

A～Cの3種類に分類し (Fig. 1)、安全性評価の基準とした。化学物質の皮膚透過の最大のバリアーとなる角層は、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。化学物質の皮膚透過係数が約 1×10^{-9} cm/sよりも著しく低い場合をtype Aと分類し、皮膚 (角層) を介して体内へ流入しない化学物質であるとし、経皮暴露しても安全であると考えた。化学物質の皮膚透過係数が約 1×10^{-9} cm/sと同程度である場合はtype Bに分類し、皮膚中に浸透した化学物質の皮膚刺激性評価が必須であると考えた。化学物質の皮膚透過係数が約 1×10^{-9} cm/sよりも著しく高い場合はtype Cに分類し、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性の評価が必須であると考えた。化学物質の皮膚透過係数より分類した化学物質の安全性評価基準をTable 1に示す。

B.2 化学物質の皮膚透過係数の算出

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。

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

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。

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

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、式(3)より透過性数 P (cm/s) は算出される。

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

皮膚透過性試験を行いレシーバー溶液中に適用化学物質が検出されなかった場合は、式(4)より下限量限界値の皮膚透過係数を算出することができる。ここで、 $P_{upper\ limit}$ (P_{ul}) は化学物質の下限量限界値から求めた $Flux_{upper\ limit}$ ($Flux_{ul}$) を適用濃度 (C_v) で除した値と定義する。

$$P_{ul} = Flux_{ul} / C_v \quad (4)$$

また、適用化学物質が皮膚中で代謝され、レシーバー溶液中に代謝生成物を検出した場合は、式(5)より代謝生成物の皮膚透過係数を定義する。ここで、 $P_{metabolite}$ (P_m) は適用化学物質の皮膚透過過程で生成した代謝生成物の皮膚透過速度 ($Flux_{代謝生成物}$) を適用化学物質濃度 ($C_{適用化学物質}$) で除した値とした。

$$P_m = \frac{Flux_{代謝生成物}}{C_{適用化学物質}} \quad (5)$$

B.3 試薬および実験材料

フタル酸ジブチル (di-BP)、フタル酸ベンジルブチル (BnBP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (di-*i*-OP)、フタル酸モノブチル (BP)、フタル酸モノベンジル (BnP)、フタル酸モノ-2-エチルヘキシル (*i*-OP)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、フルオロリン酸ジイソプロピル (DFP) は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級品または液体クロマトグラフ (HPLC) 用を使用した。これらの試薬および溶媒は精製せずにそのまま用いた。

Table 2 に本研究で選択したフタル酸エステル類の分子量と $\text{Clog}P$ を示す。なお $\text{Clog}P$ は Chem Draw Ultra 12.2[®] (Perkingelmer informatics, Cambridge, U.S.A.) を用いて算出した。

B.4 ヒト皮膚について

ヒト皮膚 (白人女性、51 歳、腹部由来、厚み 490 μm または白人女性、55 歳、腹部由来、厚み 503 μm) は、摘出後冷凍処理されたものを株式会社ケー・エー・シー (京都、日本) より株式会社ケー・エー・シーのヒト組織由来製品の倫理・安全性委員会の許可を受けた皮膚を購入した。

B.5 ヒト皮膚透過性試験

ヒト凍結皮膚は 32°C の恒温槽で 2 時間かけて解凍した (Full-thickness skin)。また損傷皮膚を想定した stripped skin では解凍後の皮膚をセロテープ[®] (ニチバン株式会社、東京、日本) 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 回行なった。その後 Fig. 2 に示す

side-by-side 型拡散セルに full-thickness skin または stripped skin を装着し表皮側および真皮側に pH7.4 リン酸緩衝液 (PBS) または 10% DMSO-PBS 溶液をそれぞれ適用し、皮膚の水和処理を 12 時間行った。処理後、表皮側に各種濃度に調製したフタル酸エステル水溶液を、真皮側に PBS または 10% DMSO-PBS 溶液を新たに適用し、皮膚透過性試験を行った。真皮側の溶液を経時的にサンプリングし、得られたサンプルは氷冷下で保存した。

B.6 各化学物質の皮膚中濃度測定

皮膚透過性試験後のヒト摘出皮膚は、表面に付着している適用化学物質を洗い流すため PBS または 10% DMSO-PBS 溶液 1 mL で 3 回洗った。その後皮膚をハサミを用いてミンスし、PBS または 10% DMSO-PBS 溶液を加え電動ホモジナイザー (Polytron PT-MR 3000[®], Kinematica, Lucerne, Switzerland) を用いて氷冷下でホモジナイズし、皮膚ホモジネートを調製した。得られた皮膚ホモジネートと 16% トリクロロ酢酸含有 PBS または 10% DMSO-PBS 溶液を等量混合・攪拌し、遠心分離 (18,800 $\times g$, 5 min, 4°C) した。得られた上清中に含まれる化学物質濃度を測定した。

