

201524015A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

気道障害性を指標とする室内環境化学物質の  
リスク評価手法の開発に関する研究

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神野 透人

平成 28 (2016) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

気道障害性を指標とする室内環境化学物質のリスク評価手法の 開発に関する研究	・ ・ ・	1
神野 透人		

### II. 分担研究報告書

1. 気道内挙動の <i>in vitro/in silico</i> 予測	・ ・ ・	10
埴岡 伸光、磯部 隆史		
2. 気道内挙動の <i>in vitro/in silico</i> 予測	・ ・ ・	17
伊藤 一秀		
3. 気道障害性の <i>in vitro</i> 評価	・ ・ ・	38
香川(田中) 聡子、大河原 晋、神野 透人、浅井 理香、野中 志保		
4. 気道障害性の <i>in vitro</i> 評価	・ ・ ・	45
河上 強志、伊佐間 和郎		
5. 気道障害性にかかる情報収集及び優先順位判定	・ ・ ・	59
小野 敦、山口 治子		
6. 気道障害性にかかる情報収集及び優先順位判定	・ ・ ・	79
東 賢一		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・ ・ ・	140
---------------------	-------	-----

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# 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)  
総括研究報告書

気道障害性を指標とする室内環境化学物質のリスク評価手法の開発に関する研究

研究代表者 神野 透人 名城大学薬学部 教授

研究要旨: 現在、厚生労働省のシックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会において、室内濃度指針値の改定あるいは対象化合物の追加に関する議論が進められている。第 17 回検討会 (平成 25 年 8 月 1 日) において事務局から提案された「室内濃度指針値見直しスキーム」によれば、全国実態調査等に基づく「初期曝露評価」に引き続いて既存のハザード情報を活用して「初期リスク評価」を行うこととされている。この「初期リスク評価」は、その評価結果を受けて詳細曝露評価および詳細リスク評価が実施されるか否かが判断される重要なステップであるが、室内環境化学物質の「初期リスク評価」に資するハザード情報が比較的限られていることから、この段階が指針値策定作業において律速となることが危惧されている。このような背景から、本研究では気道障害性に着目し、「ハザード情報の網羅的な収集ならびに不足情報の補完方法の確立」を目的として 3 つのサブテーマを設定して研究を実施した。1) 気道内挙動の *in vitro/in silico* 予測では、化学物質の物性および室内空気中濃度から気道における障害部位やそこでの曝露濃度を予測するための数値モデル開発を目的として、実験動物およびヒトの数値気道モデル構築、ならびに気道内における代謝転換予測モデルの構築を進めた。2) 気道障害性の *in vitro* 評価では、気道刺激性の予測法として Transient Receptor Potential (TRP) チャネルを標的とする化学物質のスクリーニング法、ならびに気道感作性の予測法として Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) によるスクリーニング法の確立を行った。3) 気道障害性にかかる情報収集および優先順位判定では、GHS 分類評価結果に基づいて、気道障害性 (気道刺激性および気道感作性) 分類が付された物質を検索し、さらにヒトにおける気道障害性のエビデンスを考慮に入れて候補化合物の選定を行った。また、室内環境化学物質に関して、刺激性や感作性、一般毒性、神経毒性、免疫毒性、生殖発生毒性、発がん性等に関する有害性情報およびこれらの有害性に関する量反応関係に関する科学的知見が記載された国際機関や諸外国の評価文書等を網羅的に収集するとともに、各物質の有害性情報を文献データベースで検索し、特に各物質の評価値の導出に必要なエンドポイントおよび NOEL や LOAEL 等に関する情報収集を行った。これらの研究の結果として、気道内挙動に影響を及ぼす異物代謝酵素の気道内分布の特定、*in silico* 解析に必要な数値気道モデル (ラット、イヌ、サルおよびヒト) の確立、3 種のヒト TRP チャネル (TRPV1、TRPA1、TRPM8) およびマウス TRPA1 チャネル安定発現細胞株の樹立と細胞内カルシウム濃度を指標とする High-throughput Screening 系の確立、DPRA 法の確立とフマル酸ジエステル類およびマレイン酸ジエステル類の感作性評価、気道刺激の蓋然性が比較的高い GHS 分類化合物 (74 物質) の選定、室内空気全国調査で高濃度/高頻度で検出された TXIB や 2-Ethylhexanol などの化学物質の毒性情報収集ならびに初期リスク評価結果の提示など、貴重な研究成果が得られた。今後、これらの知見および要素技術を活用し、要検討化合物のリストをシックハウス (室内空気汚染) 問題に関する検討会に提示することによって、室内濃度指針値策定/改訂作業の一層の加速化に貢献できるものと期待される。

研究分担者: 埴岡 伸光 (横浜薬科大学薬学部 教授)、伊藤 一秀 (九州大学大学院総合理工学研究院 准教授)、香川 聡子 (横浜薬科大学薬学部 教授)、河上 強志 (国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官)、小野 敦 (国立医薬品食品衛生研究所 室長)、東 賢一 (近畿大学医学部 准教授)

研究協力者: 磯辺 隆史 (横浜薬科大学薬学部)、大河原 晋 (九州保健福祉大学薬学部)、浅井 理香 (名城大学薬学部)、野中 志保 (名城大学薬学部)、伊佐間 和郎 (国立医薬品食品衛生研究所)、山口 治子 (国立医薬品食品衛生研究所)

## A. 目的

1990年代に、建材等に由来する化学物質による健康被害、いわゆるシックハウス症候群が顕在化したことから、1997~2002年に揮発性/準揮発性有機化合物13物質および総揮発性有機化合物(TVOC)にそれぞれ室内濃度指針値、暫定目標値が設定された。その後10年余りが経過し、代替溶剤等の使用による新たな室内空気汚染や準揮発性有機化合物と呼ばれる比較的沸点の高い可塑剤や難燃剤、バイオサイドによる室内環境汚染が懸念され、さらには2010年に発行されたWHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutantsに収録された未規制物質への対応を図る必要が生じたことから、2012年9月に「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会」(以下、シックハウス検討会)が約10年ぶりに開催された。その後、現在までに9回の検討会を通じて室内濃度指針値の見直しあるいは対象物質の追加に関する議論が進められており、今後は既存のハザード情報に基づく「初期リスク評価」、さらには「優先化合物リスト作成」、「詳細リスク評価」を経て最終的に室内濃度指針値の見直し等が行われる運びとなっている。

