

学位論文要旨

学位申請者氏名 杉野 雅浩

近年、様々な新規化学物質が合成されることによって人々の暮らしがずいぶん便利になった。しかしこれら化学物質のなかには、その利便性のみ注目され安全性に関する検討が不十分であったため、健康被害が生じたものもあった。われわれの身の回り、特に家庭内においても様々な化学物質を含む多くの商品が利用され、また建材や家具などにも様々な化学物質が含まれているので、われわれは無意識のうちに日々これらの化学物質に曝露されている。例えば、スプレー後に床や壁などに付着し残留した化学物質に触れることによる皮膚曝露が懸念されるが、この曝露経路は一般生活者には十分認識されていない。さらに、医薬品とは異なり、化学物質の経皮吸収を定量的に評価するシステム、特に、吸収速度が遅い物質や皮内で代謝を受ける物質に対する評価システムは確立されていない。

一般に角層は約 20 層の角質細胞が重なった高いバリア能を有するが、曝露される化学物質の分子量が 500 Da 以下と低分子であり、かつ水-オクタノール分配係数 (pK_{ow}) が 1-3 程度の脂溶性を持った多くの化学物質は皮膚透過性が高く皮膚深部に移行するばかりか、全身循環にも移行する。一方、分子量が 500 Da 以上の化学物質や、水溶性や極端な脂溶性を示す多くの化学物質は皮膚透過性が低い。例えばある化学物質が 24 時間かけて角層の第 1 層目の深部まで浸透したとしても、その層は皮膚のターンオーバーにより剥がれ落ちる（落屑する）ので皮膚吸収されることはない。この時の落屑速度を計算すると、おおよそ 10^{-9} cm/s となる。著者は、これらの現象が化学物質の皮膚透過性と角層の落屑速度の比較によって説明可能なのではないかと考えた。すなわち、化学物質の皮膚透過性の指標である透過係数が落屑速度以下の時はその化学物質は角層を透過することができず、落屑速度を上回る時は皮膚を透過するのではないかと考えた。また、皮膚内で代謝を受け構造が変化する化学物質も存在し、この場合は皮膚曝露物質の皮膚透過性と落屑速度の比較だけでは有害事象の説明ができないこともあると予想した。

一般に生体に起こる毒性反応は、曝露された化学物質濃度と関係する直接反応モデルで表すことができることが多い。つまり、皮膚に曝露された多くの化学物質が皮膚に一定量以上移行した場合、皮膚への局所毒性等の有害作用が発生する。したがって、化学物質経皮曝露後の化学物質濃度を予測することは、化学物質曝露後の安全性評価を行う上で大変有用な情報となる。そこで本研究では、皮膚に曝露される可能性のある化学物質のうち皮膚中で代謝を受けないものと受けるものをそれぞれ数種選択し、これら化学物質の皮膚透過や皮膚内代謝に関するパラメータを考慮して皮膚曝露後の化学物質の皮膚移行性と皮膚中濃度を予測・評価することとした。

第 1 編 皮膚中で代謝を受けない化学物質の皮膚透過性および皮膚中濃度評価

代謝を受けない化学物質として選択した *p*-クレゾール、ダイアジノンおよびレスメトリンのヘアレスラット腹部摘出全層皮膚および角層除去皮膚を介した *in vitro* 透過性および皮膚中濃度を測定した。なおこれら化学物質の溶媒には、汗をかいた皮膚が化学物質に触れた場合のモデルとして pH7.4 等張リン酸緩衝液 (PBS) を、スプレー剤等が直接皮膚に曝露する場合のモデルとしてスプレー溶剤に用いられているケロシンを用いた。各化学物質の皮膚透過係数と皮膚中濃度を求め、角層落屑速度を基にその大小関係を考察した。さらに、これらの皮膚に対する毒性反応と全身循環系への移行後の毒性反応の発現の可能性を予測した。

ダイアジノンおよびレスメトリンを評価した結果、皮膚透過係数が落屑速度以下であり、皮膚中にもほとんど検出されなかった。一方で透過係数が落屑速度よりも大きかった *p*-クレゾールは皮膚中濃度も高かった。このことより、皮膚透過係数と角層落屑速度の比較により、化学物質の皮膚曝露後の皮膚移行性をある程度推測できた。また、皮膚中や全身中に多量移行しうる *p*-クレゾールについては、培養細胞を用いた傷害性試験を行った結果、得られた 50%毒性発現濃度より皮膚局所で毒性を引き起こす可能性があることがわかった。しかし、皮膚透過性と全身クリアランスを用いた *p*-クレゾールの血中濃度の予測値から、全身的な毒性発現の可能性は低いことが予測された。

