

- 28) 阿部裕・山口未来・六鹿元雄・平原
嘉親・河村葉子, ポリ塩化ビニル製玩
具中の可塑剤調査, 日本食品化学学
会第 16 回総会・学術大会講演要旨集,
28, 2010
- 29) 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

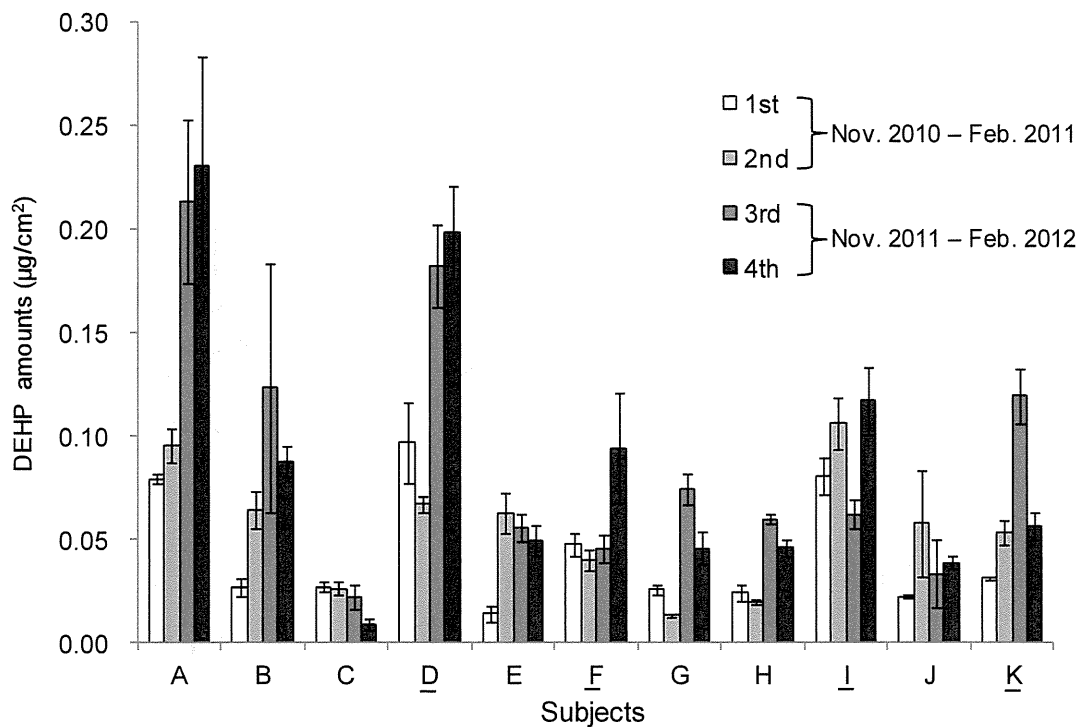


Fig. 1 Amounts of DEHP detected in the control samples (average \pm SD).
 (Alphabetical order means in order of age and underline means female subject)

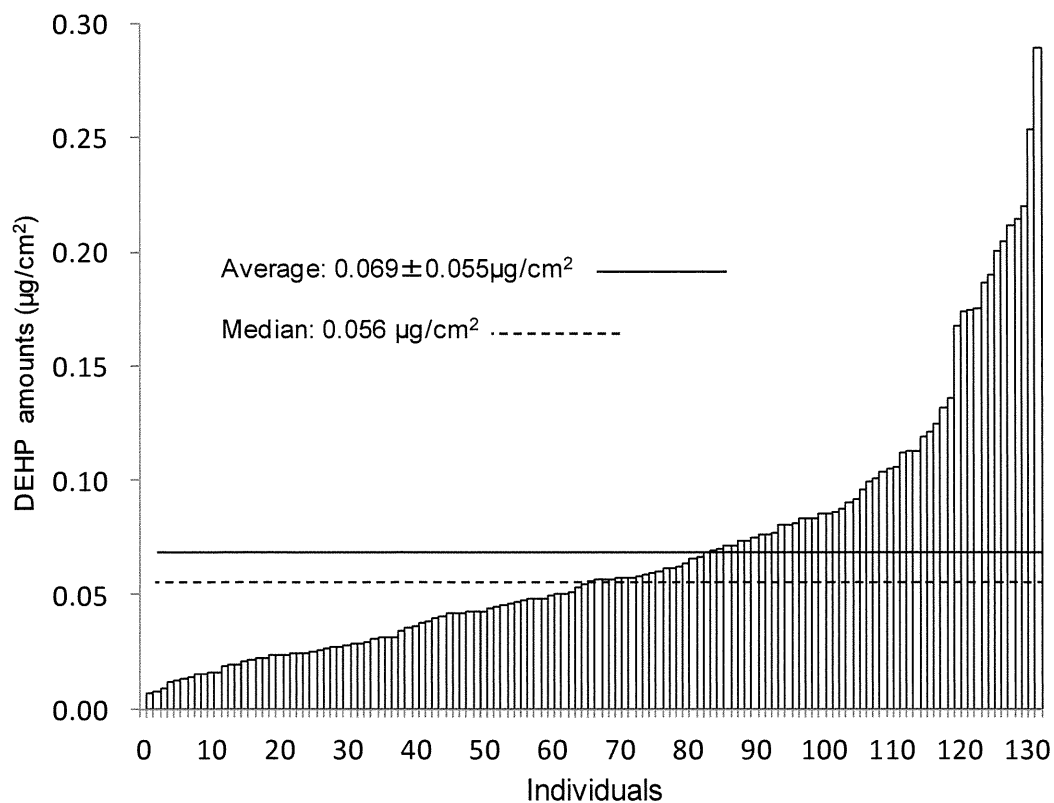


Fig. 2 Distributions of DEHP background concentrations measured in the control samples.

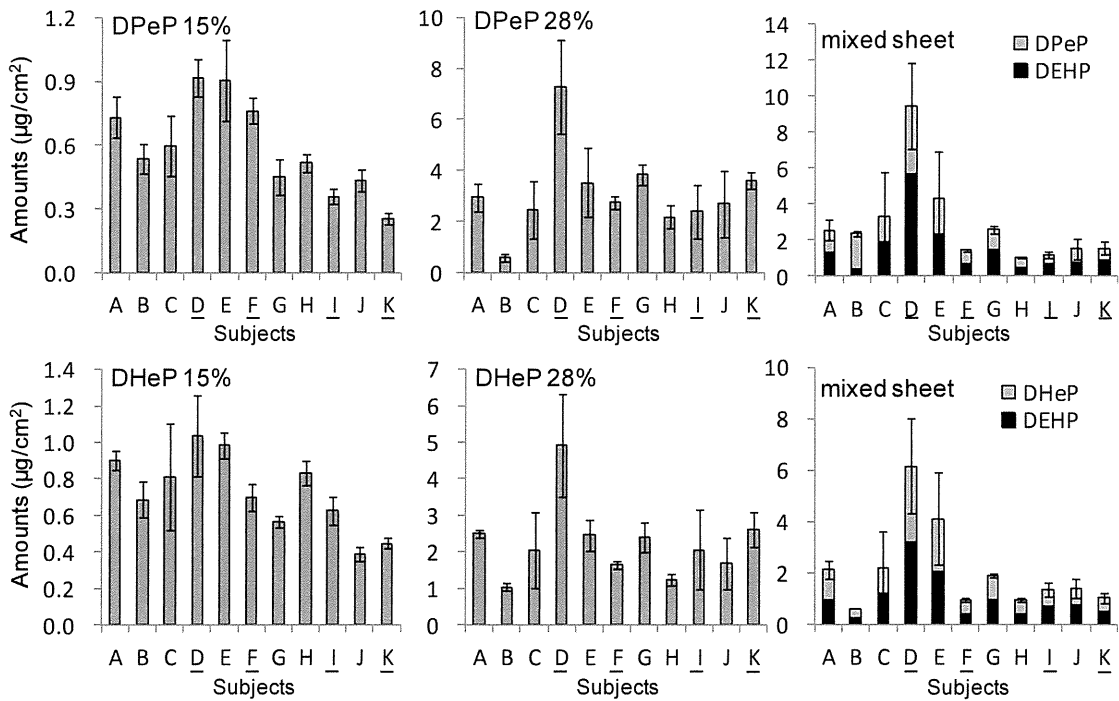


Fig. 3 Amounts of DPeP, DHeP and DEHP transferred from the model PVC sheet to the skin surface (average \pm SD). (Alphabetical order means in order of age and underline means female subject)

