

示す。RT-PCR は、Access RT-PCR System の添付プロトコールに従って行った。それぞれの PCR 産物 10  $\mu$ L に loading buffer 1  $\mu$ L を混合し、アガロース電気泳動に付した。分子量マーカー 2  $\mu$ L をアプライした後、泳動槽で 100 V、約 40 分間泳動し、0.01% ethidium bromide で 15 分染色し、バンドの染色強度を Quantity One を用いて測定した。

#### B.4 内在性エステラーゼ活性 (PNPA 加水分解活性) の測定

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 $\mu$ M
Enzyme	20 $\mu$ g protein
Total volume	500 $\mu$ L

#### B.5 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 2 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 MgSO<sub>4</sub>、0.3 mM dNTPs 及び 0.4  $\mu$ M 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  $\mu$ L 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.6 リコンビナント CES 酵素の作製

10 cm プレートを用いて HEK293 細胞を 10% FBS 含有 DMEM 中に  $3.0 \times 10^6$  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 µg) をそれぞれ PLUS Reagent (15 µL) 及び Lipofect amine LTX (60 µL) 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.7 ウェスタンブロット分析

ヒト肝ミクロゾーム及びリコンビナント 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.8 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、酵素源にヒト肝ミクロゾーム及びリコンビナント 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% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ CH<sub>3</sub>CN (85/15, v/v)と B) 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ CH<sub>3</sub>CN (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 内在性 CES 活性の低い哺乳動物細胞発現系の検討

HepG2、HEK293、Caco2 及び COS7 細胞の内在性 CES について mRNA 発現量及び酵素活性の見地から検討した。mRNA 発現量の解析は RT-PCR により行った。その結果を図 1 に示す。HepG2 細胞では、CES1、CES2 及び CES3 のい

ずれも mRNA も発現が確認された。HEK293 細胞では CES2 mRNA のみが、Caco2 細胞では、CES1 及び CES2 mRNA 発現が発現していた。一方、COS7 細胞においては、本研究で用いた条件ではいずれの CES mRNA の発現は確認出来なかった。さらに、HEK293 及び COS7 細胞では、S9 画分を酵素源にして *p*-NPA に対するエステラーゼ活性を測定した。結果を図 2 に示す。HEK293 及び COS7 細胞のエステラーゼ活性はそれぞれ 16 及び 14 nmol/min/mg protein であり、いずれも pHLM と比較し顕著に低かった。COS7 細胞では、CES1、CES2 及び CES3 のいずれにおいても目的バンドは検出がされなかったが、エステラーゼ活性は HEK293 と同程度であった。

### C.3 CES 酵素の発現

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 3 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。

### C.4 フタル酸エステル類及びそれらの代謝物の HPLC 分析法の確立

DBP、DEHP 及び BBP とそれらの CES により生成すると思われる代謝物のモノ体及びフタル酸の HPLC 分析条件を検討した。移動相に 0.1%リン酸/アセトニト

リルを用い、グラジエント溶出を行った。B.6 に示した条件下でそれぞれのフタル酸エステル類及びそれらの代謝物を良好に分離することができた (図 4~6)。

#### C.4 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 7~10 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 3 に示す。

#### C.5 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 11 及び 12 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 4 及び 5 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  $\mu\text{M}$ ) では CES2 の寄与が大きく、高基質濃度 (200  $\mu\text{M}$ ) 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 CES1 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ことが明らかにも 2  $\mu\text{M}$  で同程度、そ

れより基質濃度が高い 20  $\mu\text{M}$  及び 200  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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、ヒト肝ミクロゾーム及び哺乳動物細胞発現リコンビナント CES 酵素によるフタル酸エステル類加水分解反応を検討した。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平成 21 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ヒト肝ミクロゾームによる加水分解反応 ( DEHP $\rightarrow$ MEHP ; DBP $\rightarrow$ MBP ; BBP $\rightarrow$ 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。いずれの肝ミ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、肝ミクロゾームでは 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ッ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。

さらに、リコンビナント CES 酵素を用いてフタル酸エステル類の加水分解反応を検討した。そのために、まずヒト肝 total RNA から CES1、CES2 及び CES3 の全長 cDNA をクローニングした。このときウェスタンブロット分析を容易にするために、これら cDNA の C 末端に V5 エピトープ配列を挿入した。発現用哺乳動物細胞は、mRNA 発現量及び酵素活性から最も内在性 CES 活性の低い HEK293 細胞を用いた。

CES の基質特異性として CES1 はアシル基がかさ高い構造を有するもの、CES2 はアルコール基がかさ高い構造を有するものを加水分解しやすい傾向にあることが知られている。また、Imai らは、フルルビプロフェン誘導体のブチルエステル基加水分解反応について CES1 及び CES2 の間で  $K_m$  値は、CES1 > CES2、 $V_{max}$  値は、同程度であることを報告している (7)。本研究において DBP から MBP 及び BBP から MBzP への加水分解反応は、Imai らと同様にブチルエステル基の加水分解反応である。そのため、DBP 及び BBP 加水分解反応において  $K_m$  値が CES1 > CES2 と考えられる。また、アシル基の構造は DBP よりも BBP が CES1 優先的なかさ高い構造であるため、BBP 加水分解反応において CES1 が CES2 よりも高い  $V_{max}$  値を示したと考えられる。

しかし、DBP から MBP 及び BBP から MBzP への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 CES 酵素と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。これは、肝臓に発現している CES 酵素以外の加水分解酵素が関与している可能性が考えられる。ヒト肝臓における CES については、mRNA レベルで CES1 が最も高く、続いて CES2 が発現している。CES 以外の加水分解酵素として CES1 の 1/20 以下であるが、リパーゼの発現が報告されている (8)。従って、DBP 及び BBP が CES のみならずリパーゼにより加水分解を受け、フタル酸モノエステル体が生成するため、肝臓においてみかけ上、アロステリックな挙動を示す可能性がある。