第2編 皮膚中で代謝し得る化学物質の皮膚透過性および皮膚中濃度評価

プラスチック製品に含有される可塑剤であるフタル酸ジエステルである、ジブチル体 (di-BP)、ベンジルブチル体 (BnBP) およびジ-2-エチルヘキシル体 (di-iOP) を選択し、ヘアレスラット腹部摘出皮膚およびヒト皮膚（共に全層皮膚または角層除去皮膚）を介した、*in vitro* 透過実験を行い、化学物質の皮膚透過係数と皮膚中濃度を求めた。また、これらの皮膚中代謝パラメータを Michaelis-Menten 式を用いて求め、代謝物の皮膚深部への移行性と皮膚中濃度を評価した。

各皮膚にフタル酸ジエステル体を適用しても、ジエステル体の皮膚透過量は定量下限値以下であったが、di-BP と BnBP はそのモノエステル体であるフタル酸モノブチルとフタル酸ベンジルブチルの皮膚移行、および皮膚中濃度が観察された。すなわち、比較的脂溶性の低いこれらジエステル体 (di-BP および BnBP) は角層を透過し生きた表皮に到達した直後モノエステル体に変換され、これらが生きた表皮および真皮を速やかに拡散した。また、ヘアレスラットとヒト皮膚で検出される主なモノエステル体が異なることがわかった。さらに、これらモノエステル体の生成は、皮膚にエステラーゼ阻害処理をすることによって完全にみられなくなった。加えて、皮膚中ではモノエステル体以上の代謝物（フタル酸）は生成しないことがわかった。一方で、di-iOP は皮膚透過および皮膚中濃度が検出できず、代謝も起こらなかった。以上より、透過係数、代謝パラメータおよび代謝物の皮膚深部移行性 (P_m) に関するパラメータ群を併用することによってモノエステル体の皮膚中濃度の予測が可能となることが示唆された。しかし、ヘアレスラットとヒトの間で皮膚内の代謝活性や基質特異性が異なっていたため、これら化学物質のヒト皮膚内の挙動は慎重に予測する必要があることもわかった。

結論

皮膚内で代謝を受けない化学物質皮膚曝露後の皮膚透過係数と角層の落屑速度の比較によって、化学物質の皮膚移行性を予測可能であった。また細胞毒性試験から、皮膚局所毒性や全身的な毒性を引き起こす可能性を予測することが可能となると考えられた。また、皮膚内で代謝を受ける化学物質の評価のためには、ジエステル体の皮膚透過係数のみならず、代謝物であるモノエステル体の皮膚移行性 (P_m) によってモノエステル体の皮膚中濃度および生成量の予測が可能であった。さらに、皮膚内の代謝能には種差があることがわかった。

今回得られた結果を総合的に評価し、化学物質の皮膚透過係数と代謝物の移行性などから化学物質とその代謝物の皮膚中への移行性と皮膚中濃度を推定し、さらには安全性試験の必要性の有無を決定し得るフローダイアグラムを考案した。このダイアグラムは今後の化学物質の皮膚曝露後の安全性を推定・予測する上で大変有用と考えられた。今後はこの結果を利用することによって、さまざまな新規化学物質の皮膚曝露後の安全性評価に応用することが期待される。

論文審査の結果の要旨

近年、様々な新規化学物質が合成されることによって人々の暮らしがずいぶん便利になった。しかしこれら化学物質のなかには、その利便性のみ注目され安全性に関する検討が不十分で、健康被害が生じたものもあった。われわれの身の回り、特に家庭内においても様々な化学物質を含む多くの商品が利用され、また建材や家具などにも様々な化学物質が含まれているので、われわれは無意識のうちに日々これらの化学物質に曝露されている。特に皮膚曝露は日常的に起こっているにも関わらず、あまり注目されてこなかった。そこで最近では、すでに実用化された化学物質の暴露量（皮膚暴露量を含む）と安全性に関する議論も活発になってきた。しかし、医薬品とは異なり、化学物質の経皮吸収と皮膚中濃度を定量的に評価するシステム、特に、吸収速度が遅い物質や皮内で代謝を受ける物質に対する評価システムは確立されていない。

皮膚の最上層に位置する角層は外界異物の侵入を防ぐバリア機能を有し、皮膚のターンオーバーにより1日1層が剥がれ落ちる（落屑する）ことが知られており、この現象と安全性の関係を論じることが重要と思われた。また、代謝される化合物については代謝による消失や代謝物を考慮したモデルが必要である。杉野雅浩氏はこれらの現象に着目し、皮膚に曝露される可能性のある化学物質のうち皮膚中で代謝を受けないものと受けるものをそれぞれ数種選択し、これら化学物質の皮膚透過や皮膚内代謝に関するパラメータを考慮して皮膚曝露後の化学物質の皮膚移行性と皮膚中濃度を予測・評価することを試みた。以下、審査結果を説明する。