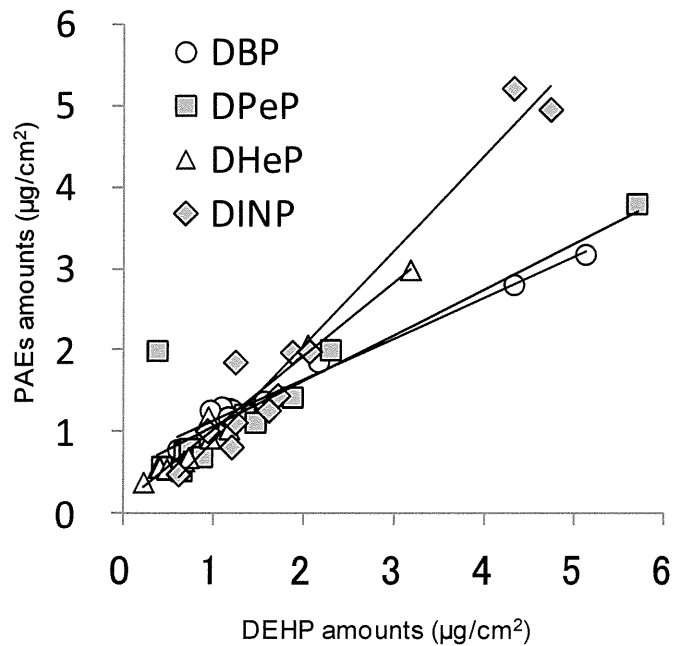


Fig. 4 Relationships between amount of DEHP and DBP, DPeP, DHeP and DINP transferred from the mixed sheet.

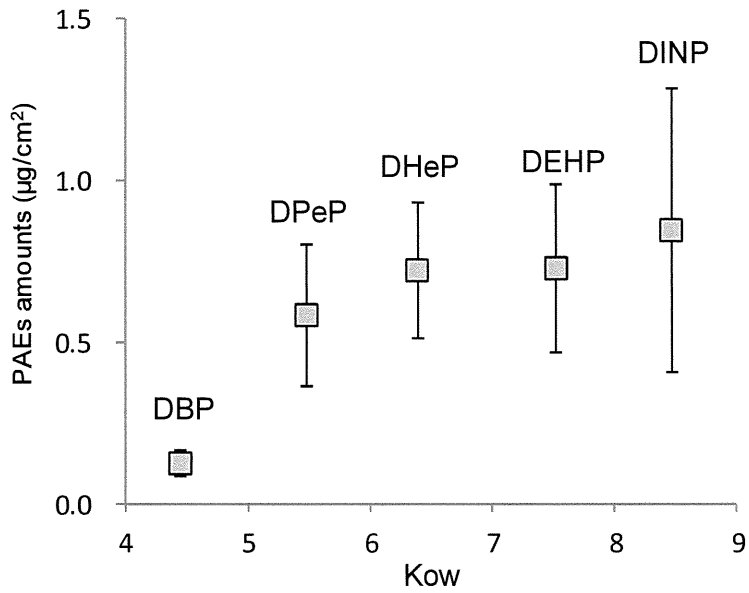


Fig. 5 Relationship between the average amounts of PAEs transferred to the skin surface from the 15% sheet and their Kow values.

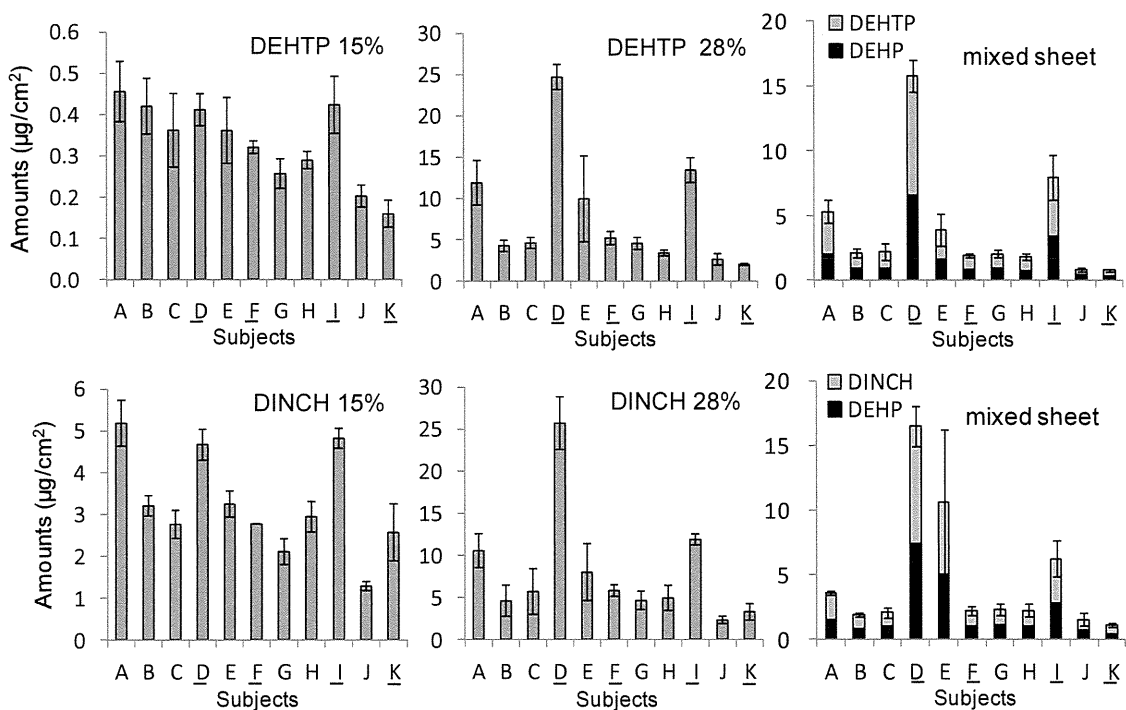


Fig. 6 Amounts of DEHTP, DINCH and DEHP transferred from the model PVC sheet to the skin surface (average \pm SD). (Alphabetical order means in order of age and underline means female subject)