本研究において DBP 及び BBP の加水分解には CES1 及び CES2 の関与が示唆された。DBP 及び BBP はプラスチック製品を介してヒトに経口、経皮あるいは経気道曝露される可能性がある。CES 酵素はこれら曝露の標的臓器である肝臓、皮膚及び肺に発現している (8,9)。そのため曝露後、速やかに生殖毒性を示すモノエステル体へ代謝し吸収され毒性を発

現する可能性が考えられる。また、胎児及び新生児においては CES の発現は成人と比べ低く、胎盤及び母乳を介して親化合物が体内に吸収・蓄積されて生殖毒性が惹起されることも推測される。フタル酸エステル類の加水分解に寄与する CES 酵素は広い臓器・組織の分布性を示し、また、活性は人種差、年齢及び遺伝的多型などにより変動することが報告されている (10)。従って、フタル酸エステル類の毒性評価には多経路曝露量及び CES 活性の個人差を考慮した毒性評価を行う必要があると我々は考えている。

#### E. 結論

本研究では、DBP、BBP 及び DEHP の肝ミクロゾーム及びリコンビナントヒト CES 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、肝ミクロゾームでは、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。一方、リコンビナントヒト CES では、1) DBP 及び BBP のブチルエステル基の加水分解反応には CES1 及び CES2 が関与する、2) CES 酵素による BBP 加水分解反応は、肝ミクロゾームと同様に MBzP へ優先的に進行する、ことが示された。

#### 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エステルラーゼ分子種. 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ミ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) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
- 2) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
- 3) Danschutter D, Braet F, Van Gysegem 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.
- 4) 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.
  - 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) Imai T, Taketani M, Shii M, Hosokawa M, Chiba K. Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine. *Drug Metab Dispos* 2006;34:1734-41.
  - 8) Satoh T, Taylor P, Bosron WF, Sanghani SP, Hosokawa M, La Du BN. Current progress on esterases: from molecular structure to function. *Drug Metab Dispos* 2002;30:488-93.
  - 9) Ahmed S, Imai T, Yoshigae Y, Otagiri M. Stereospecific activity and nature of metabolizing esterases for propranolol prodrug in hairless mouse skin, liver and plasma. *Life Sci* 1997;61:1879-87.
  - 10) Yang D, Pearce RE, Wang X, Gaedigk R, Wan YJ, Yan B. Human carboxylesterases HCE1 and HCE2: ontogenic expression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin. *Biochem Pharmacol* 2009;77:238-47.



