

び全身循環移行量を把握する必要がある。化学物質の皮膚局所濃度と暴露時間は皮膚刺激性と強く関係している。また、化学物質の皮膚中濃度はその皮膚透過性と強く関係するため、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。本研究では、フタル酸エステル類の皮膚透過性および皮膚中濃度を測定し、さらに、フタル酸エステル類の皮内代謝物の測定結果より、フタル酸エステル類の経皮暴露後の安全性について考察した。

B. 方法

B-1. 化学物質の分類定義

化学物質は皮膚透過性の観点より Type A~C の 3 種類に分類し、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皮膚の最外層に存在する角層は、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 $\mu\text{m}/\text{day}$ 、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 とし、皮膚（角層）を介して体内へ流入しない化学物質と考え、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 とし、化学物質による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 $1 \times$

10^{-9} cm/s よりも著しく高い場合は、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。

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/cm^2) は、式 (1) で示すことができる。

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

ここで、 D 、 K 、 C_v 、および L は皮膚バリアー中拡散係数 (cm^2/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 ($\text{mol}/\text{cm}^2/\text{s}$) 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) より透過係数 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

の下限定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 ($Flux_{\text{代謝生成物}}$) を適用化学物質濃度 ($C_{\text{適用化学物質}}$) で除した値とした。

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

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 1 に本研究で選択したフタル酸エステル類の CAS-No, 分子式、分子量、構造式および $ClogP$ を示す。なお $ClogP$ は Chem Draw Ultra

12.2[®] (Perkingelmer informatics, Cambridge, U.S.A.) を用いて算出した。

B-4. ヘアレスラットおよびヒト皮膚

WBN/ILA-Ht 系雄性ラット (体重 220-260 g) は城西大学生命科学研究センター (坂戸市、埼玉、日本) または石川実験動物 (深谷市、埼玉、日本) から購入した。なお、動物の飼育および実験は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に従った。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. ヘアレスラット腹部皮膚を用いた皮膚透過性試験

ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, *i.p.*) のヘアレスラットの腹部皮膚を剃毛後清拭し、ハサミを用いて摘出した。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 回行なった後、ハサミを用いて摘出した。摘出した皮膚は真皮側の脂肪を除去後、皮膚を *side-by-side* 型拡散セルに装着し、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、30 min 水和処理を行った。水和後、表皮側に各濃度に調製した各種フタル酸エステル溶液を適用し、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。また、適用したフタル酸エステル類が皮内で代謝された場合は、それらの皮膚透過係数を算出するため、エステラーゼ活性の阻害作用を持つ DFP をヘアレスラット皮膚の水和液に添加し、以下同様の操作を行った。

B-6. ヒト摘出皮膚を用いた皮膚透過性試験

ヒト凍結皮膚を 32°C の水浴で 2 時間解凍後、side-by-side 型拡散セルに full-thickness skin または stripped skin を装着し 12 時間水和した。水和後、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 溶液を適用し、皮膚透過性試験を行った。

B-7. 皮膚中濃度測定

皮膚透過性試験後のヘアレスラット腹部またはヒト摘出皮膚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 回洗い、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 (Polytron PT-MR 3000[®]、Kinematica、Lucerne、Switzerland) を用いて氷冷下でホモジ

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に 16% トリクロロ酢酸入り PBS または 10% DMSO-PBS 溶液を同量加え、15 min よく攪拌した後、遠心分離 (18,800 ×g、5 min、4°C) し、その上清を薬物濃度を求めるサンプルとした。

B-8. 皮膚ホモジネートを用いた代謝実験

ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg、i.p.) のヘアレスラットの腹部皮膚を剃毛後、清拭しハサミを用いて摘出した。次に得られたヘアレスラット腹部摘出皮膚および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。その後、皮膚ホモジネートを遠心分離 (9,000 ×g、20 min、4°C) した後、その上清を採取して酵素溶液とした。種々濃度に調製した各種フタル酸エステル溶液中へ、ヘアレスラットおよびヒト摘出皮膚の酵素溶液の最終濃度がそれぞれ 0.25%、0.75% となるように適用し、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。代謝物の生成速度を評価するため、Michaelis-Menten 式を変形した Hanes-Woolf plot 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 (4) 式で示され、C は種々濃度に調製し適用した各種ジエ

エステル体濃度、 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、ホモジネート中のタンパク質量は、Lowry 法を用いて測定した。

$$\frac{C}{V} = \left(\frac{1}{V_{max}} \right) C + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (4)$$

B-9. 各化学物質の定量

得られたサンプルは、酵素の失活の目的で 2% トリクロロ酢酸含有アセトニトリルに内部標準物質を含有させた溶液と等量混合後、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を HPLC にて定量した。HPLC 装置を Table 2 に、di-BP、BnBP、di-i-OP の定量条件を Tables 3~5 にそれぞれ示す。