B.7 皮膚ホモジネートを用いた代謝実験

解凍したヒト摘出皮膚を氷冷下でハサミを用いてミンスした後、PBS または 10% DMSO-PBS 溶液を加え電動ホモジナイザーを用いて 10% 皮膚ホモジネートを調製した。皮膚ホモジネートを遠心分

離 (9,000 ×g, 20 min, 4°C) し、得られた上清を酵素溶液とし、皮膚酵素溶液の最終濃度がそれぞれ 0.25%、0.75%となるように、種々濃度に調製した。その後、各種フタル酸エステル溶液と混合し、37°C でインキュベートしながら経時的にサンプリングを行った。得られたサンプルは、氷冷下で保存した。代謝物生成速度を評価するため、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代謝酵素パラメータ (K_m , V_{max}) を算出した。Hanes-Woolf plot は (6) 式で示され、 C は種々濃度に調製し適用した各種フタル酸ジエステル濃度、 V は代謝速度、 K_m はミカエリス係数 V_{max} は酵素の最大速度を示す。また、ホモジネート中の全タンパク質量は、Lowry 法に基づき測定した。

$$\frac{C}{V} = \left(\frac{1}{V_{max}} \right) C + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (6)$$

B.8 各化学物質の定量方法

得られたサンプルは、2% トリクロロ酢酸と内部標準物質を含有させたアセトニトリルと同量混合・攪拌後、遠心分離 (18,800 ×g, 5 min, 4°C) した。得られた上清中のフタル酸エステル類濃度を HPLC を用いて測定した。HPLC 装置を Table 3 に、di-BP、BnBP、di-*i*-OP の定量条件を Tables 4~6 にそれぞれ示した。

C. 3. 結果

C.1 フタル酸ジブチル (di-BP) の皮膚透過性・皮膚中濃度

Figure 3 に di-BP をヒト皮膚

(full-thickness, stripped) に暴露させた後の di-BP およびその代謝物の皮膚透過挙動を示す。di-BP をヒト皮膚に暴露しても、角層の有無にかかわらず、di-BP の皮膚透過性は見られず、di-BP のモノエステル体である BP の透過が確認できた。Table 7 に透過実験より算出した皮膚透過係数を示す。di-BP 透過係数 (P_{dl}) は、 1×10^{-9} cm/s 以下となり、BP の透過係数 (P_m) は、 1×10^{-9} cm/s 以上となった。この結果は、ヘアレスラット皮膚を介した透過と同様の結果であった。Figure 4 に皮膚透過試験後の di-BP およびその代謝物の皮膚中濃度を示す。角層の有無に関わらず、di-BP は検出されなかったが、BP は検出された。この結果もヘアレスラット皮膚を用いた結果と一致した。

C.2 フタル酸ベンジルブチル (BnBP) の皮膚透過性・皮膚中濃度

Figure 5 に BnBP をヒト皮膚 (full-thickness, stripped) に暴露させた後の BnBP およびその代謝物の皮膚透過挙動を示す。BnBP をヒト皮膚に適用しても、角層の有無にかかわらず、BnBP の皮膚透過は認められなかったが、BnBP の代謝物であるモノエステル体の BP および BnP の透過が見られた。Table 8 に透過実験より算出した皮膚透過係数を示す。BnBP の角層を介した P_{dl} は 1×10^{-9} cm/s 以下であり、BP および BnP の P_m は、 1×10^{-9} cm/s 以上となった。また、BP および BnP の P_m を比較すると、BnP の方が BP よりも約 10 倍以上高い値を示した。Figure 6 に

BnBP 暴露後の BnBP およびその代謝物の皮膚中濃度を示す。BnBP は角層の有無にかかわらず検出されなかったが、BP および BnP は皮膚中に検出された。BnP と BP の皮膚中濃度を比較すると、 P_m の大小と同様に BnP の方が BP よりも高い濃度検出されたが、その差は P_m 値の差と比較して小さかった。ヒト皮膚では、BnP の方が BP よりも皮膚透過性および皮膚中濃度がともに高い値を示したが、ヘアレスラット皮膚を用いた場合には、BP の方が BnP よりも皮膚透過および皮膚中濃度がともに高い値を示した。

C.3 フタル酸ジエチルヘキシル (di-i-OP) の皮膚透過性・皮膚中濃度

Figure 7 に di-i-OP をヒト皮膚 (full-thickness, stripped) に暴露後の di-i-OP およびその代謝物の皮膚透過挙動を示す。di-i-OP をヒト皮膚に適用した場合は、ジエステル体である di-i-OP も、モノエステル体である i-OP も透過は認められなかった。この結果は、ヘアレスラット皮膚を用いた皮膚透過試験の結果と一致した。Table 9 に透過実験より算出した皮膚透過係数を示す。di-i-OP および i-OP の P_{ul} はともに 1×10^{-9} cm/s 以下であった。Figure 8 に di-i-OP 適用後の i-OP およびその代謝物の皮膚中濃度を調べた結果を示す。皮膚透過の認められなかった di-i-OP および i-OP はともに皮膚中に検出されなかった。この結果も、ヘアレスラット皮膚を用いた皮膚中濃度評価試験の結果と一致した。

