぞれ、約 2.6×10^{-10} cm/s と約 5.1×10^{-10} cm/s であり、これらの結果から、フタル酸ジブチルはタイプ B に分類され、皮膚局所刺激性評価は、フタル酸ジブチルおよびフタル酸モノブチルを用いて行う必要があることが分かった。

フタル酸ジブチルのヒト皮膚中での代謝速度は、ヘアレスラット中での代謝速度と異なる結果となり、フタル酸エステル類の安全性評価を行う場合には、モノ体への代謝速度が律速段階となる可能性があるため、代謝パラメータの算出やヒト皮膚を使用した試験が必要であると考えられた。

一方、フタル酸ジエチルヘキシルは皮膚内での代謝が遅く、モノ体の生成が僅かしか認められなかった。また、ヘアレスラット健全皮膚 (intact skin) を介したフタル酸ジエチルヘキシルおよびそのモノ体の透過は認められず、フタル酸ジエチルヘキシルの HPLC の最小検出感度、適用濃度およびレシーバー量から算出した intact skin および stripped skin を介した透過係数は、約 1.1×10^{-10} cm/s と、約 1.4×10^{-10} cm/s であった。この結果から、フタル酸ジエチルヘキシルもタイプ B に分類することができた。しかしながら、フタル酸ジエチルヘキシル適用時は、モノ体の透過性も認められなかった。フタル酸ジエチルヘキシルの分子量は 390.6、ClogP は 7.6 でそのモノ体であるフタル酸モノエチルヘキシルは、分子量 278.3 で ClogP は 4.29 である。非常に脂溶性の高い化学物質であることから、透過性よりも、これらの皮膚貯留性についての検討が必要と考えられる。今後は、フタル酸ジエチルヘキシルおよびそのモノ体の皮膚中濃度の評価が必要であると考えられた。

Figure 13 に昨年度および今年度の実験結果を基に作成した、化学物質の皮膚暴露評価スキームを示す。化学物質の分子量、油水分配係数、皮膚透過係数および皮内での代謝の有無を分岐条件として作成した。化学物質の皮膚暴露後の安全性についての評価は、*in vivo* および *in vitro* 皮膚透過性試験を用いて行われているものの、すべての化学物質の評価を行う上では、莫大な時間と費用が必要となる。したがって、安全性評価手順を示す

ことによる、評価方法の効率化は非常に重要であると考え。分子量の基準は、全身作用や局所作用を示す経皮適用型医薬品の分子量基準 (500 ダルトン、ただし、アトピー性皮膚炎の治療に用いられているタクロリムスは 804 ダルトン) を考慮した。本スキームとしては安全域を考え 1000 ダルトンとしている。油水分配係数も分子量と同様、経皮適用型医薬品となりうる化学物質の性質を考慮した。油水分配係数 $-1 < \text{Log } K_{ow} < 3$ 程度が皮膚透過されやすい。本スキームでは安全域を考え $-3 < \text{Log } K_{ow} < 5$ としている。透過係数は、角層のターンオーバー速度 (20 層重なりあった厚み 1 μm の角層が、24 時間で 1 枚剥離すると仮定) 約 1×10^{-9} cm/s となる。本スキームでは安全域を考え 1×10^{-12} cm/s としている。「皮膚透過」は表皮を透過し、皮膚真皮中の毛細血管を経て全身循環系に移行する。「皮膚浸透」は表皮に浸透すること。表皮から真皮へはほとんど移行しない。したがって、全身循環系にも移行しない。今回のフローチャートの分岐条件に使用した数字の妥当性については、十分考慮する必要がある。さらなる検討が必要であると考え。また、「皮膚浸透する」の測定の仕方や Yes/No のメルクマールを決める必要がある。

本年度の研究では、フタル酸エステル体の皮膚透過性や皮膚貯留性についてだけでなく、皮膚に適用した化学物質の皮膚中濃度の算出を皮膚透過性試験から得られるパラメータを用いて試みた。

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定される。したがっ

て、皮膚透過性試験から皮膚中濃度の算出可能であれば、皮膚暴露された化学物質の安全性を評価する手段として、皮膚透過データが有効となる。化学物資の安全性や有効性をさらに詳しく評価するには、皮膚中での作用部位ごとに評価する必要がある。今後は、動物皮膚代替膜による化学物質の皮膚中濃度予測などの方法を確立し、簡便に化学物質の安全性評価を行う方法の確立も行っていきたい。

F-2. 実用新案登録
なし

E. 研究発表

E-1. 論文発表

- 1) Sugibayashi K., Todo H., Oshizaka T., Owada Y., Mathematical model to predict skin concentration of drugs: Toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative, Pharm. Res., 27, 134-142 (2010).

E-2. 学会発表

- 1) 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、徳島、2010 年 5 月
- 2) 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、静岡、2011 年 3 月