C. 結果

C-1. ジブチルフタル酸の皮膚透過性・皮膚中濃度

Figure 1 にヒト皮膚に di-BP 適用後の di-BP およびその代謝物の累積透過量-時間プロファイルを示す。ヒト皮膚に di-BP を適用すると、full-thickness および stripped skin ともに di-BP の皮膚透過が認められなかったものの、di-BP の代謝物である BP の透過が認められた。この結果は、ヘアレスラット皮膚を用いた検討結果と一致している。di-BP をヒト皮膚に適用した時の full-thickness および stripped skin を介した透過係数は $1.0 \times 10^{-9} \text{cm/s}$ 以下となった。また、代謝物である BP の full-thickness および

stripped skin の透過係数は $1.0 \times 10^{-9} \text{cm/s}$ 以上となった。Figure 2 に di-BP 適用後の di-BP の皮膚中濃度およびその代謝物濃度を示す。皮膚透過が認められなかった di-BP は、皮膚中に検出されなかった。しかし、皮内で代謝され皮膚透過が認められた BP は皮膚中で検出された。なお、皮膚中濃度に関してもヘアレスラット皮膚の結果と一致している。

C-2. ベンジルブチルフタル酸の皮膚透過性・皮膚中濃度

Figure 3 にヘアレスラットおよびヒト皮膚に BnBP を適用した後の、BnBP およびその代謝物の累積透過量-時間プロファイルを示す。ヘアレスラットおよびヒト皮膚に BnBP を適用すると、full-thickness および stripped skin ともに BnBP の皮膚透過は認められず、皮膚中にて代謝を受け生成した BnP および BP の皮膚透過が認められた。また、エステラーゼ阻害剤である DFP を用いてヘアレスラット皮膚に処理を施すと、BnBP を適用した場合には、角層の有無に関わらず皮膚透過が認められなかった。Table 7 に BnBP およびその代謝物のヘアレスラットもしくはヒト抽出皮膚透過係数を示す。BnBP の full-thickness skin を介した皮膚透過係数は $1.0 \times 10^{-9} \text{cm/s}$ 以下となったが、stripped skin を介した場合は、 $1.0 \times 10^{-9} \text{cm/s}$ と同程度であった。一方、BnBP の代謝物の皮膚透過係数は、角層の有無や使用した皮膚に関わらず、 $1.0 \times 10^{-9} \text{cm/s}$ 以上となった。興味深いこ

とに、ヘアレスラット皮膚とヒト皮膚を介した場合には、BnBP 適用後に主に生成される代謝物が異なり、ヘアレスラット皮膚では BP が、ヒト皮膚では BnP が優位となった。Figure 4 に BnBP 適用後の BnBP およびその代謝物のヘアレスラットもしくはヒト抽出皮膚中濃度を示す。ヘアレスラット皮膚では、主に BP が検出され、BnP は BP に比べて 1/10 程度の皮膚中濃度となり、適用物質である BnBP は検出されなかった。この結果は、角層の有無にかかわらず同様であった。DFP 処理を施したヘアレスラット皮膚を用いた場合は、適用物質である BnBP のみが検出された。一方、ヒト皮膚ではヘアレスラット皮膚とは異なり、主に BnP が検出された。また、ヒト皮膚では主代謝物と副代謝物の皮膚中濃度の差はあまり認められなかった。

C-3. フタル酸ジエチルヘキシルの皮膚透過性・皮膚中濃度

Figure 5 にヘアレスラットおよびヒト皮膚に di-*i*-OP を適用後の、di-*i*-OP およびその代謝物の累積透過量-時間プロファイルを示す。ヘアレスラットおよびヒト皮膚に di-*i*-OP を適用しても、角層の有無に関わらず、di-*i*-OP およびその代謝物の皮膚透過は認められなかった。また、DFP 処理を施したヘアレスラット皮膚でも同様の結果が認められた。Table 8 に di-*i*-OP のヘアレスラットおよびヒト皮膚透過係数を示す。いずれの皮膚でも full-thickness skin を介した透過係数は

$1.0 \times 10^{-9} \text{ cm/s}$ 以下となったが、stripped skin を介した場合は、 $1.0 \times 10^{-9} \text{ cm/s}$ と同程度であった。Figure 6 に di-*i*-OP 適用後の di-*i*-OP およびその代謝物のヘアレスラットもしくはヒト抽出皮膚中濃度を示す。いずれの皮膚でも角層の有無に関わらず di-*i*-OP およびその代謝物は検出されなかった。また、DFP 処理を施したヘアレスラット皮膚でも同様の結果が得られた。

C-4. フタル酸モノブチルの皮膚透過性

Figure 7 にヘアレスラット皮膚に BP を適用後の累積透過量-時間プロファイルを示す。を調べた結果を示す。BP の皮膚透過は角層の有無に関わらず認められ、その透過係数は full-thickness skin を介したときは $2.44 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 、stripped skin を介したときは $6.79 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ となり、いずれも $1.0 \times 10^{-9} \text{ cm/s}$ より高値となった。