C.4 フタル酸エステル類の皮膚代謝実験

Table 10 にフタル酸エステル類の皮膚ホモジネート中の代謝パラメータを示す。di-BP は BP へ、BnBP は BnP および BP へ皮膚中で代謝された。生成したフタル酸モノエステル体は皮膚中で代謝されず、モノエステル体が最終生成物であった。この結果は、di-BP もしくは BnBP を皮膚に適用後の皮膚透過物質と一致した。また、皮膚透過物が認められなかった、di-i-OP は皮膚ホモジネート中でも代謝されないことが分かった。これらの結果は、ヘアレスラット皮膚ホモジネートを用いた代謝試験結果と一致した。

D. 考察

フタル酸ジエステル体の di-BP をヒト摘出皮膚に暴露させると、di-BP の皮膚透過は認められなかったものの、フタル酸モノエステルである BP が代謝物として皮膚を透過した。また、透過実験終了後に di-BP および BP の皮膚中濃度を調べた結果、BP のみが検出され、適用した di-BP は皮膚中に検出されなかった。この結果は、di-BP をヘアレスラット皮膚に暴露させた結果と同様であった。しかしながら、皮膚ホモジネートを用いた代謝酵素パラメータの結果は、ヒト皮膚とヘアレスラット皮膚では異なり、ヘアレスラット皮膚を用いて得られた di-OP→BP の代謝酵素パラメータ K_m 値および V_{max} 値は、それぞれ $18.2 \mu\text{M}$ および $2.9 \times 10^{-1} \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein であり、それぞれのパラメータ値は、ヘアレスラット皮膚を用いた方がヒ

ト皮膚を用いた場合より高値を示した。ヒト皮膚とヘアレスラット皮膚の代謝酵素パラメータの違いは、BnBPを用いた場合でも確認された。BnBPを皮膚暴露させた場合には、BnPおよびBPの2種類の代謝生成物および皮膚中濃度が確認され、BnPの方がBPよりも透過量・皮膚中濃度ともに高値であった。しかしながら、ヘアレスラット摘出皮膚を用いた場合では、ヒト皮膚を用いた結果と異なり、代謝物の透過量はBP>BnPであった。ヘアレスラットを用いて得られたBnBP→BPの代謝酵素パラメータ K_m 値および V_{max} 値は、それぞれ14.8 μM および $1.3 \times 10^{-1} \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、BnBP→BnPの K_m 値および V_{max} 値は、それぞれ18.7 μM および $5.2 \times 10^{-2} \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$ であり、ヒト皮膚を用いて得られた結果と大きく異なる結果となった。

一方、di-*i*-OPは皮膚透過が認められないだけでなく、皮膚中にも検出されなかった。さらにdi-*i*-OPの代謝生成物と考えられるモノエステル体*i*-OPも検出されなかった。この要因として、di-*i*-OPの脂溶性が非常に高い(Clog*P*: 8.71)ため、皮膚への分配が著しく低くなるためと考えられた。また、モノエステル体の皮膚透過性もみられなかったが、これはdi-*i*-OPが皮膚中に発現するエステラーゼでは代謝されないためであると考えられた。

ヒト皮膚とヘアレスラット皮膚のエステラーゼ活性の結果を鑑みると、ヘアレスラット皮膚を用いた実験から、代謝物のヒト皮膚透過性もしくは皮膚中濃度の

算出を行うことは難しいと考えられた。しかしながら、物質の皮膚透過は式(7)に示すFickの拡散則に従うことが知られており、この式にミカエリスメンテン式を組み込むと(式(8))、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。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (7)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - R(C) \quad (8)$$

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、ヘアレスラットから得られた皮膚透過パラメータ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を組み合わせれば、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活性を模倣する酵素カクテル等の利用も有用な方法である。ヒト摘出皮膚を使用した実験は、動物摘出皮膚を用いた試験とは異なり、性別、年齢、および使用部位を常に同じ状態で実施することが困難である。したがって、ヒト皮膚中のエステラーゼ活性を模倣する酵素カクテルの調製が可能となれば、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と考えられる。

最後に、本研究から得られた皮膚透過性と、皮膚中濃度の結果をもとに、フタル酸エステル類の皮膚暴露の観点から分

類を行うと、皮膚透過性が落屑速度より低く、皮膚中でも検出されなかった di-BP、BnBP、di-*i*-OP、は Type A と分類された。しかしながら、di-BP、BnBP は皮膚中で代謝されそのモノエステル体の皮膚透過・皮膚中濃度が検出されたため、Type A と分類された物質でも、代謝生成物の有無の確認を行うことが重要であり、安全性を判断するには、代謝物考慮する必要がある。

E. 結論

フタル酸エステル類の安全性評価分類を行うためには、透過性だけでなく、エステラーゼによる代謝を考える必要があることが分かった。ヒト皮膚は入手方法が限られており、多くのサンプルを評価するには向いていない。そのため、酵素カクテルなどの利用により得られた代謝パラメータを Fick の拡散則に組み込む方法による評価方法の確立が、フタル酸エステル類だけでなく、様々な化学物質の安全性を評価するためには有用な方法となるであろう。