しかし、ここで問題となるのが、室内環境化学物質の「初期リスク評価」に資するハザード情報は比較的限られていることであり、この段階が指針値の策定あるいは改定作業

において律速となることが危惧されている。そこで、本研究では「ハザード情報の網羅的な収集ならびに不足情報の補完方法の確立」を目的として、1) 気道内挙動の *in vitro/in silico* 予測、2) 気道障害性の *in vitro* 評価、および3) 気道障害性にかかる情報収集および優先順位判定、の3つのサブテーマを設定して研究を実施した。

## B. 研究方法

### B-1 気道内挙動の *in vitro/in silico* 予測

ラット、イヌ、サルおよびヒト(2種類)の計5種類の上気道を対象とした数値気道モデルを作製した。数値気道モデルの基本的な作成手順はいずれの場合も同様であり、コンピュータ断層撮影法(CT)による3次元画像データ(DICOM)を基に流体解析用のメッシュ生成を行った。ヒトモデルはBMI約22程度の平均体型の男性非喫煙者2名(アジア人および西洋人)のCTデータを用いて作成した。一連のCT画像データ(DICOMデータ)より気道部分を抽出し、Mimics 4.0(Materialise)でCT画像の3次元化、ついで3-matic(Materialise)で3次元化STLのスムージングならびに流体ジオメトリの作成を行い、最終的にICEM(ANSYS)に読み込んで数値流体解析用メッシュデータを生成した。ヒトモデルについては上気道を対象としたモデルに加え、気管支第四分岐程度までの下気道も再現した詳細モデルを合わせて作成した。同様の手順で、経気道曝露試験に用いられる代表的な実験動物であるラット(Brown Norway)、イヌ(Beagle)、サル(Macaca fascicularis)についてもCTデータを基に数値気道モデルを作成した。尚、イヌの鼻腔を対象とした流体解析用の気道モデル作成は前例が無く、本研究で作成したモデルが世界初である。気道内粘膜上皮表面に形成される境界層粘性底層までを解像するため、低Re型k-εモデル(Abe Kondoh Naganoモデル)による解析を実施した。計算アルゴリズムとしてSIMPLE法、移流項の差分スキ-

ムとして二次精度風上差分、その他は中心差分を用いた。鼻呼吸を想定して気道端部（鼻腔開口面とは逆側の開口面）に5段階の平均呼吸量（風量）を与え、定常解析（吸気時）を行った。

一方、気道での揮発性有機化合物の挙動に対する異物代謝酵素の影響を明らかにする目的で、鼻粘膜、気管および気管支粘膜における Cytochrome P450s (CYPs) および Carboxylesterases (CESs) の発現について文献による調査を実施するとともに、Texanol および TXIB の加水分解に関与する CES 分子種について、予備的な検討を実施した。

## B-2 気道障害性の *in vitro* 評価

ヒトの気道上皮、肺および気道の知覚神経末端で発現する侵害受容チャンネルとして TRPV1 および TRPA1 の他に TRPM8 が同定されていることから、本研究ではまずヒト前立腺 cDNA からクローニングした TRPM8 を安定的に発現する Flp-in 293 細胞株を新たに樹立した。ついで、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を指標とする High-throughput Screening 系を確立し、2-Ethylhexanol、Texanol および TXIB による侵害受容チャンネルの活性化について検討を行った。また、TRPA1 についてはヒトとげっ歯類の間の種差について検討を行う目的で、マウス TRPA1 についても同様の手法で安定発現細胞株を樹立した。

一方、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) 法による室内環境化学物質の気道感作性スクリーニング試験を確立する目的で、まず OECD テストガイドライン TG 442C で規定される Proficiency Test (技能試験) を実施した。試験は、2 種類のペプチド（システインペプチド・リジンペプチド）と被験物質とを所定のモル濃度比で混和して 25℃で 24±2 時間暗所で静置し、その溶液を HPLC/PDA で測定してペプチド減少率を算出した。この Proficiency Test に適合していることを確認した後に、同法を用いて、2-ethylhexanol 等の室内環境化学物質 23 物質について感作性の評価を行った。

## B-3 気道障害性にかかる情報収集および優先順位判定

我が国の GHS 分類評価結果 (JP-GHS) をもとに気道障害性（気道刺激性および気道感作性）分類がされた物質の検索を行った。検索対象は、現在、公開されている平成 25 年度までの JP-GHS 分類評価結果とした。JP-GHS 分類結果は、物質ごとにエクセルシートとして公開されている。そこで、まず、製品評価技術基盤機構ホームページより日本政府による GHS 分類結果ファイルを入手し、GHS 分類項目のうちヒト健康に対する有害性 10 項目について横断検索可能な簡易データベースを構築した。構築したデータベースをもとに気道障害性評価の優先順位付けに有用な項目として気道刺激性、気道感作性の分類が示された物質の検索を行った。さらに生活環境中での曝露の可能性が高い物質に絞り込むため、常温における物質性状の検索を行い、常温で気体である物質を優先順位の高い物質として抽出した。抽出された物質については、JP-GHS 分類で示されている分類根拠をもとにヒトにおける気道障害性のエビデンスについて検索を行った。さらにスクリーニング対象物質の網羅性を補完するため日本産業衛生学会における許容濃度等の勧告および ACGIH における評価結果が示されている物質のうち JP-GHS 分類が行われていない物質の検索を行った。

一方、諸外国の室内空気質規制状況については、国際機関や国内外の室内環境規制に関する報告書、関連学会の資料、関連論文をインターネットおよび文献データベースで調査した。近年、主だった活動が見受けられた世界保健機関欧州地域事務局 (WHO 欧州)、ドイツ、フランス、カナダを主な調査対象国とした。また、室内環境化学物質に関して、刺激性や感作性、一般毒性、神経毒性、免疫毒性、生殖発生毒性、発がん性等に関する有害性情報およびこれらの有害性に関する量反応関係に関する科学的知見が記載された国際機関や諸外国の評価文書等を網羅的に収集するとともに、PubMed や TOXLINE 等