C-5. フタル酸モノベンジルの皮膚透過性

Figure 8 にヘアレスラット皮膚に BnP を適用後の累積透過量-時間プロファイルを示す。BnP の皮膚透過係数は full-thickness skin で $3.9 \times 10^{-8} \text{ (cm/s)}$ 、stripped skin では、 $7.0 \times 10^{-6} \text{ (cm/s)}$ となり、いずれも $1.0 \times 10^{-9} \text{ cm/s}$ より高値となった。

C-6. フタル酸モノ-2-エチルヘキシルの皮膚透過性

Figure 9 に *i*-OP をヘアレスラット皮膚

に適用後の累積透過量-時間プロファイルを示す。Full-thickness skin に適用しても *i*-OP の透過は認められず、下限定量値より算出した透過係数 P_{ul} は 4.8×10^{-11} (cm/s) となり、 1.0×10^{-9} cm/s 以下となった。一方、stripped skin を介した場合は、透過係数は、 4.5×10^{-8} (cm/s) となった。

C-7. フタル酸エステル類の皮膚代謝パラメータ

Table 9 に皮膚ホモジネートを用いたフタル酸エステル類の代謝実験により得られたパラメータを示す。di-BP および BnBP のみが皮膚中で代謝されることが分かった。これの V_{max}/K_m 値はヘアレスラット皮膚とヒト皮膚で異なり、ヘアレスラット皮膚の方がいずれの代謝でも高値を示すことが分かった。さらに、BnBP の代謝では、ヘアレスラット皮膚では主に BP を、ヒト皮膚では主に BnBP を生成することがわかり、主な代謝生成物が異なることがわかった。

フタル酸ジエステルの代謝生成物である BP や BnBP は皮膚中で代謝されフタル酸とならなかったことから、BP や BnBP が皮膚中の最終代謝生成物であることが分かった。

D. 考察

フタル酸ジエステル体の di-BP、BnBP を皮膚に適用したところ、ジエステル体 di-BP、BnBP の皮膚透過は認められず、また、これらは皮膚中にも検出されな

った。しかし、その代謝生成物であるモノエステル体 BP、BnP の皮膚透過は認められた。これは、皮膚(角層)に分配したジエステル体が生きた表皮に存在するカルボキシエステラーゼによりモノエステル体へと代謝されたためと考えられた。これに対し、di-*i*-OP は、皮膚透過が認められず、皮膚中にも検出されなかった。また、di-*i*-OP 適用後のその代謝生成物 *i*-OP の皮膚透過も認められなかった。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、適用溶媒への溶解性が低く適用濃度が十分確保できなかったこと、di-*i*-OP の高すぎる脂溶性のため皮膚への分配が低いことが考えられた。また、di-*i*-OP のモノエステル体が検出されなかったことについては、di-*i*-OP の側鎖が立体障害となり、皮膚中エステラーゼによる代謝が阻害された可能性が示唆された。エステル基を有する化学物質の皮膚中で起こる代謝には、エステラーゼが関与していると報告されている。ヒトのカルボキシエステラーゼの分子種のファミリーには、主に肝臓に分布するヒトカルボキシエステラーゼ 1 (hCE-1) および、主に皮膚、腸、肺などの限られた臓器に分布するヒトカルボキシエステラーゼ 2 (hCE-2) が知られている。hCE-1 は主な基質は側鎖の短いアルコール基または側鎖の長いアシル基を有する構造であり、hCE-2 の主な基質は側鎖の長いアルコール基または側鎖の短いアシル基を有する構造であることが知られて

いる。皮膚中でのフタル酸エステル類の代謝は、主に hCE-2 によると考えられるため、di-*i*-OP のように分岐鎖を持つ構造は、hCE-2 による代謝を受けにくいと考えられた。一方で、di-*i*-OP を経口暴露させると、di-*i*-OP は肝臓で hCE-1 による代謝を受け *i*-OP さらには PA を生成することが報告されている。このことから、di-*i*-OP の代謝が皮膚中で認められない原因は、カルボキシエステラーゼファミリーの発現部位の特異性によるものと考えられた。

化学物質の *in vitro* 皮膚透過試験は、ヒト摘出皮膚を用いることが好ましいが、ヒト皮膚は高価であり、数に限りがあるため入手することが難しい。そのため、ヒト摘出皮膚を用いた研究の前段階として、ヘアレスラットなどの動物摘出皮膚や培養皮膚などが使用されている。ヘアレスラット摘出皮膚とヒト摘出皮膚を介した物質の透過性はよく似ていることが知られているが、皮膚中のエステラーゼによる代謝酵素活性値は (K_m および V_{max}) はヘアレスラット摘出皮膚とヒト摘出皮膚で大きく異なる結果となった。したがって、フタル酸エステル類のように皮膚中で代謝を受ける化学物質の安全性を動物皮膚を用いて評価する場合は、皮膚中での代謝活性値の違いが把握できていなければ、化学物質の皮膚刺激性結果が偽陽性や偽陰性反応となる可能性がある。代謝生成物の皮膚透過性および皮膚中濃度は Fick の拡散則にミカエリスメンテン式を導入する

