

種々毒性物質の皮膚透過性評価法の開発

—安全性評価への応用—

杉野 雅浩

## 目次

緒言 .....	1
第1編 代謝を受けない家庭内化学物質皮膚曝露後の皮内動態評価 .....	4
第1節 理論 .....	6
第2節 実験の部 .....	11
1. 試薬および実験材料 .....	11
2. 実験動物 .....	11
3. ヘアレスラット腹部皮膚を用いた <i>in vitro</i> 透過性試験および皮膚中濃度測定 .....	12
4. HEK および HDF 生存率に対する <i>p</i> -クレゾールの影響評価 .....	14
5. <i>p</i> -クレゾールのラット全身クリアランス測定 .....	15
6. 統計解析 .....	15
第3節 結果 .....	16
1. <i>p</i> -クレゾールの皮膚透過性および皮膚中濃度 .....	16
2. ダイアジノンの皮膚透過性および皮膚中濃度 .....	19
3. レスメトリンの皮膚透過性および皮膚中濃度 .....	21
4. <i>p</i> -クレゾールによる培養皮膚細胞毒性評価 .....	21
5. <i>p</i> -クレゾール皮膚曝露後の血中濃度予測 .....	23
第4節 考察 .....	25
第5節 小括 .....	30

第2編 代謝を受ける化学物質皮膚曝露後の皮内動態評価 .....	31
第1節 理論 .....	34
第2節 実験の部 .....	36
1. 試薬および実験材料 .....	36
2. ヘアレスラットおよびヒト皮膚 .....	36
3. ヘアレスラット腹部皮膚を用いた <i>in vitro</i> 透過性試験 .....	37
4. ヒト摘出皮膚を用いた皮膚透過性試験 .....	37
5. 皮膚中濃度測定 .....	38
6. 皮膚ホモジネートを用いた皮膚代謝パラメータ測定 .....	38
7. 各化学物質の定量 .....	39
第3節 結果 .....	41
1. フタル酸ジエステル類皮膚曝露後の皮膚透過性および皮膚中濃度 .....	41
2. フタル酸モノエステル類皮膚曝露後の皮膚透過性および皮膚中濃度 .....	51
3. ヒトおよびヘアレスラット皮膚中の代謝パラメータ .....	53
第4節 考察 .....	56
第5節 小括 .....	61
総括的考察 .....	62
結論 .....	65
謝辞 .....	68
引用文献 .....	69

## 緒言

近年、様々な化学物質が新規に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。しかしこれら新規化学物質の広範な利用に伴い、その化学物質の安全性に関する議論も活発になった。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、健康被害が生じたこともあった。

近年、家庭内にも多くの化学物質が商品として使用され、また建材や家具などに含有されている化学物質も多く、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。家庭内での化学物質の代表的な曝露には、経皮曝露、経口曝露<sup>1)</sup>、および経肺・経気道曝露<sup>2)</sup>がある。家庭内で化学物質含有製品を使用する時、たとえばスプレー剤を使用する時、使用者は口をふさぐ等して経口曝露や経肺・経気道曝露を防ぐ努力をする。しかし、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経皮曝露が懸念されており、しかもこの曝露経路は一般生活者には十分認識されていない。また、建材や家具などに含まれる化学物質の曝露にも注意が必要である。そこで最近では、すでに実用化された化学物質の曝露量（経皮曝露量を含む）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。これも、経皮曝露を一般生活者に認識されづらくさせる一因を担っていると考えられる。

皮膚は外側から順に表皮、真皮、皮下組織に大別され、皮脂腺、汗腺、毛包等が表皮と真皮を貫通している構造を示す<sup>3)</sup>。表皮を形成する主な細胞である角

化細胞は表皮中の基底層で作られ、分化に伴い皮膚表層へ移動し、やがて脱核を起し角質細胞となる。この角質細胞はケラチン等の硬タンパク質から成り<sup>4)</sup>、ヒトでは角層は角質細胞が約 20 層積み重なっている（厚みは 20  $\mu\text{m}$  程度）。角層は化学物質や細菌等の様々な物質の体内への侵入を防いでおり<sup>5-7)</sup>、このバリア能は消化管、鼻粘膜、肺粘膜など他の上皮に比べ極めて高い<sup>3)</sup>。一般に角層は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  $\text{p}K_{ow}$  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。このような性質を持つ化学物質は皮膚に適用する医薬品として選択されている。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。このような、皮膚をほとんど透過しない化学物質の皮膚移行性や皮膚透過性の予測に関する評価は十分に行われていない。

角層は、1 日に 1 層が細胞分裂に伴い表皮に組み込まれると同時に、角層最外部の一層が垢として脱落（落屑）する<sup>8)</sup>。そのため、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、その部分は落屑するので皮膚吸収されることはない。著者は、この現象が化学物質の皮膚透過係数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、落屑速度以上の時は皮膚を透過するのではないかと考えた。化学物質の中には、皮膚内で代謝を受け構造が変化するものも存在する。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皮膚移行性の説明できないことがあると考えられる。

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を用いて説明できることが多い。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皮膚内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、特に家庭内にある化学物質の皮膚透過係数から皮膚曝露後の皮膚中濃度および皮膚移行性を予測することとした。

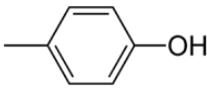
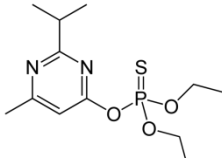
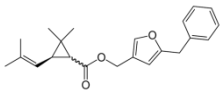
本論文第 1 編では、皮膚中で代謝されない化学物質の代表として汎用されている殺虫剤成分 (*p*-クレゾール、ダイアジノン、レスメトリン) が皮膚に接触した後の皮膚透過性と皮膚中濃度を調べ、皮膚透過係数と角層の落屑速度と比較によって化学物質皮膚曝露後の皮膚移行性の予測を試みた。また第 2 編では、エステル基を有し皮膚中で代謝されると考えられ可塑剤としてプラスチック製品に含まれる化学物質 (フタル酸ジエステル類) を選択して、それらの皮膚曝露後の皮膚透過性および皮膚中濃度を測定した。また、フタル酸ジエステル類の代謝物であるフタル酸モノエステル類とフタル酸の皮膚透過性、皮膚中濃度および生成速度についても検討を加えた。最後に、得られた結果を総合し、種々化学物質皮膚曝露後の皮内移行性の予測に関するフローダイアグラムを作成し、安全性評価に寄与できる方法論の構築を目指した。

## 第1編 代謝を受けない家庭内化学物質皮膚曝露後の皮内動態評価

人類は多くの新規化学物質を合成し、生活レベルの向上に役立ててきた。しかし、これらのなかには危険性（毒性）を示すものもあるため、我々人類は化学物質の毒性を評価し、毒性の高い物質を使用しないあるいは使用を制限する必要が生じた。これら化学物質のヒトへの一般的な曝露経路には、経口経路<sup>1)</sup>、経呼吸器経路<sup>2)</sup>、そして経皮経路がある。

本編では、一般生活者が家庭用品に含まれる化学物質に曝露される可能性に着目した。家庭で経皮曝露を受ける可能性のある代表的物質の1つに噴霧殺虫剤がある。噴霧殺虫剤の使用時に使用者は口をふさぎ息を止めるなどして、経口曝露や経呼吸器曝露を避けようとする。しかしながら、噴霧後に床や壁に付着した殺虫成分が皮膚を介して吸収されることはあまり認識されていない。また、噴霧により皮膚に直接付着することによる皮膚曝露にも注意をはらう必要がある。そこで今回、殺虫モデル成分としてレスメトリン、ダイアジノンを選んで、これらの経皮曝露後の皮膚移行性の安全性評価法確立の前段階として、主にヘアレスラット摘出皮膚を用いた透過実験から皮膚中への移行量を予測した。また、レスメトリン、ダイアジノンとは分子量や脂溶性の指標である  $\log K_{ow}$  が異なる成分として *p*-クレゾールを用いて同様に試験し、安全性と物性の違いについても考察した。Table 1 に用いた曝露物質の構造と物性をまとめて示す<sup>9)</sup>。

Table 1 Chemical structures, physicochemical properties and toxic parameters of the test biocides used in this study

CAS no.	Chemical structure	M.W.	<i>m.p.</i> (°C)	<i>b.p.</i> (°C)	$\log K_{o/w}$ <sup>*</sup>	Oral <i>LD</i> <sub>50</sub> (mg/kg bw) <sup>**</sup>	Dermal <i>LD</i> <sub>50</sub> (mg/kg bw) <sup>*</sup> **
106-44-5	<p><i>p</i>-Cresol</p> 	108.1	35	202	1.94	207	300
333-41-5	<p>Diazinon</p> 	304.4	120	306	3.11	1340	>2020
10453-86-8	<p>Resmethrin</p> 	338.5	43-48	180	3.46	6091	>2000

\*<sup>9)</sup> National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH), \*\* in male rats, \*\*\* in rabbits