F. 知的所有権の取得状況

F-1. 特許取得

なし

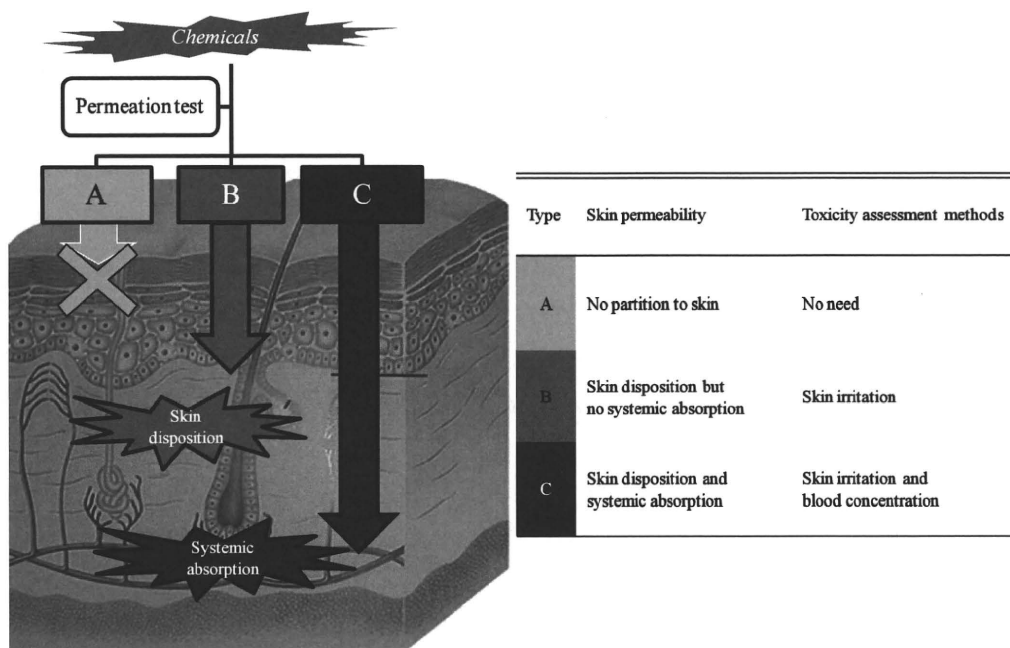


Fig. 1 Relationship of skin permeability and toxicity assessment methods

Table 1 Classification of chemicals in the transdermal toxicity assessment against skin exposure

| Type | Permeability coefficient | Skin conc. | Blood conc. |
|------|---------------------------|---------------|---------------|
| A | $\ll 1.0 \times 10^{-9}$ | Extremely low | Not detected |
| B | $\leq 1.0 \times 10^{-9}$ | High | Extremely low |
| C | $> 1.0 \times 10^{-9}$ | High | High |

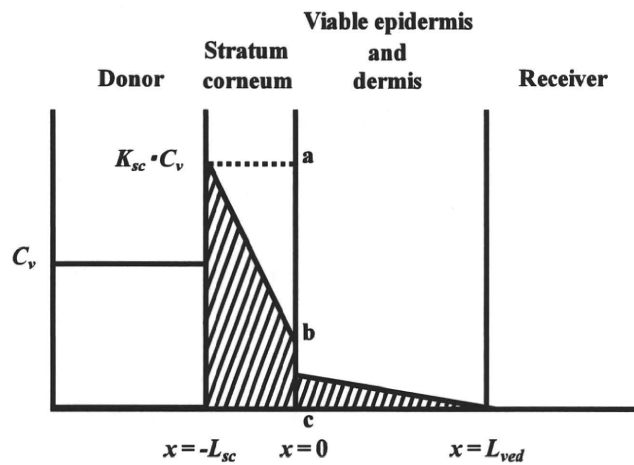


Fig. 3 Typical concentration-distance profile of chemical compound using two-layered diffusion model

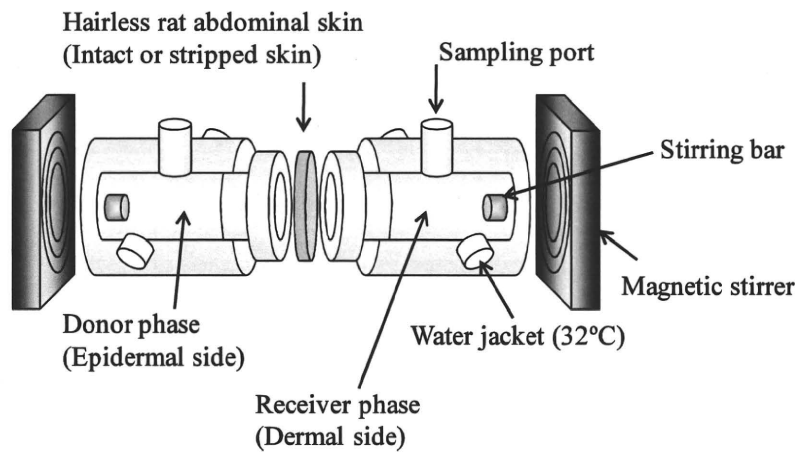


Fig. 4 Set-up of side-by-side diffusion cell for skin permeation experiment

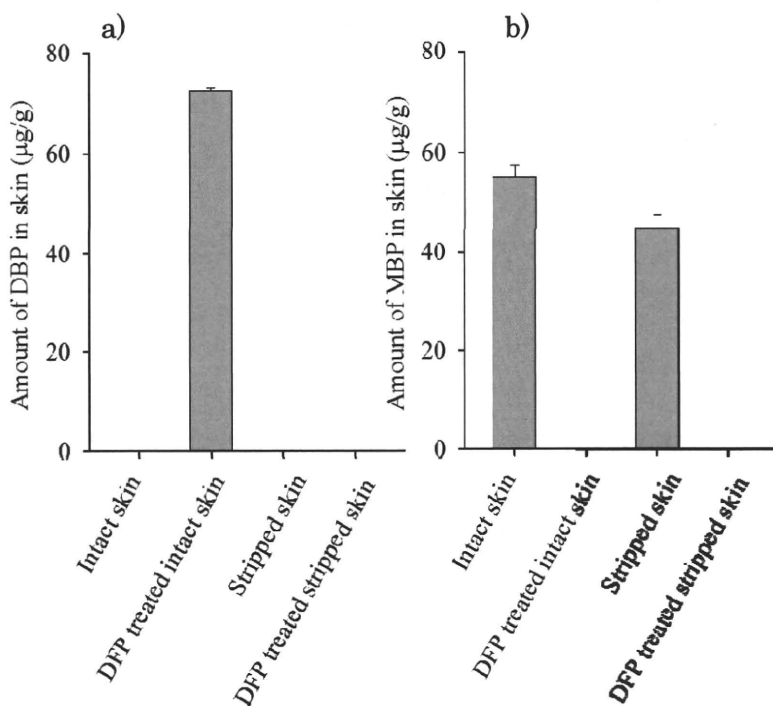


Fig. 5 Amount of dibutyl phthalate a) or monobutyl phthalate b) in hairless rat skin after application of dibutyl phthalate.