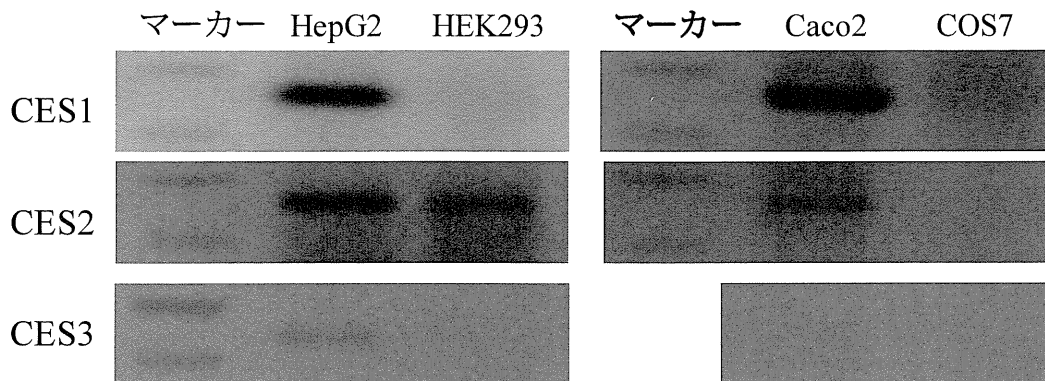


図1 哺乳動物細胞における内在性 CES1、CES2 及び CES3 の mRNA 発現レベル

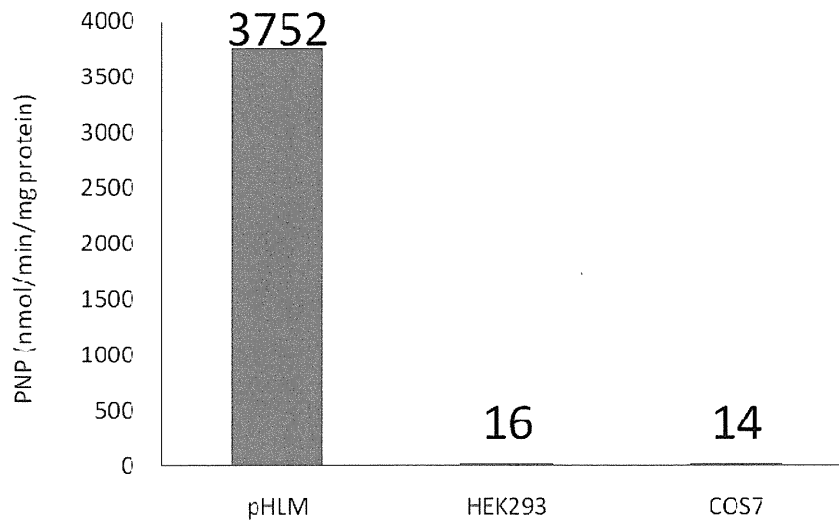


図2 肝マイクロゾーム並びに HEK293 及び COS7 細胞ににおける内在性エステラーゼ活性

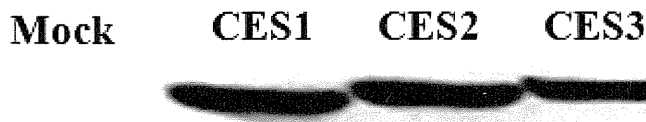


図3 リコンビナント CES1、CES2 及び CES3 のウェスタンブロッティング

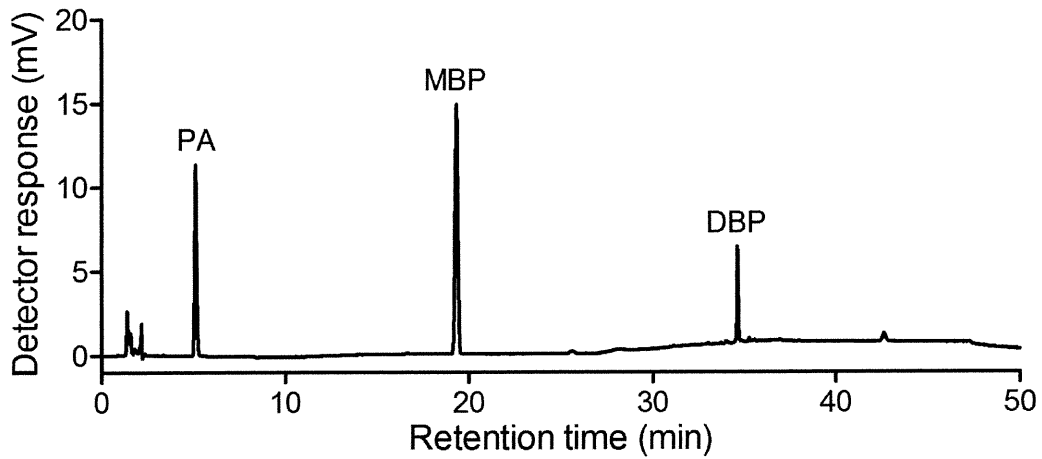


図 4 DBP 及びその加水分解代謝物の HPLC クロマトグラフィー

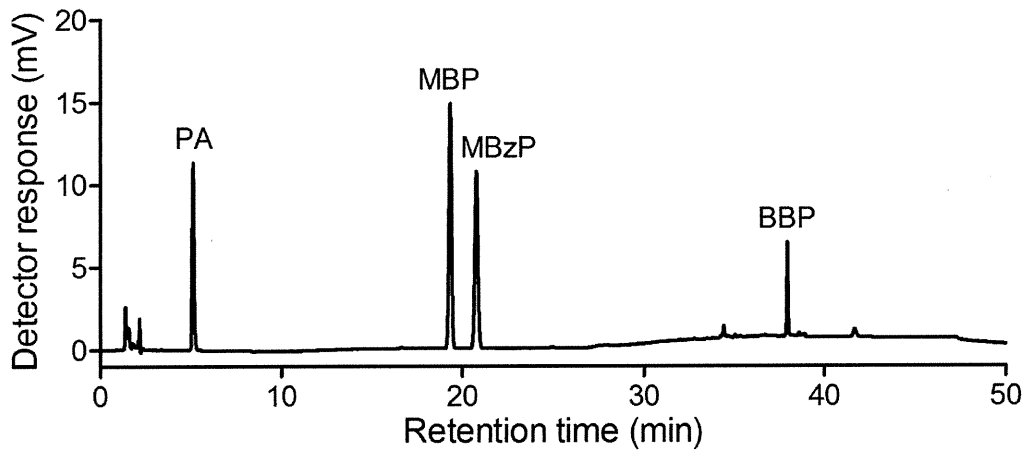


図 5 BBP 及びその加水分解代謝物の HPLC クロマトグラフィー

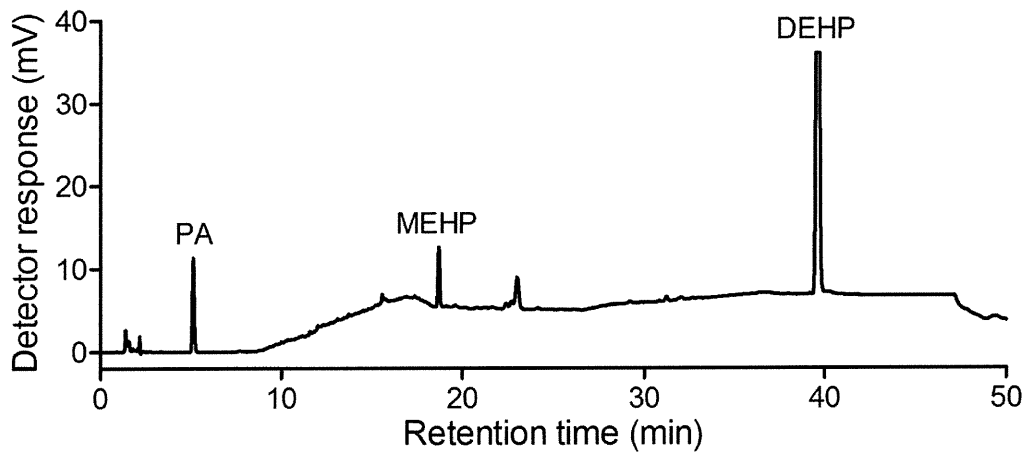


図 6 DEHP 及びその加水分解代謝物の HPLC クロマトグラフィー

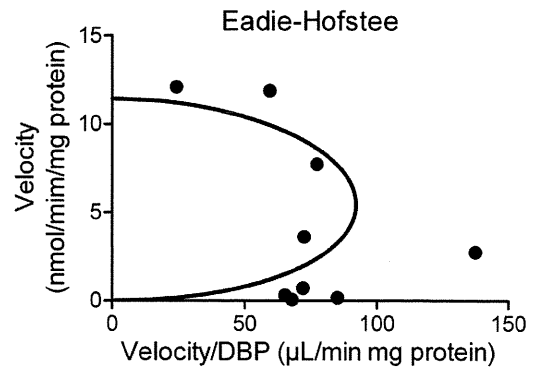
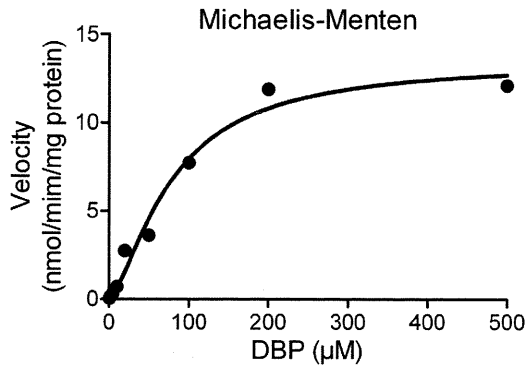