## 第1節 理論

化学物質の毒性反応は、曝露される生細胞の環境下での化学物質濃度に依存する<sup>10)</sup>ため、化学物質皮膚曝露後の皮膚移行量の程度を知ることは、化学物質のリスク評価に重要である<sup>11)</sup>。毒性反応は薬効のような有用な作用と同様、化学物質の濃度が直接関係する直接反応と化学物質が関与する酵素反応や受容体結合が関係する間接反応に分類される<sup>10)</sup>。化学物質の皮膚毒性反応を直接反応と考えた場合、化学物質による細胞毒性  $T$  と曝露される生細胞中濃度  $C$  に以下に示す Hill 式が成り立つ<sup>12)</sup>。

$$T = \frac{T_{\max} C^{\gamma}}{TC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}} \quad (1)$$

ここで、 $T_{\max}$ 、 $TC_{50}$ 、そして  $\gamma$  はそれぞれ最大毒性反応、毒性発現 50%濃度、そして Hill 係数（形状因子）を表す。すなわち、曝露される生細胞中の化学物質濃度がわかれば、どの程度の毒性が生じるか予測できることとなる。式 (1) は皮膚中で引き起こされる毒性  $T$  と皮膚中濃度  $C$  についても成り立つと考えられる。同様に全身循環系に移行した後の血中濃度  $C$  と全身毒性  $T$  との関係についても適用することができる。

化学物質の皮膚透過係数 permeability coefficient、 $P$  (cm/s) は定常状態の経皮吸収速度  $J$  (mmol/cm<sup>2</sup>/s)を用いて表現することができる。ここで、 $J$  と  $P$  には以下の関係がある。

$$P = \frac{J}{C_v} \quad (2)$$

ここで、 $C_v$  は皮膚表面に曝露される化学物質の濃度 ( $\text{mmol}/\text{cm}^3$ ) である。 $P$  は化学物質にもよるが、高いものでは  $10^{-6} \text{ cm/s}$ 、低いものでは  $10^{-10} \text{ cm/s}$  またはそれ以下になる。 $P$  はその単位からも分かるように化学物質が単位時間あたりに拡散した距離すなわち線速度である。ここで、*in vitro* 摘出皮膚透過試験を行いレシーバー溶液中に適用した化学物質が検出されなかった場合は、以下に示す式 (3) より下限定量限界値の皮膚透過係数  $P_{upper\ limit}$  ( $P_{ul}$ ) を算出することができる。ここで  $P_{ul}$  は、皮膚透過実験最終時間の化学物質のレシーバー濃度の下限定量限界値を代入して求めた皮膚透過速度 ( $J_{upper\ limit}$ ;  $J_{ul}$ ) を適用濃度 ( $C_v$ ) で除して求めた。すなわち、

$$P_{ul} = \frac{J_{ul}}{C_v} \quad (3)$$

となる。

また経皮吸収された化学物質の定常状態血中濃度  $C_{ss}$  は、化学物質の体内動態が線形速度論で示され、皮膚透過速度が体内への吸収速度と等しい (0 次吸収) 時、定常状態の経皮吸収速度  $Flux_{ss}$  と全身クリアランス  $CL_{tot}$  ( $\text{mL/s}$ ) を用いて以下のように表すことができる。

$$C_{ss} = \frac{Flux_{ss} \cdot Area}{CL_{tot}} = \frac{C_v \cdot Area}{CL_{tot}} \cdot P \quad (4)$$

ここで  $Area$  は適用 (曝露) 面積 ( $\text{cm}^2$ ) を表す。式 (4) より、経皮吸収された物質の血中濃度は皮膚透過係数  $P$  と全身クリアランス  $CL_{tot}$  から予測が可能であ

る<sup>13-16)</sup>。

一方、化学物質を適用する表皮を構成する表皮細胞は表皮基底層で1日1回分裂し、基底細胞から有棘細胞、顆粒細胞、角層細胞へと分化していき、約1か月で角層の最上層に到達する。また、角層最上層は一日一層、垢という形ではがれる。これを落屑 (desquamation) という<sup>17)</sup>。1日 (24 × 60 × 60 秒) に角層一層 (厚みは約1 μm) が剥がれる速度を計算すると、desquamation rate は約  $1 \times 10^{-9}$  cm/s となる<sup>17)</sup>。なお、化学物質が一日かけて角層表層部の1層深部に浸透した場合でも、この部分は剥がれるので、表皮の生細胞がある顆粒層、有棘層、基底層には化学物質は移行しないことになる<sup>18)</sup>。すなわち、化学物質の皮膚を介する透過係数が  $1 \times 10^{-9}$  cm/s より小さければ、化学物質は角層実質層を透過しないと結論づけられる<sup>18)</sup>。逆に、 $1 \times 10^{-9}$  cm/s より大きければ、化学物質は皮膚透過し全身循環系に吸収される可能性がある。

Table 2 に皮膚に適用される種々の薬物の皮膚透過係数の文献値を示す。これら皮膚に適用される薬物は、その薬効から局所作用薬と全身作用薬に分類できる。Table 2 からわかるように、局所作用薬は  $1 \times 10^{-9}$  cm/s かそれ以下の値を示すものが多い。一方、全身作用薬は明らかに  $1 \times 10^{-9}$  cm/s より大きい値を示す。これらのデータからわかるように、皮膚透過係数はその化学物質皮膚適用 (曝露) 後の作用部位を予測するのに大変有用な指標となる。

以上示したように、経皮曝露された化学物質の危険性、安全性の評価には経皮吸収 (皮膚透過係数) という概念が大変重要となる。なお、この推定法は曝露される化学物質が角層を経て皮膚中に浸透する場合のみ成り立つ。この概念を Fig. 1 に示す。

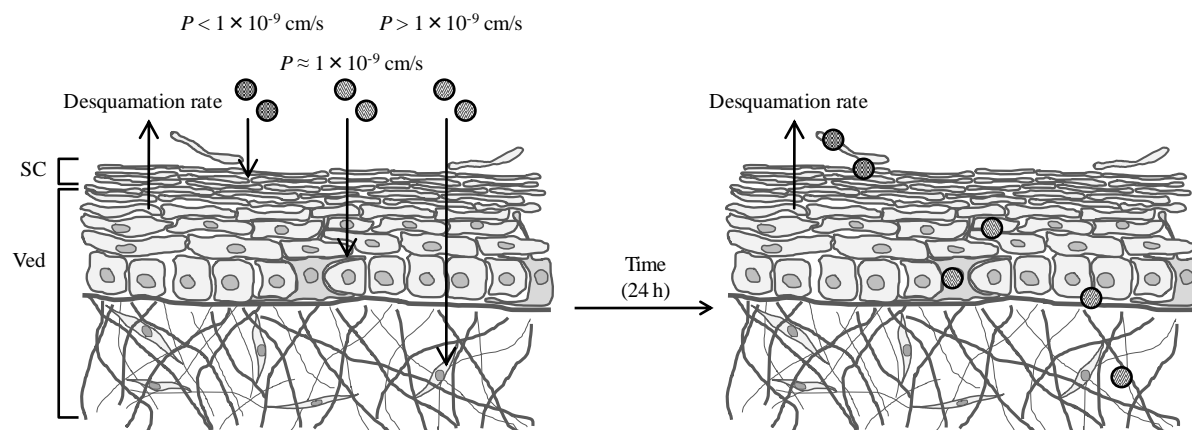


Fig. 1 Schematic representation of skin permeation images expected by comparing the permeability coefficient,  $P$ , with the desquamation rate ( $\approx 1 \times 10^{-9} \text{ cm/s}$ )

SC; stratum corneum, Ved; viable epidermis and dermis

本編では、まずモデル曝露物質の皮膚透過性を測定して  $P$  を求め、得られた  $P$  と desquamation rate の関係により、3種の殺虫成分の皮内浸透性を評価した。また同時に、モデル殺虫成分  $p$ -クレゾールの濃度と Hill 式の関係<sup>12)</sup>から、皮膚曝露された  $p$ -クレゾールの刺激性を評価した。さらに、 $p$ -クレゾールが全身循環系に移行した後の全身安全性についても考察した。

Table 2 Permeability coefficients of topically applied drugs

Expected site of effect	Compound name	Molecular weight	Permeability coefficient (cm/s)	Reference
Local	Acyclovir	225.2	$4.7 \times 10^{-7}$	[18]
	Clobetasol propionate	410.9	$2.2 \times 10^{-8}$	[19]
	Clotrimazole	344.8	$1.4 \times 10^{-10}$	[20]
	Diclofenac	269.1	$1.8 \times 10^{-7}$	[21]
	Hydrocortisone	362.5	$8.3 \times 10^{-10}$	[22]
	Metronidazole	171.2	$7.5 \times 10^{-8}$	[21]
	Penciclovir	253.3	$2.8 \times 10^{-8}$	[18]
	Pimecrolimus	810.5	$4.2 \times 10^{-11}$	[23]
	Tacrolimus	804.0	$2.6 \times 10^{-9}$	[23]
	Terbinafine	291.4	$2.8 \times 10^{-10}$	[20]
Systemic	Caffeine	194.2	$2.9 \times 10^{-8}$	[34]
	Estradiol	272.4	$8.3 \times 10^{-8}$	[20]
	Fentanyl	336.5	$9.7 \times 10^{-6}$	[25]
	Isosorbide dinitrate	236.1	$1.3 \times 10^{-6}$	[26]
	Methylphenidate	233.3	$7.1 \times 10^{-7}$	[27]
		233.3	$1.8 \times 10^{-8}$	[26]
	Nicotine	162.2	$7.5 \times 10^{-7}$	[28]
	Nitroglycerine	227.1	$9.9 \times 10^{-5}$	[29]
	Norelgestromin	327.5	$4.1 \times 10^{-6}$	[27]
	Oxybutynin	357.5	$2.8 \times 10^{-8}$	[27]
	Rivastigmine	250.3	$1.5 \times 10^{-6}$	[27]
	Rotigotine	315.5	$3.6 \times 10^{-8}$	[30]
	Salicylic acid	138.1	$6.1 \times 10^{-7}$	[20]
		138.1	$4.1 \times 10^{-7}$	[27]
	Scopolamine	303.4	$1.4 \times 10^{-8}$	[24]
		303.4	$2.2 \times 10^{-7}$	[27]
	Sumatriptan	295.4	$6.9 \times 10^{-9}$	[31]
	Testosterone	288.4	$1.1 \times 10^{-7}$	[20]

