

201133009A

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 23 年度 **総括・分担研究報告書**

研究代表者 神野 透人

平成 24 (2012) 年 3 月

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神野 透人

平成 24 (2012) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

- 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 . . . . . 12  
神野 透人、香川(田中) 聡子
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  
法の開発に関する研究 . . . . . 24  
伊佐間 和郎、河上 強志
3. 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 . . . . . 42  
酒井 康行、小森 喜久夫、岩沢 こころ
4. 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 . . . . . 54  
杉林 堅次、藤堂 浩明
5. 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 . . . . . 70  
埴岡 伸光、高原 有香、鬼無 悠、成松 鎮雄
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 . . . . . 82  
— ハウスダスト中ピレスロイド系殺虫剤の実態調査 —  
香川(田中) 聡子、神野 透人、岡元 陽子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 107
IV. 研究成果の刊行物・別刷	・・・ 108

# I. 総括研究報告書

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: 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、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°Cの化学物質を主要なターゲットとして、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ー推定手法 (1)、及び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確立 (2) を進めた。また、家庭用品から放散あるいは溶出する化学物質の吸入率/経皮吸収率評価手法の開発 (3 及び 4) や、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、暴露経路依存的な異物代謝予測手法に関する研究 (5) を引き続き実施した。さらに、室内環境質に関する調査・監視体制の構築、確立に向けた取り組みの一環として、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 (6) を進めた。

各々のサブテーマにおいて、(1)では CONFLEX/DFT/COSMO-RS 法による物理化学的パラメーターの予測法を確立し、室内環境中の典型的な SVOC の一つであるピレスロイド系殺虫剤に適用した。SVOC の皮膚移行に関しては、フタル酸エステル類及びその代替可塑剤の PVC シートから皮膚への移行量を実測した。また、繊維製品及び革製品に含有される特定芳香族アミン類の実態調査を行い、EU 基準値を超える濃度の特定芳香族アミン類が検出される製品が存在することを明らかにするとともに、毒性及び暴露に関する情報から暴露評価モデルによる経皮暴露量の試算を行った。生物学的利用率の評価 (3 及び 4) 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確立した。初回通過代謝に係る課題 (5) では、リコンビナント CESs 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、その特性を明らかにした。また、室内環境中の SVOC の網羅的な解析 (6) ではハウスダストを介したピレスロイド系殺虫剤の暴露について評価を行った。

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: 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)、広瀬 明彦 (国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター総合評価研究室)、小森 喜久夫 (東京大学生産技術研究所)、岩沢 ころこ (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 有香 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)、鬼無 悠 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)、岡元 陽子 (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。

最終年度となる今年度は、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、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ー推定手法、及び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確立を進めた。また、家庭用品から放散あるいは溶出する化学物質の吸入率/経皮吸収率評価手法の開発や、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、暴露経路依存的な異物代謝予測手法に関する研究を引き続き実施した。さらに、室内環境質に関する調査・監視体制の構築、確立に向けた取り組みの一環として、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)

ピレスロイド系殺虫剤 13 化合物について、幾何異性を考慮に入れた 3 次元分子構造を ChmeBio3D Ultra ver. 12 を用いて作成した。この 3 次元座標データを初期構造として、配座探索プログラム CONFLEX ver. 6.8 により 10 kcal/mol の範囲で MMFF94s 力場による配座解析を行い、各異性体の最安定配座を求めた。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 4.1 及び SPARC Online ver. 4.5 についても併せて検討した。ただし、これらの手法では幾何異性体の存在を考慮せずに計算を行った。

### B-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に関する研究 (伊佐間)

本分担研究は、研究所の職員 11 名 (男性 7 名、女性 4 名) を対象に、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.175-2) を得た上で実施した。

既知量の可塑剤 (Phthalates (PAEs)、Di(2-ethylhexyl) Terephthalate (DEHTP) 及び 1,2-Cyclohexane Dicarboxylic Acid Diisononyl Ester (DINCH)) を添加したポリ塩化ビニル (PVC) シート (1.5 cm×1.5 cm) あるいは実際の PVC 製家庭用品を被験者の左前腕内側部分の皮膚に貼付けて 30 分間接触させた後に、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。綿棒に回収された可塑剤をアセトンで抽出し、GC/MS で定量した。