ことで予測可能であることから、ヒト皮膚ホモジネートやヒト皮膚中の酵素活性を模倣する酵素カクテルなどを利用して、代謝酵素パラメータが得られれば、代謝物の皮膚透過性や皮膚中濃度が予測可能となるであろう。

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ったところ、皮膚透過性が落屑速度 ($1.0 \times 10^{-9} \text{cm/s}$) より低く、皮膚中でも検出されなかった di-BP、BnBP、di-*i*-OP、*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、少なからず di-BP、BnBP は皮膚(角層)へ移行していることが考えられた。しかし、これらの化学物質は皮膚中で速やかに代謝を受けるため、これら化学物質自体が全身循環系へ移行することはほぼ無いと考えられた。また、BnP は角層落屑速度より速い皮膚透過性が認められたため Type B または C と分類された。さらに、BP は角層落屑速度より速い皮膚透過性が認められ、皮膚中でも高濃度で検出されたため Type C と分類することができると判定した。

E. 結論

フタル酸エステル類を皮膚透過性の観点から分類するとジエステル体は全身循環系への移行はほぼ無いが、モノエステル体は全身循環系への移行が懸念

される結果となった。さらに、モノエステル体は皮膚への移行性が高いため皮膚刺激性も評価することが必要だと考えられた。皮膚中で代謝を受ける可能性がある化学物質を皮膚透過性の観点から分類する場合には、皮膚中の代謝酵素活性を十分に把握し、適用物や代謝生成物の皮膚透過性を評価する必要がある。以上より、皮膚透過性の観点から化学物質を分類する手法は、フタル酸エステル類の経皮暴露後の安全性評価に有用であると考えられる。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

なし

F-2. 学会発表

- 1) 鈴木貴雅, 中田圭一, 石井宏, 藤堂浩明, 神野透人, 杉林堅次: 家庭内化学物質の定量的経皮暴露評価. 日本薬学会第 130 年会 (2010.3)
- 2) 古井克典, 藤堂浩明, 杉林堅次: 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験結果に及ぼす皮膚バリア機能及び代謝能. 日本動物実験代替法学会第 23 回大会 (2010.12)
- 3) 押坂勇志, 杉野雅浩, 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 (2011.3)
- 4) 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. 第 55 回日本薬学会関東支部大会 (2011.10)
- 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関する研究. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3)

Table 1 Chemical and physical properties of model compounds used in this study.

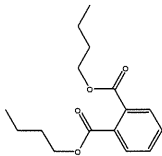
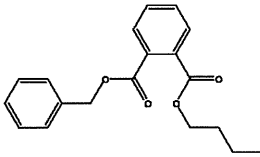
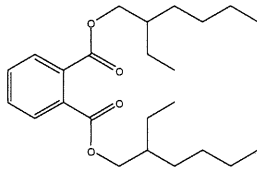
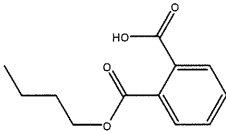
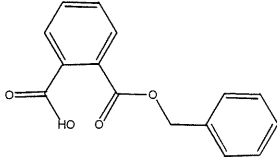
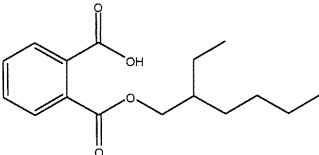
CAS No.	一般名 (略語)	構造式	分子式 (分子量)	Clog <i>P</i>
84-74-2	Dibutyl phthalate (di-BP)		C ₁₆ H ₂₂ O ₄ (278.3)	4.73
85-68-7	Benzyl butyl phthalate (BnBP)		C ₁₉ H ₂₀ O ₄ (312.4)	4.97
117-81-7	Di (2-ethylhexyl) phthalate (di- <i>i</i> OP)		C ₂₄ H ₃₈ O ₄ (390.6)	8.71
131-70-4	Monobutyl phthalate (BP)		C ₁₂ H ₁₄ O ₄ (222.2)	2.72
2528-16-7	Monobenzyl phthalate (BnP)		C ₁₄ H ₁₀ O ₄ (256.25)	3.23
4376-20-9	Mono (2-ethylhexyl) phthalate (<i>i</i> OP)		C ₁₆ H ₂₂ O ₄ (278.3)	4.71

Table 2 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 3 HPLC conditions : 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 4 HPLC conditions: BP, BnP, and 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 5 HPLC conditions : *i*-OP and 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

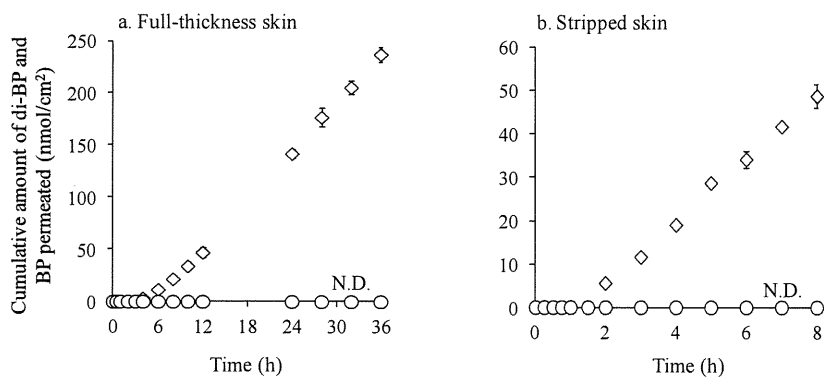


Fig. 1 Skin permeation profiles of di-BP and its metabolite (BP) through human full-thickness skin (a) and stripped skin (b). Symbols: ○; di-BP and ◇; BP. Each point represents the mean ± S.D.. N.D. means not detect.