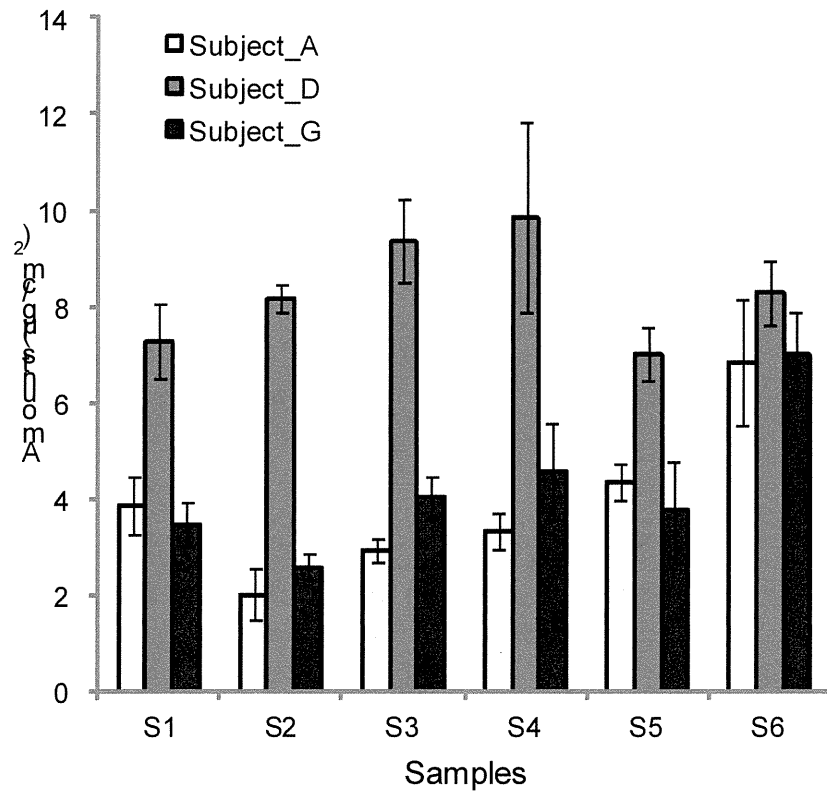


Fig. 7 Amounts of DEHP (S1 – 5) and DINCH (S6) transferred from the household products to the skin surface (average \pm SD). [S1: card case (DEHP 17%), S2: desk mat (DEHP 21%), S3: floor mat (DEHP 36%), S4: floor mat (DEHP 27%), S5: cushion (DEHP 25%), S6: ring float (DINCH 30%)]

Table 1. Physical and chemical properties and GC/MS conditions of the compounds.

Compounds	Cas. No.	M.W. ^a	Kow ^b	Retention Time (min) ^c	Quantifying ion (m/z)	Qualifying ion (m/z)
DPeP	131-18-0	306.4	5.47	12.90	149	237
DHeP	84-75-3	334.5	6.38	13.74	149	251
DEHP	117-81-7	390.6	7.52	14.51	149	167
DEHTP	6422-86-2	390.6	7.40	15.40	261	149
DINCH	166412-78-8 ^d	424.6	8.53 ^e	14.65 - 16.20	155	281
DEHP-d ₄	93951-87-2	394.6		14.91	153	171

^a Molecular weight ^b Calculated by Pallas (ver 3.6.2.1) ^c FocusGC/DSQ II

^d in EU (U.S. and Canada; 474919-59-0) ^e as normal nonyl ester

Table 2. Concentrations of compounds in the model PVC sheet (n=3)

Compounds	Blending ratio of the compounds (%)	Average (%)	SD	CV (%)
DPeP	15	16	0.60	3.7
	28	34	4.3	13
	14 ^a	11	1.1	9.8
DHeP	15	16	0.55	3.5
	28	32	1.0	3.2
	14 ^b	12	1.2	10
DEHTP	15	12	0.44	3.6
	28	32	2.3	7.2
	14 ^c	13	0.25	1.8
DINCH	15	13	0.82	6.1
	28	23	1.2	5.0
	14 ^d	10	0.083	0.82
DEHP	14 ^a	13	1.1	8.7
	14 ^b	12	1.4	11
	14 ^c	12	0.28	2.3
	14 ^d	13	0.29	2.1

^a mixture of DEHP and DPeP ^b mixture of DEHP and DHeP

^c mixture of DEHP and DEHTP ^d mixture of DEHP and DINCH

Table 3. Concentrations (%) of compounds and content ratio of target compound and DEHP in mixed PVC sheet, and slopes and coefficients of linear regression.

PVC sheet	Concentrations		Content ratio (A/B)	Slope and coefficient of linear regression	
	Target compound (A)	DEHP (B)		Slope	Regression coefficient
DBP	11	13	0.91	0.503	0.990
DPeP	11	13	0.85	0.559	0.884
DHeP	12	12	0.99	0.898	0.991
DINP	13	12	1.1	1.16	0.978
DEHTP	13	12	1.1	1.42	0.997
DINCH	10	13	0.75	1.19	0.998

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 岩沢 こころ 東京大学 生産技術研究所 物質・環境系 研究員

研究要旨： 前年度までに培養肺胞モデルにおける BBP の透過とそれを概ね記述する数理モデルを構築したが、その乖離の原因の一つとして、疎水性の高い BBP においては、培養ディッシュ等の培養器内壁への非特異的な吸着による減少が無視しえないことが推察された。そこで、器壁への吸着による BBP 濃度の減少を考慮する修正数理モデルを構築し、併せて細胞存在下・非存在下における実測を行ったところ、細胞の存在下で器壁への吸着が大きく変化することが明らかとなり、細胞から分泌される界面活性剤様の物質の関与が疑われる結果となった。一方、肺胞内の毒性物質暴露と肺上皮の障害・透過現象をより詳細に再現するための培養系の改善として、肺胞マクロファージ様細胞の導入と肺サーファクタント成分の添加について予備的な検討を行い、少なくとも 24 時間程度の急性暴露実験においては、肺胞上皮とマクロファージ様細胞の共培養と市販サーファクタント薬剤の内腔側への添加が十分に可能であることを明らかとした。

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。これは、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、家庭用品の代表例としてプラスチック製品の可塑剤である

フタル酸エステル類を対象とした。これらについては、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 23 年度においては、前年度までに概ね構築・実証したベンジルブチルフタレート（Benzyl Butyl Phthalate, BBP）の肺胞上皮の透過を記述する数理モデルの修正

と、肺胞内環境をよりよく模倣するために、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。

B. 研究方法

B.1 フタル酸エステル

前年度まで検討してきた3種のフタル酸エステル類のうち、Benzyl Butyl Phthalate (BBP)に絞って検討を行った。

B.2 肺胞上皮由来細胞の培養と BBP 透過実験

肺胞上皮由来細胞として、肺胞由来がん細胞株である A549 細胞（肺胞の II 型上皮細胞由来）を用いた。通常の試験にはマルチウェルプレートを用いた。

透過性の試験には、半透膜型培養器（セルカルチャーインサート Costar 3460 (12 穴用)）に、A549 細胞を培養した。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。通常約 10 日間培養し実験に供した。

前年度までの知見に基づき、膜上面側（肺胞内腔側）または膜下面側（基底膜側、血液側）から BBP を 10 mM 添加し、

それぞれの側の濃度を HPLC で計測した。BBP の反対側への透過量を 1、3、6、12、24、48 時間にて計測した。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。

器壁内部への吸着を定量化するために、セルカルチャーインサートのみをセットした細胞無しの培養系についても、同様の実験と計測を行った。

B.3 ヒト単核球由来細胞株 THP-1 の培養とマクロファージ様細胞への分化誘導

ヒトマクロファージ様由来細胞には、ヒト骨髓単核球由来細胞株の THP-1 細胞の分化誘導系を用いた。すなわち、継代維持培養した THP-1 細胞に、PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) を 5 ng/mL の濃度で暴露し、24-72 時間後までの分化を、FITC ラベル化 CD11b 抗体を用いるフローサイトメトリーおよび組織培養用プラスチックへの付着性によって評価した。