のデータベースについて各物質の有害性情報を検索し、特に各物質の評価値の導出に必要なエンドポイントおよび NOEL や LOEL 等に関する情報収集を行った。平成 27 年度は、国立医薬品食品衛生研究所におけるこれまでの全国調査で高頻度/高濃度で検出された 2-Ethylhexanol、Texanol、TXIB、環状シロキサソール類、グリコール類、酢酸エステル類を対象に、気道障害性等に係る有害性や量反応関係等に関する情報を収集した。得られた有害性情報から有害性評価を行い、健康リスク評価値 (RfC: Reference Concentration) を導出した。RfC は、Critical effect level の影響濃度 (NOEL や LOEL) に対して、反復曝露から連続曝露への補正や不確実係数の適用を行って導出した。このようにして得られた RfC 値と、2011 年度から国立医薬品食品衛生研究所で実施している全国調査結果をもとに、曝露余裕度 (MOE: Margin of Exposure) を算出して初期リスク評価を行った。

### C. 結果と考察

#### C-1 気道内挙動の *in vitro/in silico* 予測

鼻粘膜、気管および気管支粘膜における CYPs および CESs の発現について調査をおこなった結果、鼻粘膜では CYP1B1、CYP2A6、CYP2A13、CYP2B6、CYP2C、CYP2F1、CYP2J2、CYP2S1 および CYP3A4、気管支粘膜では CYP1A1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C18、CYP2E1 および CYP3A5 など多様な Cytochrome P450 分子種が発現していることが明らかになった。また、エステル型の化合物の挙動に大きな影響を及ぼすと考えられる CESs については、鼻粘膜で CES1 および CES2、気管支粘膜では CES1 のみが発現していることが明らかになった。今後、異種的に強制発現させた異物代謝酵素の Cocktail を用いることによって、室内環境化学物質の鼻粘膜および気道における挙動予測が可能になるものと期待される。

ラット、イヌ、サルおよびヒト (2 種) の

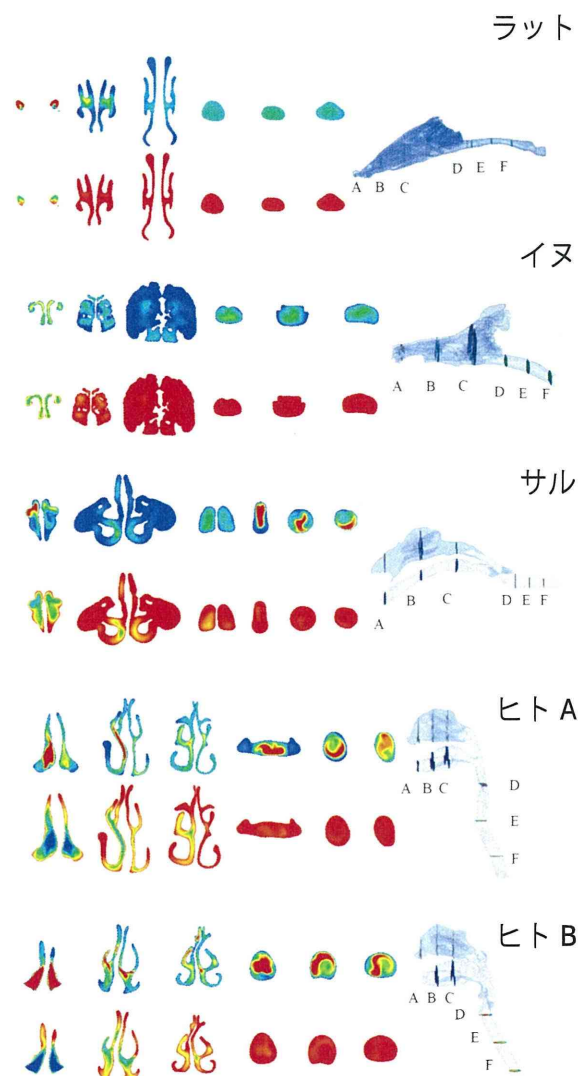


図 1 数値気道モデルによる上気道内の流れ場・温度場の解析結果

計 5 種類の数値気道モデルを作製した。各モデルについて、代表的な断面、ならびに安静時呼吸量を想定した流れ場および温度場の解析結果を図 1 に示した。尚、上段は流れ場解析結果 (スカラ風速分布)、下段は温度場解析結果である。各モデルとも鼻腔内には明確な不均一性が確認された。特に、粘膜上皮表面温度と空気温度の温度差が最大となる鼻孔近傍の対流熱伝達量が大きく、空気が鼻腔内を通過するにしたがって混合が促進され、空気温度が深部温度と平衡に達することが明らかとなった。

ヒトモデルに関しては、上気道に加えて気管支第四分岐まで幾何形状を再現した詳細モデルを 2 種類作製し、鼻呼吸を想定した定

常状態 (吸気時) を仮定して気道内流れ場、温度場、粒子拡散場の解析を行った。下気道に着目すると、左右の鼻腔を通過した空気が混合して咽頭部で壁面衝突するため、この領域で相対的に高い対流熱フラックス域が確認された。また、CHTC (Convective Heat Transfer Coefficient、対流熱伝達率) の分布についてみると、呼吸量増加にともなってCHTC の値が増加する線形関係の傾向が認められ、概算として、熱・物質輸送効率に20%程度の個体差が存在すると考えられる解析結果が得られた。

### C-2 気道障害性の *in vitro* 評価

気道で発現する侵害受容チャンネルの一つであるヒト TRPM8 (hTRPM8) の安定発現細胞株を樹立し、TXIB、Texanol および 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol について hTRPM8 に対する Agonist 作用を検討した結果、いずれの化合物にも活性化能は認められなかった。次に、室内環境化学物質による TRPA1 活性化の種差を明らかにする目的で、ヒトおよびマウス TRPA1 (それぞれ hTRPA1、mTRPA1) 発現系を用いて、タバコ煙中のアルカロイド類である Nicotine ならびにその脱メチル化体である Nornicotine について hTRPA1 および mTRPA1 に対する活性化能を比較した。その結果、Nicotine および Nornicotine はいずれもマウスおよびヒトの TRPA1 を活性化したが、mTRPA1 の方が hTRPA1 よりも EC<sub>50</sub> 値が小さく、mTRPA1 の