Table 6 Skin permeability coefficients of di-BP and BP through human full-thickness or stripped skin after application of di-BP.

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

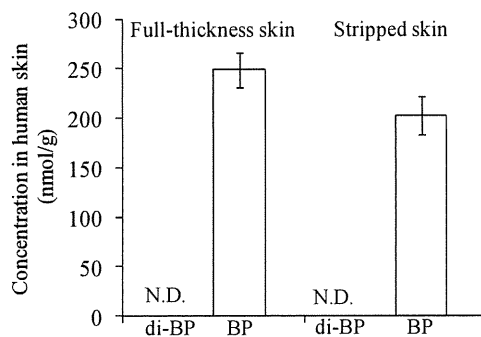
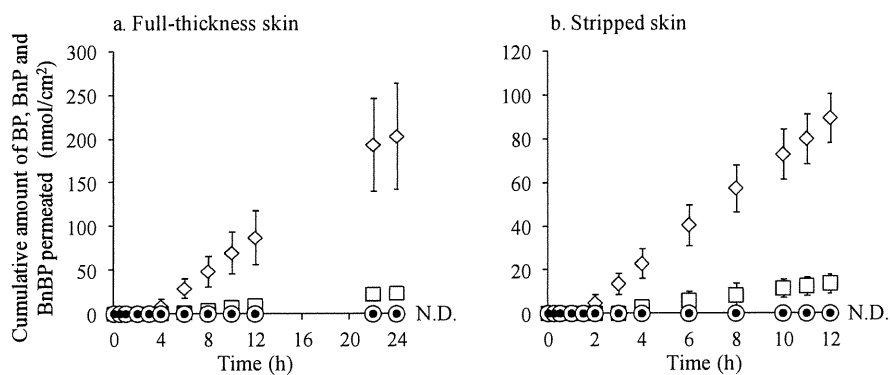


Fig. 2 Concentration of di-BP and its metabolite (BP) in human skin after application of di-BP. Each column represents the mean \pm S.D..

A) Hairless rat skin



B) Human skin

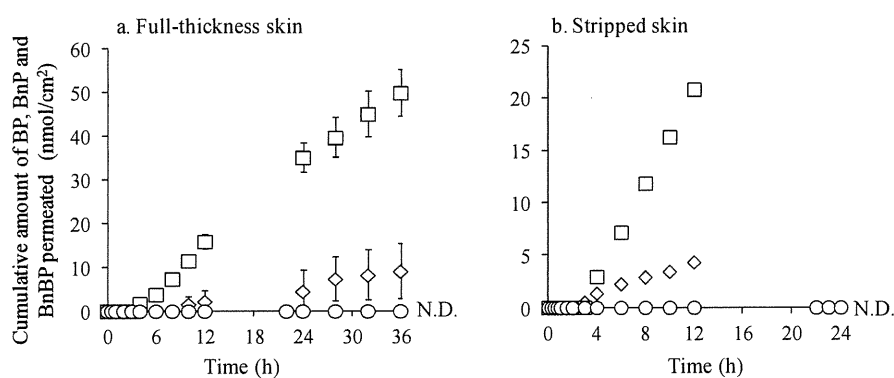


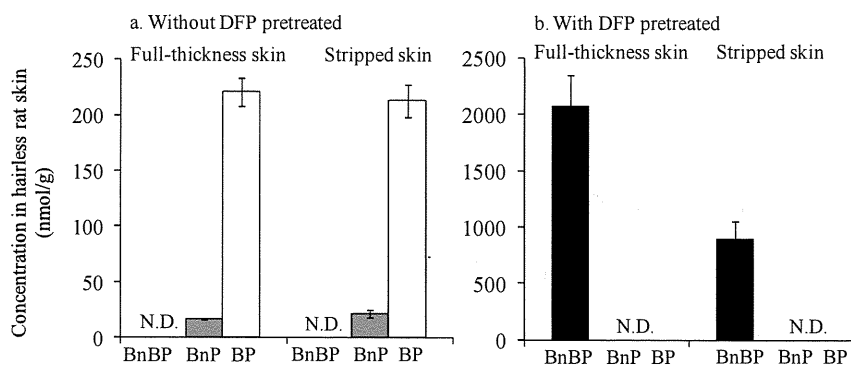
Fig. 3 Skin permeation profile of BnBP and its metabolites through A) excised hairless rat skin or B) excised human skin. Symbols: \circ ; BnBP, \square ; BnP, \diamond ; BP.