B.4 A549 細胞と THP-1 細胞の共培養

マルチウェルプレートで単層培養した A549 細胞の飽和層に、48 時間の PMA 処理で分化誘導した THP-1 細胞を、 4.0×10^4 cells/cm² で播種、その後 48 時間まで形態を観察した。

B.5 肺胞内腔液の再現

新生児呼吸窮迫症候群治療剤としてウ

シ肺抽出物が、“サーファクテン”として田辺三菱製薬から販売されている。これは、健康なウシ肺の抽出物で、一定比率のリン脂質・遊離脂肪酸・トリグリセライドを1ビン中に120 mg含有するものである。処方に従って、この120 mgを4 mLの生理的食塩水に溶解分散し、10%の濃度で培養液に添加、単層で培養されたA549細胞に負荷し、24時間後の生存率を、WST-1を用いる生細胞試験にて評価した。

C. 研究結果および考察

C.1 器壁内表面への吸着の考慮

まず、12穴のカルチャーインサートをを用いる培養系において、A549細胞を含む場合と含まない場合それぞれについて、肺胞内腔側および体内側から10 mMのBBPを添加し、それぞれの側の濃度変化を48時間まで計測した(図1)。一方、気液内表面への吸着を考慮する修正数理モデルを構築した(図2)。

A549有無の違い・暴露側の違いからなる4セットのBBP濃度の経時変化データから、細胞層を介した輸送に関する速度定数 $k_1 \sim k_4$ 、上側および下側の器壁への吸着に関する速度定数 $k_5 \sim k_8$ を決定しようとしたところ、正の速度定数セットを決定することが困難であった。この原因の一つとして、A549の存在下で、BBPの器壁への吸着が予想外に低いことが考えられたが、現状では実証するには至らなかった。

A549細胞は肺胞ガンを由来としてもち、その特性は肺胞の生理学的な呼吸機能の

実現を容易にするための界面活性剤成分を分泌する肺胞のII型細胞に近いことが報告されている(Nardone LL and Andrews SB, *Biochim Biophys Acta*. 1979, 573(2), 276-95.)。この分泌量は正常のII型細胞には及ばないが、それでも培養に伴って系内に蓄積された界面活性様物質の存在が、ポリスチレン製のディッシュやインサート内壁へのBBPの吸着を妨げたことは容易に想定できる。

以上のような問題点は、*in vitro*特有のものであり、*in vitro*の数理モデルをほぼ完全に構築するためには明らかにしておかねばならない点である。細胞の有無によって、モデルの線型結合性が崩れるという予想外の障害が現れたが、A549細胞と一定時間接触をさせた培養液を用いて吸着実験を行うなどの手段で今後明らかとしていきたい。

C.2 肺胞マクロファージ様細胞の導入

肺胞内の実環境を図3に示す。今までの検討では、肺胞上皮細胞のみを導入してきたが、肺胞マクロファージは、粒子の貪食と除去や外部刺激に対する炎症性サイトカイン類の分泌など、経肺暴露を考える上で無視できない存在である。肺胞上皮細胞との共培養はすでに少数報告されており、炎症性サイトカインの分泌を通じて、肺上皮細胞への障害性を高めるなどの観察結果が示されている

(Wottrich R et al., *Int J Hyg Environ Health*. 2004, 207(4), 353-361; Alfaró-Moreno E et al., *Eur Respir J*. 2008, 32(5), 1184-94; Müller L et al., *J R Soc Interface*. 2010, 6(7), Suppl 1, S27-40)。しかしながら、その例

は多くなく、特に上皮細胞層上でどの程度安定的に保持されるかなどの基本的な知見が明らかにされていない。

そこで、ヒト肺胞マクロファージ様細胞のモデルとして多用されている PMA 分化誘導ヒト単核球由来 THP-1 細胞について、分化誘導を行うと共に、A549 細胞層へ播種し共培養した際の安定性について基礎的な検討を行った。

まず PMA での分化誘導について、マクロファージの表面マーカーである CD11b を用いたフローサイトメトリーを行い、72 時間処理で顕著な発現集団の増加を観察した (図 4)。平行して行った組織培養用ディッシュへの付着実験から、PMA 処理時間の増大と共に、付着性が増し、48 時間以上の処理でほぼ 100% の細胞が付着することが確かめられた (図 5)。以上のことより、分化誘導には、少なくとも 48 時間でできれば 72 時間程度の PMA 処理が適切であることが確認された。

さらに PMA で分化誘導した THP-1 を予め形成させておいた A549 飽和細胞層に播種したところ、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付着形態を保っていた (図 6)。このことから、共培養状態を保持したまま少なくとも 48 時間程度の急性暴露評価は十分に行えるといえる。また、PMA を除いて 48 時間純粋培養した THP-1 細胞は、その付着性を失ったことから、A549 細胞層上での長時間の付着形態維持は A549 細胞との何らかの生物学的作用によるものであることが推察された。

C.3 肺サーファクタントの内腔側への添加

肺胞内環境の再現を目指す場合、従来からの気液界面培養および C.2 で試みた肺胞マクロファージの導入に加えて、肺胞内腔液の再現が重要であると考えられる (図 3)。これは *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に加もさることながら、可溶性物質に関してはその溶存性に、粒子状物質についてその肺胞内での凝集性に、それぞれ大きな影響を与えると考えられる。しかしながら、*in vitro* 培養において、肺胞内腔液の再現を目指した例は我々の調べた範囲では皆無であった。

わが国では、未熟新生児の呼吸を容易にするための薬剤として、サーファクテンが販売されている。これはウシの肺抽出物をその主成分としており、まずはその使用が試みられるべき試薬であると考えた。そこで処方に従って、この 120 mg を 4 mL の PBS に溶解分散した濃厚液を培養液に 10% で添加し、A549 細胞層に暴露した。その結果、24 時間でやや生存率の低下がみられるものの顕著ではなく、*in vitro* 培養においても使用できそうとの結果を得た (図 7)。

今回、培養液との混合時に多くの不要性物質が観察されたことと細胞形態がやや変化したことから、濃度やその分散状態も含めて添加方法を最適化する必要があると考えられる。今回は、10% FBS を含む培養液を用いたが、例えば総タンパ

ク濃度を生理的なレベル（約 10 倍）に高めてから添加するなどの手法も有効かもしれない。一方、高価なウシ肺抽出物を用いるのではなく、適切なリン脂質やタンパクを混合することで培養系への添加に適した人工的な肺胞内腔液の再現を試みていく必要もあろう。

D. 結論

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* 培養系でのデータと数理モデルとを用いて評価するための手法確立を目的とした。特に今年度は、*in vitro* 現象を記述する数理モデルの精度を向上させることと、肺胞内腔環境をより良く模倣再現するために、肺胞マクロファージ様細胞の導入やサーファクタント成分を含む肺胞内腔液の可能性について、基礎的な検討を行った。

前年度までに培養肺胞モデルにおける BBP の透過とそれを概ね記述する数理モデルを構築したが、その乖離の原因の一つとして、疎水性の高い BBP においては、培養ディッシュ等の培養器内壁への非特異的な吸着による減少が無視しえないことが推察された。そこで、器壁への吸着による BBP 濃度の減少を考慮する修正数理モデルを構築し、併せて細胞存在下・非存在下における実測を行ったところ、細胞の存在下で器壁への吸着が大きく変化することが明らかとなり、細胞から分泌される界面活性剤様

の物質の関与が疑われる結果となった。

一方、肺胞内の毒性物質暴露と肺上皮の障害・透過現象をより詳細に再現するための培養系の改善として、肺胞マクロファージ様細胞の導入と肺サーファクタント成分の添加について予備的な検討を行い、少なくとも 48 時間程度の急性暴露実験においては、肺胞上皮とマクロファージ様細胞の共培養と市販サーファクタント薬剤の内腔側への添加が十分に可能であることを明らかとした。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 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).