### B-3 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)

前年度までに構築・実証した Benzyl Butyl Phthalate (BBP) の肺胞上皮の透過を記述する数理モデルの精緻化を行うとともに、培養ヒト肺胞モデルの高度化を目的として肺胞マクロファージ様細胞の導入と肺胞内腔液の *in vivo* 組成再現に関する基礎的な検討を行った。数理モデルの精緻化では、セルカルチャーインサートのみの無細胞系についての透過実験結果を基に、BBP の器壁内部への吸着を考慮に入れて最適化を行った。ヒト肺胞モデルの高度化では、肺胞由来ガン細胞株 A549 細胞 (肺胞の II 型上皮細胞由来) の飽和層に PMA 処理で分化誘導した THP-1 細胞 (ヒト骨髄単核球由来細胞株) を播種し、共培養の影響を 48 時間後まで形態学的に観察した。また、肺胞内腔液の再現を目的として、ウシ肺サーファクタント (サーファクテン; ウシ肺抽出物) の生理食塩水溶液を 10% の濃度で培養液に添加し、24 時間後の A549 細胞の生存率を評価した。



#### B-4 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)

ヒト皮膚 (白人女性、51 歳、腹部由来、厚み 490  $\mu\text{m}$  または白人女性、55 歳、腹部由来、厚み 503  $\mu\text{m}$ ) は、供給元においてヒト組織由来製品の倫理・安全性委員会の許可を受けた凍結皮膚を購入して実験に使用した。Side-by-side 型拡散セルにヒト皮膚 (Full-thickness Skin または Stripped skin) を装着し、水和処理を 12 時間行った後に表皮側にフタル酸エステル水溶液を、真皮側に PBS または 10% DMSO-PBS 溶液を適用し、皮膚透過性試験を行った。次いで、皮膚透過性試験後のヒト皮膚を PBS または 10% DMSO-PBS 溶液で洗浄した後に氷冷下でホモジナイズし、得られた皮膚ホモジネートの上清中に含まれる化学物質濃度を測定した。

ヒト皮膚ホモジネートの遠心上清 (9,000  $\times\text{g}$ , 20 min, 4°C) を酵素源とし、各種フタル酸エステルの代謝物生成速度を評価した。代謝酵素パラメーター ( $K_m$ ,  $V_{\text{max}}$ ) は Michaelis - Menten 式を変形した Hanes - Woolf plot から回帰直線を求め、最小二乗法を用いて算出した。

#### B-5 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)

正常ヒト肝臓由来の mRNA から一本鎖 cDNA を合成し、これを鋳型として CES1、CES2 及び CES3 cDNA を PCR により増幅した。PCR 産物を pENTR/d-TOPO ベクターにクローニングし、さらに Gateway LR 反応により哺乳動物細胞発現用の pcDNA-DEST40 ベクターへサブクローニングした。得られた哺乳動物発現ベクターを Lipofect

amine LTX を用いて HEK293 細胞にトランスフェクションし、24 時間培養した後に常法に従い S9 画分を調製した。フタル酸エステル類の加水分解活性は、酵素源にリコンビナント CES 酵素を用いて Danschutter et al. 及び Mazzeo et al. の方法に準じて測定した。リコンビナント CES 酵素 Western Blot 分析は、Laemmli の方法に準じて 10% SDS-Polyacrylamide Gel で電気泳動を行った後に、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。一次抗体としてマウス抗 V5-HRP 抗体を使用し、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス 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。バンドの発光強度は Scion Image V4.0.3 を用いて定量化した。

#### 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 -ハウスダスト中ピレスロイド系殺虫剤の実態調査 (香川(田中))

一般家庭 (関東近郊) の 13 軒を対象に、専用ダストバッグを装着した充電式ハンディクリーナーを用いて寝室及び居間のハウスダストを採取した。ハウスダストはサンプリング終了後速やかに (サンプリング終了当日~2 日後までに) 回収し、抽出を行うまで -20°C で保存した。採取したダストを振動ふるいで分級し、63  $\mu\text{m}$  以下の画分の一部を試験に用いた。ハウスダスト試料 200 mg にアセトン 2 mL を加えて攪拌した後に 30 分間超音波処理し、室温、暗所で一晚インキュベーションした。得られた抽出液中のピレスロイド系殺虫剤 (Empenthrin, Profluthrin, Transfluthrin, Metofluthrin, Allethrin, Prallethrin, Imiprothrin, Resmethrin, Phthalthrin, Bifenthrin, Phenothrin, Cyphenothrin,

Permethrin, Baythroid, Ethofenprox) を GC/MS により定量した。

### C. 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

室内環境で汎用されるピレスロイド系殺虫剤 13 物質の幾何異性体について、CONFLEX による配座探索及び DFT 法による構造最適化を行い、得られた表面電荷分布を基に COSMO-RS 法により物理化学的パラメーターを推定した。