Each value shows the mean \pm S.D.(n = 3).

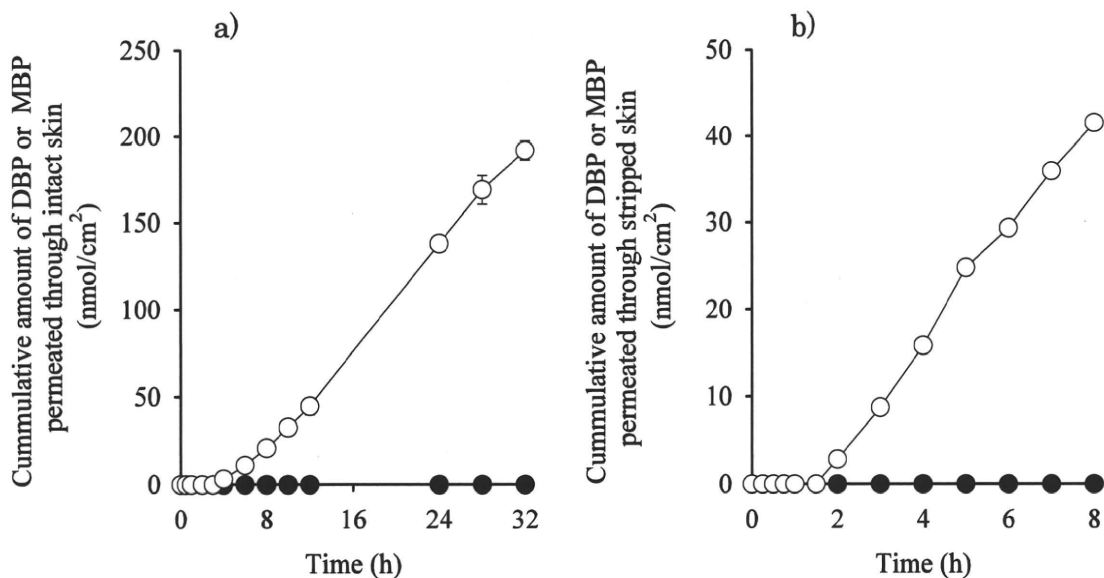


Fig. 6 Time course of cumulative amount of dibutyl phthalate (DBP) and monobutyl phthalate (MBP) through excised human intact (a) or stripped skin (b). Symbols; ○: MBP, ●:DBP.

Each value shows the mean \pm S.D.(n = 3).

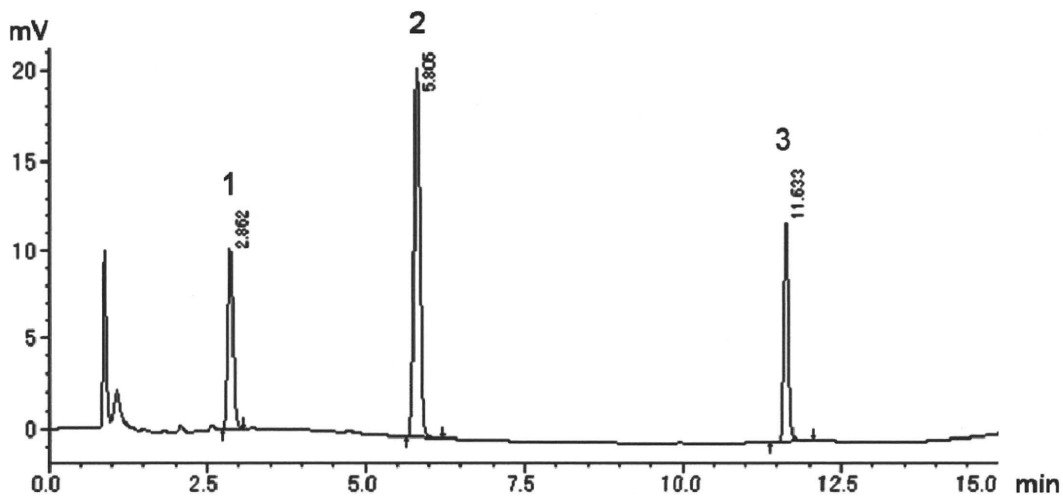


Fig. 7 Chromatogram of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate that determined by simultaneous HPLC analysis.

1: Diethylhexyl phthalate, 2: Nonyl 4-hydroxybenzoate, 3: Monoethylhexyl phthalate.