2. 学会発表

1) 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: 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. 日本動物実験代替法学会第 24 回大会, 2011 年 12 月.

F. 知的所有権の取得状況

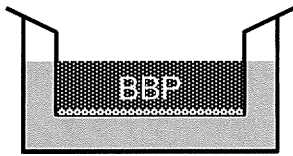
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

BBPを内腔側に添加



●, 内腔側濃度
○, 体内側濃度

BBPを体内側に添加

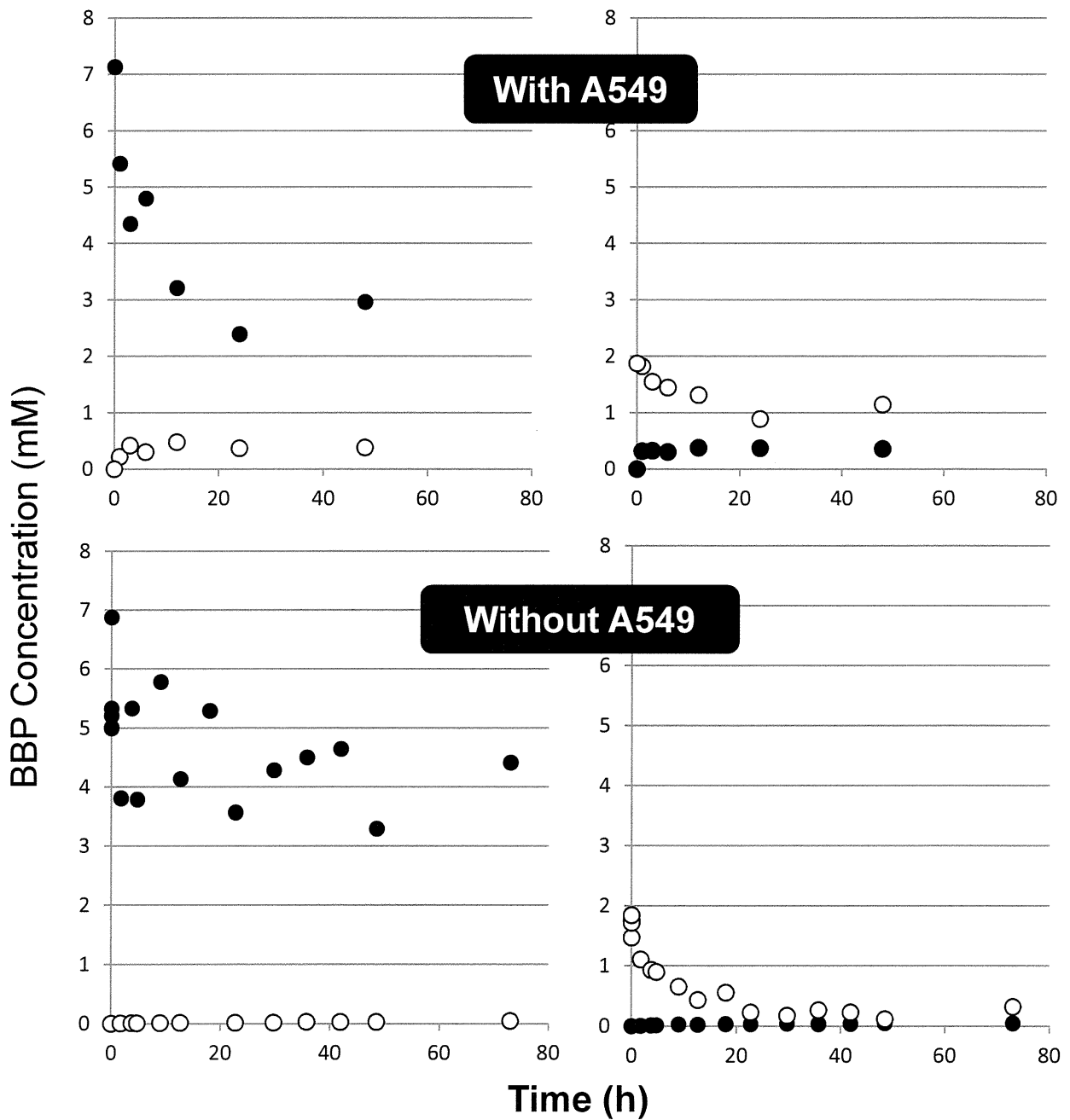
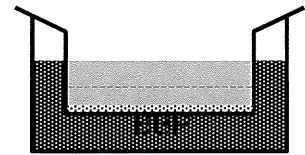
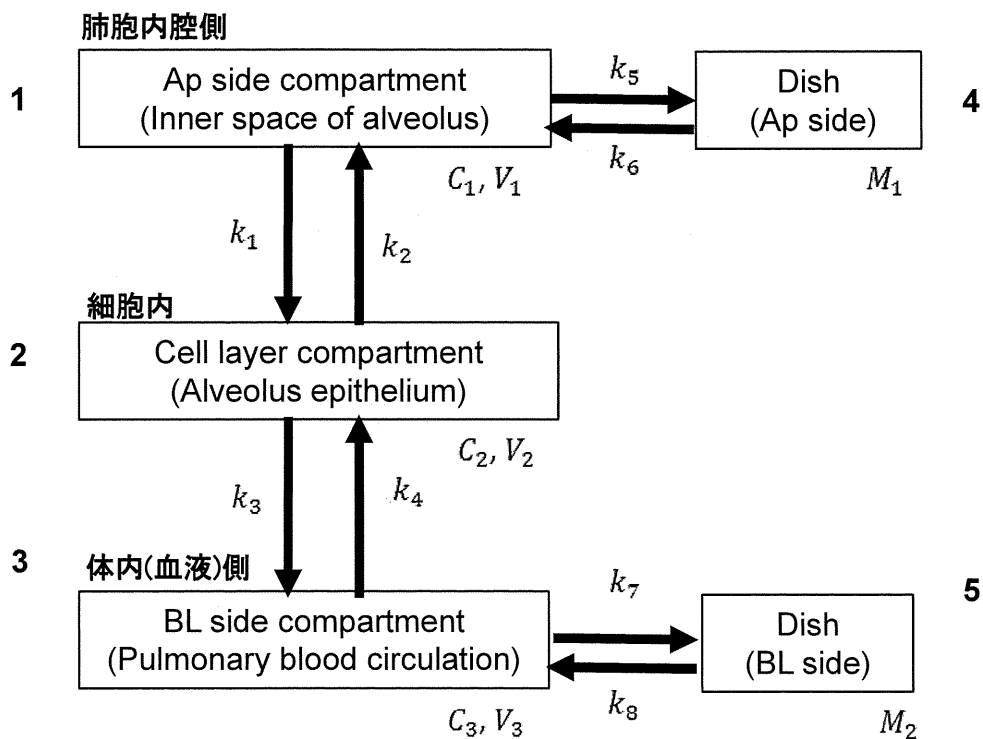