## 第2節 実験の部

### 1. 試薬および実験材料

殺虫成分である *p*-クレゾール、ダイアジノン、溶剤として用いられるケロシンおよび酸化防止剤である 2,6-Di-*t*-butyl-4-methylphenol (BHT) は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) より購入した。レスメトリンは住友化学株式会社 (東京、日本) から供与された。その他の試薬および溶媒は特級品または液体クロマトグラフ (HPLC) 用を和光純薬工業株式会社より購入して用いた。なお、これらの試薬は精製せずにそのまま用いた。

正常ヒト新生児包皮表皮角化細胞 (HEK)、正常ヒト新生児包皮表皮角化細胞増殖用無血清液体培地 (HuMedia-KG2)、トリプシン/EDTA 溶液、トリプシン中和液および HEPES 緩衝液は倉敷紡績株式会社 (大阪、日本) から購入した。ヒト皮膚線維芽細胞株 (HDF) は東洋紡績株式会社 (大阪、日本) から購入した。Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) は大日本製薬株式会社 (東京、日本) から購入した。Fetal bovine serum (FBS) は ICN Biomedicals, Inc. (Aurora, OH, U.S.A.) から購入した。トリプシンは Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, U.S.A.) から購入した。3-(4, 5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT 試薬) はシグマアルドリッチジャパン株式会社 (東京、日本) から購入した。

### 2. 実験動物

WBM/ILA-Ht 系雄性ヘアレスラットおよび Wistar 系雄性ラット (200-250 g) は城西大学生命科学研究センター (埼玉、日本)、石川実験動物研究所 (埼玉、日本) または埼玉実験動物 (埼玉、日本) から購入した。なお、動物の飼育および実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学動物実験規

定に従い行った。

3. ヘアレスラット腹部皮膚を用いた *in vitro* 透過性試験および皮膚中濃度測定

ペントバルビタールナトリウム麻酔下 (50 mg/kg, *i.p.*)、剃毛処理したヘアレスラットの腹部皮膚を、左右から1枚ずつ摘出した。ただし、角層除去皮膚は adhesive テープ (セロテープ<sup>®</sup>、ニチバン株式会社、東京、日本) で20回ストリップ処理し、角層を完全に除去した後に摘出した皮膚を用いた。摘出皮膚 (全層皮膚および角層除去皮膚) は真皮側の脂肪を丁寧に取り除き、縦型拡散セル (セル容量 4.0 mL、有効透過面積 0.64 cm<sup>2</sup>) に取り付けた。各バイオサイドを種々濃度に溶解させた (*p*-クレゾール、ダイアジノン、およびレスメトリン濃度をそれぞれ 100 μmol/mL、16.4 μmol/mL、および 0.59 μmol/mL とした) pH 7.4 等張リン酸緩衝等張溶液 (PBS) またはケロシン溶液 0.5 mL を角層側に適用した (レスメトリンはケロシン溶液のみで実験した)。ここで PBS は汗をかいた皮膚が化学物質に触れた場合を想定したモデル溶媒として、ケロシンは殺虫剤溶媒として実用化されており、スプレー剤等が直接皮膚に曝露する場合を想定したモデル溶媒として使用した。実験中、皮膚温度を 32°C に保ち、真皮側の PBS をマグネティックスターラーで攪拌した。経時的に真皮側の溶液 400 μL 採取し、その都度、同量の PBS を補充した。実験時間を 90 分 (*p*-クレゾール) および 24 時間 (ダイアジノンおよびレスメトリン) とし、実験終了後にドナー溶液は回収した。サンプルは、同量のアセトニトリルと混和後、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 5 min) することでタンパク質を除去し、測定に供された。

皮膚透過実験終了後に、ヘアレスラット皮膚の有効透過面積部分を切り取り、PBS 4.0 mL 存在下ではさみを用いて細断し、さらに氷冷下電動ホモジナイザー (Polytron PT-MR 3000, Kinematica, Switzerland) (10,000 rpm, 3 min) を用いてホ

モジナイズした。*p*-クレゾール適用群の皮膚ホモジネートサンプルは、遠心分離（15,000 rpm, 4°C, 5 min）し、その上清をバイアルに集めた。ダイアジノンとレスメトリン適用群の皮膚ホモジネートサンプルは同量の 2 ppm BHT 入りジクロロメタンと混和・振とうし<sup>32)</sup>、遠心分離（15,000 rpm, 4°C, 10 s）した後の下層のジクロロメタン層をバイアルに集めた。

これらのサンプル溶液はタンパク質除去と酸化防止処理を施した。すなわち、*p*-クレゾールは、採取した溶液 200  $\mu$ L を同量のアセトニトリルと良く混和し、遠心分離（15,000 rpm, 4°C, 5 min）によりタンパク質除去を行った。レスメトリンは、採取した溶液 500  $\mu$ L を同量の 2 ppm BHT 入りメタノールと良く混和した。さらに、この混液 0.5 mL とジクロロメタン 0.5 mL を混ぜ、振とうした。また、ダイアジノンのレシーバー溶液は特別な調製はせずにそのまま測定に用いた。

得られた各サンプル溶液中の各化学物質濃度は、HPLC または GC-MS を用いて測定した。HPLC システムは、LC-10AT<sub>VP</sub> ポンプ、SIL-10ADVP オートインジェクター、SPD-10A<sub>VP</sub> 紫外・可視吸光度検出器、CTO-10AS<sub>VP</sub> カラムオーブン（株式会社島津製作所、京都、日本）から構成され、C18 シリカゲルを充填した Superiorex ODS column（株式会社資生堂、東京、日本）を定量に用いた。サンプル中の *p*-クレゾール濃度は、280 nm の吸光度により測定した。4-ヒドロキシ安息香酸メチルを内部標準物質として用いた。移動相には 40% アセトニトリル水溶液を用い、流速 1.2 mL/min、カラム温度を 40°C に設定し、20  $\mu$ L を注入した。サンプル中のダイアジノン濃度は、245 nm の吸光度により測定した。移動相に 3 : 1 : 1 のアセトニトリル、メタノール、水の混合溶媒<sup>32)</sup>を用いた他は、*p*-クレゾールの測定と同様の方法を用いた。

レスメトリンは、6890N GC（Agilent Technologies, Waldbronn, Germany）を用いて定量した。検出器には Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector



を用い、キャピラリーカラム (HP-5ms, 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm of film thickness, Agilent Technologies) によって構成された GC/MS を用いて分析した。インジェクション容量 2 μL をスプリットレス分析により装置に導入し、流速 1 mL/min、サンプル導入部、イオンソースの温度はそれぞれ 280°C および 230°C に設定した。カラムは、50°C から 170°C まで、昇温速度を 40°C/min に設定し、その後 170°C から 300°C へ昇温速度を 6°C/min に設定し分析を行った。検出は、セレクトイブイオンモードにより行い、質量電荷比が 123 および 171 のピーク<sup>33)</sup>からレスメトリン濃度を求めた。

#### 4. HEK および HDF 生存率に対する *p*-クレゾールの影響評価

HEK および HDF は、HuMedia-KG2 および 10% FBS 添加 DMEM を培地として用い、CO<sub>2</sub> インキュベータ (MCO-18AIC、三洋電気株式会社、大阪、日本) 中で 5% CO<sub>2</sub>, 95% Air, 37°C の条件下で培養した。細胞は 80% コンフルエントとなった時点でトリプシン処理によりディッシュより剥離し、実験に使用した。

HEK または HDF を 96 well microplate (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、東京、日本) に  $2.0 \times 10^5$  cells/mL となるように調製した細胞懸濁液を 100 μL 播種し ( $6.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)、インキュベータ内で 24 時間プレインキュベートした。*p*-クレゾールは細胞培養時の培地を用いて各濃度溶液を調製した。HEK または HDF に調製した溶液 100 μL を 3、12 および 24 h 曝露した後、0.3 mg/mL MTT-培地溶液 100 μL を 3 時間適用した。細胞への曝露は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在環境下で行った。その後 MTT-培地を除去し、0.04 M HCl-isopropanol 溶液 100 μL を適用し、室温・暗所で 30 min 間放置し生成したホルマザンを抽出した。抽出したホルマザン溶液はマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2<sup>®</sup>、モレキュラーデバイスジャパン株式会社、東京、日本) により波長 570 nm (対照波長 650 nm) の