方が hTRPA1 よりも Nicotine および Nornicotine に対する感受性が高いことが明らかになった。これらの結果は、TRPA1 を介する侵害刺激に関して、毒性実験に繁用されるマウスとヒトの間に種差が存在することを示しており、げっ歯類で得られた気道刺激性にかかる結果をヒトに外挿する際の妥当性について化合物ごとに検証する必要があるものと考えられる。

室内空気汚染全国実態調査で高頻度・高濃度での検出が報告されているグリコール類、グリコールエーテル類とその類縁化合物や、欧州で接触皮膚炎発症時にシックハウス様症状を併発したとの報告のある Dimethyl Fumarate とその類縁化合物など 23 化合物について DPRA により評価した。その結果、Dimethyl、Diethyl および Dibutyl Fumarate ならびにマレイン酸ジエステル類 6 化合物が陽性と分類され、それ以外の化合物はすべて陰性と分類された (表 1)。Dimethyl Fumarate には強い感作性が知られており、その類縁化合物であるフマル酸ジエステル類及びマレイン酸ジエステル類も Dimethyl Fumarate に交叉反応性を示すとともに、それら自体も感作性を有していることが知られている。本研究でも、これらの Dimethyl、Diethyl および Dibutyl Fumarate については、陽性と分類された。しかしながら、皮膚感作性が報告されている Diethylhexyl Maleate およびその異性体である Diethylhexyl Fumarate については陰性と分類された。DPRA では、ペプチドと被

表 1 マレイン酸ジエステル類およびフマル酸ジエステル類の DPRA 評価結果

Chemicals	Depletion (%)			Prediction	Lys/Cys
	Cysteine	Lysine	Mean		
Dimethyl maleate	100	83	91.6	Positive (High)	0.83
Diethyl maleate	100	81	90.3	Positive (High)	0.81
Dibutyl maleate	100	36	68.2	Positive (High)	0.36
Diethylhexyl maleate	5.45	- 0.32	2.56	Negative	-
Dimethyl fumarate	100	46.1	73.1	Positive (High)	0.46
Diethyl fumarate	100	46.2	73.1	Positive (High)	0.46
Dibutyl fumarate	100	10.7	55.3	Positive (High)	0.11
Diethylhexyl fumarate	8.6	0.5	4.6	Negative	-



験物質との反応を水系で行うため、疎水性化合物については正確に評価することが難しいとされている。Diethylhexyl Maleate および Diethylhexyl Fumarate はオクタノール・水分配係数が他の化合物に比べて大きく、これが DPRA で偽陰性の結果が得られた一因であると推察される。

### C-3 気道障害性にかかる情報収集および優先順位判定

2820 物質の JP-GSH 分類評価結果について、気道刺激性に関する項目として、健康に対する有害性のうち項目 8：特定標的臓器毒性 (単回曝露) において区分 3 (気道刺激性) もしくは区分 1 (呼吸器) と分類された物質を抽出した結果、1075 物質が抽出された。一方、気道感作性については、健康に対する有害性のうち項目 4：呼吸器感作性について区分 1 と分類された物質を抽出した結果、96 物質が該当した。また、気道感作性 96 物質のうち 86 物質については気道刺激性物質にも分類されており、気道感作性のみで分類された物質は 10 物質であった。次に室内環境汚染の可能性の高い物質として、常温における物質性状について GHS 分類情報をもとに気体であるとされている物質に絞り込みを行った結果、気道刺激性 131 物質、気道感作性 4 物質が抽出された。ただし、気道感作性分類により抽出された 4 物質はいずれも気道刺激性により抽出された 131 物質に含まれていた。抽出された常温で気体の気道刺激性物質 131 物質のうち 74 物質については、JP-GHS 分類根拠においてヒトでのエビデンスが記載されており、これらについては室内環境汚染評価の優先順位の高い物質と考察された。

WHO、ドイツ連邦環境庁、フランス環境労働衛生安全庁 (ANSES) およびカナダ保健省の室内空気質ガイドライン/室内空気指針値に関する情報を収集した結果、ドイツ連邦環境庁は、2015 年までに 49 の物質または物質群に対して室内空気質ガイドラインを定めており、2014 年から 2015 年の間に 1-

Butanol、1-Methyl-2-Pyrrolidone (NMP)、Ethyl Acetate、Trichloroethylene、2-Butanone Oxime (Methyl Ethyl Ketoxime) および 2-Chloropropane の 6 物質に新たに室内濃度指針値を策定していることが判明した。さらに、日本の実態に基づいた健康リスクベースの優先取組リストを作成するために、これまでの全国調査で高頻度・高濃度で検出された揮発性有機化合物を中心に有害性情報を収集し、初期リスク評価を行った。その結果、MOE が小さく詳細な調査が必要 (優先度 A) と判定された物質は、既築住宅では夏期の 2-Ethylhexanol、Decamethylcyclpentasiloxane (D5)、Ethyl Acetate、新築住宅では冬期の TXIB と Ethyl Acetate であった。

### D. 結論

本研究では、室内濃度指針値策定に必要なハザード情報の網羅的な収集、ならびに不足情報の補完方法の確立を目的として、1) 気道内挙動の *in vitro/in silico* 予測、2) 気道障害性の *in vitro* 評価、および 3) 気道障害性にかかる情報収集および優先順位判定、の 3 つのサブテーマを設定して研究を実施した。1) の研究課題では、鼻粘膜および気管で発現する異物代謝酵素の特定、ならびに数値気道モデルの作製を行った。これらの成果によって、室内環境化学物質の気道内代謝変換による物性の変化を考慮に入れた精緻な気道モデルの構築が可能となった。2) の研究課題では、気道で発現する主要な侵害受容チャネル (TRPV1、TRPA1 および TRPM8) について High-throughput Screening の確立が完了し、室内環境化学物質による気道刺激の評価系が完成した。また、DPRA 法による感作性 High-throughput Screening 系の構築も完了し、重要な室内環境汚染物質の一つであるフマル酸エステル類の評価に実際に適用して有用性を検証した。3) の研究課題では、気道刺激性をはじめとする室内環境化学物質の有害性に関する広範な情報を収集し、室内濃度指針値策定あるいは室内空気汚染全国調査の候