QSAR による予測手法 (EPI Suite 4.1 及び SPARC ver. 4.5) と比較した場合、オクタノール/水分係数 (LogP) の推定値では何れの手法も実測値と概ね良い相関を示し、相関係数  $r$  は 0.9026 (SPARC 4.5)~0.9996 (EPI Suite 4.1) の範囲であった。一方、揮散性の指標となる蒸気圧 (VP) では、LogP と比較して全体的に予測精度は劣るものの、COSMO-RS 法で得られた推定値と実験値の相関性が最も高い結果が得られた。さらに、ピレスロイド系殺虫剤の VP 値について、GC 保持時間

$r = 0.9709$ , Slope =  $1.299 \pm 0.103$

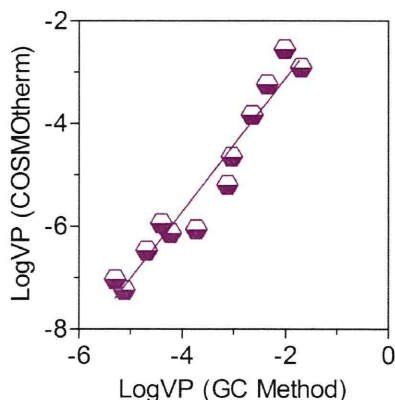


図 1 COSMOtherm によるピレスロイド系殺虫剤 Vapor Pressure (VP)推定値と GC/MS 法による実験値の相関

から実験的に得られる推定値と COSMO-RS 法による推定値の相関性について検討を行った結果、両者の間には平均で 1.6 Unit、最大で 2.3 Unit の差異がみられるものの、相関係数  $r$  は 0.9709 であり、極めて高い相関が認められた (図 1)。

これら結果は、CONFLEX による配座探索と DFT/COSMO-RS 法の組み合わせによって一群の類縁化合物の物理化学的パラメーターを少なくとも相対的に見積もることが可能であることを示しており、非経験的な手法である本法は構造活性相関に基づく EPI Suite 等の経験的な手法の補完法として有用であると考えられる。

#### C-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に関する研究

11 名 (32~58 歳: 男性 7 名、女性 4 名) の被験者に対して、昨年度とは異なる種類および含有量の PAEs (DPeP 及び DHeP) 並びに代替可塑剤 (DEHTP 及び DINCH) を含有する PVC シートを用いて皮膚への移行特性を評価した。その結果、昨年度と同様に全ての被験者のコントロール試料中から DEHP が検出され、その濃度範囲は 0.0065~0.29  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、中央値は 0.056  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  であった。また、全ての被験者について各 PAEs または代替可塑剤を 15% 含有するシートよりも、28% 含有シートあるいは DEHP との混合シート (各 14%) からの移行量が多く、被験者の年齢や性別と可塑剤移行量には関連は認められなかった。

また、5 種類の PAEs について皮膚表面への移行性を比較したところ、LogP の増加に伴って皮膚表面に移行しやすくなる傾向が

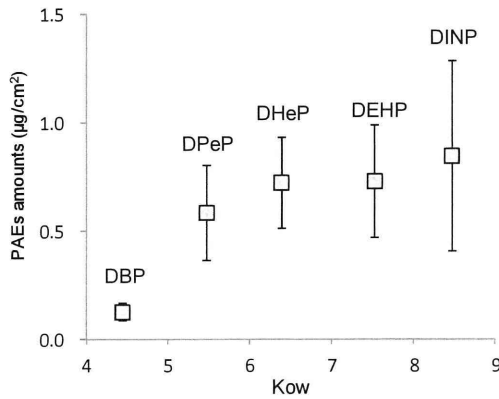


図2 各PAEsの皮膚への平均移行量とオクタノール/水分配係数  $K_{ow}$  の相関

認められ（移行性：DBP<DPeP<DHeP<DEHP<DINP）、モデル PVC シートから皮膚表面へのPAEs 移行性には、その疎水性が影響していると考えられた（図2）。

さらに、一部の被験者では試験全体を通じて可塑剤の皮膚表面移行性が他の被験者に比べて非常に高い傾向を示し、家庭用品表面の化学物質の皮膚表面への移行性には大きな個人差が存在することが明らかになった。

### C-3 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

昨年度までに構築したヒト肺胞上皮細胞モデルにおいて、器壁内表面への吸着を考慮に入れて数理モデルの最適化を行った。A549 細胞の存在/非存在下で暴露側（肺胞内腔側または基底膜側・血液側）の異なる計4組の経時的な濃度変化データから細胞層を介した輸送に関する速度定数並びに器壁への吸着に関する速度定数の決定を試みたところ、正の速度定数セットを得ることが困難であった。この原因を特定するには至らなかったものの、A549 細胞が分泌する界面活性剤成分の影響で、細胞の有無によってBBPの吸着/溶解挙動が変化した可能性が考えられる。