吸光度を測定し、死細胞率を求めた。この時クレゾール濃度 0  $\mu\text{mol/mL}$  適用群をコントロールとして用いた。Hill 式 (式 (1)) 中のパラメータ ( $TC_{50}$ ,  $T_{max}$ ,  $\gamma$ ) は得られた死細胞率から最小二乗法を用いて Hill 式にあてはめ求めた。

#### 5. *p*-クレゾールのラット全身クリアランス測定

ウレタン麻酔下 (1.0 g/kg, *i.p.*) の Wistar ラットに 100  $\mu\text{mol/mL}$  *p*-クレゾール溶液 250  $\mu\text{L}$  (25  $\mu\text{mol}$ ) を急速単回頸静脈内投与した。実験中は動物用ホットカーペットを使用し、動物の体温を維持した。投与した箇所と反対側の頸静脈より経時的に血液 300  $\mu\text{L}$  をヘパリン入り注射筒を用いて採取した。採取した血液を遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) し、その上清を血漿サンプルとした。血漿サンプルはアセトニトリルによるタンパク質除去操作後、前述した方法に従って血漿中 *p*-クレゾール濃度を測定した。

また、得られた血中濃度-時間プロファイルより、以下に示す 2-コンパートメントモデルに従う消失速度式 (5) (血漿クリアランスモデル, *i.v. bolus*) に Microsoft Excel2003 ソルバーを用いてフィッティングすることで、各動態パラメータ ( $A$ ,  $B$ ,  $\alpha$ , および  $\beta$ ) を求めた。

$$C = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad (5)$$

#### 6. 統計解析

データは特別な記載がない限り平均値  $\pm$  S.E.として表記した。結果の解析には Student's t-test を用い、有意水準を 1%または 5%とした。

### 第3節 結果

#### 1. *p*-クレゾールの皮膚透過性および皮膚中濃度

Figure 2 に雄性ヘアレスラット摘出全層皮膚および角層除去皮膚を介した *p*-クレゾールの累積皮膚透過量-時間プロファイルを示す。100  $\mu\text{mol/mL}$  *p*-クレゾールのケロシン溶液 0.5 mL を適用した場合、全層皮膚の 90 分累積透過量は 7.28  $\mu\text{mol/cm}^2$ 、同濃度の PBS 溶液を適用した場合は 2.18  $\mu\text{mol/cm}^2$  であり、ケロシンを用いた方が有意に ( $p < 0.01$ , 3.3 倍) 高くなった。一方、角層除去皮膚の 90 分累積透過量はケロシン溶液で 11.7  $\mu\text{mol/cm}^2$ 、PBS 溶液で 12.0  $\mu\text{mol/cm}^2$  であり、両溶液間で有意差が見られなかった。*p*-クレゾールの角層除去皮膚と全層皮膚透過性を比べると、ケロシンおよび PBS 溶液はともに角層を除去<sup>34)</sup>した角層除去皮膚透過量が高くなった。

次に *p*-クレゾールの皮膚中濃度を調べた。Figure 3 に *in vitro* 皮膚透過実験開始後 90 分の各皮膚中の *p*-クレゾール濃度を示す。全層皮膚にケロシン溶液を適用したときの *p*-クレゾール皮膚中濃度は 62.0  $\mu\text{mol/g}$ 、PBS 溶液を適用したときの皮膚中濃度は 33.9  $\mu\text{mol/g}$  であり、ケロシンを用いた方が有意に ( $p < 0.01$ , 1.8 倍) 高かった。また角層除去皮膚透過実験後において、*p*-クレゾールの皮膚中濃度は、ケロシン溶液を用いたときには 51.7  $\mu\text{mol/g}$ 、PBS 溶液を用いたときには 37.0  $\mu\text{mol/g}$  であったが、有意差は認められなかった ( $p = 0.070$ )。

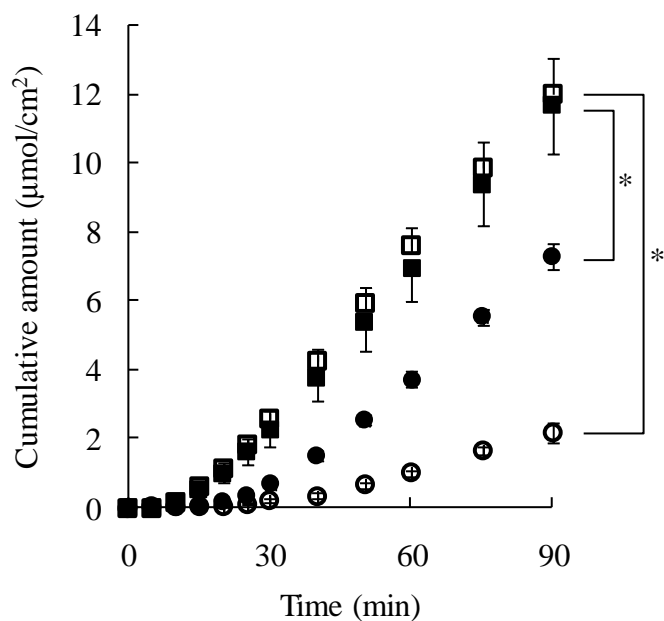


Fig. 2 Permeation profile of *p*-cresol through hairless rat full-thickness (circle) and stripped (square) skin. Closed and open symbols indicate kerosene and PBS, respectively, as donor vehicle. Each data point shows the mean  $\pm$  S.E. of 3 or 4 separate experiments. \*;  $p < 0.05$

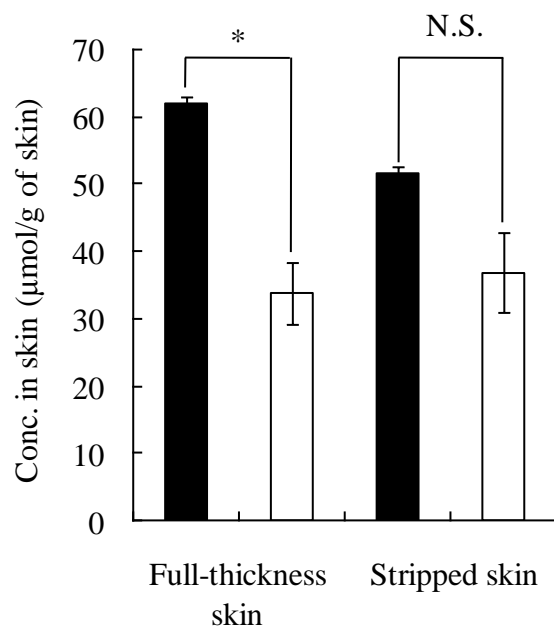


Fig. 3 Concentration of *p*-cresol in skin after the *in vitro* permeation experiment. A donor solution of kerosene (closed column) or PBS (open column) was used. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of three separate experiments. \*;  $p < 0.05$ , N.S.; no significant difference

## 2. ダイアジノンの皮膚透過性および皮膚中濃度

ダイアジノン (164 nmol/mL) の 24 時間曝露では、全層皮膚および角層除去皮膚どちらを用いた透過性評価においても、PBS およびケロシン溶液からの透過量は検出限界以下であった。Figure 4 にダイアジノンの *in vitro* 透過実験開始 24 時間後の各皮膚中のダイアジノン濃度を示す。全層皮膚にケロシン溶液を適用したときのダイアジノンの皮膚中濃度は 15.6 nmol/g、PBS 溶液を適用したときの皮膚中濃度は 76.8 nmol/g であり、*p*-クレゾールの結果と異なり PBS を用いた方が 4.9 倍高かった。また角層除去皮膚にケロシン溶液を適用したときのダイアジノンの角層除去皮膚中濃度は 1.19 nmol/g、PBS 溶液を適用したときの角層除去皮膚中濃度は 84.2 nmol/g であり、PBS を用いた方が 71 倍高かった。さらに皮膚移行率の指標となる適用ドナー濃度に対する皮膚中濃度の比はどちらの溶媒を用いた場合も 1.0 を超えた (適用濃度よりも皮膚中濃度の方が高くなった)。

以上、ダイアジノンの皮膚透過量は検出限界以下であったが、皮膚中への移行は観察された。

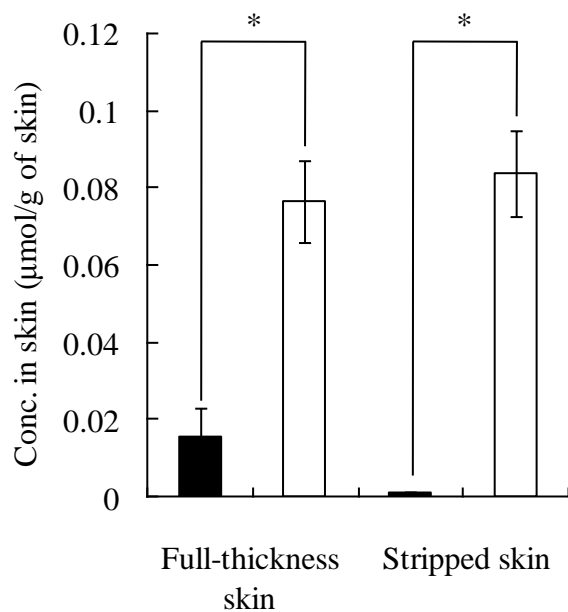


Fig. 4 Concentration of diazinon in the skin after the *in vitro* permeation experiment. A donor solution of kerosene (closed column) and PBS (open column) was used. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of six separate experiments. \*;  $p < 0.05$