図1. 肺胞上皮細胞存在・非存在下におけるBBP濃度の減少



●細胞層を含む場合

$$V_1 \cdot dC_1/dt = -k_1 \cdot C_1 \cdot V_1 + k_2 \cdot C_2 \cdot V_2 - k_5 \cdot C_1 \cdot V_1 + k_6 \cdot M_1$$

$$V_2 \cdot dC_2/dt = k_1 \cdot C_1 \cdot V_1 - (k_2 + k_3) \cdot C_2 \cdot V_2 + k_4 \cdot C_3 \cdot V_3$$

$$V_3 \cdot dC_3/dt = k_3 \cdot C_2 \cdot V_2 - k_4 \cdot C_3 \cdot V_3 - k_7 \cdot C_3 \cdot V_3 + k_8 \cdot M_2$$

●細胞層を含まない場合

$$V_1 \cdot dC_1/dt = -k_5 \cdot C_1 \cdot V_1 + k_6 \cdot M_1$$

$$V_3 \cdot dC_3/dt = -k_7 \cdot C_3 \cdot V_3 + k_8 \cdot M_2$$

C_i : Concentration in the compartment i

V_i : Volume of the compartment i

k_i : Mass-transfer coefficient

M_i : Total absorbed amount of BBP

図2. 器壁への吸着を考慮する修正数理モデル

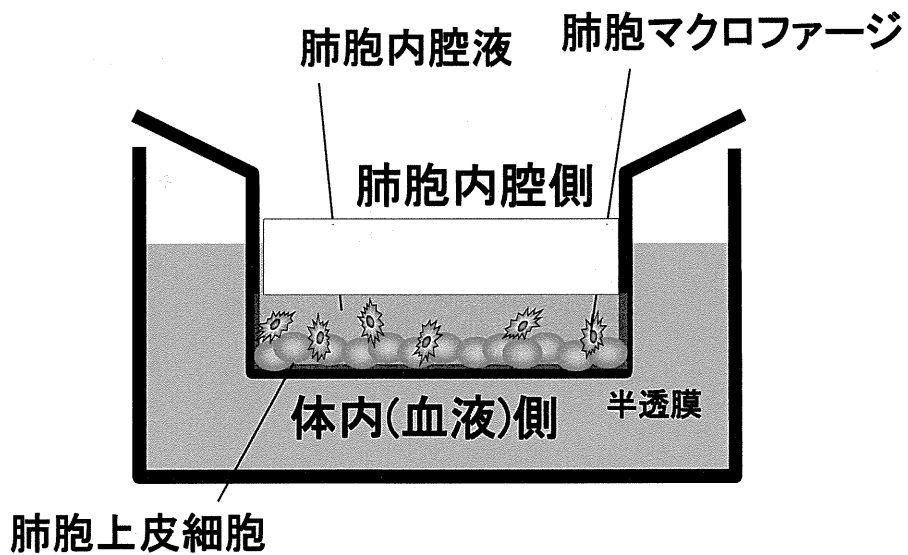
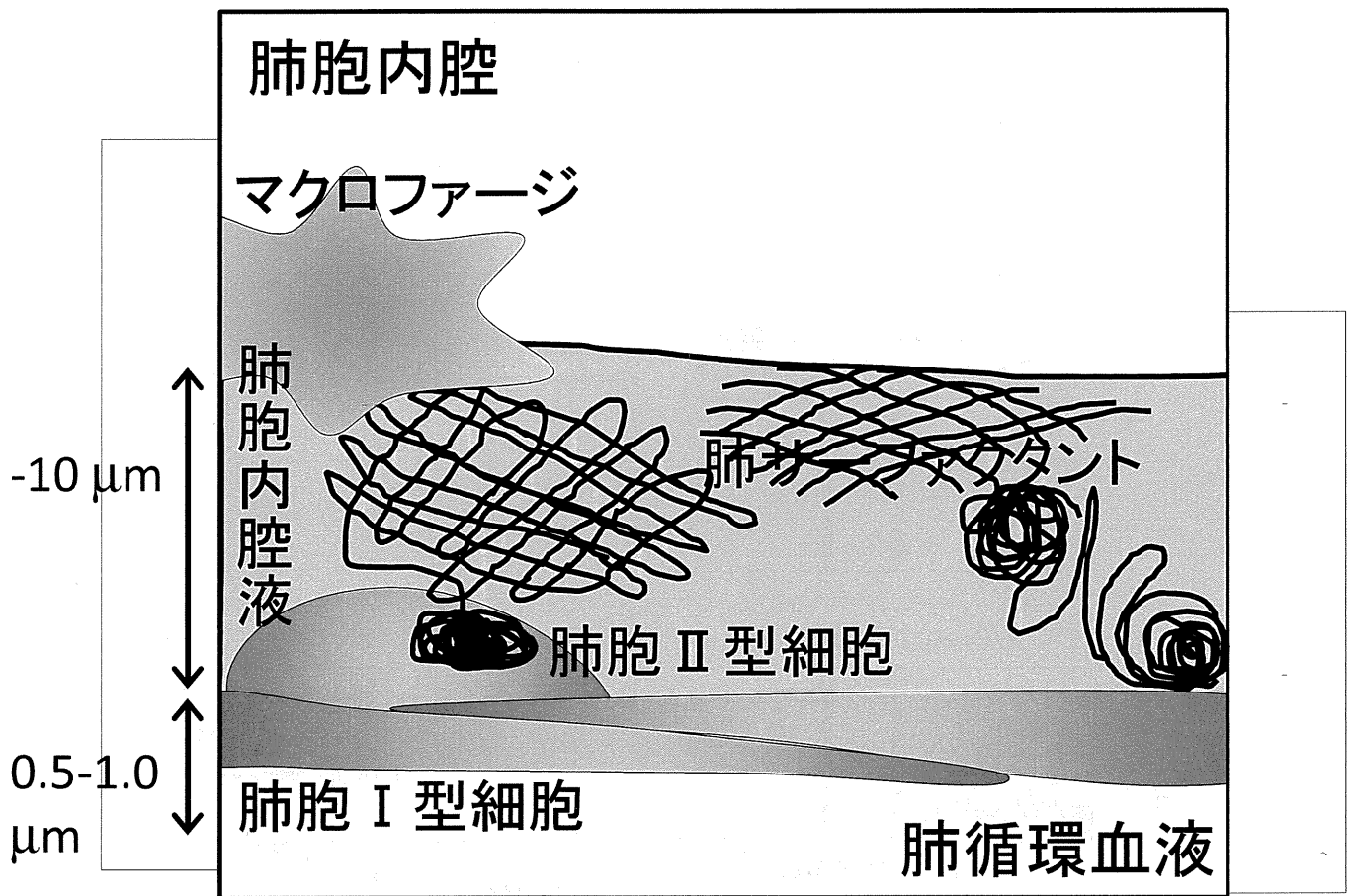