図7 ヒト肝ミクロゾームによる DBP から MBP への加水分解反応の速度論的解析

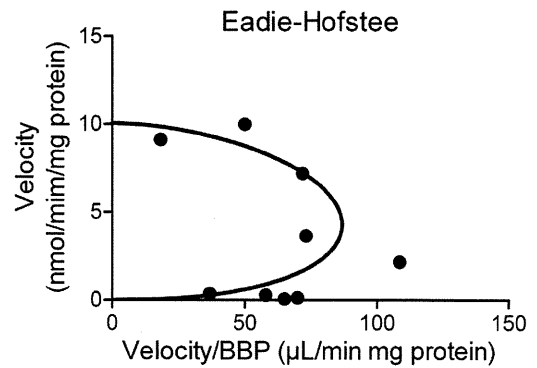
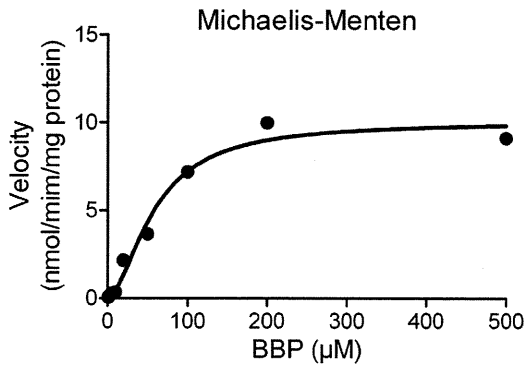


図8 ヒト肝ミクロゾームによる BBP から MBzP への加水分解反応の速度論的解析

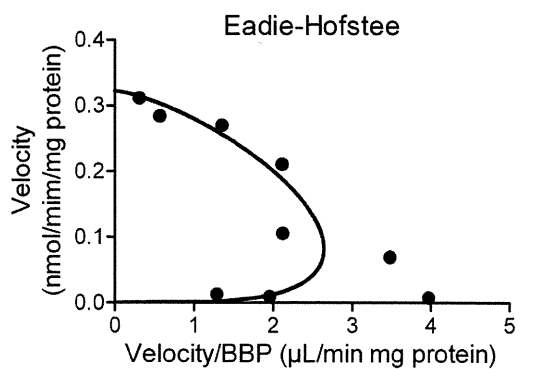
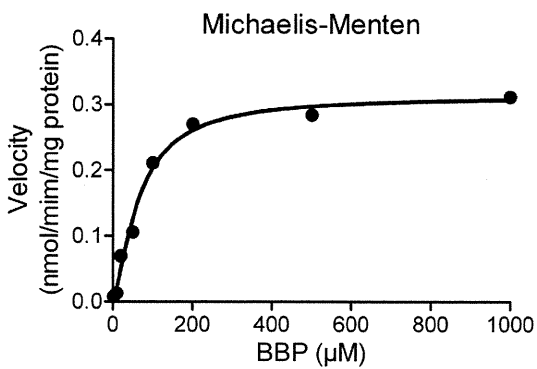