### 3. レスメトリンの皮膚透過性および皮膚中濃度

レスメトリン (590 nmol/mL) の 24 時間曝露では皮膚透過量は検出限界以下であった。そこで、ドナー濃度を 10 倍 (5.9  $\mu\text{mol/mL}$ ) にし、レシーバーに 4% アルブミンを添加した系<sup>35)</sup>についても皮膚透過実験を行った。しかし、全層皮膚および角層除去皮膚共、レスメトリンおよびその分解物の皮膚透過および皮膚中移行は観察されなかった。

### 4. *p*-クレゾールによる培養皮膚細胞毒性評価

Figure 5 に主なヒト皮膚構成細胞である表皮由来細胞の HEK および真皮由来細胞の HDF の培地 (HuMedia-KG2 および 10% FBS 添加 DMEM) に種々濃度の *p*-クレゾールを 3、12、24 時間適用した時の死細胞率を示す。皮膚透過実験に用いた濃度 (100  $\mu\text{mol/mL}$ ) よりも低い濃度で、ほぼ 100% の細胞が死滅した。また、Table 3 には得られた死細胞率 ( $T$ ) を Hill 式 (式 (1)) に当てはめた時の  $T_{max}$ 、 $\gamma$ 、 $TC_{50}$  の各パラメータを示す。*p*-クレゾールの細胞毒性は濃度依存的であり、*p*-クレゾールの適用時間を 12 から 24 時間に延長すると、 $TC_{50}$  が HEK では 8.37 から 6.69  $\mu\text{mol/mL}$  に、HDF では 6.04 から 5.27  $\mu\text{mol/mL}$  とわずかであるが低値に移行した。 $\gamma$  値は曝露時間の延長に伴い HEK および HDF でわずかに上昇する傾向を示したが、今回用いた 2 つの細胞種間に大きな違いはなかった。

また、90 分間の透過実験終了後の *p*-クレゾール皮膚中濃度は、HEK および HDF に *p*-クレゾールを 3 時間曝露した時の  $TC_{50}$  値より高かった (Fig. 3, Table 3) ことから、今回用いたような、高濃度の *p*-クレゾール (100  $\mu\text{mol/mL}$ ) の 30 分間の皮膚曝露が起こった場合、皮膚局所毒性が起り得ると考えられた。



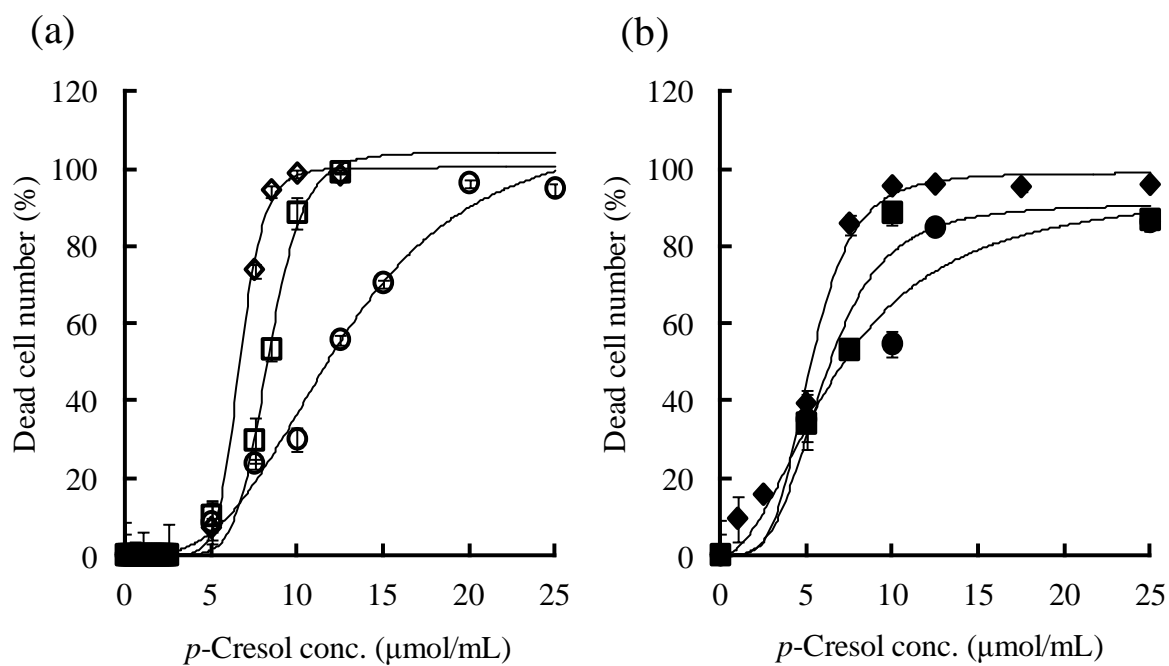


Fig. 5 Relationship between the number of dead cells and concentration of *p*-cresol applied on HEK (a) or HDF (b) for 3 (circle), 12 (square) and 24 (diamond) hours. Each value shows the mean  $\pm$  S.E. of six experiments. Solid lines are fitted curves drawn by the least squares method to Hill equations.

Table 3 Irritation parameters for the 3-, 12-, or 24-hour exposure of HEK or HDF to *p*-cresol

Cell	Applied period (h)	$T_{max}$ (%)	$\gamma$	$TC_{50}$ ( $\mu\text{mol/mL}$ )
HEK	3	111	3.12	12.5
	12	104	8.43	8.37
	24	100	9.69	6.69
HDF	3	94.9	2.03	6.80
	12	90.9	3.63	6.04
	24	98.9	4.37	5.27

##### 5. *p*-クレゾール皮膚曝露後の血中濃度予測

Figure 6 にラットに 1 匹あたり 25  $\mu\text{mol}$  の *p*-クレゾールを静脈内に投与した後の血中濃度の経時推移を示す。全身投与された *p*-クレゾールの血中濃度は時間経過とともに速やかに減少した。*p*-クレゾールの消失過程について、赤池の情報基準 (AIC) <sup>36)</sup> によるモデル推定を行ったところ、体内動態は 2-コンパートメントモデルに従うことが示された。そこで、本実験結果を式 (5) に示した 2-コンパートメントモデルに当てはめ *p*-クレゾールのラットの体内動態パラメータ  $A$ ,  $B$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  をそれぞれ算出したところ、0.12  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.06  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.38  $\text{min}^{-1}$ 、0.09  $\text{min}^{-1}$  となった。さらに、消失速度定数、分布容積、全身クリアランスはそれぞれ 0.18  $\text{min}^{-1}$ 、140 mL、25 mL/min と計算された。

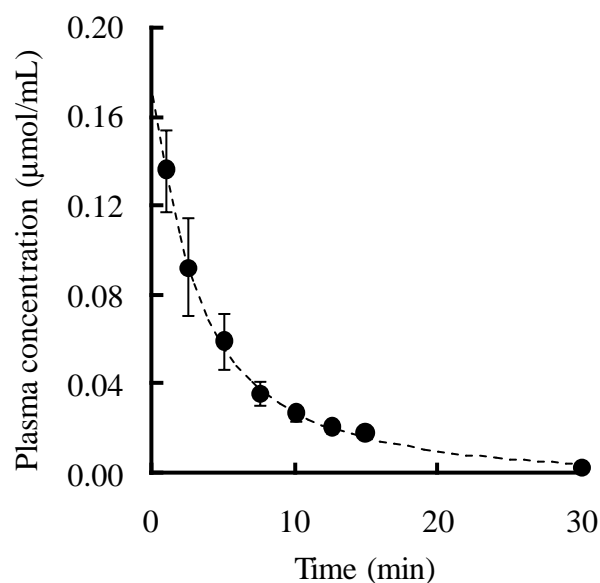


Fig. 6 Elimination kinetics of *p*-cresol after *i.v.* injections to rats. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of four separate experiments. Broken line shows a theoretical curve drawn by toxicokinetic parameters estimated using the least squares method.