F. 研究発表

F.1 論文発表

なし

F.2 学会発表

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

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（仮）、日本薬学会第 132 年会、北海道

G. 知的所有権の取得状況

G.1 特許取得

なし

G.2 実用新案登録

なし

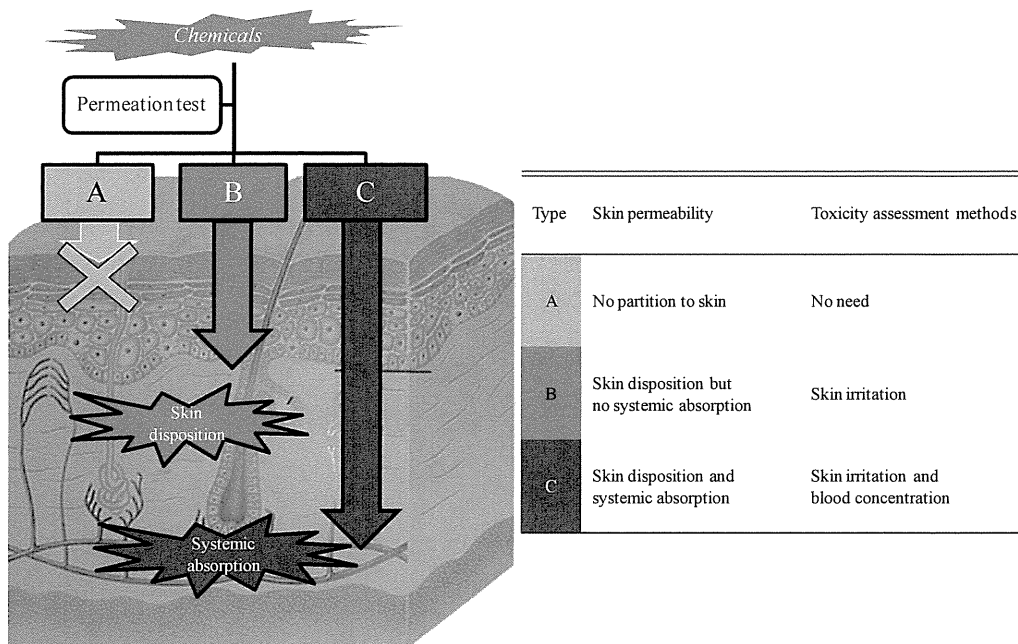


Fig. 1 Classification of chemicals according to skin permeability and toxicity assessment methods.

Table 1 Classification of chemicals according to skin permeability coefficient, skin concentration and blood concentration.

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

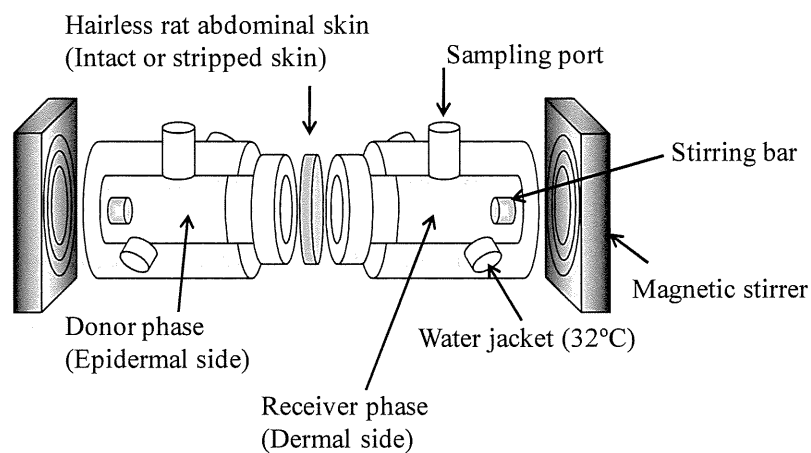


Fig. 2 Set-up of side-by-side diffusion cell for skin permeation experiment

Table 2 Chemical and physical properties of model compounds used in this study.

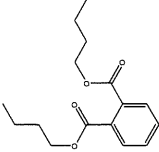
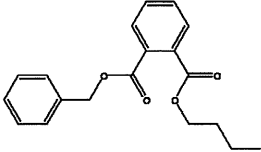
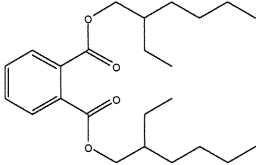
CAS No.	一般名 (略語)	構造式	分子式 (分子量)	Clog <i>P</i>
84-74-2	Dibutyl phthalate (di-BP)		C ₁₆ H ₂₂ O ₄ (278.3)	4.73
85-68-7	Benzyl butyl phthalate (BnBP)		C ₁₉ H ₂₀ O ₄ (312.4)	4.97
117-81-7	Di (2-ethylhexyl) phthalate (di- <i>i</i> -OP)		C ₂₄ H ₃₈ O ₄ (390.6)	8.71