図3. In vivo肺胞内環境と改善肺胞上皮モデル

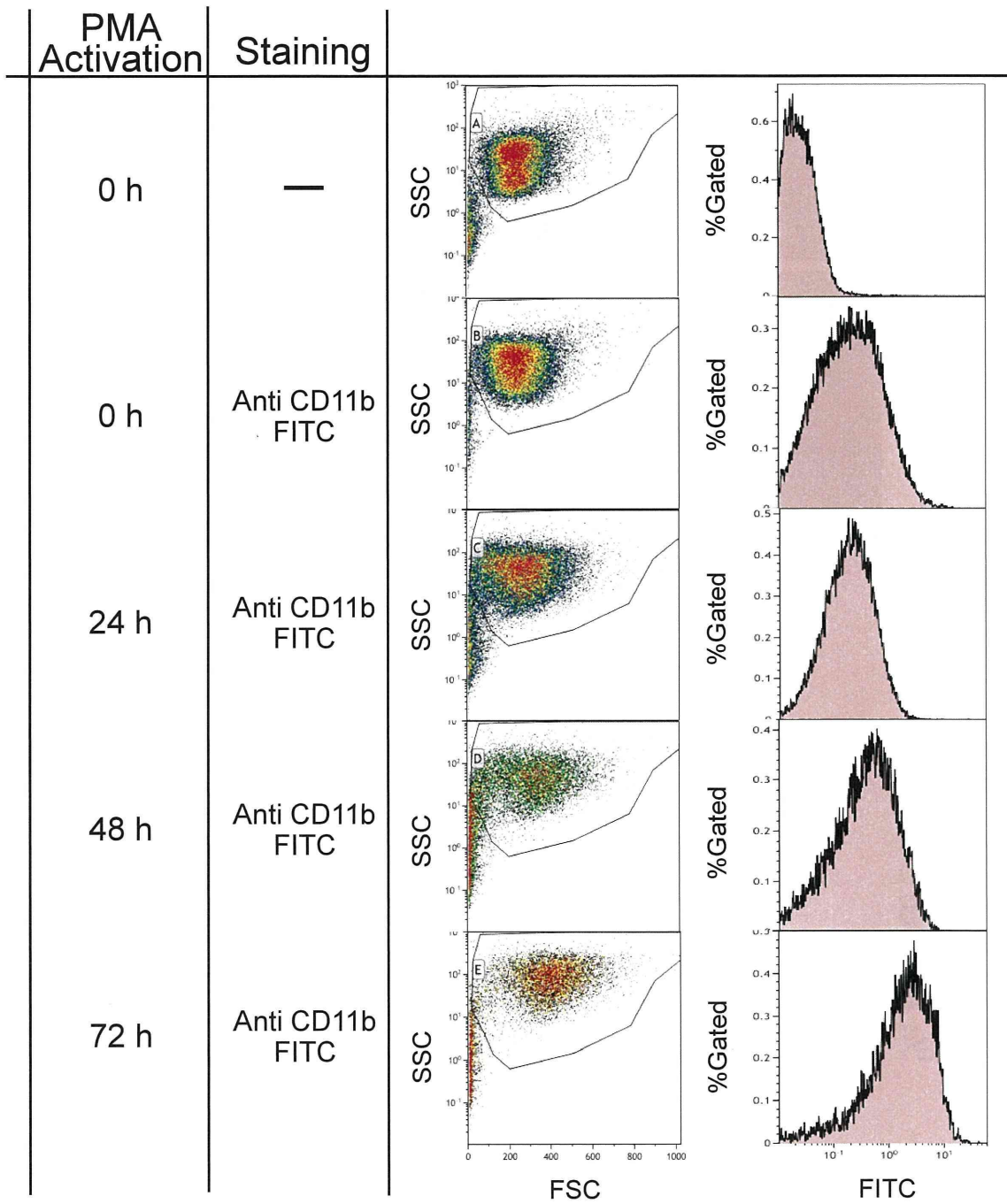


図4. THP-1細胞のPMA処理によるマクロファージ様分化—CD11b陽性細胞の増加

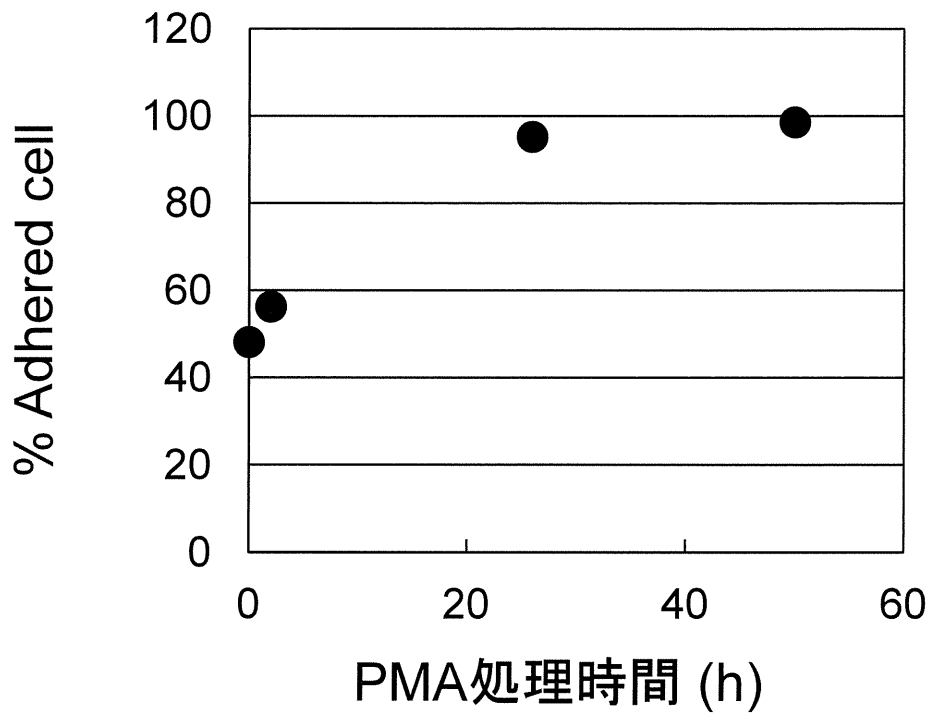
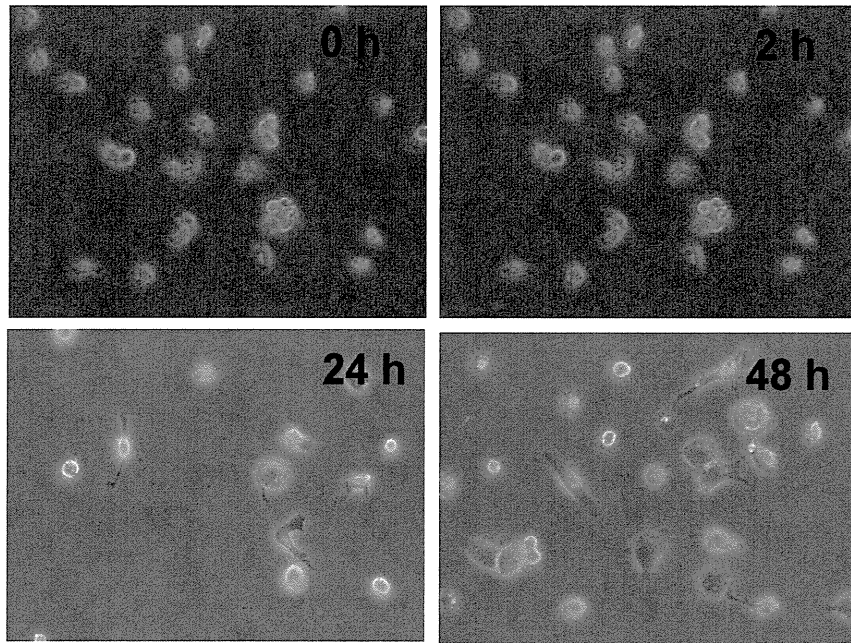