皮膚曝露された物質の皮膚透過が定常状態を迎えると、経皮吸収挙動は 0 次吸収過程になると仮定できる。そこで、定常状態時の血中濃度を、皮膚透過係数と全身クリアランスを用いた式 (4) を用いて予測した。その結果、 $10 \text{ cm}^2$  の皮膚が  $100 \text{ } \mu\text{mol/mL}$  の *p*-クレゾールに曝露した場合、定常状態血中濃度は健全皮膚モデルを想定した全層皮膚に曝露し続けた場合  $0.014\text{-}0.046 \text{ } \mu\text{mol/mL}$  になり、損傷皮膚モデルを想定した角層除去皮膚に曝露し続けた場合には  $0.063 \text{ } \mu\text{mol/mL}$  となると計算された。これは、細胞毒性試験から求めた  $TC_{50}$  値よりはるかに低く、また、 $\gamma$  値を考慮しても、傷害性は起こらないと考えられた。

## 第4節 考察

現在、多くの新規化学物質が我々人類の生活の質を向上するために用いられるようになったが、同時にこれら化学物質の曝露、特に長期にわたる曝露が懸念されるようにもなった。そこで本編では、殺虫剤成分の実使用条件下での皮膚曝露に焦点を当て、代表的なバイオサイド成分である *p*-クレゾール、ダイアジノンおよびレスメトリンを選択し、その皮膚透過性と皮膚落屑速度を比較することで皮膚移行性の評価が可能かどうか検討した。化学物質の皮膚透過ルートとして、角層実質を透過するルートのほかに毛嚢や汗腺などの付属器官<sup>37)</sup>を透過するルートも知られている。しかし Potts and Guy<sup>38)</sup>によれば、化学物質の *n*-オクタノール-水分配係数 ( $K_{ow}$ ) が 0.1 から 1000 になると、皮膚透過係数 ( $P$ ) は 690 倍になると計算され、このことから明らかなように、これら付属器官ルートへの寄与は化学物質の脂溶性が上がるほど無視できるくらいに小さくなると推定される<sup>39)</sup>。今回用いた *p*-クレゾールの  $K_{ow}$  は、1.94 であり (Table 1)、毛嚢経路の透過寄与は無視できると予測される。

今回バイオサイド皮膚適用時の溶媒として用いたケロシンは殺虫剤に直接触れた場合の曝露形態のモデル溶媒として使用した (殺虫剤液の多くはケロシンとなっている)。また、PBS は汗の代用品として用いた。すなわち、一度噴霧された殺虫剤が建材などに付着し、その後建材などに汗をかいた皮膚が触れた場合の曝露形態のモデル溶媒として使用した。なお、化学物質の正確な皮膚曝露評価には、ヒト皮膚透過性を調べるのが大変重要であるが、ヒト皮膚は倫理的問題から入手が困難であり、多くの化合物の安全性を評価する第一段階としてあまり現実的ではない。そこで、今回はすでにヒト皮膚透過性との相関性が報告されている<sup>40)</sup>ヘアレスラット皮膚を用いた透過実験および皮膚中濃度測定を

行った。本研究にあたって注目した点は、角層はすでに死んでいる組織であるので、ここでは毒性は生じないということである。言い直せば、皮膚表面に曝露されただけでは毒性は生じない、また、曝露された化学物質は角層を通り抜け、生きた表皮・真皮に到達しなければ通常毒性が生じることはないと考えられる点である。

ヘアレスラット皮膚透過実験の結果、*p*-クレゾールは極めて速やかに皮膚を透過することがわかった (Fig. 2)。式 (2) を用いて皮膚透過実験より算出した *p*-クレゾールの全層皮膚および角層除去皮膚透過係数はいずれも  $10^{-5} - 10^{-6}$  cm/s オーダーを示した (Table 4)。化学物質の皮膚透過係数が落屑速度以下の場合、化学物質の皮膚内への浸透はほとんどないと考えられるが、*p*-クレゾールの透過係数は落屑速度である  $1 \times 10^{-9}$  cm/s を大きく (1000 - 10000 倍程度) 上回り、*p*-クレゾールは皮膚中に検出されると考えられた。皮膚の比重を  $1 \text{ g/cm}^3$  と考えた場合<sup>41)</sup>、皮膚中の *p*-クレゾール濃度は適用濃度に近くなり (Fig. 3)、*p*-クレゾールによる皮膚局所毒性が疑われた。また、その高い皮膚透過性 ( $10^{-5} - 10^{-6}$  cm/s) から *p*-クレゾールの全身循環系への移行をも懸念された。

一方で、ダイアジノンおよびレスメトリンの 24 時間透過実験では皮膚透過は見られなかった。定量下限値と、透過試験時間から算出・推定されるダイアジノンとレスメトリンの皮膚透過係数は  $10^{-10}$  オーダーと  $10^{-9}$  オーダーであり、これらの値は落屑速度と大きな差はなかった (Table 4)。化学物質の皮膚透過係数が落屑速度以下の場合、化学物質は角層を通り抜けることなく体外へ押し出されると考えられる。このことは、24 時間の *in vitro* 実験から得られたこれらの物質の皮膚中濃度が著しく低い値を示したことから支持された。また、レスメトリンはその構造中にエステル基を有していることから皮膚内で代謝されることが考えられたが、代謝物は確認できなかった。

Table 4 Relationship between permeability coefficient and the desquamation rate

	$P_{\text{kerosene}}$ (cm/s)	$P_{\text{PBS}}$ (cm/s)	$P_{\text{des}}$ (cm/s)
<i>p</i> -Cresol	$1.91 \times 10^{-5}$	$5.97 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-9}$
Diazinon	$< 7.28 \times 10^{-10}$ *	$< 7.28 \times 10^{-10}$ *	$1 \times 10^{-9}$
Resmethrin	$< 1.82 \times 10^{-9}$ *	-	$1 \times 10^{-9}$

Full-thickness skin permeability coefficients ( $P$ , cm/s) of biocides were predicted from *flux* at the steady-state or limit of quantification (LOQ) value.

\* calculated from LOQ

*p*-クレゾールのように皮膚透過係数が落屑速度を上回る物質の場合 (Table 4) はその安全性が懸念される。そこで、*p*-クレゾールの皮膚局所毒性を評価するため、*p*-クレゾール濃度と細胞傷害性の関係から Hill 式を用いて最大毒性  $T_{max}$ 、 $TC_{50}$  値、Hill 係数  $\gamma$  などのパラメータを算出した<sup>12)</sup> (Table 3)。最大毒性は、HEK および HDF を用いたどの群もおおよそ 100% となり、曝露時間の延長に伴い  $TC_{50}$  値が低濃度にシフトしたことから、*p*-クレゾールの細胞毒性は時間依存的である可能性が示された。また、Hill 係数 ( $\gamma$ ) は適用時間に伴わずかに上昇する傾向がみられるものの、大きな変化は見られないため、細胞障害メカニズムは適用時間にかかわらず同じであると考えられた。さらに、今回実験に用いた適用時間での皮膚中 *p*-クレゾール濃度 (Fig. 3) は細胞障害性試験の結果より求めた  $TC_{50}$  よりも高値 (Table 3) を示したため、*p*-クレゾールによる皮膚毒性が発現する可能性が示された。なお、我が国の殺虫剤の使用頻度が夏季に集中することから、一般生活者に焦点を当てて今回の研究では急性毒性を考慮することとし

た。なお、産業従事者に焦点を当てた場合では、*p*-クレゾールとの慢性的な接触も考えられるため、慢性毒性についても考慮する必要があるだろう。

*p*-クレゾールの皮膚透過係数から推測すると、全身循環系への移行が十分起こり得ることを上に述べた。そこで、*p*-クレゾールが経皮吸収された時の定常状態時の血中濃度を皮膚透過係数と *in vivo* 代謝実験より得られた全身クリアランス値より式 (4) を用いて予測した。ラットを用いた場合、*p*-クレゾールのラット体内からの消失は非常に速やかであり (Fig. 6)、たとえ 100  $\mu\text{mol/mL}$  の *p*-クレゾールにヘアレスラットの皮膚が長時間 (定常状態に達するまで ; 20 分以上) 広範囲 (10  $\text{cm}^2$ ) にわたって曝露されたとしても、血中濃度は 0.05  $\mu\text{mol/mL}$  程度にしかならないことがわかった。*p*-クレゾールの蓄積性は低いことが知られており<sup>42)</sup>、急性毒性 ( $LD_{50}$ ) は、207  $\text{mg/kg}$ <sup>43)</sup>との報告があり、これを体重 300 g のラットに急速静脈内投与したとしても血中濃度は 4.3  $\mu\text{mol/mL}$  と計算され、今回の実験系ではこの濃度をはるかに下回るため、重篤な全身毒性はほとんど起こらないのではないかと考えられた。また、本論文研究の目的が経皮曝露評価であるとの観点から、一度全身吸収された *p*-クレゾールが皮膚中に再分配し皮膚に障害を与えることを仮定した。しかし、予測される血中濃度 (0.05  $\mu\text{mol/mL}$ ) は MTT 試験結果からはほとんど毒性のない濃度であった。したがって、一度皮膚曝露された *p*-クレゾールが曝露されていない皮膚部位に毒性を示す可能性は低いと考えられた。さらに、*p*-クレゾールの実使用は *rinse-off* 使用が多く *leave-on* でないため、このような使用状態での皮膚毒性はほとんどないと判定できた。

以上の結果より、化学物質の皮膚透過係数と皮膚落屑速度の比較から、 $T_{max}$  モデルから得られる毒性に関するパラメータを用いて、皮膚中濃度や血中濃度と比較することで、皮膚局所安全性および全身毒性のより正確な安全性の予測が行えると考えられた。さらに皮膚透過係数と落屑速度・全身クリアランスの

比較は、毒性物質だけではなく、薬物の皮膚局所・全身の pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) 評価にも応用が可能であることは明らかであり、皮膚透過係数算出の有用性が改めて示された。今回用いた化合物は経皮曝露後に生体内変換が起こらなかったが、含窒素化合物やエステル化合物の中には、皮膚内に存在する代謝酵素 (N-アセチルトランスフェラーゼ、エステラーゼなど) により生体内変換を受ける可能性がある。また、生体内変換により代謝活性化を受ける物質もあるため、この現象は曝露評価での重要な因子になりうる。そのため、化学物質の皮膚曝露後の安全性評価を行うためには、化学物質の化学構造をよく考慮して検討することが不可欠である。