Table 3 HPLC system

System controller	CBM-20A	(Shimadzu, Kyoto, Japan)
Pump	LC-20AD	(Shimadzu, Kyoto, Japan)
Auto injector	SIL-20AC	(Shimadzu, Kyoto, Japan)
Column oven	CTO-20AC	(Shimadzu, Kyoto, Japan)
UV detector	SPD-20AC	(Shimadzu, Kyoto, Japan)
Analysis soft	LC solution	(Shimadzu, Kyoto, Japan)

Table 4 HPLC conditions for determination of di-BP

Column	Cadenza CD-C18, 75×4.6 mm
Retention time	BP : 1.6 min, di-BP : 6.3 min
Wave length	254 nm
Mobile phase	0.5% Phosphoric acid : Acetonitrile = 6.5 : 3.5
Internal standard	Hexyl 4-hydroxybenzoate (t_R : 3.3 min)
Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	40°C

Table 5 HPLC conditions for determination of BnBP

Column	Cadenza CD-C18, 75×4.6 mm
Retention time	BP : 9.0 min, BnP : 11 min, BnBP : 18 min
Wave length	280 nm
Mobile phase	0.5% Phosphoric acid : Acetonitrile = 6.75 : 3.25 (0 - 9 min)→ 8 : 2 (9 - 13 min)→ 8 : 2 (13 - 20 min)→ 6.75 : 3.25 (20 - 23 min)
Internal standard	Ethyl 4-hydroxybenzoate (t_R : 4.5 min)
Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	40°C

Table 6 HPLC conditions for determination of di-*i*-OP

Column	Cadenza CD-C18, 75×4.6 mm
Retention time	<i>i</i> -OP : 3.0 min, di- <i>i</i> -OP : 12 min
Wave length	280 nm
Mobile phase	0.5% Phosphoric acid : Acetonitrile = 3 : 7 (0 - 4 min) → 0 : 10 (4 - 8 min) → 3 : 7 (8 - 12 min) → 3 : 7 (12 - 15 min)
Internal standard	Nonyl 4-hydroxybenzoate (t_R : 5.9 min)
Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	40°C

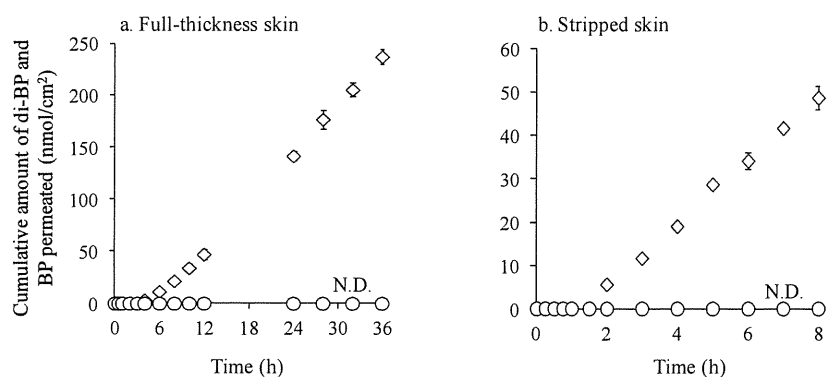


Fig. 3 Skin permeation profile of di-BP and its metabolite (BP) through human full-thickness skin (a) and stripped skin (b). Symbols: ○; di-BP and ◇; BP. Each point represents the mean ± S.D.. N.D. means not detect.

Table 7 Skin permeability coefficients of di-BP and BP through human full-thickness or stripped skin after application of di-BP.

Application	Chemicals	Full-thickness	Stripped
chemicals	permeated	skin (cm/s)	skin (cm/s)
di-BP	di-BP	$P_{ul} < 2.6 \times 10^{-10}$	$P_{ul} < 5.1 \times 10^{-10}$
	BP	$P_m: 8.6 \times 10^{-6}$	$P_m: 7.2 \times 10^{-6}$

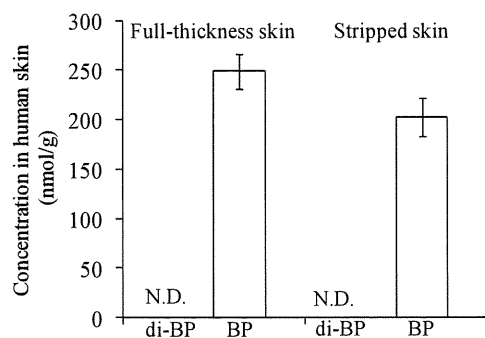


Fig. 4 Concentration of di-BP and its metabolite (BP) in human skin after application of di-BP. Each column represents the mean \pm S.D..