Open symbols were for non-DFP pretreatment and closed symbols were for DFP pretreatment. Each point represents the mean \pm S.D..

Table 7 Skin permeability coefficients of BnBP and its metabolites through hairless rat human full-thickness or stripped skin after application of BnBP

	Application chemicals	Chemicals permeated	Full-thickness skin (cm/s)	Stripped skin (cm/s)
Hairless rat skin	BnBP	BnBP	$P_{ul} < 4.7 \times 10^{-11}$	$P_{ul} < 1.8 \times 10^{-9}$
		BnP	$P_m: 9.2 \times 10^{-7}$	$P_m: 9.0 \times 10^{-7}$
		BP	$P_m: 6.0 \times 10^{-6}$	$P_m: 3.5 \times 10^{-6}$
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	$P_m: 2.7 \times 10^{-7}$	$P_m: 2.5 \times 10^{-7}$

A) Hairless rat skin



B) Human skin

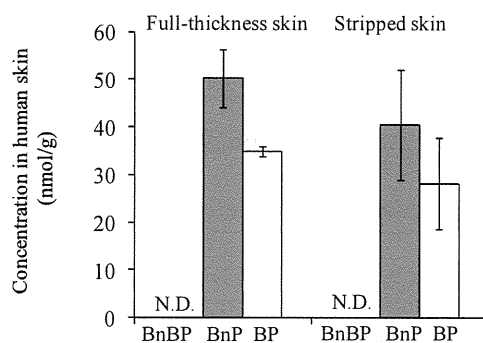
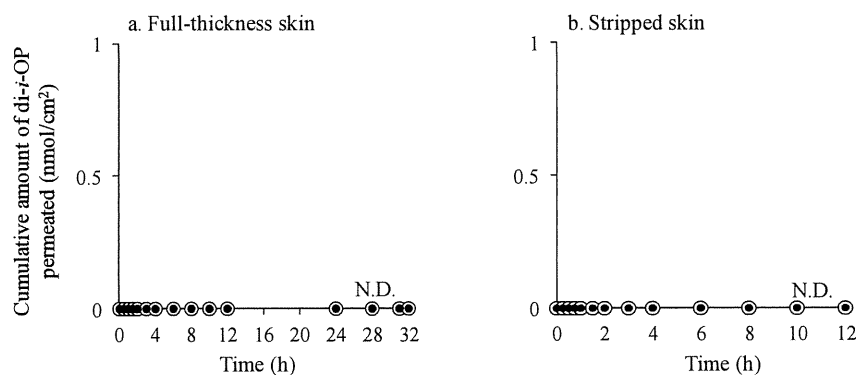


Fig. 4 Skin concentration of BnBP and its metabolites in A) excised hairless rat or B) excised human skin . a) non-DFP pretreated skin (b) DFP pretreated skin. Each column represents the mean \pm S.D..

A) Hairless rat skin



B) Human skin

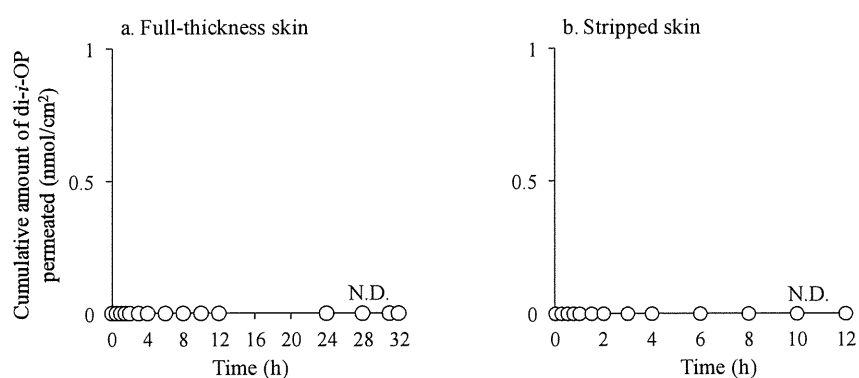
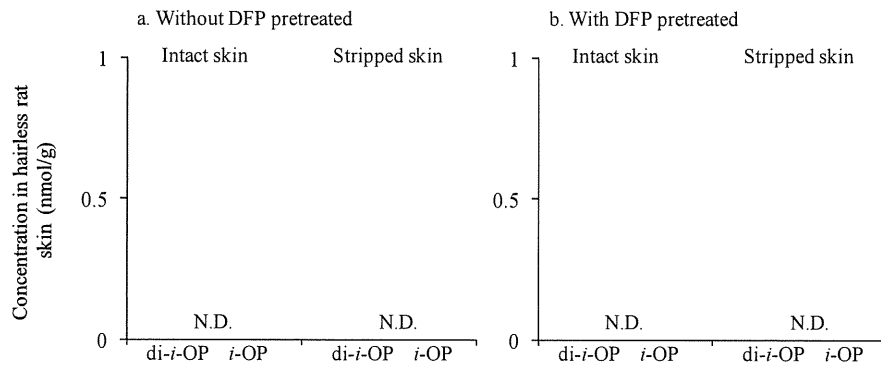


Fig. 5 Skin permeation profile of di-*i*-OP through A) hairless rat skin or B) human skin. Open symbols were for non-DFP pretreatment and closed symbols were for DFP pretreatment.