補化合物を選定する上で、きわめて有用な情報が得られた。

今後、これらの知見および要素技術を活用して要検討化合物のリストを作成し、シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会に提示することによって、室内濃度指針値の策定/改訂作業の一層の加速化が期待される。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Hanioka N., Kinashi Y., Tanaka-Kagawa T., Isobe T., Jinno H.: Glucuronidation of mono(2-ethylhexyl) phthalate in humans: roles of hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases. *Arch Toxicol, in press*. doi: 10.1007/s00204-016-1708-9.
- 2) Hanioka N., Isobe T., Kinashi Y., Tanaka-Kagawa T., Jinno H.: Hepatic and intestinal glucuronidation of mono(2-ethylhexyl) phthalate, an active metabolite of di(2-ethylhexyl) phthalate, in humans, dogs, rats and mice: an in vitro analysis using microsomal fractions. *Arch Toxicol, in press*. doi: 10.1007/s00204-015-1619-1.
- 3) Isobe T., Kofuji K., Okada K., Fujimori J., Murata M., Shigeyama M., Hanioka N., Murata Y.: Adsorption of histones on natural polysaccharides: The potential as agent for multiple organ failure in sepsis. *Int J Biol Macromol*, 2016, 84:54–57.
- 4) Kishi N., Takasuka A., Kokawa Y., Isobe T., Taguchi M., Shigeyama M., Murata M., Suno M., Hanioka N.: Raloxifene glucuronidation in liver and intestinal microsomes of humans and monkeys: contribution of UGT1A1, UGT1A8, and UGT1A9. *Xenobiotica*, 2016, 46(4):289–295.
- 5) Miyake Y., Hirose R., Isobe T., Hanioka N.: Molecular cloning and functional analysis of minipig UDP-glucuronosyltransferase 1A6. *Xenobiotica*, 2016, 46(3):193–199.
- 6) Mukai M., Isobe T., Okada K., Murata M., Shigeyama M., Hanioka N.: Species and sex differences in propofol glucuronidation in liver microsomes of humans, monkeys, rats and mice. *Pharmazie*, 2015, 70(7):466–470.
- 7) Nguyen Lu Phuong and Kazuhide Ito : Investigation of Flow Pattern in a Realistic Replica Model of Human Respiratory Tract using PIV : *Building and Environment*, 94, 2015, pp504-515.
- 8) Nguyen Lu Phuong, Masato Yamashita, Sung-Jun Yoo, Kazuhide Ito, Prediction of convective heat transfer coefficient of human upper and lower airway surfaces in steady and unsteady breathing conditions, *Building and Environment*, 100, 2016, pp172-185.
- 9) Takeuchi S., Tanaka-Kagawa T., Saito I., Kojima H., Jin K., Satoh M., Kobayashi S., Jinno H.: Differential determination of plasticizers and organophosphorus flame retardants in residential indoor air in Japan. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, Jun 24. doi:10.1007/s11356-015-4858-z
- 10) Kawakami T., Isama K., Ikarashi Y.: Survey of isothiazolinones and other preservatives in household wet tissue products in Japan, *J. Environ. Chem.*, 25, 207-214, 2015.
- 11) Hirata-Koizumi M., Fujii S., Hina K., Matsumoto M., Takahashi M., Ono A., and Hirose A., Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in rats: perfluorohexadecanoic acid and perfluorotetradecanoic acid, *Fundam Toxicol Sci.*, 2(4), 177-190, 2015.
- 12) Ono A., Kobayashi K., Serizawa H., Kawamura T., Kato H., Matsumoto M., Takahashi M., Hirata-Koizumi M., Matsushima Y. and Hirose A., A repeated

dose 28-day oral toxicity study of  $\beta$ -bromostyrene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2015.2, 191-200

- 13) Kato H., Fujii S., Takahashi M., Matsumoto M., Hirata-Koizumi M., Ono A. and Hirose A., Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluorododecanoic acid in rats. *Environ Toxicol*, 2015.30, 1244-1263
- 14) Azuma K, Tanaka-Kagawa T, Jinno H. Health risk assessment of inhalation exposure to 2-ethylhexanol, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate, and texanol in indoor environments. Proceedings of the 14th international conference of Indoor Air Quality and Climate, 7 pages, *in press*, 2016.

#### 学会発表

- 1) 埴岡 伸光, 磯部 隆史, 香川(田中) 聡子, 神野 透人: フタル酸モノ-2-エチルヘキシルの肝及び小腸ミクロゾームによるグルクロン酸抱合反応の種差, 日本薬学会第136年会 (2016.3)
- 2) 磯部 隆史, 小藤 恭子, 村田 慶史, 埴岡 伸光: アルギン酸ゲルビーズの敗血症性多臓器不全予防への利用に関する検討, 日本薬学会第136年会 (2016.3)
- 3) 磯部 隆史, 埴岡 伸光, 小藤 恭子, 村田 慶史: 天然高分子の敗血症性多臓器不全予防への応用, 第24回ポリマー材料フォーラム (2015.11)
- 4) 埴岡 伸光, 岸 直樹, 高 賀茜, 古川 由貴, 磯部 隆史, 須野 学: ヒト及びカニクイザルにおけるラロキシフェンのグルクロン酸抱合反応: UGT1A1, UGT1A8 及び UGT1A10 の役割, 日本薬物動態学会第30会年会 (2015.11)
- 5) 光宗 航基, 伊藤 一秀: 齧歯類を対象とした数値気道モデル開発と鼻腔内流れ場・温度場の数値解析: 日本建築学会大会学術講演梗概集, 2015.9, D-2, pp763-764
- 6) 山下 真登, Sung-Jun Yoo, 伊藤 一秀: ヒト数値気道モデルを対象とした熱・エア