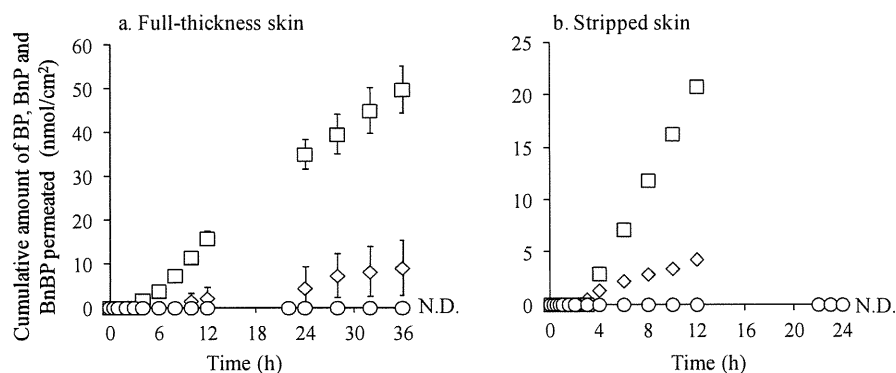


Fig. 5 Skin permeation profile of BnBP and its metabolites through A) excised hairless rat skin or B) excised human skin. Symbols: \circ ; BnBP, \square ; BnP, \diamond ; BP. Open symbols were for non-DFP pretreatment and closed symbols were for DFP pretreatment. Each point represents the mean \pm S.D..

Table 8 Skin permeability coefficients of BnBP and its metabolite through human skin after application of BnBP

	Application chemicals	Chemicals permeated	Full-thickness skin (cm/s)	Stripped skin (cm/s)
Human skin	BnBP	BnBP	$P_{ul} < 4.6 \times 10^{-11}$	$P_{ul} < 1.8 \times 10^{-9}$
		BnP	$P_m: 1.1 \times 10^{-6}$	$P_m: 1.5 \times 10^{-6}$
		BP	$P_m: 2.7 \times 10^{-7}$	$P_m: 2.5 \times 10^{-7}$

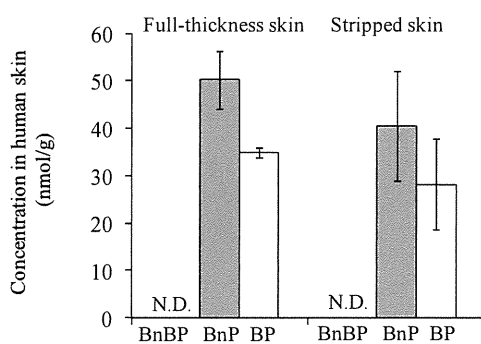


Fig. 6 Skin concentration of BnBP and its metabolites in excised human skin .

Each column represents the mean \pm S.D..

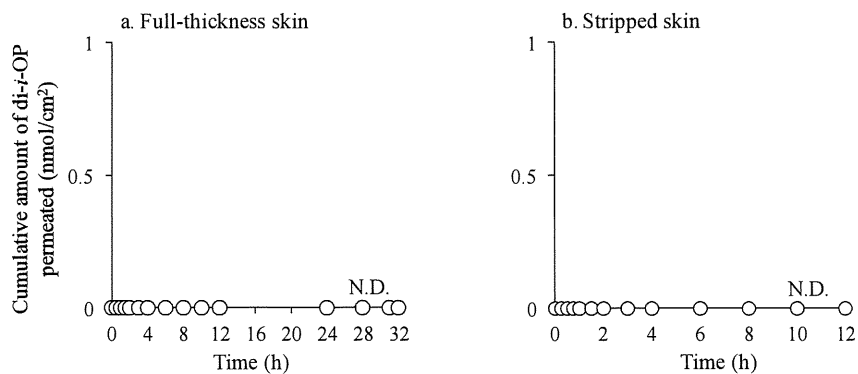


Fig. 7 Skin permeation profile of di-*i*-OP through full-thickness or stripped skin.

Table 9 Skin permeability coefficients of di-*i*-OP after application of di-*i*-OP.

	Application chemicals	Chemicals permeated	Full-thickness skin (cm/s)	Stripped skin (cm/s)
Human skin	di- <i>i</i> -OP	di- <i>i</i> -OP	$P_{ul} < 1.1 \times 10^{-10}$	$P_{ul} < 1.4 \times 10^{-10}$
		<i>i</i> -OP		

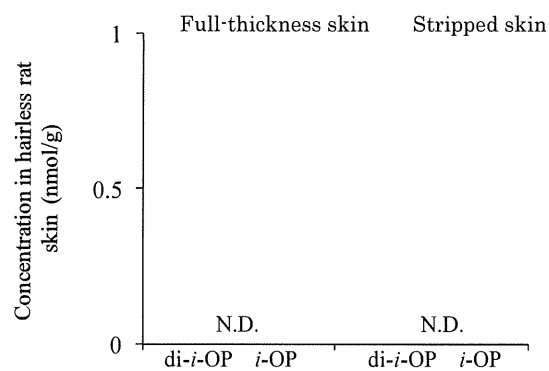


Fig. 8 Concentration of di-*i*-OP and its metabolite(*i*-OP) in full-thickness or stripped skin.

Table 10 Enzymatic parameters of K_m and V_{max} for the metabolism of phthalate esters.

Substrates	Metabolites	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	V_{max}/K_m (min/mg protein)
di-BP	BP	13.2	4.1×10^{-2}	3.1×10^{-3}
BnBP	BP	165	2.6×10^{-3}	1.6×10^{-5}
	BnP	58.5	4.7×10^{-2}	8.0×10^{-4}
di- <i>i</i> -OP	<i>i</i> -OP		N.D.	