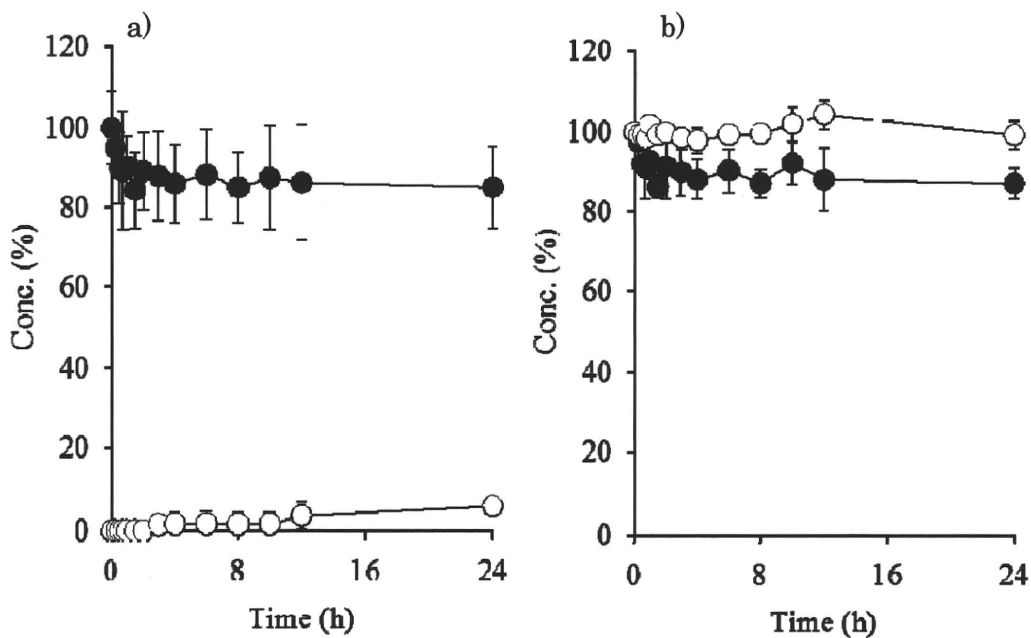


Fig. 8 Time course of concentration ratio of diethylhexyl phthalate (closed symbols) and ethylhexyl phthalate (open symbols) in skin homogenate (a) or 10% DMSO solution (b). Each value shows the mean \pm S.D.(n = 3).

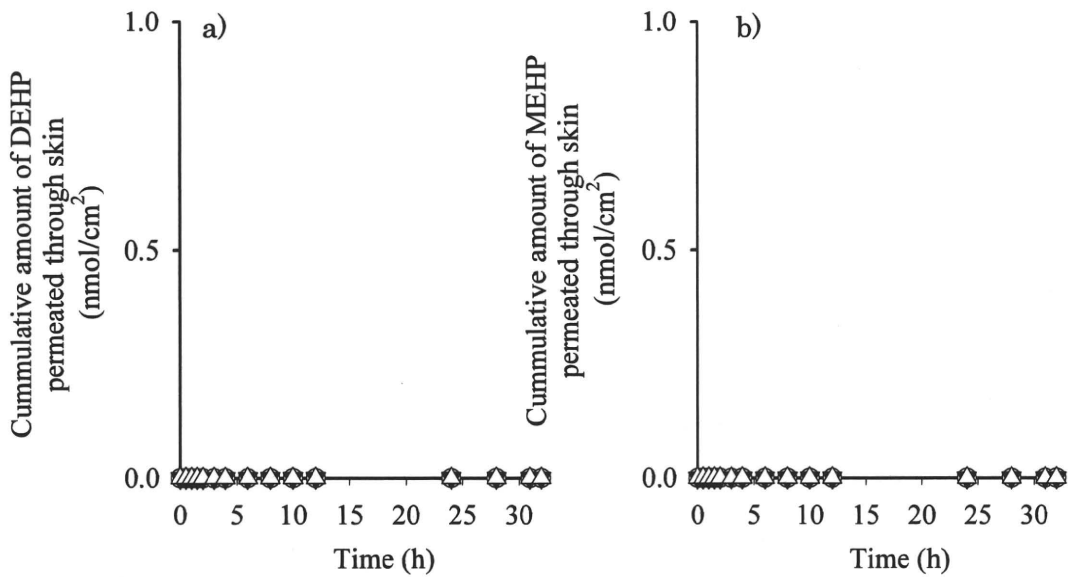


Fig. 9 Time course of cumulative amount of DEHP (a) or MEHP (b) through excised hairless rat skin after application of DEHP. Symbols; ●: intact skin, ▼: DFP treated intact skin, ○: stripped skin, △: DFP treated stripped skin. Each value shows the mean \pm S.D. (n = 3).

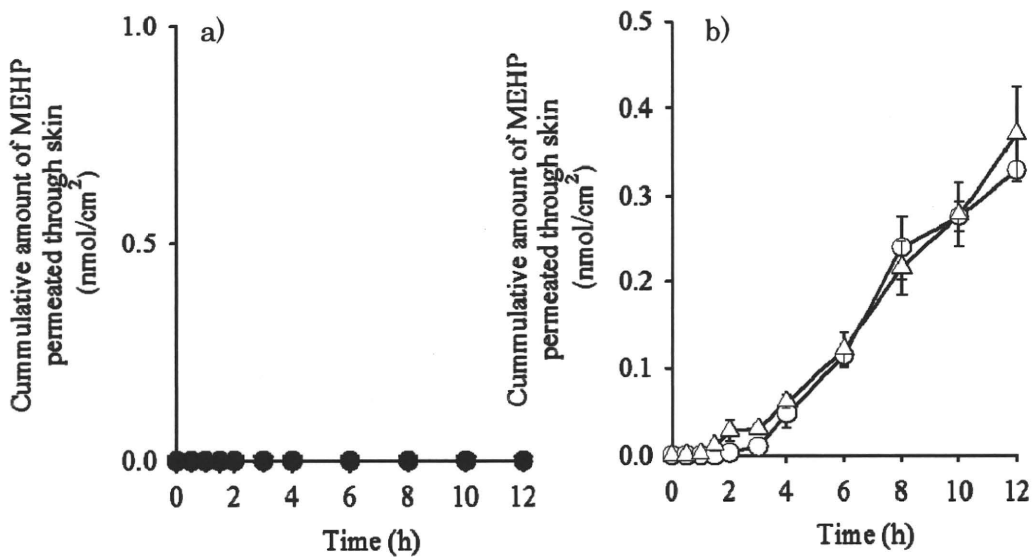


Fig. 10 Time course of cumulative amount of MEHP through excised hairless rat intact skin (a) or stripped skin (b) after application of MEHP. Symbols; ●: intact skin, ▼: DFP treated intact skin, ○: stripped skin, △: DFP treated stripped skin. Each value shows the mean \pm S.D. (n = 3).