図9 ヒト肝ミクロゾームによる BBP から MBP への加水分解反応の速度論的解析

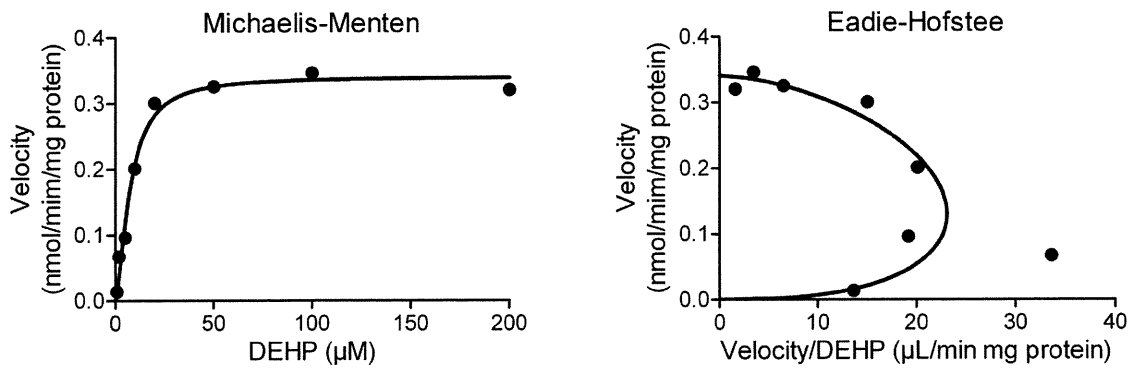


図 10 ヒト肝ミクロゾームによる BBP から MBP への加水分解反応の速度論的解析

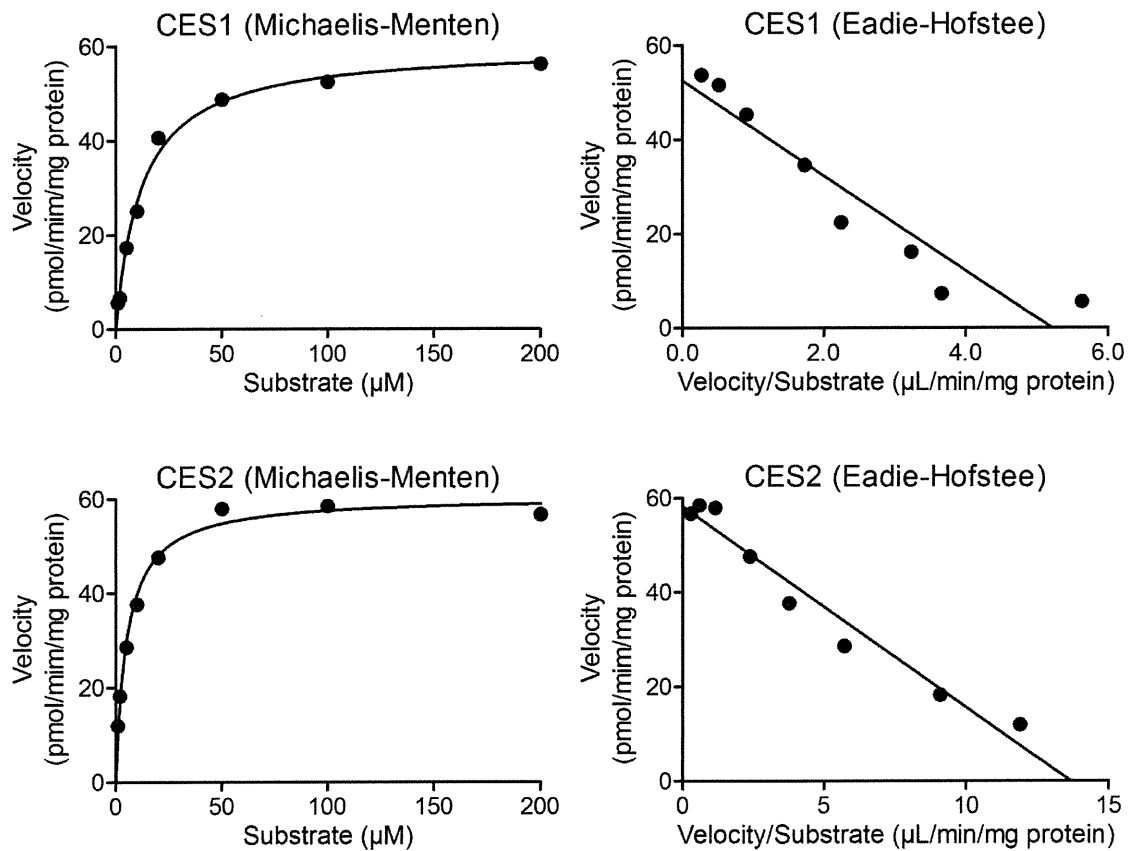


図 11 リコンビナント CES1 及び CES2 による DBP から MBP への加水分解反応の速度論的解析

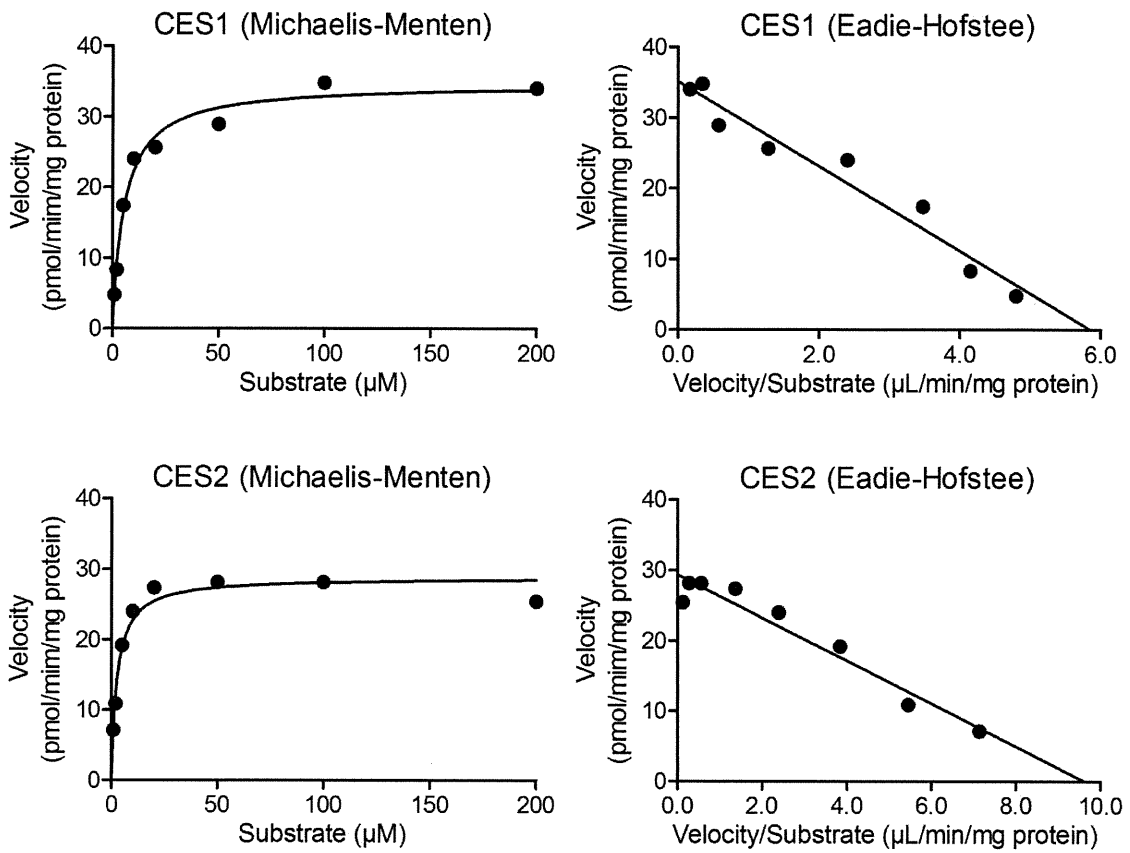


図5 リコンビナント CES1 及び CES2 による BBP から MBzP への加水分解反応の速度論的解析

表 1 CES mRNA の RT-PCR 解析に用いたプライマー

Primer	Sequence
CES1-FP	5'-CTATTTACAAACCGAAAGGAGAACA-3'
CES1-RP	5'-ATGGAGACAAAACAAGAACAGAGAC-3'
CES2-FP	5'-CAATTAACAAGCCTTTCAAGATGAT-3'
CES2-RP	5'-GATGCTGGAACCTCGTAGAAGTACAC-3'
CES3-FP	5'-AGATCTTCTCCGTTTCAGAGGAC-3'
CES3-RP	5'-GTCCGAGTTGCTTCCTAGGTATT-3'