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
研究協力者 高原有香 岡山大学薬学部
研究協力者 鬼無 悠 岡山大学薬学部
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

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)のリコンビナントヒトカルボキシエステラーゼ (CES: CES1, CES2, CES3) による加水分解反応の速度論的解析を行った。その結果、DBP 及び BBP のブチルエステル基の加水分解反応に CES1 及び CES2 が関与していることが示唆された。一方、CES3 は、DBP 及び BBP の加水分解反応にも関与しなかった。また、BBP の加水分解反応は、モノベンジルフタレート (MBzP) へ優先的に進行した。DEHP の加水分解反応は、本研究の条件下ではいずれの CES 分子種でも進行しなかった。これらの結果より、CES1 及び CES2 は、DBP 及び BB の加水分解反応を触媒し、これら CES 分子種がフタル酸エステル類の毒性発現に何らかの形で関与している可能性が示唆された。

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) は親化合物と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。本研究において、平成 22 年度では DBP、BBP 及び DEHP のヒト肝ミクロゾームにより加水分解反応を受け、その反応の進行性はフ

タル酸エステル類でおおきく異なることを明らかにした。本年度は、DBP、BBP 及び DEHP がカルボキシエステラーゼ (CES) により加水分解反応を受けるか、またどの CES 分子種がどの程度それらの代謝反応に参与しているかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

B.1 実験材料

実験に用いた試薬などの入手先は以下に示す。

DEHP、DBP、BBP、MEHP、MBP、MBzP、フタル酸 PA、*p*-nitrophenyl acetate (PNPA) 及び Agarose S (和光純薬工業)；正常ヒト肝臓由来 mRNA：Biochain Institute；HEK293 細胞：理研バイオリソースセンター；Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、Fetal bovine serum (FBS)、NaHCO₃ 及び Opti-MEM：Gibco；RNeasy mini Kit 及び QIA shredder：Qiagen；Access RT-PCR System 及びマウス抗 V5-HRP 抗体：Promega；Gene Amp PCR-DYDTEM 2700A：Applied Biosystems；SuperScript III First-Strand Synthesis for RT-PCR 及び Lipofectamine LTX：Invitrogen。その他試薬は分析用、特級及び HPLC 用試薬を用いた。

B.2 CES1、CES2 及び CES3 発現プラスミド作製

正常ヒト肝臓由来の mRNA から SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR を用いた逆転写反応により一本鎖 cDNA を合成した。CES1、CES2 及

び CES3 cDNA は一本鎖ヒト肝臓 cDNA 15 ng (CES1)、あるいは 30 ng (CES2 及び CES3)を鋳型にして、表 1 に示すセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 溶液は、一本鎖 DNA (30 ng)、Platinum Pfx DNA polymerase、1mM MgSO₄、0.3 mM dNTPs 及び 0.4 μM プライマーセット (センス及びアンチセンスプライマー)を加え、全量を 50 μL とした。PCR は、94°C で 120 秒間加熱後、94°C で 15 秒間 (変性)、64°C で 30 秒間 (アニーリング) 及び 68°C で 120 秒間 (伸長反応) を 25 サイクル行った。その後、ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit v2.0 及び DNA Analyzer ABI Prism 3700 を用いて両鎖の塩基配列を決定した。それぞれの CES 酵素の C 末端に V5 エピトープタグ配列を付加したプラスミドを作製するために、終止コドン除去したプライマーを用いて PCR により増幅し、同様に PCR 産物を pENTR/d-TOPO ベクターにクローニングした。これにより抗 V5 エピトープ抗体を用いたウェスタンブロット分析でこれら酵素の発現を容易に確認が可能となる。pENTR ベクターから哺乳動物細胞発現用の pcDNA-DEST40 ベクターへのサブクローニングは、Gateway LR 反応 (attL 部位と attR 部位との間の組換え反応) を利用して行った。

B.3 リコンビナント CES 酵素の作製

CES1、CES2 及び CES3 プラスミドの

構築及び HEK293 細胞へのトランスフェクションの概略を図 1 に示す。10 cm プレートを用いて HEK293 細胞を 10% FBS 含有 DMEM 中に 3.0×10^6 cell となるように継代し、細胞がプレートの約 70% になるまで培養した。培地を除去後、滅菌 PBS で洗浄し、DMEM を 15 mL 加えた。その後、pcDNA-DEST40/CES1、pcDNA-DEST40/CES2、pcDNA-DEST40/CES3 (24 μ g) をそれぞれ PLUS Reagent (15 μ L) 及び Lipofect amine LTX (60 μ L) を全量 1.5mL になるように Opti-MEM I Reduced-Serum Medium で希釈し、この DNA-Lipofect amine 複合体を加えてトランスフェクションした。24 時間培養した後、細胞を回収し懸濁液で懸濁させた。ネガティブコントロール (mock) にはベクターをトランスフェクションしていない HEK293 細胞を作製した。その後、常法に従い S9 画分を調製しタンパク質量を測定した。