## 第5節 小括

殺虫成分であり、皮膚の内部で代謝を受けない物質として、*p*-クレゾール、ダイアジノン、レスメトリンの3種類の化学物質を選択し、これら化学物質の皮膚透過性と、皮膚中化学物質濃度を求め、角層の落屑速度を用いて考察した。その結果、皮膚曝露後の化学物質の皮膚移行性は、皮膚透過係数と落屑速度との比較によりある程度予測が可能であることが明らかとなった。また、皮膚中や全身中に移行しうる皮膚透過係数が大きい化学物質については、培養細胞を用いた細胞毒性試験から求めた  $TC_{50}$  や  $\gamma$  値を用いることで、皮膚局所毒性が予測可能となると考えられた。さらに、体内動態挙動の解析により化学物質の消失クリアランスを求めることで定常状態時の血中濃度を予測することができ、これが全身毒性の発現の予測にも有用となると考えられた。以上のことより、化学物質の皮膚透過係数を用いる本手法は多くの化学物質の安全性のみならず有効性を予測する上で有用なツールとなることがわかり、特に、皮膚透過性の低い化学物質に関して、重要な知見を与えるツールとなることがわかった。

## 第2編 代謝を受ける化学物質皮膚曝露後の皮内動態評価

フタル酸ジエステル類は、可塑剤としての有用性および低原価等から、化学繊維やプラスチック製品<sup>44), 45)</sup>を始め、塩化ビニル製品<sup>46)</sup>、建築資材<sup>47)</sup>、カーペット、化粧品、接着剤等多くのもの<sup>48)</sup>に封入されている。近年、フタル酸ジエステル類は、内分泌かく乱物質でありシックハウス症候群の原因物質となる可能性が指摘された。また、人工授精卵培養液中からもフタル酸エステル類が検出され、受精卵や胎児への影響が懸念されている<sup>49)</sup>。これらのことから、我が国では、特定のおもちゃや食品容器包装へのフタル酸エステルの使用が禁止されるようになった。しかし、フタル酸ジエステルは準揮発性物質<sup>50)</sup>であり、我々の身の回りの多くの製品中に含有されているため、ヒトの皮膚もかなり高頻度でこの化学物質に曝露されている<sup>51, 52)</sup>と予想される。

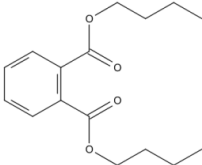
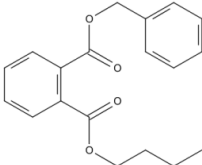
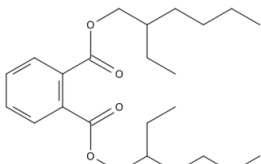
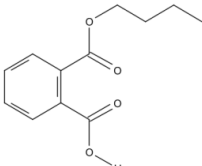
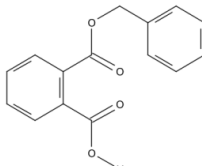
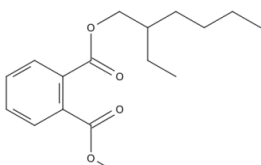
種々の外界異物の侵入を防ぐため、皮膚には角層に大きな物理バリアがあり、さらに表皮・真皮中に酵素バリアがある。しかし一方で、ある程度の脂溶性を有し、分子量が500以下の化学物質の多くは、速度の大小はあるものの皮膚を浸透・透過し、一部の薬物などでは全身循環系へも移行することが知られている<sup>53)</sup>。また、角層を透過し皮膚内に浸透した化学物質は、生きた表皮や真皮中に存在するエステラーゼやN-アセチルトランスアミナーゼ等によって代謝（一部は活性化）を受けることが知られている。

可塑剤として用いられるフタル酸ジエステル類は、分子量が500以下で脂溶性を示すものが多い。そのため、これらの化学物質が皮膚と接触すると、皮膚を浸透・透過する可能性がある。また、ジエステル体であるために、皮膚内のエステラーゼによってフタル酸モノエステルやフタル酸（PA）となり、生成し

たこれら代謝物が皮膚を透過する可能性もある。したがって、フタル酸ジエステルが皮膚と接触すると、フタル酸ジエステルそのものだけでなく、代謝物も皮膚を介して全身循環系へ移行し、曝露量によっては局所毒性だけでなく全身毒性をも引き起こす可能性がある。しかし、今までにフタル酸ジエステル類の皮膚透過性と代謝性の両者を考慮し安全性を説明した報告はほとんどない。

そこで本研究では、皮膚内で代謝を受けると予想されるエステル基を持ち、可塑剤として汎用される 3 種のフタル酸ジエステル類；フタル酸ジブチル (di-BP)、フタル酸ベンジルブチル (BnBP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (di-iOP) (Table 5) の皮膚透過性および皮膚中濃度をヘアレスラットおよびヒト摘出皮膚を用いて比較・評価した。さらに、これらフタル酸ジエステル類が皮膚中で加水分解物される可能性が考えられたため、フタル酸モノブチル (BP)、フタル酸モノベンジル (BnP) およびフタル酸モノ-2-エチルヘキシル (iOP) (Table 5) の生成速度およびそれらのヘアレスラット皮膚透過速度を調べた。このことより、皮内易代謝性フタル酸ジエステル類の皮膚曝露後の皮内移行性を予測することで、安全性評価手法の開発に向けた評価系の確立を試みた。

Table 5 Chemical and physical properties of phthalates used in this study.

CAS No.	Compounds name (abbreviation)	Chemical structure	Molecular formula (M.W.)	Clog <i>P</i>
84-74-2	Dibutyl phthalate (di-BP)		C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> (278.3)	4.73
85-68-7	Benzyl butyl phthalate (BnBP)		C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> (312.4)	4.97
117-81-7	Di (2-ethylhexyl) phthalate (di- <i>i</i> OP)		C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> (390.6)	8.71
131-70-4	Monobutyl phthalate (BP)		C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> (222.2)	2.72
2528-16-7	Monobenzyl phthalate (BnP)		C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> (256.25)	3.23
4376-20-9	Mono (2-ethylhexyl) phthalate ( <i>i</i> OP)		C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> (278.3)	4.71

## 第1節 理論

化学物質の皮膚曝露後の安全性を考える上で、その物質の皮膚透過性の指標である皮膚透過係数  $P$  (cm/s) を算出することが重要であることは第1編で示した。皮膚が化学物質に曝露されると、化学物質は Fick の拡散則に従い皮膚に分配し、拡散・透過する。このとき、定常状態時の化学物質の単位面積当たりの皮膚透過速度  $J$  (nmol/cm<sup>2</sup>/s) は、式6で示すことができる。

$$J = \frac{DKC_v}{L} = PC_v \quad (6)$$

ここで、 $D$ 、 $K$ 、 $C_v$ 、および  $L$  はそれぞれ化学物質の皮膚バリア中拡散係数 (cm<sup>2</sup>/s)、皮膚バリア/基剤分配係数 (無次元)、化学物質の基剤中濃度 (nmol/mL)、および皮膚バリアの厚み (cm) である。なお、透過係数  $P$  (cm/s) は式(2)より算出される。また、*in vitro* 摘出皮膚透過試験を行いレシーバー溶液中に適用した化学物質が検出されなかった場合は、以下に示す式(3)より下限定量限界値の皮膚透過係数を算出することができることも第1編で示した。すなわち、

$$P_{ul} = \frac{J_{ul}}{C_v} \quad (3)$$

となる。

また、適用化学物質が皮膚中で代謝され、レシーバー溶液中に代謝生成物を検出する場合は、以下に示す式(7)より代謝生成物の皮膚深部移行係数を求めた。ここで、代謝性生物の皮膚深部移行性 ( $P_{metabolite}$  ;  $P_m$ ) は適用化学物質の皮

皮膚透過過程で生成した代謝生成物の皮膚深部移行速度 ( $J_{metabolite}$ ;  $J_m$ ) を適用化学物質の濃度 ( $C_v$ ) で除した値とした。

$$P_m = \frac{J_m}{C_v} \quad (7)$$

第1編でも示したように、皮膚の最外層に存在する角層は約20層の角質細胞層からなり、約20  $\mu\text{m}$  の厚みがある。角層は最外層から一日一層剥がれ落ちるので、角層落屑速度 ( $P_{des}$ ) は1 ( $\mu\text{m}/\text{day}$ ) すなわち約  $1 \times 10^{-9}$  ( $\text{cm}/\text{s}$ ) と算出することができる<sup>17)</sup>。第1編に引き続き、この手法を用いてフタル酸エステル類の皮膚曝露時の皮膚移行量の予測を行った。

一方で、皮膚に浸透した化学物質、特にエステル化合物は、皮膚内に存在する酵素によって代謝を受けることが知られている<sup>54)</sup>。その代謝速度 ( $V$ ) は、一般に以下に示す Michaelis-Menten 式 (8) によってあらわすことができる。

$$V = \frac{V_{max} \cdot C}{K_m + C} \quad (8)$$

ここで、 $K_m$ 、 $V_{max}$  および  $C$  はそれぞれ、ミカエリス定数、酵素反応最大速度および種々化学物質濃度を示す。なお、角層中にはエステラーゼなどの酵素の活性はなく、角層下の表皮や真皮にあると考えた。