Table 8 Skin permeability of di-*i*-OP after application of di-*i*-OP.

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

A) Hairless rat skin



B) Human skin

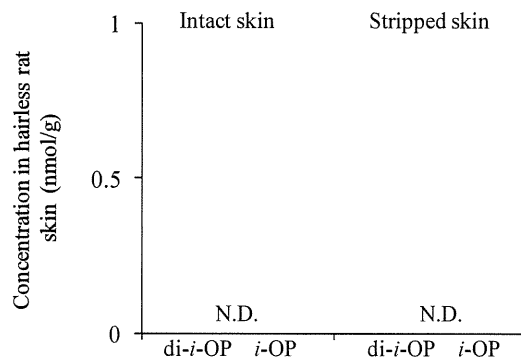


Fig. 6 Concentration of di-*i*-OP and its metabolite(*i*-OP) in A) excised hairless rat skin and B) excised human skin. a) non-DFP pretreated skin, b) DFP pretreated skin.

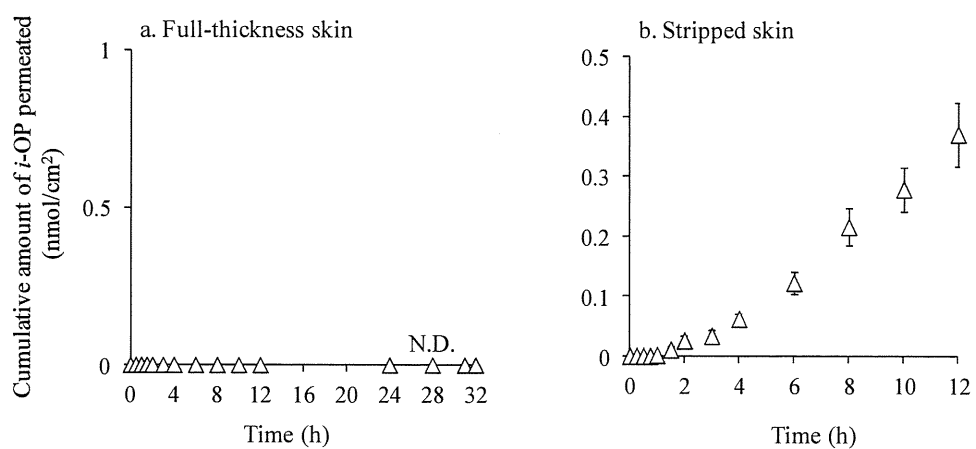


Fig. 9 Skin permeation profile of *i*-OP through a) full-thickness or b) stripped hairless rat skin. Each point represents the mean \pm S.D..

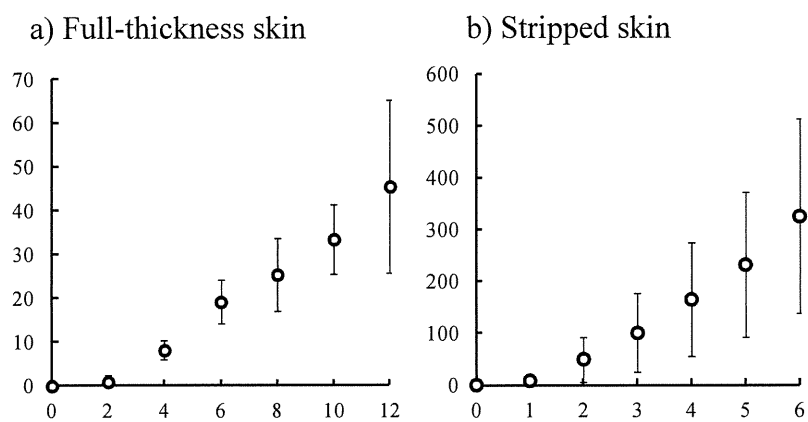


Fig. 7 Skin permeation profile of BP through a) full-thickness or b) stripped hairless rat skin. Each point represents the mean \pm S.D..

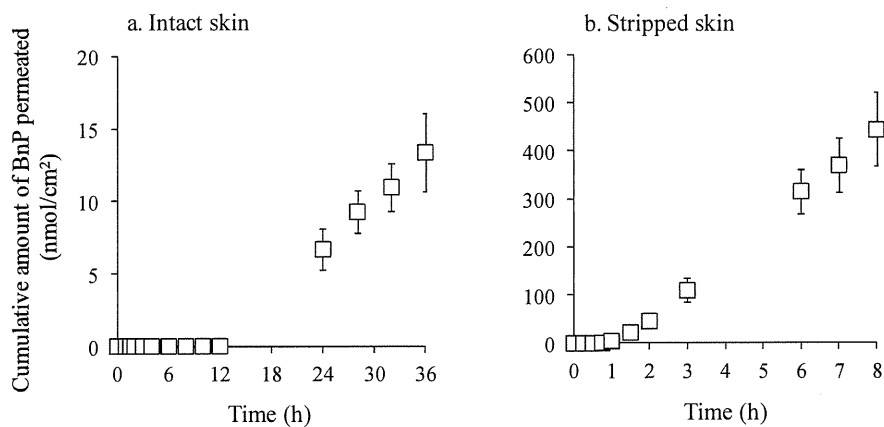


Fig. 8 Skin permeation profile of BnP through a) full-thickness or b) stripped hairless rat skin. Each point represents the mean \pm S.D..