表 2 CES1、CES2 及び CES3 発現プラスミド作製に用いたプライマー

Primer	Sequence
humCES1-FP	5'-CACCATGTGGCTCCGTGC-3'
humCES1-RP	5'-TCACAGCTCTATGTGTTCTGTCTGG-3'
humCES2-FP	5'-CACCATGCGGCTGCACAG-3'
humCES2-RP	5'-CTACAGCTCTGTGTGTCTCTCTTCAG-3'
humCES3-FP	5'-CACCATGGAGAGAGCAGTGAGAGT-3'
humCES3-RP	5'-TCAGAGGTCCTCCTGGGCC-3'

For removal of termination signal	
CES1-RP-del-TGG	5'-CAGCTCTATGTGTTCTGTCTGGG-3'
CES2-RP-del-TAG	5'-CAGCTCTGTGTGTCTCTCTTCAGG-3'
CES3-RP-del-TGA	5'-GAGGTCCTCCTGGGCCTTC-3'

表 3 プールドヒト肝ミクロゾームにおけるフタルエステル類の加水分解反応の速度論的パラメーター

Substrate	Metabolite	$S_{50}^a$	$V_{max}^b$	$n^c$	$CL_{int}^d$
DBP	MBP	94 ± 8	17 ± 2	2.3 ± 0.4	92 ± 1
BBP	MBzP	65 ± 4	12 ± 1	2.0 ± 0.2	94 ± 4
	MBP	100 ± 19	0.41 ± 0.05	1.2 ± 0.0	2.4 ± 0.1
DEHP	MEPH	7.8 ± 0.3	0.41 ± 0.04	1.6 ± 0.1	28 ± 3

Each value is the mean ± SD of three separate experiments. <sup>a</sup>μM. <sup>b</sup>nmol/min/mg protein. <sup>c</sup>Hill coefficient. <sup>d</sup>μL/min/mg protein.

表 4 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 (11.1, 16.9)	58.1 (57.8, 56.6)	4.13 (5.23, 3.35)
		CES2	6.42 (7.85, 5.18)	57.1 (53.4, 60.5)	8.89 (6.80, 11.7)

Each value is the mean of two separate experiments. <sup>a</sup>μM. <sup>b</sup>pmol/min/mg protein. <sup>c</sup>μL/min/mg protein.

表 5 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 (9.21, 5.41)	39.9 (45.5, 34.9)	4.89 (4.94, 6.44)
		CES2	3.34 (4.95, 2.66)	22.7 (16.7, 28.8)	6.80 (3.38, 10.8)

Each value is the mean of two separate experiments. <sup>a</sup>μM. <sup>b</sup>pmol/min/mg protein. <sup>c</sup>μL/min/mg protein.

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

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

研究分担者 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  
研究協力者 古川 容子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室  
研究協力者 岡元 陽子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室  
研究協力者 大田 悠紀子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室  
研究協力者 永井 美緒 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室

研究要旨: 室内環境中の化学物質、特に準揮発性有機化合物 (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。したがって、室内環境における SVOC 暴露を適切に評価するためには、呼吸に伴うガス状・粒子状 SVOC の経気道暴露の他にハウスダストの摂取による経口暴露を併せて考慮する必要がある。そこで、本研究では一般家庭ハウスダスト中の可塑剤フタル酸エステル類、難燃剤/可塑剤リン酸トリエステル類及びピレスロイド系殺虫剤について調査を行い、ハウスダストを介した経口暴露の蓋然性について考察を行った。

24 家庭のハウスダスト中並びに室内空気中のガス状及び粒子状フタル酸エステル類濃度を調査した結果、ハウスダスト中濃度の中央値及び最大値はそれぞれ Dibutyl phthalate (DBP) ; 0.014 mg/g Dust, 0.12 mg/g Dust, Benzyl butylphthalate (BBP) ; 0.0011mg/g Dust, 0.017 mg/g Dust, Diethylhexyl phthalate (DEHP) ; 0.86 mg/g Dust, 5.3 mg/g Dust であった。居間及び寝室 48 室の室内空気中の DBP の中央値は  $0.10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (ガス状)、 $0.31 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (粒子状)、最大値は  $0.61 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (ガス状)、 $0.99 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (粒子状) であった。一方、DEHP は大部分が粒子状で存在し、中央値は  $0.16 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最大値は  $1.05 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。本研究で得られた 95 パーセンタイル値を用いて、体重 50 kg、呼吸量  $20 \text{ m}^3/\text{day}$  の成人が 1 日あたり 50 mg のハウスダストを摂取する (RIVM Report, 2008) と仮定して室内環境での暴露量を概算すると、DBP に関しては 1 日推定摂取量のほとんどが食物及び飲料水を介した暴露であるのに対し、DEHP では食物及び飲料水からの暴露に匹敵する量 (約 80% に相当) をハウスダストから摂取する可能性のあることが明らかになった。

次に、室内環境中でハウスダストを媒体として暴露される可能性のある化学物質を網羅的に解析する目的で、ハウスダストのアセトン抽出液を GC/TOF-MS で分析し、デコンボリューション解析によってハウスダスト中の SVOC を暫定的に同定した。その結果、



一般家庭ハウスダスト中の SVOC として高頻度且つ高濃度に検出される DEHP の他に、可塑剤・難燃剤リン酸トリエステル類が高頻度に検出された。そこで、11 種のリン酸トリエステル類についてガスクロマトグラフ四重極型質量分析計(GC/MS) による定量方法を確立し、ハウスダスト中の濃度を測定した。その結果、REACH 規制の高懸念物質 (SVHC) に指定されている Tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) が高頻度に検出され、今回の実態調査結果における最高濃度を用いて摂取量を算出した場合、ハウスダストを介する推定 1 日摂取量が経口摂取量 (飲料水+食物)の 15%となる可能性が示された。