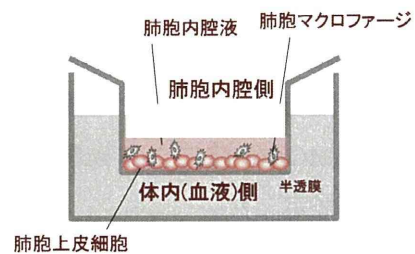
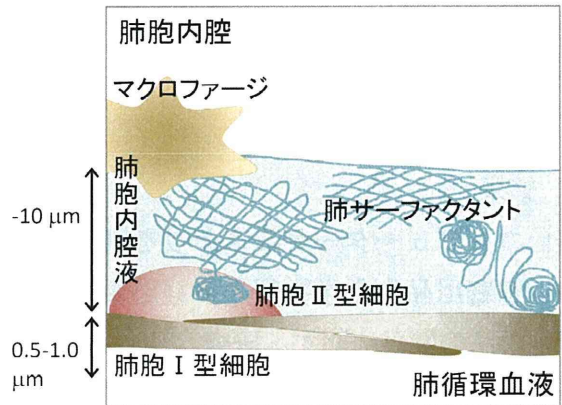


図3 *In vivo* 肺胞内環境と改善肺胞上皮モデル

培養ヒト肺胞モデルの高度化では、A549 細胞の飽和細胞層にPMA 処理で分化誘導したTHP-1 細胞を播種し、共培養の影響を48 時間後まで形態学的に観察した。その結果、THP-1 細胞は1 時間以内に付着し、その後少なくとも48 時間まではマクロファージ様の形態を保持したことから、急性影響に関する共培養暴露評価系として利用可能であると考えられる（図3）。

さらに、実際の肺胞内環境に近い *in vitro* ヒト肺胞モデルの構築を目的として、肺サーファクタントの適用について検討を行った。肺サーファクタントは *in vivo* では表面張力の低下をもたらすことで肺胞の伸縮を容易にするといった生理学的意義もさることながら、化学物質の溶存性や粒子状物質の肺胞内での凝集性に大きな影響を及ぼすものと考えられる。そこで、入手可能なウシ由来肺サーファクタント（サーファクテン）の適用可能性について検討を行った結果、24 時

間後に細胞生存率の若干の低下がみられたものの、*in vitro* 培養系への適用可能性を示唆する結果が得られた。ただし、培養液との混合時に多くの不溶性物質の生成が認められたことや細胞形態の軽微な変化が観察されたことから、濃度や添加方法の最適化が必要であると考えられる。

#### C-4 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

ヒト皮膚では、角層の有無に関わらず DBP の皮膚透過は認められず、モノエステル体である BP の透過が確認された。また、皮膚中からは BP のみが検出された。これらの結果はヘアレスラット皮膚による透過性試験と同様の結果であった。BnBP の場合も角層の有無に関わらず代謝物 (BP 及び BnP) のみの透過が観察され、BnP の透過速度が BP よりも約 10 倍以上大きい値を示した。また、皮膚中からはモノエステル体のみが検出され、BnP の方が BP よりも高濃度であり、BnBP に関するこれらの結果はヘアレスラット皮膚とは異なるものであった。一方、DEHP のヒト皮膚透過性試験ではジエステル体、モノエステル体の何れの透過も認められず、皮膚中からも検出されなかった。

表 1 ヒト皮膚ホモジネートによるフタル酸エステル類加水分解反応の速度論的パラメーター

Substrate	Metabolite	$K_m$	$V_{max}$	$V_{max}/K_m$
DBP	BP	13.2	$4.1 \times 10^{-2}$	$3.1 \times 10^{-3}$
BnBP	BP	165	$2.6 \times 10^{-3}$	$1.6 \times 10^{-5}$
	BnP	58.5	$4.7 \times 10^{-2}$	$8.0 \times 10^{-4}$
DEHP	MEHP	N.D.	N.D.	N.D.