ロゾル粒子輸送解析: 日本建築学会九州支部研究発表会・研究報告, 2016.3, pp249-252

- 7) 光宗 航基, 久我 一喜, 山下 真登, Sung-Jun Yoo, 伊藤 一秀: ラット・イヌ・サル・ヒトを対象とした上気道内対流熱伝達率解析: 日本建築学会九州支部研究発表会・研究報告, 2016.3, pp257-260
- 8) 河上 強志, 伊佐間 和郎, 香川(田中) 聡子, 神野 透人: 家庭用水性スプレー製品中のグリコール類及びグリコールエーテル類等の分析, 24 回環境化学討論会 (2015.6)
- 9) 河上 強志, 伊佐間 和郎, 五十嵐 良明: ウェットティッシュ製品に含まれる防腐剤調査, 第45回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会・学術大会 (2015.11)
- 10) Jinno H, Tanaka-Kagawa T: Revision of the Indoor Air Quality Guidelines in Japan: Consumer Products as Sources of Air Pollution in Indoor Environment. *AsiaTox* 2015 (2015.6)
- 11) 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 神野 透人: 生活環境化学物質による TRP イオンチャネルの活性化, 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.6)
- 12) 田原 麻衣子, 真弓 加織, 五十嵐 良明, 埴岡 伸光, 香川 (田中) 聡子, 神野 透人: COSMO-RS 法による空気-鼻粘液分配係数の予測, 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.6)
- 13) 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 神野 透人: 金属化合物によるヒト侵害刺激受容 TRP イオンチャネルの活性化, メタルバイオサイエンス研究会 2015 (2015.8)
- 14) 香川 (田中) 聡子, 田原 麻衣子, 上村 仁, 斎藤 育江, 武内 伸治, 神野 透人: 室内環境中の粒子状物質の日内変動とその組成に関する研究, フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー (2015.9)
- 15) 河上 強志, 伊佐間 和郎, 香川(田中) 聡子, 神野 透人: 家庭用芳香剤などのスプレー製品に含まれるグリコールエーテル

等の実態調査, 第52回全国衛生化学技術  
協議会年会 (2015.12)

- 16) Nishimura T., Hirata-Koizumi M., Yamada T., Kawamura T., Ono A., Hirose A., and Ema M, Derivation of the health advisory guidance values for sub-acute exposure of drinking water, Society of Toxicology 55th Annual meeting, New Orleans, USA, March 2016.
- 17) Hirose A., Hirata-Koizumi M., Kawamura T., Matsumoto M., Takahashi M., Nishimaki-Mogami T., Nishimura T., Ema M., and Ono A., Derivation of subacute reference doses for drinking water quality management, The 51st EUROTOX2015, Porto, Portugal, September 2015.
- 18) Ono A., Matsumoto M., Takahashi M., Kawamura T., Hirata-Koizumi M., and Hirose A., Is a 14-day dose setting study able to predict its 28-day repeated dose toxicity?, The 51st EUROTOX2015, Porto, Portugal, September 2015.
- 19) Azuma K, Tanaka-Kagawa T, Jinno H. Health risk assessment of inhalation exposure to 2-ethylhexanol, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate, and texanol in indoor environments. 14th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Ghent, Belgium, 3–8 July, 2016. (in acceptance)
- 20) Azuma K, Tanaka-Kagawa T, Jinno H. Health risk assessment of inhalation exposure to cyclic dimethylsiloxanes, glycols, and acetic esters in indoor environments. 28th Conference of the International Society for Environmental Epidemiology, Rome, Italy, 1–4 September, 2016. (in acceptance)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得  
なし  
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）  
分担研究報告書

気道障害性を指標とする室内環境化学物質のリスク評価手法の開発に関する研究

気道内挙動の *in vitro/in silico* 予測

研究分担者	埴岡 伸光	横浜薬科大学	教授
研究協力者	磯部 隆史	横浜薬科大学	講師

研究要旨

揮発性有機化合物による気道粘膜刺激症状はシックハウス症候群の主訴の一つである。室内空気中のテキサノール及び TXIB などの揮発性有機化合物濃度と気道における局所的な濃度を関連づけるためには、気道内での気流の状態、気道表面における空気と粘液との間の分配係数、粘膜での薬物代謝酵素による変換など、気道内での挙動を適切に見積もる必要がある。気道の中でも鼻腔から気管支は揮発性有機化合物により刺激を受ける部位として知られており、揮発性有機化合物の鼻粘膜などにおける代謝を明らかにすることは局所的な暴露濃度を推定する上で重要となる。そこで我々は、気道における異物代謝を明らかにする目的で、鼻粘膜、気管及び気管支粘膜の異物代謝酵素発現パターンについて検討を行った。鼻粘膜で遺伝子の発現が確認されたのは主に CES2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2A13、CYP2B6、CYP2C、CYP2F1、CYP2J2、CYP2S1、CYP3A 及び CYP4B1 の 11 種類であった。気管で遺伝子が発現している酵素は、鼻粘膜に比べて少なく主に CES1、CES2、CES3、CYP2A6、CYP2A13、CYP2B6 及び CYP2S1 の 7 種類であった。気管支粘膜では主として、CES1、CYP1A1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C18、CYP2E1、CYP3A5 及び CYP4B1 の 9 種類であった。CES が鼻粘膜、気管及び気管支粘膜でそれぞれ主として存在する分子種が異なるのに対し、CYP は僅かではあるものの気道において共通して存在する分子種も認められることが明らかとなった。気道粘膜刺激症状への関与が予測されるテキサノール及び TXIB の局所暴露濃度を推定する上で、CES 及び CYP の気道における局在性を考慮した代謝反応の速度論的な解析を行うことの重要性が示唆された。

A. 研究目的

1990 年代に建材等から発生する化学物質などによる健康被害（シックハウス症候群）が顕在化し、13 種類の室内空気汚

染物質に対する室内濃度指針値および総揮発性有機化合物（TVOC）の暫定目標値が設けられた。その後、10 年余りが経過し、現在では室内濃度指針値の見直しお

よび対象物質の追加に関する議論が進められており、研究代表者らは全国規模の室内環境汚染物質の実態調査を行い、新たに 2-エチルヘキサノール、テキサノール、TXIB、環状シロキサン類、グリコールエーテル類及び酢酸エステル類による汚染実態を明らかにした。これらの揮発性有機化合物の室内空気中の濃度と気道における局所的な濃度を関連づけるためには、気道内での気流の状態、気道表面における空気と粘液との間の分配係数、粘膜での薬物代謝酵素による変換など、気道内での挙動を適切に見積もる必要がある。気道の中でも鼻腔から気管支は揮発性有機化合物により刺激を受ける部位として知られており、揮発性有機化合物の鼻粘膜などにおける代謝を明らかにすることは局所的な暴露濃度を推定する上で重要となる。本研究において我々は、ヒトの気道における異物代謝酵素の発現パターンについて検討を行い、鼻腔上皮細胞での CES および CYP の発現分子種を明らかにするとともに、テキサノール及び TXIB の加水分解反応について速度論的な評価を実施する。