B.4 ウェスタンブロット分析

リコンビナント CES 酵素を Laemmli の方法 (1) 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 (2) 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。一次抗体としてマウス抗 V5-HRP 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マウス

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.5 PNPA 加水分解活性測定

PNPA 加水分解活性は、PNPA を除く下記の反応溶液を 37°C で 2 分間プレインキュベーションした後、PNPA の添加により反応を開始した。37°C で 0、5、10、15、20 及び 30 分間反応した後、PNPA から PNP への加水分解反応を 405 nm の吸光度を測定することで定量した。

	Final concentration
HEPES buffer (pH 7.4)	50 mM
PNPA	100 μ M
Enzyme	20 μ g protein
Total volume	500 μ L

B.6 フタル酸エステル類加水分解活性測定酵素源にリコンビナント CES 酵素を用いて

フタル酸エステル類加水分解活性は、酵素源にリコンビナント CES 酵素を用いて Danschutter ら及び Mazzeo らの方法に準じて測定した (3.4)。基質 (DBP、BBP あるいは DEHP) を除く下記の反応溶液を 37°C で 1 分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 分間遠心分離後、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。

(反応組成)

	Final concentration
Kpi buffer (pH 7.4)	50 mM
Substrate	1–5000 μM
Enzyme	20 μg protein
Total volume	500 μL

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.7 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 CES cDNA の発現プラスミド

ヒト肝 total RNA から CES1、CES2 及び CES3 の全長 cDNA をクローニングした。これらの C 末端には V5 エピトープ配列を挿入し、その領域以外の塩基配列は GenBank の CES1 (NM_001025195)、CES2 (NM_003869) 及び CES3 (NM_024922) と一致した。

C.2 CES 酵素の発現

本研究では HEK293 細胞を用いてヒトの CES1、CES2 及び CES3 酵素を過剰発現させた。CES 酵素の発現は S9 画分のウェスタンブロット分析により確認した。その結果を図 2 に示す。CES1、CES2 及び CES3 のいずれにおいても V5 エピトープ配列を認識したタンパク質バンドが検出された。また、CES 発現 HEK293 細胞 S9 画分を酵素源にして PNPA に対する加水分解活性を測定した。その結果、CES1、CES2 及び CES3 のいずれもコントロール細胞に比べ 2.1~6.2 倍高い活性を示した (図 3)。

C.3 リコンビナント CES 酵素によるフタル酸エステル類加水分解反応

リコンビナント CES1、CES2 及び CES3 を酵素源にしてフタル酸エステル類加水分解反応の速度論的解析を行った。酵素源として CES1 及び CES2 を用いた場合の DBP 及び BBP 加水分解反応の Michaelis-Menten プロット及び Eadie-Hofstee プロットを図 4 及び 5 に示した。しかし、DEHP を基質に用いた場合、いずれの CES 酵素を用いた場合においても代謝物である MEHP 及び PA に対応するピークは確認されず、また CES3 を酵素源とした場合においての、DBP 及び BBP 加水分解反応及び CES 酵素において BBP から MBzP への加水分解においても、mock と同程度の加水分解活性しか示さなかったため、本条件で速度論的解析を行うことは出来なかった。CES1 及び CES2 による DBP 加水分解及び BBP から MBzP への加水分解活性は典型的な Michaelis-Menten 型の挙動を示した。これらプロットから算出した速度論的パラメーター値を表 2 及び 3 に示す。

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 酵素の寄与が明らかになった。これらの加水分解反応において CES3 はいずれの基質濃度においても CES1 及び CES2 の 1/10 以下の加水分解活性値であり、関与はほとんど見られなかった。DBP から MBP への加水分解反応において 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。そのため低基質濃度 (2~20 μM) で

は CES2 の寄与が大きく、高基質濃度 (200 μM) になると CES1 と CES2 の寄与が同程度となった。一方、BBP から MBzP への加水分解においては、 K_m 値においては、DBP から MBP への加水分解反応と同様に CES2 が高くなったが、 V_{max} 値においても CES1 が CES2 に比べ 1.8 倍高いという結果となった。つまり、基質濃度が低い場合は CES2 の寄与が大きくなるが、CES2 の V_{max} 値と比べ CES1 の V_{max} 値が大きいため基質濃度が高くなると CES1 の寄与が大きくなるということが明らかにも 2 μM で同程度、それより基質濃度が高い 20 μM 及び 200 μM の場合は CES1 の寄与が大きくなっていることがわかる。BBP 加水分解により生じる二つの加水分解代謝物である MBzP 及び MBP に関して比較すると、BBP 基質濃度 20 μM 時において CES1 及び CES2 の MBzP に比べ MBP 加水分解活性はそれぞれ 11 及び 8.0 倍高かった。

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。さらにこのフタル酸エステル類が加水分解を受け生成するフタル酸モノエステル体もまた、生殖毒性が確認されており、フタル酸エステル類の生体内動態の解明は、安全性及び毒性評価法を検討する上で重要となる。そこで、本研究では、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