さらに、室内環境中でハウスダストを媒体として暴露される可能性のある化学物質としてピレスロイド殺虫剤 15 物質を選定し、GC/MS による分析法を確立した。確立した分析方法で、一般家庭からサンプリングしたハウスダスト (12 家庭) 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、調査家庭の 50% (6 家屋)から Permethrin が検出され、最高濃度は 16  $\mu\text{g/g}$  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) 及び Transfluthrin (3 家屋)が検出された。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した場合、成人のハウスダスト摂取量を 50 mg と仮定すると 1 日摂取量は 0.8 ( $\mu\text{g/day}$ )と推定され、1 日許容摂取量 (0.05 mg/kg bw/day, EPA)の 0.03%に相当することが明らかになった。

#### A. 研究目的

シックハウス症候群や本態性化学物質過敏状態など室内環境化学物質に起因すると考えられる健康被害の増加に伴って、建材や家具等の家庭用品から放散される化学物質に大きな関心が寄せられている。主要な発生源の一つである建材に関しては、建築基準法の改正によって放散化学物質の低減化策が講じられている。一方、居住者によって家庭内に持ち込まれる家庭用品には多種多様な化学物質が使用されているものの、それらの製品から放散される化学物質の室内環境への負荷については情報が限られている。

これまで高揮発性有機化合物 (VVOC, b.p.:  $<0^{\circ}\text{C} \sim 50\text{-}100^{\circ}\text{C}$ )や揮発性有機化合

物 (VOC, b.p.:  $50\text{-}100^{\circ}\text{C} \sim 240\text{-}260^{\circ}\text{C}$ ) 等による室内空気汚染に関する研究が積極的に進められてきた。しかし、比較的沸点の高い準揮発性有機化合物 (SVOC, b.p.:  $240\text{-}260^{\circ}\text{C} \sim 380\text{-}400^{\circ}\text{C}$ ) は、粒子を形成、あるいは粒子に吸着して床に沈降すると考えられるため、室内空気よりもむしろハウスダストに貯留している可能性が高い。特に小児は、床近くで行動し、Hand-to-mouth 等の行動特性があるため、指手を介して経口摂食する可能性が高く、ハウスダストが化学物質の重要な暴露媒体となることが予想される。そこで、本研究では一般家庭ハウスダスト中の可塑剤フタル酸エステル類、難燃剤/可塑剤リン酸トリエステル類及びピレスロイド系

殺虫剤について調査を行い、ハウスダストを介した経口暴露の蓋然性について考察を行った。

## B. 研究方法

### B-1 ハウスダストのサンプリング方法

フタル酸エステル類及びリン酸トリエステル類に関する調査では、関東近郊の一般家庭 25 軒を対象に、シリカ繊維円筒濾紙を装着したステンレス製ダスト採取管を家庭用掃除機に接続してハウスダストを採取した。サンプリング過程でのフタル酸エステル類の汚染を避ける目的で、ダスト採取に用いる部材はすべてステンレスないしはテフロン樹脂製とした (図 1)。ハウスダストは寝室及び居間の床・棚からほぼ同じ面積をほぼ同じ時間掃除機で吸引するように調査協力者に依頼した。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 25 mg にアセトン 2 mL を加えて超音波抽出し GC/MS により分析を行った。ただし、Diethylhexyl Phthalate (DEHP) に関しては濃度が高かったため 5 倍希釈液を分析に用いた。

ピレスロイド系殺虫剤に関する調査では、一般家庭 (関東近郊) 13 軒を対象として、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 (リョービ社製、BHC1400) を用いてハウスダストをサンプリングした。ハウスダストは寝室及び居間の床・棚等室内から偏りなくサンプリングするよう協力者に依頼した。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、室温で約 16 時間暗所に放置し、得られた抽出液中のピレスロイド系殺虫剤を GC/MS により分析した。

### B-2 室内空気のサンプリング方法

ハウスダスト中のフタル酸エステル類の調査と並行して室内空気中のガス状及び粒子状物質のサンプリングを行った。予めサンプリングスケジュールをプログラムした Pocket Pump (SKC Inc.) をサンプリング協力者に配布した。Tenax TA 捕集管 (ガス状物質捕集用) の前段に粒子状物質捕集用の石英フィルターを装着したステンレス製濾紙ホルダー (内径 13 mm) を接続して Pocket Pump に装着し、流速 40 mL/min で居室及び寝室それぞれ 8 時間 (19.2 L) 室内空気を採取した (図 2)。粒子状物質捕集用の石英フィルターは予め 5 w/v%ジメチルジクロロシラン-トルエン溶液 (和光純薬、ガスクロマトグラフ用) で 10 時間以上処理した後にメタノールで洗浄し、ヘリウムガスで風乾させたものを用いた。ガス状物質捕集用の Tenax TA 捕集管の両端のガラスウールはシラン処理済み石英ウール (GLサイエンス社製) に詰め替えて使用した。室内空気のサンプリングはハウスダスト採取のために掃除機を駆動させる前、あるいは掃除機を駆動させた後 6 時間以上の経過した後に室内空気のサンプリングを開始した。1 家庭におけるハウスダスト及び室内空気のサンプリングは 36 時間以内に実施する

こととした。

### B-3 GC/MSによるハウスダスト抽出液中のSVOCの定量

ハウスダスト抽出液中のフタル酸エステル類の定量には GCMS-QP2010 (島津製作所) を使用し、Rtx-5 カラム (0.18 mm i.d. × 20 m, 0.2 μm) を用いて、80°C - (40°C/min) - 200°C - (20°C/min) - 320°C の昇温条件で分離した。SIM 法で DBP (m/z 149, 223)、BBP (m/z 149, 206)、DEHP (m/z 149, 279) の各イオンを測定し、それぞれの重水素標識化合物添加による内部標準法で定量した (図 3)。