図5. THP-1細胞のPMA処理によるマクロファージ様分化—ディッシュへの付着

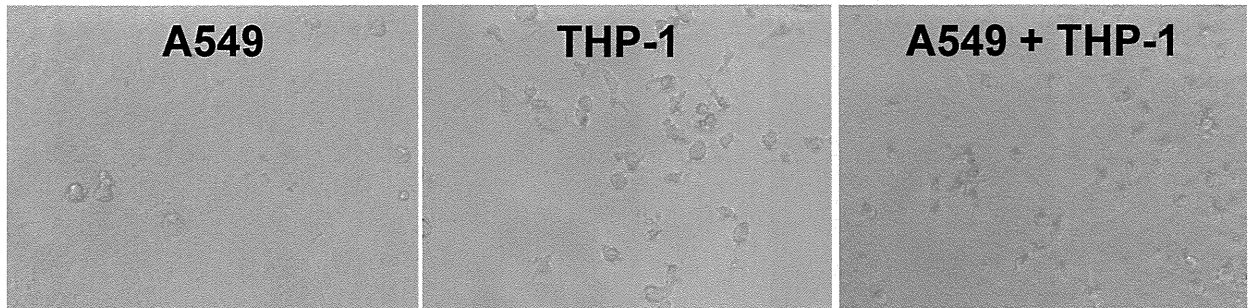


図6. A549とマクロファージ様分化誘導THP-1の共培養

サーファクテン
(田辺製薬製・肺サー
ファクタント吸入剤)



10%サーファクテンを含む培養液
(FBS含有DMEM)

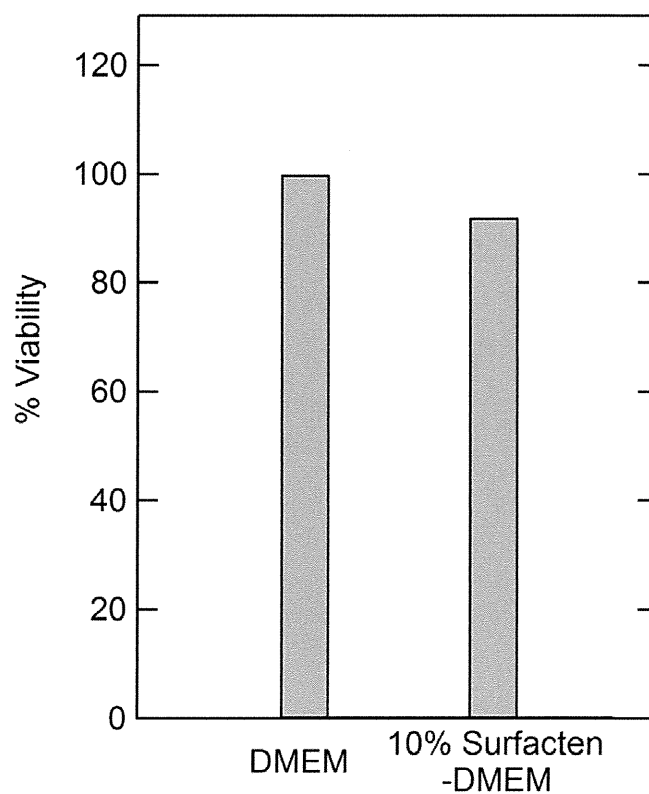
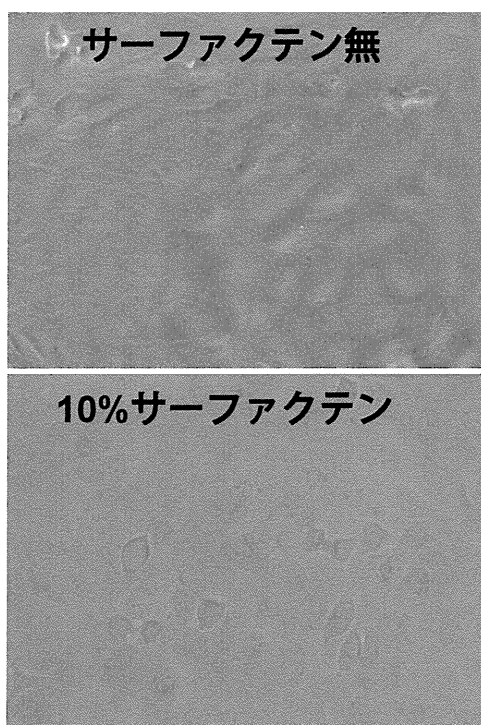
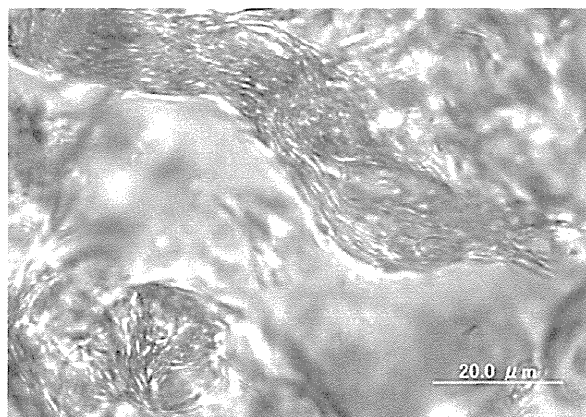


図7. サーファクテン10%含有培養液の位相差顕微鏡写真と
24時間後のA549の生存率

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

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

研究要旨: フタル酸ジエステル類のヒト皮膚透過性について調べ、昨年度報告したヘアレスラット皮膚を介した透過性と比較した。フタル酸ジエステル類を適用後のジエステル体およびその代謝物であるフタル酸モノエステルの皮膚透過物および皮膚中検出物はヒト皮膚とヘアレスラット皮膚で同じであったが、フタル酸モノエステルの代謝物量や主代謝物はヘアレスラット皮膚とヒト皮膚では異なる結果となった。また、代謝実験より得られた酵素パラメータもヘアレスラット皮膚とヒト皮膚で大きく異なる結果を示したことから、ヘアレスラット摘出皮膚を用いた代謝物の皮膚透過および皮膚中濃度評価は注意が必要であることが分かった。しかしながら、代謝物の皮膚透過は、Fick の拡散則にミカエリスメンテン式を組み込むことで予測可能であることから、ヘアレスラットを用いて得られた皮膚透過パラメータとヒト皮膚ホモジネートもしくはヒト皮膚酵素活性を模倣した酵素カクテルを用いて得られた代謝パラメータの利用を組み合わせることで、フタル酸ジエステル類の安全性評価が可能であると考えられた。

A. 研究目的

前年度までの研究成果より、フタル酸ジエステルは皮内でカルボキシエステラーゼにより代謝され、モノエステル体として皮膚透過することを報告している。したがって、フタル酸エステル類の経皮暴露後の安全性を評価するには、モノエステル体の皮膚透過性や皮膚中濃度の評価が重要となる。

皮膚中のカルボキシエステラーゼ活性はラットやマウスなどのげっ歯類とヒトでは異なると報告されていることから、ヒト皮膚暴露後のフタル酸ジエステルお

よびそのモノエステルの皮膚透過を評価することは大変重要である。そこで、本年度は、フタル酸ジエステルであるフタル酸ジブチル、フタル酸ジエチルヘキシルおよびフタル酸ベンジルブチルを皮膚暴露し、フタル酸ジエステルおよびその代謝物の皮膚透過性および代謝酵素パラメータについて調べ、ヘアレスラット皮膚を用いて得られた値と比較した。

B. 方法

B.1. 化学物質の分類定義

化学物質を皮膚透過性の観点より Type