

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 礪部 隆史	横浜薬科大学	講師

研究要旨

室内環境汚染による健康への影響が危惧される揮発性有機化合物濃度と気道における局所的な濃度の関連性を解析するためには、化学物質の気道表面における空気と粘液との間の分配係数、ならびに粘膜における薬物代謝酵素による変換などを明確にする必要がある。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。本研究では、気道における揮発性有機化合物の代謝経路および生成物を明らかにすることを目的として、気道粘膜刺激症状への関与が指摘されている TXIB およびテキサノールの *in vitro* 代謝試験を行った。2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB) は、カルボキシエステラーゼによって主に 1-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl isobutyrate (1-HTMPIB) に代謝された。また、3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl isobutyrate (3-HTMPIB) も検出され、3-HTMPIB は、さらに 2,2,4-trimethylpentane-1,3-diol (TMPD) に代謝された。これらの知見は、気道粘膜刺激症状への関与が予測される TXIB およびテキサノールの局所暴露濃度を推定するための重要な情報となる。

A. 研究目的

室内空気汚染物質および総揮発性有機化合物 (TVOC) に対する室内濃度指針値や暫定目標値が設けられているが、新たな問題として、代替溶剤等の使用による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化学物質による室内環境汚染が危惧されている。このような背景から、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、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール ジイソブチレート (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。これまでに我々は、ヒトの気道における薬物代謝酵素の発現パターンについて検討を行い、鼻腔上皮細胞での薬物代謝酵素の発現分子種を明らかにするとともに、薬物代謝酵素の中でも特にカルボキシエステラーゼ (CES) がテキサノールおよび TXIB の代謝において重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。本研究では、CES が関与するテキサノールおよび TXIB の加水分解反応について薬物代謝学的な評価を実施した。

## B. 研究方法

気道における揮発性有機化合物の代謝プロファイルを明らかにするために、薬物代謝酵素が高発現しているヒト肝マイクロゾームを用いて気道粘膜刺激症状への関与が指摘されている TXIB およびテキサノールの *in vitro* 代謝試験を行った。

### B-1. 試験方法

ヒト肝マイクロゾームを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で 1 分間プレインキュベーションした後、TXIB またはテキサノールを添加し、反応を開始させた。10 分間のインキュベーション後に、ヘキサンを添加することで反応を止め、内標準物質としてアントラセ

ン-d10 を加えた。ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌した後、1,500×g で 10 分間遠心分離し、得られたヘキサン相をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) にて分析した。

### B-2. GC/MS 条件

GC/MS 装置は日本電子株式会社の JMS-Q1000GC K9 を用いた。カラムにはレステック社製の Rtx-5MS (長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25µm) を用いた。サンプルはスプリットレス法により注入した。イオン化はイオン化エネルギーを 70 eV に設定し、電子イオン化法により行った。カラムオーブンは 40°C で 1 分間保持した後、15°C/分のペースで 250°C まで上昇させ、その後 3 分間保持した。MS スペクトルは  $m/z$  値が 41 から 350 の範囲をスキャンし、SIM 測定により代謝物の定量を行った。

## C. 結果と考察

TXIB の加水分解代謝物として、1-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl isobutyrate (1-HTMPIB)、3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl isobutyrate (3-HTMPIB) および 2,2,4-trimethylpentane-1,3-diol (TMPD) が報告されている。本研究で実施した分析方法により、いずれの代謝物も定量的測定が可能であった。

本件研究のヒト肝マイクロゾームを用いた *in vitro* 代謝試験では、TXIB の大部分が 1 位のエステル結合を加水分解された 1-HTMPIB へと代謝された (図 1)。一方、3-HTMPIB への代謝は僅かであった。これは 4 位のメチル基が立体障害となり、3