次に、ヒト皮膚から調製した S9 によるフタル酸エステル類の代謝 (加水分解) につ

いて検討を行った結果、Intrinsic Clearance ( $V_{max}/K_m$ ) で比較すると、 $V_{max}/K_m (DBP \rightarrow BP) > V_{max}/K_m (BnBP \rightarrow BnP) > V_{max}/K_m (BnBP \rightarrow BP)$  であり、ヒト皮膚透過試験で観察された結果を支持するものであった (表 1)。

次式に示したように、物質の皮膚透過を表す Fick の拡散則 (式 1) に Michaelis-Menten 式を組み込むことによって (式 2)、代謝物の皮膚透過性や皮膚中濃度を考慮することが可能となる。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (1)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - R(C) \quad (2)$$

ここで、C は化学物質濃度、D は拡散係数、R(C) はミカエリスメンテン式を示す。

これらの式は、ヘアレスラット皮膚による透過性試験から得られた皮膚透過パラメーターとヒト皮膚ホモジネートを用いて得られた代謝パラメーターを組み合わせることによって皮膚内で代謝を受ける化学物質の皮膚透過性および皮膚中濃度が予測可能であることを示している。また、ヒト皮膚ホモジネートの代わりに、ヒト皮膚中のエステラーゼをはじめとする異物代謝酵素活性を模倣する“酵素カクテル”の確立も有用なアプローチであり、これによって皮内代謝を受ける化学物質の有効性や安全性の迅速スクリーニングが可能になるものと考えられる。

#### C-5 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

フタル酸エステル類加水分解反応のより詳細な代謝プロファイルを解析するために、哺乳動物細胞発現リコンビナント CES1、CES2 及び CES3 酵素によるフタル酸エステ

ル類加水分解反応を検討した。リコンビナント CES1、CES2 及び CES3 を酵素源にして DBP、BBP 及び DEHP の加水分解反応の速度論的解析を行った。DEHP を基質とした場合、いずれの CES 酵素でも代謝物 (MEHP 及び PA) は検出されなかった。また CES3 を酵素源とした場合には、DBP 及び BBP の加水分解反応は Mock Control と同程度の活性しか認められなかったため、本条件で速度論的解析を行うことは出来なかった。

DBP から MBP へ及び BBP から MBzP への加水分解において CES1 及び CES2 両酵素の寄与が明らかになった。DBP から MBP への加水分解反応では、CES1 及び CES2 酵素に関して比較すると、 $V_{max}$  値はほぼ同程度であり、 $K_m$  値において CES2 が CES1 の 2.2 倍高い結果となった。一方、BBP から MBzP への加水分解では、 $K_m$  値においては、DBP の加水分解反応と同様に CES1 が高く、 $V_{max}$  値にも CES1 が CES2 に比べ 1.8 倍高いという結果となった (表 2 及び表 3)。

表 2 リコンビナント CES 酵素による DBP の加水分解反応の速度論的パラメーター

Substrate	Metabolite	Enzyme	$K_m^a$	$V_{max}^b$	$V_{max}/K_m^c$
DBP	MBP	CES1	14.1	58.1	4.13
		CES2	6.42	57.1	8.89

Each value is the mean of two separate experiments. <sup>a</sup> $\mu\text{M}$ . <sup>b</sup> $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$ . <sup>c</sup> $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ .

表 3 リコンビナント CES 酵素による BBP の加水分解反応の速度論的パラメーター

Substrate	Metabolite	Enzyme	$K_m^a$	$V_{max}^b$	$V_{max}/K_m^c$
BBP	MBzP	CES1	8.15	39.9	4.89
		CES2	3.34	22.7	6.80

Each value is the mean of two separate experiments. <sup>a</sup> $\mu\text{M}$ . <sup>b</sup> $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$ . <sup>c</sup> $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ .

上述したフタル酸エステル類加水分解反応の速度論的プロファイルはリコンビナント

ト CES 酵素と昨年度報告した肝ミクロゾームの間で異なっていた。すなわち、本研究で用いたリコンビナント CES 酵素は典型的な Michaelis-Menten モデルに従ったのに対し、肝ミクロゾームは Eadie-Hofstee プロットにおいてフック型となりアロステリックな挙動を示した。さらに、リコンビナント CES1 及び CES2 酵素による DBP や BBP の加水分解反応の  $S_{50}$  と  $K_m$  値は肝ミクロゾームに比べて 7-22 倍低い値となった。これらの結果は、肝臓にする CES 酵素以外の加水分解酵素、例えばリパーゼ等がフタル酸エステル類の加水分解に関与する可能性があることを示していると考えられる。

