

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

全国規模の室内環境汚染物質の実態調査により、新たに 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIBTM, TMPD-DIB と略す)、2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate (TexanolTM, TMPD-MIB と略す)などの揮発性有機化合物による汚染実態が明らかになった。気道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、TMPD-DIB、TMPD-MIB などの気道における代謝を明らかにすることは、これらの揮発性有機化合物による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、TMPD-DIB および TMPD-MIB の気道における代謝プロファイルの解明を目的として、TMPD-DIB および TMPD-MIB の *in vitro* 代謝試験を行った。TMPD-DIB は、カルボキシエステラーゼによって 1-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl isobutyrate (1-HTMPIB と略す) および 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl isobutyrate (3-HTMPIB と略す) へ代謝され、3-HTMPIB は、さらに 2,2,4-trimethylpentane-1,3-diol (TMPD と略す) へと代謝された。ヒト肝マイクロソームによる TMPD-DIB 加水分解の速度論的挙動は、Michaelis-Menten のモデルに従った。1-HTMPIB 生成活性と 3-HTMPIB 生成活性では、 K_m 値にそれほど大きな差は認められなかった。しかしながら、 V_{max} 値は 1-HTMPIB 生成活性が 3-HTMPIB 生成活性のおよそ 4 倍の値を示した。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 TMPD-DIB および TMPD-MIB 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、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、2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIBTM, TMPD-DIB と略す)、2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate (TexanolTM, TMPD-MIB

と略す) などの揮発性有機化合物による汚染実態を明らかにした。気道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、TMPD-DIB、TMPD-MIBなどの気道における代謝を明らかにすることは、これらの揮発性有機化合物による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TMPD-DIB および TMPD-MIB 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、TMPD-DIB およびTMPD-MIBの気道における代謝プロファイルの解明を目的として、TMPD-DIB およびTMPD-MIBの代謝学的な検討を実施した。

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ミ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 TMPD-DIB およびTMPD-MIBの *in vitro* 代謝試験を行った。

B-1. 試験方法

ヒト肝ミクロゾームを含む 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、TMPD-DIB または TMPD-MIB 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

ヒト肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 代謝試験では、TMPD-DIB は 1 位のエステル結合が加水分解され 1-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl isobutyrate (1-HTMPIB と略す) および 3 位のエステル結合が加水分解された 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl isobutyrate (3-HTMPIB と略す) へと代謝された。1-HTMPIB に比べ 3-HTMPIB へ代謝される割合は低く、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た。

TMPD-MIB は TMPD-DIB 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、2,2,4-trimethylpentane-1,3-diol (TMPD と略す) へと代謝されたが、1-HTMPIB はほとんど代謝されなかった。TMPD-DIB 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た。

ヒト肝マイクロゾームによる TMPD-DIB 加水分解の速度論的挙動は、Michaelis-Menten のモデルに従った (Fig. 1)。1-HTMPIB 生成活性と 3-HTMPIB 生成活性では、 K_m 値にそれほど大きな差は認められなかった。しかしながら、 V_{max} 値は 1-HTMPIB 生成活性が 3-HTMPIB 生成活性のおよそ 4 倍の値を示した。

これらの結果から、TMPD-DIB のエステル部位間で加水分解活性に違いが生じている原因は、エステル部位における CES との親和性の差ではなく、4 位のメチル基が立体障害となり、3 位のエステル部位に対する CES の加水分解反応の進行を妨げていることである可能性が示唆された。

D. 結論

本研究では、気道における TMPD-DIB 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 TMPD-DIB および TMPD-MIB の *in vitro* 代謝試験を行った。

その結果、TMPD-DIB は CES によって 1-HTMPIB および 3-HTMPIB へ代謝されることが明らかとなり、3-HTMPIB はさらに TMPD へと代謝されることが明らかとなった。ヒト肝マイクロゾームによる TMPD-DIB の加水分解において 1-HTMPIB 生成活性と 3-HTMPIB 生成活性は Michaelis-Menten の速度論的挙動を示した。 K_m 値にそれほど大きな差は認められなかったが、 V_{max} 値は 1-HTMPIB 生成活性が 3-HTMPIB 生成活性のおよそ 4 倍の値を示した。

これらの結果より、TMPD-DIB 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、代謝プロファイル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) Miyata-Nozaka Y., Mohd Zain S., Taguchi M., Shigeyama M., Isobe T., Hanioka N.: Carbamazepine 10,11-epoxidation in human liver microsomes: influence of the CYP3A5*3 polymorphism, *Pharmazie*, 2017, 72(12):747-750.
- 2) Isobe T., Ohkawara S., Tanaka-Kagawa T., Jinno H., Hanioka N.: Hepatic glucuronidation of 4-tert-octylphenol in humans: inter-individual variability and responsible UDP-glucuronosyltransferase isoforms, *Arch Toxicol*, 2017, 91(11): 3543-3550.
- 3) 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.

- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) 礒部 隆史, 大河原 晋, 香川(田中) 聡子, 神野 透人, 埴岡 伸光: ヒトにおける 4-tert-オクチルフェノールのグルクロン酸抱合反応に関与する UGT 分子種とその役割, フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台, 2017 年 9 月 1-2 日
- 2) 大河原 晋, 中村 恵理子, 礒部 隆史, 埴岡 伸光, 神野 透人, 香川(田中) 聡子: BEAS-2B 細胞におけるイソチアゾリノン系抗菌剤による炎症性メディエーター産生, フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台, 2017 年 9 月 1-2 日
- 3) 前川 梨沙, 青木 明, 岡本 誉士典, 植田 康次, 大河原 晋, 埴岡 伸光, 香川(田中) 聡子, 神野 透人: BEAS-2B 細胞におけるイソチアゾリノン系抗菌剤による炎症性メディエーター産生, フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台, 2017 年 9 月 1-2 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

Fig. 1 ヒト肝ミクロゾームによる TMPD-DIB 加水分解反応の速度論的解析