位のエステル結合の加水分解を妨げているためと推察される。

テキサノールは TXIB の加水分解物で、1-HTMPIB およびその構造異性体である 3-HTMPIB からなる。ヒト肝マイクロゾームを用いた *in vitro* 代謝試験において、3-HTMPIB はさらに加水分解を受け、TMPD へと代謝されたが、1-HTMPIB はほとんど代謝されなかった。TXIB の代謝でみられた選択性と同様に、1-HTMPIB の代謝においても 4 位のメチル基が立体障害となり、3 位のエステル結合の加水分解を妨げているためにこのような選択性が表れると考えられる。

TXIB およびテキサノールの *in vitro* 代謝試験の結果より、CES が TXIB の 1-HTMPIB への加水分解反応、および 3-HTMPIB の TMPD への加水分解反応に強く関与していることが明らかとなった。

#### D. 結論

本研究では、気道における TXIB など揮発性有機化合物の代謝プロファイルを明らかにすることを目的として、薬物代謝酵素が高発現しているヒト肝マイクロゾームを用いて TXIB およびテキサノールの *in vitro* 代謝試験を行った。その結果、図 1 に示したように、TXIB は CES によって主に 1-HTMPIB へと代謝されることが明らかとなり、また 3-HTMPIB は TMPD へと代謝されることが明らかとなった。

これらの結果より、TXIB など気道粘膜刺激症状への関与が予測される揮発性有機化合物の局所暴露濃度を推定する上で、代謝経路および生成物を明らかにすることの重要性が示唆された。

E. 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., Isobe T., Ohkawara S., Tanaka-Kagawa T., Jinno H.: Glucuronidation of 4-tert-octylphenol in humans, monkeys, rats, and mice: an *in vitro* analysis using liver and intestine microsomes, *Arch Toxicol*, 2017, 91(3):1227–1232.
- 2) 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*, 2017, 91(2):689–698.
- 3) 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*, 2016, 90(7):1651–1657.
- 4) 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.

#### 2. 学会発表

- 1) 磯部 隆史, 黒田 勝也, 大河原 晋, 香

- 川(田中) 聡子, 神野 透人, 埴岡伸光:  
4-tert-オクチルフェノールの肝および  
小腸マイ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 137 年  
会, 仙台, 2017 年 3 月 24-27 日
- 2) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 磯部 隆  
史, 埴岡 伸光, 神野 透人: 消毒副生成  
物・ハロアセトアミドによるヒト侵害受  
容器 TRPA1 の活性化, 日本薬学会第  
137 年会, 仙台, 2017 年 3 月 24-27 日
- 3) 大河原 晋, 岩田 哲, 磯部 隆史, 埴岡  
伸光, 神野 透人, 香川(田中) 聡子: ヒ  
ト由来培養細胞株における  
2-n-Octyl-4-isothiazolin-3-one に対する  
感受性の差違, 日本薬学会第 137 年会,  
仙台, 2017 年 3 月 24-27 日
- 4) 神野 透人, 浅井 理香, 野中 志保, 戸  
邊 隆夫, 青木 明, 岡本 誉士典, 植田  
康次, 大河原 晋, 磯部 隆史, 埴岡 伸  
光, 香川(田中) 聡子: タバコ煙によ  
る侵害刺激受容体活性化の種差に関す  
る研究, 平成 28 年 室内環境学会学術  
大会, つくば, 2016 年 12 月 15-16 日
- 5) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 磯部 隆  
史, 埴岡 伸光, 神野 透人: 香料アレル  
ゲンによる気道刺激に関する研究, 平  
成 28 年 室内環境学会学術大会, つく  
ば, 2016 年 12 月 15-16 日
- 6) 大河原 晋, 河野 みどり, 中村 心一,  
和田 光弘, 磯部 隆史, 埴岡 伸光, 神  
野 透人, 香川(田中) 聡子: イソチア  
ゾリン系抗菌剤の BEAS-2B 細胞におけ  
る細胞毒性およびサイトカイン産生能  
に対する影響, フォーラム 2016 衛生薬  
学・環境トキシコロジー, 品川, 2016 年  
9 月 10-11 日

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図 1. Carboxyl esterase (CES) による TXIB の加水分解