#### C-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

一般家庭 12 家屋を対象にハウスダストをサンプリングし、そのアセトン抽出液中のピレスロイド系殺虫剤を測定した。その結果、今回調査した家庭の 50% (6 家屋) から Permethrin が検出され、最高濃度は 16  $\mu\text{g}/\text{g house dust}$  であった。Permethrin に比べ検出頻度及び濃度は低いものの、Bifenthrin (5 家屋)、Transfluthrin (3 家屋) が検出された。成人のハウスダスト摂取量を 50 mg (RIVM, 2008) と仮定すると、今回の調査における最高濃度の Permethrin をハウスダストから摂取量した場合、一日摂取量は 0.8 ( $\mu\text{g}/\text{day}$ ) と推定され、一日許容摂取量 (0.05 mg/kg bw/day, EPA) のおおよそ 0.03% に相当することが明らかになった。

#### 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/水分配係数 (LogP)、オクタノール/空気分配係数 ( $K_{oa}$ ) 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、

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

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  $K_{dg}$  はダスト-空気分配係数 (Dust-Air Partition Coefficient)、 $f_{om\_dust}$  はハウスダスト中の有機物の体積比、 $\rho_{dust}$  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。本研究で確立した CONFLEX/DFT/COSMO-RS 法による推定手法を室内環境で汎用されるピレスロイド系殺虫剤に適用した。その結果、LogP 及び VP については QSAR 法と同等もしくはそれを上回る精度で予測できることが明らかになった。特筆すべきは、GC 保持時間から実験的に求めたピレスロイド系殺虫剤の VP 値と CONFLEX/DFT/ COSMO-RS 法による推定

値の間に極めて良好な相関 ( $r=0.9709$ ) が認められたことである。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。

家庭用品への直接的な接触による経皮暴露に関する課題では、製品から皮膚表面への移行量/移行速度の評価法を確立し、5種類の PAEs に適用した結果、皮膚表面への移行性は DBP < DPeP < DHeP < DHEP < DINP の順であった。PAEs の皮膚表面への移行量と LogP との相関について検討を行ったところ 移行量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) =  $0.155 \times \text{LogP} - 0.395$  ( $r = 0.5935$ ) で表される正の相関が認められた。したがって、PVC シートから皮膚表面への PAEs 移行性にはアルキル側鎖の炭素数、換言すれば PAE 分子の疎水性が決定的な影響及ぼすものと考えられる。また、皮膚への移行性に関する研究で付随的に得られた重要な知見として、家庭用品から皮膚表面への化学物質の移行性には大きな個人差が存在することが明らかになった。このような個人差を生じる要因については現在のところ不明であるが、皮脂の質的/量的な差異など生態側の要因を明らかにすることによって、性差や年齢差の影響を加味した評価が可能になると考えられる。

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 BBP 透過性の評価を行い、昨年度構築した肺胞内腔側液相・細胞相・血液相の3つの相間の動的分配平衡モデルに新たに器壁への吸着を考慮したパラメーターを導入して数理モデルの精緻化を行った。ただし、おそらく A549 細胞の有無によって BBP の器

壁への吸着/溶解挙動が変化するため、妥当なパラメーターセットを導出することは困難であった。これに関しては今後の検討課題であるが、A549 細胞が分泌する界面活性剤成分の影響も想定されることから、肺サーファクタントの導入など培養ヒト肺胞モデルの高度化も併せて検討する必要がある。経皮吸収では、拡散セルによる *in vitro* 評価の結果を基に、ヒト皮膚を用いて透過性と貯留性を指標とする SVOC の分類を進めた。さらに、ヒト皮膚によるフタル酸エステル類の加水分解について、ヒト皮膚ホモジネートを用いて速度論的な解析を行い、ヘアレスラット皮膚による透過性試験とヒト皮膚ホモジネートによる代謝試験を組み合わせることで、皮膚内で代謝を受ける化学物質についても皮膚透過性および皮膚中濃度を予測できる可能性があることを示した。

このような肺あるいは皮膚での化学物質の初回通過代謝の評価に関して、リコンビナント酵素の適用可能性について検討を行い、哺乳動物細胞で異所的に発現させた異物代謝酵素 (CES) が有用であることを示した。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、例えば臓器ごとの特性を反映した”異物代謝酵素カクテル”の創出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の推算手法、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) Kawakami T., Isama K., Matsuoka A.: Analysis of phthalic acid diesters, monoester, and other plasticizers in polyvinyl chloride household products in Japan, *J. Environ. Sci. Health Part A*, **46**, 855-864, 2011
- 2) Kawakami T., Isama K., Jinno H., Matsuoka A. and Nishimura T.: Transfer of phthalic acid diesters from model PVC sheet to skin surface. *Organohalogen Compounds*, **73**, 1116-1119, 2011
- 3) 酒井康行, 小森喜久夫: ヒトハザード評価における新しい流れと課題. 自動車研究, **33**(5), 9-14, 2011