Table 9 Enzymatic parameters of K_m and V_{max} for metabolism of phthalate esters

Substrate	Products		K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	V_{max}/K_m (min/mg protein)
di-BP	BP	Hairless rat skin	18.2	2.9×10^{-1}	1.6×10^{-2}
		Human skin	13.2	4.1×10^{-2}	3.1×10^{-3}
BnBP	BP	Hairless rat skin	14.8	1.3×10^{-1}	9.1×10^{-3}
			BnP	18.7	5.2×10^{-2}
	BnP	Human skin	165	2.6×10^{-3}	1.6×10^{-5}
			58.5	4.7×10^{-2}	8.0×10^{-4}
di- <i>i</i> -OP	<i>i</i> -OP	Hairless rat skin		N.D.	
		Human skin		N.D.	
BP	PA	Hairless rat skin		N.D.	
		Human skin		N.D.	
BnP	PA	Hairless rat skin		N.D.	
		Human skin		N.D.	
<i>i</i> -OP	PA	Hairless rat skin		N.D.	
		Human skin		N.D.	

N.D. means not detected.

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

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。本研究期間では、dibutyl phthalate (DBP)、butyl benzyl phthalate (BBP)及び bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)を対象にした。平成 21 年度は、対象化学物質の代謝に関与するカルボキシエステラーゼ (carboxylesterase, CES) の寄与の可能性、程度及び関与する分子種の同定するための CES 酵素の発現系の構築及び 3 種のフタル酸エステル類の加水分解代謝物の HPLC 定量法の確立を行った。平成 22 年度は、対象化学物質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。平成 23 年度は、対象化学物質のリコンビナント CES (CES: CES1, CES2, CES3) による加水分解反応の速度論的解析を行った。これらの検討から、フタル酸エステル類は、ヒト肝臓において CES により加水分解反応を受けることが示唆された。また、DBP 及び BBP の加水分解反応には CES1 及び CES2 酵素が関与し、これら分子種のフタル酸エステル類の毒性発現に対する役割は異なる可能性が示唆された。本研究で得られた知見は、種差、個人差並びに曝露経路を考慮したフタル酸エステル類の安全性及び毒性評価法の確立に重要な情報を提供すると期待される。

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。本研究において、平成 21 年度は、DBP、BBP 及び DEHP の代謝に関与するカルボキシルエステラーゼ (carboxylesterase, CES) の寄与の可能性、程度及び関与する分子種の同定するための CES 酵素の発現系の構築及びこれらフタル酸エステル類の加水分解代謝物の HPLC 定量法の確立を行った。平成 22 年度は、対象化学物質のヒト肝ミ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。さらに、平成 23 年度は、対象化学物質のリコンビナント CES (CES: CES1, CES2, CES3) による加水分解反応の速度論的解析を行った。

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 ; HepG2 細胞、HEK293 細胞、Caco2 細胞及び COS7 細胞 (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、QIA shredder : Qiagen ; Access RT-PCR System 及びマウス抗 V5-HRP 抗体 : Promega ;

DC protein assay kit : Bio Rad ; Gene Amp PCR-DYDTEM 2700A : Applied Biosystems ; SuperScript III First-Strand Synthesis for RT-PCR 及び Lipofectamine LTX : Invitrogen。プールドヒト肝ミクロゾーム (pHLM, Age 33-78 years) : BD Biosciences ; ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス 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 細胞培養

HepG2、HEK293、Caco2 及び COS7 細胞は 10%FBS 及び penicillin (100 units/mL)、streptomycin (100 µg/mL) 含有 DMEM 培地中で培養した。継代は細胞が 80-90%まで生育した時点で行った。細胞数は、細胞の一部を 0.1%トリパンブルーで染色し、改良ノイバウエル血球計算盤を用いて光学顕微鏡で観察することにより求めた。

B.3 内在性 CES の mRNA 発現量の測定

細胞が 80-90%まで生育した 10 cm プレート 3 枚から RNeasy mini Kit を用い total RNA を抽出した。得られた total RNA の一部をとり RNase free water で 100 倍に希釈し、260 nm と 280 nm の吸光度を測定して濃度と純度を測定した。抽出した total RNA を用いて CES1、CES2 及び CES3 mRNA 発現量を RT-PCR 解析により半定量した。用いたプライマーのオリゴヌクレオチド配列を表 1 に