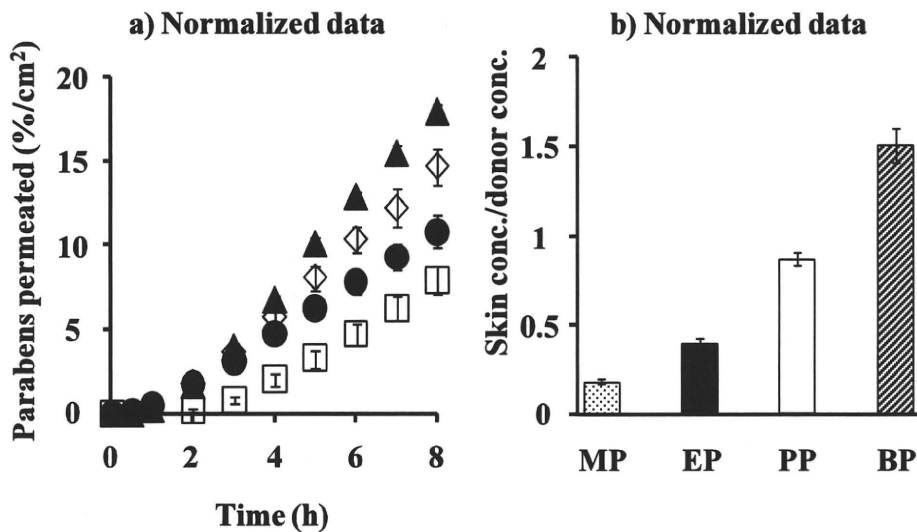


Fig. 11 Time course of the cumulative amount of parabens that permeated through hairless rat skin (a) and skin concentration of parabens at the 8h after skin permeation experiment (b). ●: 10 mM MP, ◇: 3 mM EP, ▲: 1 mM PP, □: 0.5 mM BP Each data point represents the mean \pm S.E. ($n = 4 \sim 8$).

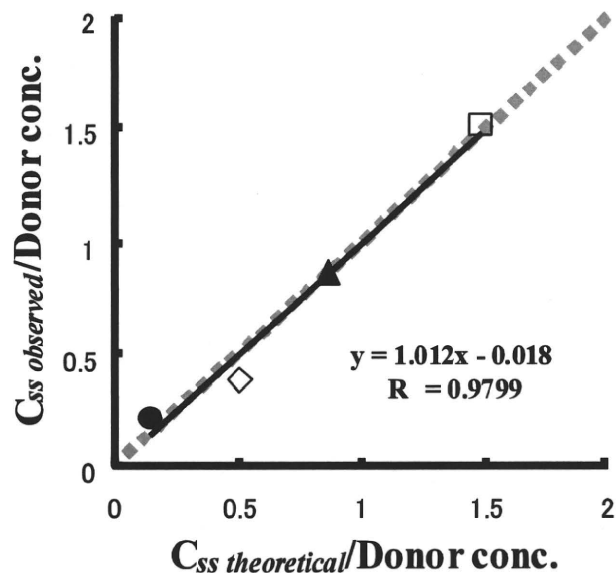


Fig. 12 Relationship between C_{ss} theoretical in silicone membrane/Donor conc. and C_{ss} observed in rat skin/Donor conc. Symbols: the same as in Fig. 11. Each value shows the mean \pm S.E. ($n = 3 \sim 8$).

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

曝露経路依存的な異物代謝予測手法の開発に関する研究

| | | | |
|-------|-------|------------------|-----|
| 研究分担者 | 埴岡 伸光 | 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 | 准教授 |
| 研究協力者 | 高原 佑輔 | 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 | |
| 研究協力者 | 高原 有香 | 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 | |
| 研究協力者 | 成松 鎮雄 | 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 | 教授 |

研究要旨：室内環境中に存在するフタル酸エステル類の生体内代謝の個人差を解明し、異物代謝の要因を考慮したリスク評価法を確立することを目的としている。本年度は、dibutyl phthalate (DBP)、butyl benzyl phthalate (BBP)及び bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)のヒト肝マイクロゾームによる加水分解反応の速度論的解析を行った。その結果、いずれの加水分解反応も Hill 式に従う速度論的挙動を示し、DBP 及び BBP 加水分解反応の V_{\max} 及び CL_{\max} 値は、DEHP 加水分解反応に比べ高いことが明らかとなった。また、BBP では二つの代謝経路のうちモノベンジルフタレート (MBzP) への経路が優先的に進行した。DEHP については、 S_{50} 値は比較的 low、加水分解反応に関与する酵素に対して親和性が高いが、他のフタル酸エステル類に比べて代謝されにくいことが示唆された。

A. はじめに

プラスチック原料 PVC の可塑剤として使用されているフタル酸エステル類は、生活空間を取り巻く化学物質であり、ヒトは日常的に経口、経皮あるいは経気道的に非意図的に曝露されていることが懸念される。これらフタル酸エステル類のうち、dibutyl phthalate (DBP)、butyl benzyl phthalate (BBP) 及び bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)は生殖毒性を有することが示唆されている。これら化合物は主に小腸においてリパーゼ及びエステラーゼでフタル酸モノエステル