リン酸トリエステル類をはじめとするハウスダスト中 SVOC の網羅的な分析には GC2010 (Shimadzu) 及び TruTOF HT (LECO Japan) を使用した。GC による分析条件として、注入口温度は 280°C、スプリットレスモードで Rxi 5Sill MS カラム (0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚 0.25 μm) に試料を導入し、80°C (2 min.) - (20°C/min.) - 320°C (4 min.) の昇温条件で分離した。尚、He をキャリアガスとして線速度一定モード (30 cm/sec) で分析した。TOF-MS による分析条件として、トランスファーライン温度は 300°C、イオン源温度は 280°C とした。分離された成分は EI 法 70eV でイオン化し、35-500 のイオンを 2600 V で検出した。データ取り込み速度は 20 spectra / second に設定した。TOF-MS は 72 時間ごとに校正を行った。定量及びデコンボリューション解析には ChromaTOF Version 4.23 (LECO Japan) を使用した。

リン酸トリエステル類の定量には GCMS-QP2010 を使用した。分析条件として、注入口温度は 250°C、スプリットレスモードで Rtx-5MS カラム (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm) に試料を導入し、50°C (2 min) - (10°C/min) - 260°C (10 min) の昇温条件で分離した。尚、He をキャリアガスとして線速度一定モード (30 cm/sec) で分析した。トランスファーライン温度は 250°C、イオン源温度は 230°C とした。SIM 法で Trimethyl phosphate (TMP; m/z 79, 110)、Triethyl phosphate (TEP; m/z 99, 155)、Tripropyl phosphate (TPP; m/z 99, 141)、Tributyl phosphate (TBP; m/z 99, 155)、Tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP; m/z 249, 251)、Tris (2-chloroisopropyl) phosphate (TCIPP; m/z 99, 125)、Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP; m/z 99, 191)、Tris(butoxyethyl) phosphate (TBEP; m/z 85, 125)、Triphenyl phosphate (TPHP; m/z 326, 325)、Tris(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP; m/z 99, 113)、Tricrecyl phosphate (TCP; m/z 368, 367) の各イオンを測定した (図 4)。

ピレスロイド系殺虫剤の定量は GCMS-QP2010 を使用し、GC による分析条件として、注入口温度は 250°C、スプリットレスモードで Rtx-5MS カラム (0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚 0.25 μm) に試料を導入し、50°C (2 min.) - (25°C/min.) - 100°C - (10°C/min) - 320°C (5 min.) の昇温条件で分離した。尚、He をキャリアガスとして線速度一定モード (40 cm/sec) で分析した。インターフェイス温度は 250°C、イオン源温度は 230°C とした。SIM 法で Empenthrin

(*m/z* 123, 91, 81)、Profluthrin (*m/z* 109, 177, 67)、Transfluthrin (*m/z* 163, 91, 165)、Metofluthrin (*m/z* 109, 67, 176)、Allethrin (*m/z* 123, 79, 136)、Prallethrin (*m/z* 123, 81, 105)、Imiprothrin (*m/z* 123, 81, 151)、Resmethrin (*m/z* 123, 171, 143)、Phthalthrin (*m/z* 164, 123)、Bifenthrin (*m/z* 181, 166)、Phenothrin (*m/z* 123, 183, 81, 124)、Cyphenothrin (*m/z* 123, 81, 181)、Permethrin (*m/z* 183, 163, 165)、Baythroid (*m/z* 163, 165, 206)、Ethofenprox (*m/z* 163, 135, 164)の各イオンを測定した(定量イオンを下線で示した)(図5)。

#### B-4 加熱脱離 (TD) -GC/ MS による室内空气中ガス状及び粒子状フタル酸エステル類の定量

TD-GC/MS 測定には TDTs-2010 及び GCMS-QP2010 (Shimadzu) を使用した。50 mL/min の流速で He ガスを通しながら吸着管を 300°C に加熱し、脱離した化合物を予め -10°C に冷却した Tenax TA トラップ管に再吸着させた。その後トラップ管を 300°C まで急加熱し、気化したフタル酸エステル類をスプリット比 20 で Rtx-1 カラム (0.32 mm i.d. × 60 m, 1 μm) に導入し、80°C (5 min) - (20°C/min) - 320°C (11 min) の昇温条件で分離した。室内空気サンプリング後の石英フィルターは清浄なガラスチューブに充填し、Tenax TA 捕集管と同様に TD-GC/MS により分析を行った。SIM 法で DBP (*m/z* 149, 223)、BBP (*m/z* 149, 206)、DEHP (*m/z* 149, 279) の各イオンを測定し、それぞれの重水素標識化合物添

加による内部標準法で定量した。

#### B-5 統計的解析手法

結果の解析は Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。

#### C. 研究と考察

##### C-1 フタル酸エステル類

関東近郊の 25 家庭において居間及び寝室のハウスダスト及び室内空気をサンプリングした。今回の調査で対象とした 25 件のうち 1 件については、分析に要する充分量のハウスダストが得られなかったため、結果の解析対象から除外した。

一般家庭 24 件の居間及び寝室のハウスダスト中のフタル酸エステル類濃度の中央値及び最大値はそれぞれ DBP ; 0.014 mg/g Dust、0.12 mg/g Dust、BBP ; 0.0011mg/g Dust、0.017 mg/g Dust、DEHP ; 0.86 mg/g Dust、5.3 mg/g Dust であった (図 6)。24 件の居間及び寝室計 48 室の室内空气中的 DBP の中央値は 0.10 μg/m<sup>3</sup> (ガス状)、0.31μg/m<sup>3</sup> (粒子状)、最大値は 0.61μg/m<sup>3</sup> (ガス状)、0.99μg/m<sup>3</sup> (粒子状) であった。DEHP に関してはそのほとんどが粒子状で存在し、中央値は 0.16μg/m<sup>3</sup>、最大値は 1.05μg/m<sup>3</sup> であった。BBP はガス状及び粒子状いずれも定量下限値未満であった (図 7)。尚、室内空气中濃度とハウスダスト中濃度にはいずれのフタル酸エステル類についても相関関係は認められなかった。

各経路からのフタル酸エステル類摂取