第1編では、代謝を受けない化学物質として選択した殺虫成分である *p*-クレゾール、ダイアジノンおよびレスメトリンのヘアレスラット腹部摘出全層皮膚および角層除去皮膚を介した *in vitro* 透過性および皮膚中濃度を測定した。なおこれら化学物質の溶媒には、汗をかいた皮膚に触れた場合のモデルとして pH7.4 等張リン酸緩衝液を、スプレー剤等が直接皮膚に曝露した場合のモデルとしてスプレー溶剤に用いられるケロシンを用いた。各化学物質の皮膚透過係数と皮膚中濃度を求め、角層落屑速度を基にそれらの大小関係を考察した。さらに、これらの皮膚に対する毒性反応と全身循環系への移行後の毒性反応の発現の可能性を予測した。その結果、ダイアジノンおよびレスメトリンの皮膚透過係数は落屑速度以下であり、それらの皮膚中濃度は検出限界以下か極めて低かった。一方、*p*-クレゾールの透過係数は落屑速度よりも大きく、高い皮膚中濃度が観察された。以上、皮膚透過係数と角層落屑速度の比較により、これら3化学物質の皮膚曝露後の *in vivo* における皮膚透過性が予測された。また、*p*-クレゾールについては、培養細胞を用いた傷害性試験より得られた50%毒性発現濃度よりも皮膚中濃度が高く、皮膚局所で一次刺激性を引き起こす可能性があることがわかった。しかし、皮膚透過性と全身クリアランスを用いた *p*-クレゾールの血中濃度の予測値から、*p*-クレゾールの全身的な毒性発現の可能性は低いことが予測された。

第2編では、皮膚中で代謝し得る化学物質としてプラスチック製品に含有される可塑剤であるフタル酸ジエステルについて検討した。まず、ジブチル体 (di-BP)、ベンジルブチル体 (BnBP) およびジ-2-エチルヘキシル体 (di-iOP) の3種類についてヘアレスラット腹部摘出皮膚およびヒト摘出皮膚（共に

全層皮膚または角層除去皮膚)を介した *in vitro* 透過実験を行い、皮膚透過性と皮膚中濃度を求めた。また、これらの皮膚中代謝パラメータを Michaelis-Menten 式を用いて求め、さらに、代謝物の皮膚深部への移行性と皮膚中濃度を評価した。その結果、各フタル酸ジエステル皮膚適用後の皮膚透過したジエステルは定量限界以下であった。しかし、di-BP と BnBP 適用後はそのモノエステルであるフタル酸モノブチルとフタル酸モノベンジルの皮膚移行および皮膚(生きた表皮と真皮)中濃度が観察された(なお、脂溶性の高い di-iOP 適用後はモノエステル代謝物も見られなかった)。すなわち、比較的脂溶性の低いジエステル(di-BP、BnBP)は角層を透過して生きた表皮に到達した直後に対応するモノエステルに代謝され、これらが生きた表皮と真皮中を速やかに拡散・浸透・移行した。また、大変興味深いことに、ヘアレスラットとヒト間で皮膚透過または皮膚中で検出される主なモノエステル種が異なっていた。さらに、モノエステル体の代謝物と考えられたフタル酸の生成は、皮膚透過実験においても皮膚ホモジネートを用いた代謝実験でも確認されなかった。加えて、透過係数、代謝パラメータ、さらには代謝物の移行性に関わるパラメータ群を併用することによって、代謝物であるモノエステルの皮膚中濃度の予測が可能となった。しかし、ヘアレスラットとヒトの代謝活性や基質特異性が異なっていたので、ヒト挙動はこれらを考慮して慎重に予測する必要があることもわかった。

本論文に示された皮膚透過と代謝のパラメータおよび角層落屑速度を用いた評価法は、代謝を受けないまたは代謝を受ける化学物質の経皮吸収性と皮膚中または血中濃度に関する情報を得る手段として、また安全性評価のための基礎的な情報を得る手段として有用であると考えられた。さらに、杉野氏は、得られた結果を総合的に評価し、化学物質の皮膚透過係数と代謝物の移行性などから化学物質とその代謝物の皮膚中への移行性と皮膚中濃度を推定し、さらには安全性試験の必要性の有無を決定し得るフローダイアグラムを考案した。このダイアグラムは今後の化学物質の皮膚曝露後の安全性を推定・予測する上で大変有用と考えられた。

以上本研究は、種々殺虫成分や可塑剤などのわれわれの身の回りにある化学物質の皮膚移行性、皮膚中濃度、さらには皮膚中代謝について調べ、これらに皮膚曝露した際の安全性評価において基礎的な情報を提供したものである。本研究は今後の研究の発展にも大きな寄与をするものと思われ、その独創性、研究意義いずれをとっても本研究科課程による博士(薬学)論文に十分値するものと判定した。さらに杉野雅浩氏の人柄や見識についても博士(薬学)となるのに十分であると判断した。