に代謝されるが、この代謝物 (MBzP、MBP 及び MEHP)は親化合物の同等あるいはそれ以上の生殖毒性が認められている。そのためフタル酸モノエステル体への加水分解反応は、安全性及び毒性評価を行うために重要となる。本研究では DBP、BBP 及び DEHP のヒト肝マイクロゾームによる加水分解反応を *in vitro* 系で検討した。

B. 研究方法

B-1. 実験材料

DEHP、DBP、BBP、MEHP、MBP、MBzP 及びフタル酸 (PA) (和光純薬工業)；プ

ールドヒト肝ミクロゾーム (Lot number 18888 ; Gender male:female=12:12 ; Race Caucasian:Hispanic=23:1 ; Age 33-78 year)、ヒト個人肝ミクロゾーム (HH741 ; Male ; Caucasian ; 68 year、HK37 ; Female ; Caucasian ; 56 year、HG43 ; Female ; Caucasian ; 23 year) (BD Biosciences) ; DC protein assay kit、Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) ; ウサギ抗ヒト CES1 抗体及びウサギ抗ヒト CES2 抗体 (Abnova Coporation) ; ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (Zymed Laboratories) ; Enhanced Chemi Luminescence Plus (GE Healthcare)。その他試薬は分析用、特級及び HPLC 用試薬を用いた。

B-2. フタル酸エステル類加水分解活性測定

フタル酸エステル類加水分解活性は、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 ら及び Mazzeo らの方法に準じて測定した (1,2)。基質 (DBP、BBP あるいは DEHP) を除く下記の反応溶液を 37°C で 1 時間プレインキュベーション後、基質を添加することにより反応を開始した。反応は、リン酸 (2M) 20 mL 添加することで反応を停止した。反応停止後、12,000×g、4°C で 20 時間遠心分離後、上清を PTFE 膜 (0.45 µm) でろ過した。そのろ液 50 µL を HPLC に付し代謝物であるモノエステル体及びフタル酸生成量を絶対検量線法にて算出した。基質及びその代謝物はメタノールに溶解し、この反応溶媒濃度は 1% とした。HPLC 条件は下記の

ように設定した。カラム : Inertsil ODS-SP (5 µm, 4.6 mm×150 mm) ; 検出 : UV 254 nm ; 移動相 : A) 0.1% H₃PO₄/ CH₃CN (85/15, v/v) と B) 0.1% H₃PO₄/ CH₃CN (15/85, v/v) のグラジエント ; 流速 : 1.2 mL/min ; カラム温度 : 40°C。

1) DBP のグラジエントタイムテーブル

| min | 0 | 5 | 15 | 30 | 40 | 50 | 60 | 65 |
|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| (A) | 85 | 85 | 55 | 55 | 15 | 15 | 85 | 85 |
| (B) | 15 | 15 | 45 | 45 | 85 | 85 | 15 | 15 |

2) DEHP のグラジエントタイムテーブル

| min | 0 | 5 | 15 | 30 | 40 | 50 | 60 | 65 |
|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| (A) | 85 | 85 | 55 | 55 | 15 | 15 | 85 | 85 |
| (B) | 15 | 15 | 45 | 45 | 85 | 85 | 15 | 15 |

3) BBP のグラジエントタイムテーブル

| min | 0 | 5 | 15 | 30 | 45 | 55 | 65 | 70 |
|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| (A) | 85 | 85 | 65 | 65 | 15 | 15 | 85 | 85 |
| (B) | 15 | 15 | 35 | 35 | 85 | 85 | 15 | 15 |

B-3. ウェスタンブロット分析

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 Laemmli の方法 (3) に準じて、10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動に付した。泳動後、Towbin らの方法 (4) に従いタンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は 5% スキムミルクを含む PBS 溶液に浸し、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 (5% スキムミルク含有 PBS により 2000 倍希釈) を加え 2 時間反応した後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (5% スキムミルク含有 PBS により 5000 倍希釈) と 1 時

間反応させた。反応終了後、PBS 溶液及び 0.1% Tween 20 を含む PBS 溶液で洗浄した後、化学発光法によって抗体と結合したバンドを検出した。そのバンド発光強度は Scion Image V4.0.3 (Scion Co.) を用いて定量化した。

B-4. データ解析

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 Version 4.00 (GraphPad Software) 及び SigmaPlot v7.1.0.1 (SPSS Inc.) を用いて Michaelis-Menten 及び Eadie-Hofstee プロットを作成して S_{50} 及び V_{max} 値を算出した。*In vitro* クリアランスは $CL_{max}(V_{max}/S_{50} \times (n-1)/n(n-1)^{1/n})$ とした。また、有意差検定は Dunnett's *post-hoc* test を行い、有意差の有無は危険率 5%を基準とした。

C. 結果

C-1. プールドヒト肝マイクロゾームによるフタル酸エステル類加水分解反応

プールドヒト肝マイ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の速度論的解析を行った。DBP、BBP 及び DEHP 加水分解反応の Michaelis-Menten プロット及び Eadie-Hofstee プロットを図 1~4 に示す。いずれの加水分解反応の Eadie-Hofstee プロットもフック型の曲線を示した。また、これらのプロットから Hill 式に従い算出した速度論的パラメーター値を表 1 に示す。