## B. 研究方法

ヒトの鼻粘膜、気管および気管支粘膜における異物代謝酵素の発現に係る主立った論文を調査し、テキサノール及び TXIB の気道における加水分解反応を速度論的に評価する上で重要となる CES 及び CYP 分子種を検討した。

## C. 結果

気道内での加水分解反応に関与する主

な CES 分子種の組織分布は、複数のグループによって研究がなされていた。Zhang らの免疫組織化学的研究と Sasagawa らの代謝学的な調査によって、鼻粘膜における発現及び活性が明らかにされた分子種は CES2 であった。

気管における CES の発現については、Sanghani らが CES の生体内局在性をまとめた論文中で報告しており、主に発現していたのは CES1、CES2 及び CES3 の遺伝子であった。

気管支で発現がみられる CES 分子種を研究しているグループもあるが、テキサノール及び TXIB など揮発性有機溶媒の粘膜刺激症状への影響を調査する上では、気管支全体としてよりも粘膜部分での異物代謝酵素の発現が重要と考えられる。気管支粘膜での異物代謝を研究している Leclerc らの報告によると、気管支粘膜で遺伝子が発現していた主な分子種は CES1 であった。

CYP については、Ding らがそれまでに報告された各組織における CYP 遺伝子の発現状況を総説として報告しており、そのなかで鼻粘膜における異物代謝の重要性を述べると共に、鼻粘膜で遺伝子発現がみられる 6 種類の CYP 分子種 (CYP2A6、CYP2A13、CYP2B6、CYP2C、CYP2J2、CYP3A) を明らかにした。その後、Zhang らの研究によって新たに CYP1B1、CYP2F1、CYP4B1 の遺伝子についても鼻粘膜で発現していることが示された。Saarikoski らのグループは *in situ* ハイブリダイゼーション及び免疫組織化学的な検出方法で各組織における CYP2S1 の遺伝子ならびにタンパク質の発現状態を調

べ、鼻粘膜における CYP2S1 の発現を明らかにした。これらの報告より、鼻粘膜で遺伝子の発現が確認されている主な分子種は、CYP1B1、CYP2A6、CYP2A13、CYP2B6、CYP2C、CYP2F1、CYP2J2、CYP2S1、CYP3A 及び CYP4B1 であった。

気管での CYP 遺伝子の発現については、Ding らが総説を報告しており、遺伝子の発現がみられたのは主に CYP2A6、CYP2A13、CYP2B6 及び CYP2S1 であった。

気管支粘膜に関しては、Mace らと Leclerc らが CYP 遺伝子の発現を調べており、気管支粘膜上で遺伝子の発現が主に認められたのは、CYP1A1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C18、CYP2E1、CYP3A5 及び CYP4B1 であった。

#### D. 考察

鼻腔から気管支は揮発性有機化合物により刺激を受ける部位として知られており、テキサノール及び TXIB など揮発性有機化合物の鼻粘膜など気道における代謝を明らかにすることは局所的な暴露濃度を推定する上で重要となる。ヒトの気道における主な異物代謝酵素の発現パターンについて関連する論文を調査及び検討した結果を Table 1 にまとめた。鼻粘膜で遺伝子の発現が確認されている異物代謝酵素は主に CES2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2A13、CYP2B6、CYP2C、CYP2F1、CYP2J2、CYP2S1、CYP3A 及び CYP4B1 の 11 種類であった。中でも CES2 はタンパク質としての発現並びに酵素活性も確認されているため、テキサノールおよび TXIB の加水分解反応への関与が示唆さ

れた。

気管で遺伝子発現が認められる代謝酵素の種類は鼻粘膜に比べて少なく、主に CES1、CES2、CES3、CYP2A6、CYP2A13、CYP2B6 及び CYP2S1 の 7 種類であった。

気管支粘膜においては、主として以下に示す 9 種類の酵素、CES1、CYP1A1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C18、CYP2E1、CYP3A5 及び CYP4B1 について遺伝子の発現が報告されていた。特に CES1 及び CYP4B1 は遺伝子の発現量が高く、気管支粘膜の主要な異物代謝酵素である可能性が示唆されていた。

CES は鼻粘膜、気管及び気管支粘膜で存在している分子種が異なるため、テキサノールおよび TXIB の加水分解反応に関する速度論的な解析結果は各組織で異なると推測される。そのため、CES の各分子種について速度論的な解析を行うことは、気道におけるテキサノール及び TXIB の挙動を明らかにする上で重要と考えられる。

また、一種類の化合物の代謝に複数の酵素が関与することは珍しくなく、テキサノール及び TXIB の代謝においても、複数の異物代謝酵素の関与が予測される。CES による加水分解後あるいは加水分解と並行して CYP による代謝が起こる可能性もあるため、鼻粘膜、気管及び気管支粘膜で共通して遺伝子の発現がみられた CYP2A6 及び CYP2B6 を CES の反応系に加えて行う総合的な解析は、気道での挙動を明らかにする有効な手段と思われる。

#### E. 結論

ヒトの気道における主な異物代謝酵素



の発現パターンについて関連する論文を調査及び検討した結果、鼻粘膜で遺伝子の発現が確認されたのは主に CES2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2A13、CYP2B6、CYP2C、CYP2F1、CYP2J2、CYP2S1、CYP3A 及び CYP4B1 の 11 種類であった。気管で遺伝子が発現している酵素は、鼻粘膜に比べて少なく主に CES1、CES2、CES3、CYP2A6、CYP2A13、CYP2B6 及び CYP2S1 の 7 種類であった。気管支粘膜では主として、CES1、CYP1A1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C18、CYP2E1、CYP3A5 及び CYP4B1 の 9 種類であった。