### F-2. 学会発表

- 1) 神野透人, 香川 (田中) 聡子: 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物性値予測法に関する研究. 平成 23 年度室内環境学会学術大会, 2011 年.12 月.
- 2) 神野透人, 香川 (田中) 聡子: COSMO-RS 法によるピレスロイド系殺虫剤の物理化学的パラメーター予測. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月.
- 3) Kawakami T., Isama K., Jinno H., Matsuoka A. and Nishimura T.: Transfer of phthalic acid diesters from model PVC sheet to skin surface. 31th International Symposium on

Halogenated Persistent Organic Pollutants.  
Crown Plaza Hotel, Brussels, Belgium. Aug.  
2011.

- 4) 岩沢こころ, 田中玄弥, 小森喜久夫, 藤井隆夫, 奥山光作, 畑中研一, 迫田章義, 香川(田中)聡子, 神野透人, 酒井康行: 培養ヒト肺胞上皮モデルと数理モデルによるフタル酸エステルのヒト影響予測. 日本動物実験代替法学会第 24 回大会, 2011 年 12 月
- 5) 増茂裕子, 藤堂浩明, 杉林堅次: 家庭用品から溶出するフタル酸エステル類の皮膚透過性にかんする研究. 第 55 回日本薬学会関東支部大会, 千葉
- 6) 増茂裕子, 藤堂浩明, 杉林堅次: 家庭用品から溶出するフタル酸エステル類の皮膚透過性に関する研究. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月.
- 7) 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, Nov. 2010.

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)

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 (LogP)、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。ピレスロイド系殺虫剤 13 物質について各々の幾何異性体の最安定配座を CONFLEX ver. 6.8 により探索した。ついで PQSmol を用いて構造最適化を行い、得られた COSMO ファイルを基に COSMO-RS 法による物性値の推算を行った。その結果、LogP の予測では何れの手法も実測値と概ね良い相関を示したのに対し、蒸気圧については COSMOtherm で得られた値と実験値の相関性が最も高く ( $r = 0.78$ ), 回帰直線の傾きは 0.93 であった。QSAR に基づく代表的な方法である EPI Suite ではピレスロイドの幾何異性体を考慮できず、混合物としての予測も困難であることから、COSMO-RS 法は従来の QSAR 法を補完する有用な物理化学的パラメーター予測手法であると考えられる。

A. 研究目的

室内環境中の化学物質、特に沸点が 240 ないし 260℃から 380 ないし 400℃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や建物の床・壁面に付着して存在すると考えられる。このような SVOC の暴露経路として、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や床面等への直接的な接触による経皮暴露が懸

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予測し、暴露量を評価するためには、生活環境中での化学物質の動態、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。

室内環境中の化学物質の存在形態を規定

する重要な要因として、蒸気圧 (VP) やオクタノール/水分係数 (LogP) などの物理化学的なパラメーターが知られている。しかし、必ずしも全てのパラメーターについて実測値が入手出来るわけではなく、化学物質の動態や暴露経路をシミュレーションする上で高精度の予測手法確立が必要とされている。そこで、本研究では家庭用品由来の主要な室内環境化学物質の一つであるピレスロイド系殺虫剤を対象にして、Conductor like Screening Model for Realistic Solvents (COSMO-RS) 法の適用可能性について検討を行った。

表 1 ピレスロイド系殺虫剤と主な用途

化合物	主な用途
Allethrin	蚊取り線香
Cyphenothrin	エアゾール剤・燻煙剤
Empenthrin	衣料用防虫剤
Furamethrin	蚊取りマット
Imiprothrin	エアゾール剤
Metofluthrin	電気蚊取り
Permethrin	エアゾール剤・燻煙剤
Phenothrin	エアゾール剤・燻煙剤
Phthalthrin/ Tetramethrin	エアゾール剤
Prallethrin	エアゾール剤・電気蚊取り
Profluthrin	衣料用防虫剤
Resmethrin	エアゾール剤
Transfluthrin	エアゾール剤・液体蚊取り

## B. 実験方法

### B-1 配座探索及び量子化学計算

本研究では表 1 に示した 13 種類のピレスロイド系殺虫剤を対象とした。各ピレスロイドの主要な幾何異性体の構造式を図 1 に示した。これらの幾何異性体を考慮に入れた 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. 6.8 により 10 kcal/mol の範囲で MMFF94s 力場による配座解析を行い、各異性体の最安定配座を求めた。