C-2. 個人ヒト肝マイクロゾームによるフタル酸エステル類加水分解反応

個人ヒト肝マイ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の速度論的解析を行った。個人ヒト肝マイクロゾームによる DBP、BBP 及び DEHP の加水分解反応の Eadie-Hofstee プロットは、プールドヒト肝マイクロゾームと同様にいずれもフック型となり、アロステリックな挙動を示した。これらのプロットから Hill 式に従い算出した速度論的パラメーター値を表 2 に示す。個人ヒト肝マイクロゾームとプールドヒト肝マイクロゾームを比較すると DBP から MBP への加水分解反応においては、HH741 及び HK37 の S_{50} 値がそれぞれ 128 及び 133%高くなり、 V_{max} 値はそれぞれ 138 及び 132%高い値を示したが、 CL_{max} 値は同程度であった。同様に BBP から MBP への加水分解反応においても pHLM と比較して、HH741 及び HK37 の S_{50} 値は 148 及び 194%、 V_{max} 値は 122 及び 155%高い結果となった。一方 CL_{max} 値には酵素源間で大きな差は認められなかった。

C-3. ヒト肝マイクロゾームにおける CES1 及び CES2 タンパク質の発現量

プールドヒト肝マイクロゾーム及び個人ヒト肝マイクロゾームの CES のウェスタンプロット分析を行った。その結果を図 5 に示す。プールド及び個人ヒト肝マイクロゾームのいずれにおいても抗ヒト CES1 及び CES2 抗体と交差するタンパク質バンドが検出された。検出された CES1 タンパク質バンド発色強度はプールドヒト肝マイクロゾームに比べ HH741 及び HK37 では、ほぼ同等なのに対して HG43 では、プールドヒト肝マイクロゾームの約 70%程

度と低い傾向を示した。また、個人ヒト肝マイクロゾームの HH741、HK37 及び HG43 の CES2 タンパク質バンド発色強度はプールドヒト肝マイクロゾームの 60~70%程度であった。

D. 考察

先に述べたように、フタル酸エステル類は生殖毒性を有する化学物質である。そこで、本研究では、生殖毒性が示唆されている DBP、BBP 及び DEHP に焦点を当て、肝マイクロゾームによるフタル酸エステル類の加水分解反応の検討を行った。それぞれの加水分解反応における代謝物及び基質の分析は昨年度に確立した HPLC 条件を用いた。検討したフタル酸エステル類の加水分解反応 (DEHP→MEHP; DBP→MBP; BBP→MBzP, MBP) はいずれも 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した。また、フタル酸モノエステル体から生じる二次代謝物であるフタル酸は、本研究の条件下では検出することができなかった。いずれの肝マイクロゾームにおいても DEHP の加水分解反応は、DBP 及び BBP に比べて S_{50} 及び V_{max} 値はそれぞれ約 1/10 及び約 1/30-45 であった。このことは、DEHP 加水分解反応に関与する酵素に対して基質の親和性は高いが、他のフタル酸エステル類に比べて代謝されにくく、体内に蓄積されやすいことを意味しているかもしれない。

一方、DBP から MBP 及び BBP から MBzP への加水分解反応の V_{max} 値は DEHP 及び BBP から MBP への加水分解反応より高く、比較的高濃度でこれらフタル酸

エステル類が曝露されると、モノエステル体に起因する毒性が発現する可能性も考えられる。BBP の加水分解反応は二つの経路があるが、肝マイクロゾームでは MBzP への経路が優先的に進行した。興味深いことに、この反応は、ラットではヒトとは逆に MBP への反応が優先的に進行することが報告されている (5)。また、肝臓におけるエステラーゼ酵素の発現レベル及び加水分解活性は、ヒトとラットの間で大きな種差が認められており、BBP の加水分解反応のプロファイルの種差もこの事実起因しているかもしれない。Clewell らは、MBP が MBzP に比べラットライディツヒ細胞においてステロイド産生を約 2 倍強く阻害することを報告している (6)。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、BBP の毒性発現の程度に種差が生じる可能性が考えられ、ラットのデータをヒトへと外挿するには十分な検討が必要である。

ヒト肝マイクロゾームによるフタル酸エステル類の加水分解反応の S_{50} 及び V_{max} 値にはそれぞれ 1.9 及び 1.6 倍の個人差が認められた。この個人差の要因として、フタル酸エステル類の加水分解反応に関与すると考えられるカルボキシルエステラーゼ (CES) 酵素の肝臓における発現量の違いあるいは遺伝子多型が考えられる。CES 酵素は肝臓及び小腸などに発現し、エステル型プロドラッグの代謝活性化に重要な役割を果たす薬物代謝酵素である。例えば、ACE 阻害剤や CPT-11 の加水分解活性は、CES 発現量あるいは機能に起因する 6-31 倍の高い個人差も報告さ

れている(7-9)。フタル酸エステル類の加水分解反応の個人差も CES が重要な鍵となっているものと考えられたため、現在はリコンビナント CES (CES1、CES2 及び CES3) 酵素を作製し、DBP、BBP 及び DEHP の加水分解反応におけるそれぞれの CES 酵素分子種の役割について検討しているところである。

E. 結論

本研究では、DBP、BBP 及び DEHP のヒト肝マイクロゾームによる *in vitro* 系における加水分解反応の検討を行った。その結果、1) いずれの加水分解反応も Hill 式に従う速度論的挙動を示す、2) DBP 及び BBP 加水分解反応は、DEHP 加水分解反応に比べ進行しやすい、3) BBP では MBzP への経路が優先的に進行する、ことが明らかとなった。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

なし

F-2. 学会発表

- 1) 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ルエステラーゼ分子種. 第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会, 山口, 2010 年 5 月 15 日.
- 2) 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マイ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, 東京, 2010 年 9 月 9 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

G-1. 特許取得

なし

G-2. 実用新案登録

なし

G-3. その他

なし

H. 参考文献

- 1) Danschutter D, Braet F, Van Gyseghem E, Hachimi-Idrissi S, Van Bruwaene B, Moloney-Harmon P, Huyghens L. Di-(2-ethylhexyl)phthalate and deep venous thrombosis in children: a clinical and experimental analysis. *Pediatrics*. 2007; 119:742-53.
- 2) Mazzeo P, Di Pasquale D, Ruggieri F, Fanelli M, D'Archivio AA, Carlucci G. HPLC with diode-array detection for the simultaneous determination of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in seminal plasma. *Biomed Chromatogr*. 2007; 21:1166-71.
- 3) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-5.
- 4) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76:4350-4.
- 5) IPCS. Butyl benzyl phthalate.