CES は鼻粘膜、気管及び気管支粘膜で存在している分子種が異なるため、テキサノールおよび TXIB の加水分解反応に関する速度論的な解析結果は各組織で異なると推測される。CYP に関しては、CYP2A6 及び CYP2B6 が気道で共通して存在する分子種であり、CES と連携してテキサノール及び TXIB の代謝に関与している可能性が示唆された。

気道粘膜刺激症状への関与が予測されるテキサノール及び TXIB の局所暴露濃度を推定する上で、CES 及び CYP の気道における局在性を考慮した代謝反応の速度論的な解析を行うことの重要性が示唆された。

#### F. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

##### 1. 論文発表

1) Hanioka N., Kinashi Y., Tanaka-Kagawa T., Isobe T., Jinno H.: Glucuronidation of mono(2-ethylhexyl) phthalate in humans: roles of hepatic and intestinal UDP-

glucuronosyltransferases. Arch Toxicol, in press. doi: 10.1007/s00204-016-1708-9.

2) Hanioka N., Isobe T., Kinashi Y., Tanaka-Kagawa T., Jinno H.: Hepatic and intestinal glucuronidation of mono(2-ethylhexyl) phthalate, an active metabolite of di(2-ethylhexyl) phthalate, in humans, dogs, rats and mice: an in vitro analysis using microsomal fractions. Arch Toxicol, in press. doi: 10.1007/s00204-015-1619-1.

3) Isobe T., Kofuji K., Okada K., Fujimori J., Murata M., Shigeyama M., Hanioka N., Murata Y.: Adsorption of histones on natural polysaccharides: The potential as agent for multiple organ failure in sepsis. Int J Biol Macromol, 2016, 84:54–57.

4) Kishi N., Takasuka A., Kokawa Y., Isobe T., Taguchi M., Shigeyama M., Murata M., Suno M., Hanioka N.: Raloxifene glucuronidation in liver and intestinal microsomes of humans and monkeys: contribution of UGT1A1, UGT1A8, and UGT1A9. Xenobiotica, 2016, 46(4):289–295.

5) Miyake Y., Hirose R., Isobe T., Hanioka N.: Molecular cloning and functional analysis of minipig UDP-glucuronosyltransferase 1A6. Xenobiotica, 2016, 46(3):193–199.

6) Mukai M., Isobe T., Okada K., Murata M., Shigeyama M., Hanioka N.: Species and sex differences in propofol glucuronidation in liver microsomes of humans, monkeys, rats and mice. Pharmazie, 2015, 70(7):466–470.

## 2. 学会発表

- 1) 埴岡伸光, 磯部隆史, 香川(田中)聡子, 神野透人: フタル酸モノ-2-エチルヘキシルの肝及び小腸ミクロゾームによるグルクロン酸抱合反応の種差, 日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年 3 月 26-29 日
- 2) 磯部隆史, 小藤恭子, 村田慶史, 埴岡伸光: アルギン酸ゲルビーズの敗血症性多臓器不全予防への利用に関する検討, 日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年 3 月 26-29 日
- 3) 磯部隆史, 埴岡伸光, 小藤恭子, 村田慶史: 天然高分子の敗血症性多臓器不全予防への応用, 第 24 回ポリマー材料フォーラム, 東京 2015 年 11 月 27-28 日
- 4) 埴岡伸光, 岸直樹, 高須賀茜, 古川由貴, 磯部隆史, 須野学: ヒト及びカニクイザルにおけるラロキシフェンのグルクロン酸抱合反応: UGT1A1、UGT1A8 及び UGT1A10 の役割, 日本薬物動態学会第 30 会年会, 東京, 2015 年 11 月 12-14 日

## G. 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

### 3. その他

なし

Table 1. Summary of expression of carboxylesterase genes and cytochrome P450 genes in human airway

Tissue	Metabolic enzyme	Reference
Nasal mucosa	CES2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C, CYP2F1, CYP2J2, CYP2S1, CYP3A, CYP4B1	[1], [2], [3], [4], [5]
Trachea	CES1, CES2, CES3, CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2S1	[3], [6]
Bronchial mucosa	CES1, CYP1A1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C18, CYP2E1, CYP3A5, CYP4B1	[7], [8]

#### Reference

- [1] Zhang W., Xu G., McLeod H. L.: Comprehensive Evaluation of Carboxylesterase-2 Expression in Normal Human Tissues Using Tissue Array Analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2002, 10(4):374-380.
- [2] Sasagawa T., Yamada T., Nakagawa T., Tsujioka T., Takahashi Y., Kawakita N., Nonaka K., Nakamura A.: *In vitro* metabolism of dexamethasone cipeclate, a novel synthetic corticosteroid, in human liver and nasal mucosa. *Xenobiotica*, 2011, 41(10):874-884.
- [3] Ding X., Kaminsky L. S.: Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003, 43:149-173.
- [4] Zhang X., Zhang Q.Y., Liu D., Su T., Weng Y., Ling G., Chen Y., Gu J., Schilling B., Ding X.: Expression of cytochrome P450 and other biotransformation genes in fetal and adult human nasal mucosa. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(10):1423-1428.
- [5] Saarikoski S. T., Wikman H. A. L., Smith G., Wolff C. H. J., Husgafvel-Pursiainen K.: Localization of cytochrome P450 CYP2S1 expression in human tissues by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53(5):549-556.
- [6] Sanghani S. P., Sanghani P. C., Schiel M. A., Bosron W. F.: Human carboxylesterases: an update on CES1, CES2 and CES3. *Protein Pept Lett*, 2009, 16(10):1207-1214.
- [7] Leclerca J., Ngangueta E. C. N., Cauffieza C., Allorgea D., Pottiera N., Lafitteb, J. J., Debaertc M., Jaillardd S., Brolya F., Guidicea J. M. L.: Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: Transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues. *Biochimie*, 2011,

93(6):1012–1027.

- [8] Macé K., Bowman E. D., Vautravers P., Shields P. G., Harris C.C., Pfeifer A. M. A.: Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. *Eur J Cancer*, 1998, 34(6):914–920.