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

量子化学計算で得られた COSMO ファイル及び Energy ファイルを用いて、COSMOtherm ver. C21-0111\_a (COSMOlogic) により物理化学的パラメーターを推算した。尚、各ピレスロイド系殺虫剤はそれぞれの幾何異性体の等量混合物であるものと仮定して計算を行った。また、比較のために、EPI Suite 4.1 及び SPARC ver. 4.5 を用いて定量的構造活性相関による物性値の推定を行った。ただし、これらの手法では幾何異性体の存在を考慮せずに計算を行った。

## C. 結果と考察

CONFLEX による配座探索で得られたそれぞれのピレスロイド系殺虫剤異性体の最安定構造を初期構造として、DFT 法による構造最適化を行った。COSMO 計算で得られた表面電荷分布 (Sigma Surface) の一例を図 2 に示した。

図 3 は PhysProp Database で LogP の実験値が得られた、d-Allethrin (LogP, 4.78)、Imiprothrin (2.90)、Phthalthrin/Tetramethrin (4.73)、Permethrin (6.50)、Prallethrin (4.49)、Resmethrin (6.14) 及び Transfluthrin (5.46) の 7

物質について、COSMOtherm、EPI Suite 4.1 及び SPARC ver. 4.5 による推定値との相関を示したものである。オクタノール/水分配係数の予測では何れの手法も実測値と概ね良い相関を示し、相関係数  $r$  は 0.9026 (Sparc 4.5)~0.9996 (EPI Suite 4.1) の範囲であった (表 1)。

一方、Vapor Pressure についても同様に、PhysProp Database (d-Allethrin、d,d-T80-phenothrin、Empenthrin、Imiprothrin、Phthalthrin/ Tetramethrin、Permethrin、Phenothrin、Resmethrin 及び Transfluthrin)あるいは EPA (Metofluthrin)、住友化学 (Profluthrin)の資料に記載されている実験値と推定値との相関について検討を行った (図 4)。その結果、LogP と比較して予測精度は劣るものの、COSMOtherm で得られた推定値と実験値の相関性が最も高く ( $r = 0.7769$ )、回帰直線の傾きは 0.93 であった (表 2)。

さらに、ピレスロイド系殺虫剤の Vapor Pressure 推定値について、実験的に得られる推定値との相関性についても検討を行った。すなわち、次式に基づいて GC/MS 保持時間から算出した推定値 (Tsuzuki M. (2001) *Chemosphere* 45: 729-736)と COSMO-RS 法による推定値を比較した。

$$\log P^S = [(\log P_{\text{DBP}}^S - \log P_{\text{DEHP}}^S) \times t + t_{\text{DBP}} \times \log P_{\text{DEHP}}^S - t_{\text{DEHP}} \times \log P_{\text{DBP}}^S] / (t_{\text{DBP}} - t_{\text{DEHP}}),$$

ただし、ここで  $P^S$  はピレスロイド系殺虫剤の Vapor Pressure、 $\log P_{\text{DBP}}^S$  及び  $\log P_{\text{DEHP}}^S$  はそれぞれ Dibutyl Phthalate、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate の Vapor Pressure 対数値 (ここでは参考文献に記載されている -2.57 と -4.72 を用いた)、 $t$ 、 $t_{\text{DBP}}$ 、 $t_{\text{DEHP}}$  はそれぞれピレスロイド系

殺虫剤、DBP 及び DEHP の GC における保持時間を表す。

この式に、本研究で検討を行ったピレスロイド系殺虫剤及びフタル酸エステル類 (DBP 及び DEHP) の GC/MS 保持時間 (詳細については本報告書の香川らの項を参照) を代入して  $\log P^S$  値を算出した。図 5 はこのようにして得られた GC/MS 法によるピレスロイド系殺虫剤 Vapor Pressure の推定値と COSMOtherm による推定値の相関を示したものである。両者の間には平均で 1.6 Unit、最大で 2.3 Unit の差異がみられるものの、相関係数  $r$  は 0.9709 であり、極めて高い相関が認められた。これら結果は、CONFLEX による配座探索と DFT/COSMO-RS 法の組み合わせによって、一群の類縁化合物の Vapor Pressure を少なくとも相対的には適切に見積もることが可能であることを示しているものと考えられる。

#### D. 結論

ピレスロイド系殺虫剤 13 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。LogP の予測では何れの手法も実測値と概ね良い相関を示したのに対し、蒸気圧については COSMOtherm で得られた値と実験値の相関性が最も高く、GC/MS 法による実験的な推定値とも良好な相関が認められた。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る。

#### E. 健康危険情報

なし