International Chemical Safety Cards.
1999; 0834.

- 6) Clewell RA, Campbell JL, Ross SM, Gaido KW, Clewell HJ 3rd, Andersen ME. Assessing the relevance of in vitro measures of phthalate inhibition of steroidogenesis for in vivo response. *Toxicol In Vitro*. 2010; 24:327-34.
- 7) Hatfield MJ, Tsurkan L, Garrett M, Shaver TM, Hyatt JL, Edwards CC, Hicks LD, Potter PM. Organ-specific carboxylesterase profiling identifies the small intestine and kidney as major contributors of activation of the anticancer prodrug CPT-11. *Biochem Pharmacol*. 2011; 81:24-31.
- 8) Zhu HJ, Appel DI, Jiang Y, Markowitz JS. Age- and sex-related expression and activity of carboxylesterase 1 and 2 in mouse and human liver. *Drug Metab Dispos*. 2009; 37:1819-25.
- 9) Nakamura Y, Sugihara K, Sone T, Isobe M, Ohta S, Kitamura S. The in vitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology*. 2007; 235:176-84.

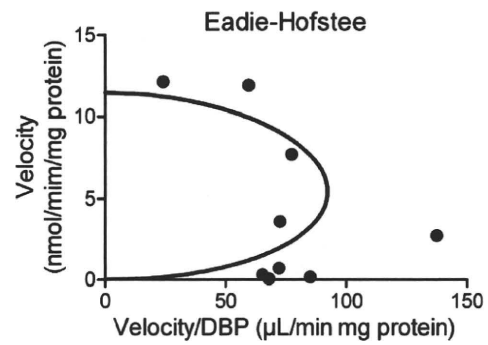
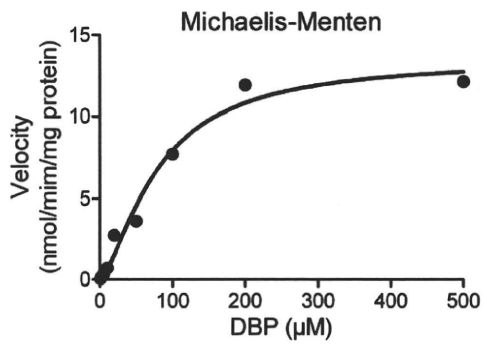


図1 ヒト肝ミクロゾームによる DBP から MBP への加水分解反応の速度論的解析

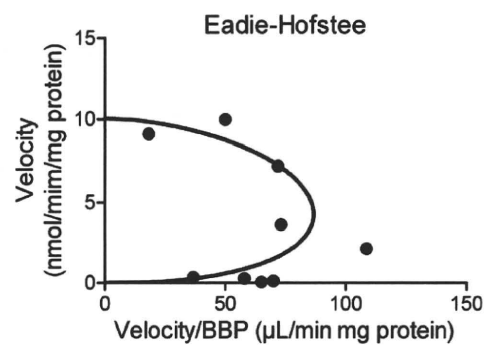
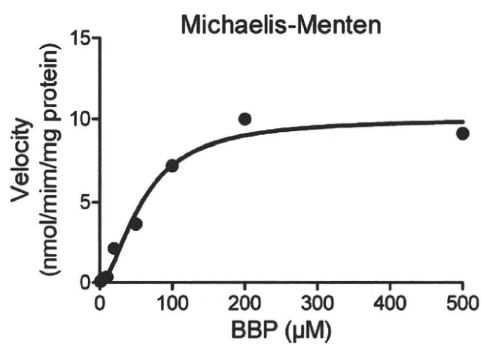


図2 ヒト肝ミクロゾームによる BBP から MBzP への加水分解反応の速度論的解析

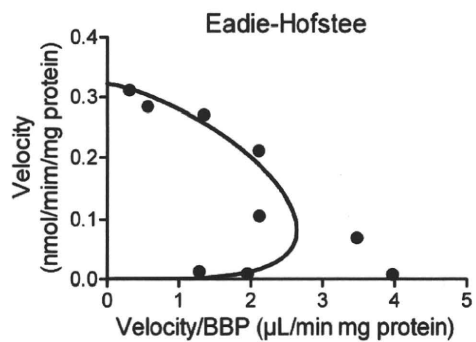
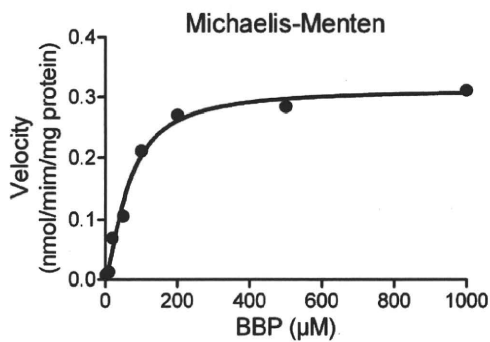


図3 ヒト肝ミクロゾームによる BBP から MBuP への加水分解反応の速度論的解析