そこで本編では第一編と同様に、皮膚透過実験から得られた化学物質の皮膚透過係数  $P$  と角層落屑速度  $P_{des}$  を比較・検討することで、フタル酸ジエステル類の皮膚透過性と皮膚中への移行量を推定した。また、フタル酸ジエステル類の皮膚中での代謝能を評価した。さらに、安全性評価をする時には皮膚透過性のみならず皮膚中濃度も重要であることから、代謝物の皮膚中濃度を比較した。

## 第2節 実験の部

### 1. 試薬および実験材料

フタル酸ジブチル (di-BP)、フタル酸ベンジルブチル (BnBP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (di-*i*OP)、フタル酸モノブチル (BP)、フタル酸モノベンジル (BnP)、フタル酸モノ-2-エチルヘキシル (*i*OP)、フタル酸 (PA)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、およびフルオロリン酸ジイソプロピル (DFP) は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級品または液体クロマトグラフ (HPLC) 用を精製せずにそのまま用いた。Table 5 に本研究で選択したフタル酸エステル類の分子量と  $\text{Clog } P$  をも示す。なお  $\text{Clog } P$  値は Chem Draw Ultra 12.2<sup>®</sup> (PerkinElmer informatics, M.A., U.S.A.) を用いて算出した。

### 2. ヘアレスラットおよびヒト皮膚

WBN/IIa-Ht 系雄性ヘアレスラット (体重 220-260 g) は城西大学生命科学研究センター (埼玉、日本) または石川実験動物 (埼玉、日本) から購入した。なお、動物の飼育および実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学動物実験規定に従い行った。摘出後冷凍処理されたヒト皮膚 (白人女性、51 歳、腹部由来、厚み 490  $\mu\text{m}$  または白人女性、55 歳、腹部由来、厚み約 500  $\mu\text{m}$ ) は、株式会社ケー・エー・シー (京都、日本) より得た。なお、本材料は株式会社ケー・エー・シーのヒト組織由来製品の倫理・安全性委員会の許可を受けたものである。

### 3. ヘアレスラット腹部皮膚を用いた *in vitro* 透過性試験

ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, *i.p.*) のヘアレスラットの腹部皮膚を剃毛後清拭し、ハサミを用いて摘出した。また、損傷皮膚を想定した角層除去皮膚では、セロファンテープ (セロテープ®、ニチバン株式会社、東京、日本) を使用して角層を完全に除去するため 20 回テープストリッピングを行なった後、ハサミを用いて摘出した。摘出した皮膚は真皮側の脂肪を除去後、side-by-side 型拡散セル (有効透過面積 0.95 cm<sup>2</sup>) に装着し、表皮側および真皮側に pH7.4 リン酸緩衝液 (PBS) (for di-BP and BP) または 10% DMSO-PBS 溶液 (for BnBP, BnP, di-iOP, and iOP) をそれぞれ適用し、30 min 水和処理を行った。水和後、表皮側に各濃度に調製したフタル酸エステル溶液 (di-BP; 718 nmol/mL, BnBP; 400 nmol/mL, di-iOP; 256 nmol/mL, BP; 4.0 μmol/mL, BnP; 4.0 μmol/mL, iOP; 1.4 μmol/mL) を 2.5 mL 適用し、皮膚透過実験を行った。真皮側の溶液を経時的にサンプリングし、得られたサンプルは氷冷下で保存した。また、適用したフタル酸ジエステル類とは異なるモノエステル体がレシーバー側から検出された場合 (皮内で変換された場合) は、ジエステル体自身の皮膚透過性を測定するため、エステラーゼ活性の阻害作用を持つフルオロリン酸ジイソプロピル (DFP)<sup>55-57)</sup> を併用して透過実験を行った。すなわち、前述した皮膚の水和処理の時に、2.7 μmol/mL DFP-PBS 溶液を皮膚の水和溶液として用い、皮内のエステラーゼ活性を阻害した。透過実験は、DFP 濃度が 0.54 μmol/mL となるように調製した PBS 溶液を用いた以外は同様の操作で行った。

### 4. ヒト摘出皮膚を用いた皮膚透過性試験

ヒト凍結皮膚は 32°C の恒温槽内で 2 時間かけて解凍した後、side-by-side 型拡散セルに全層皮膚または角層除去皮膚 (ラットの場合と同様の方法で作製) を



装着し生理食塩液を 12 時間適用し、水和処理をした。水和後、表皮側に前述した各種濃度に調製したフタル酸ジエステル水溶液を、真皮側に PBS (for di-BP) または 10% DMSO-PBS 溶液 (for BnBP and di-*i*OP) を適用し、皮膚透過性試験を行った。

## 5. 皮膚中濃度測定

皮膚透過性試験後のヘアレスラット腹部またはヒト摘出皮膚表面に付着している適用化学物質を洗い流すため PBS (for di-BP and BP) または 10% DMSO-PBS 溶液 (for BnBP, BnP, di-*i*OP, and *i*OP) 1 mL を用いて 3 回洗った。透過実験に用いた皮膚の有効透過面積を切り出し、ハサミを用いてミンスした後、PBS または 10% DMSO-PBS 溶液を加え電動ホモジナイザー (Polytron PT-MR 3000<sup>®</sup>、Kinematica、Lucerne、Switzerland) を用いて氷冷下で皮膚ホモジネート (4%) を調製した。得られた皮膚ホモジネートに 16% トリクロロ酢酸入り PBS または 10% DMSO-PBS 溶液を同量加え、15 min よく攪拌した後、遠心分離 (18,800 ×g、5 min、4°C) によって除タンパク質操作をし、上清を薬物濃度測定用のサンプルとした。DFP によるエステラーゼ活性阻害処理をした皮膚を介した透過実験を行った後の皮膚中濃度の測定は、0.54 μmol/mL DPF-PBS 溶液を用いた以外は同様の操作を行った。

## 6. 皮膚ホモジネートを用いた皮膚代謝パラメータ測定

ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg、*i.p.*) でヘアレスラットの腹部皮膚を剃毛後、清拭し皮膚を摘出した。得られたヘアレスラット腹部摘出皮膚および前述したヒト摘出皮膚を氷冷下でハサミを用いてミンスした後、PBS (for di-BP and BP) または 10% DMSO-PBS 溶液 (for BnBP, BnP, di-*i*OP, and *i*OP) を加え電

動ホモジナイザーを用いて皮膚ホモジネート（10%）を調製した。その後、皮膚ホモジネートを遠心分離（9,000×g、20 min、4°C）し、余分な皮膚片を取り除いた後、その上清を採取して酵素溶液とした。種々濃度（5-100 nmol/mL）に調整した各種フタル酸ジエステル溶液中へ、ヘアレスラットおよびヒト摘出皮膚ホモジネートの最終濃度がそれぞれ0.25%、0.75%となるように適用し、37°Cでインキュベートしながら経時的にサンプリングを行った。得られたサンプルは氷冷下で保存した。代謝物の生成速度を評価するため、Michaelis-Menten式（式8）を変形したHanes-Woolf plotを用いて代謝酵素パラメータ（ $K_m$ 、 $V_{max}$ ）を算出した。ホモジネート中のタンパク質量は、Lowry法<sup>58)</sup>を用いて測定した。なお、Hanes-Woolf plotは式（9）で示される。

$$\frac{C}{V} = \left( \frac{1}{V_{max}} \right) C + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (9)$$

## 7. 各化学物質の定量

得られたサンプルは、酵素の失活（タンパク質除去）の目的で2%トリクロロ酢酸含有アセトニトリルに内部標準物質を含有させた溶液と等量混合後、遠心分離（18,800 g、5 min、4°C）し、除タンパク質操作を行った。得られた上清中に含有されるフタル酸エステル類濃度をHPLC-UVを用いて定量した。

サンプル中のフタル酸エステル濃度は、LC-20ADポンプ、SIL-20ACオートインジェクター、SPD-20AC紫外可視吸光度検出器、CTO-20ACカラムオーブンにより構成されたHPLC-UVシステム（島津製作所、京都、日本）を用いて測定した。データの解析には、LC solution analysis software（島津製作所）を用いた。カラムには、Cadenza CD-C18（インタクト株式会社、京都、日本）カラムを用い、

流速 1 mL/min、カラム温度を 40°C に設定した。その他、移動相や測定波長等の定量条件等は全て Table 6 に示す。

Table 6 HPLC-UV condition for determination of phthalates.

Chemicals	Mobile phase	$\lambda$ (nm)**	<i>Rt</i> (min)*
di-BP	0.5% Phosphoric acid : Acetonitrile = 6.5 : 3.5	254	BP : 1.6 min, di-BP : 6.3 min
BnBP	0.5% Phosphoric acid : Acetonitrile = 6.75 : 3.25 (0 - 9 min) → 8 : 2 (9 - 13 min) → 8 : 2 (13 - 20 min) → 6.75 : 3.25 (20 - 23 min)	280	BP : 9.0 min, BnP : 11 min, BnBP : 18 min
di- <i>i</i> OP	0.5% Phosphoric acid : Acetonitrile = 3 : 7 (0 - 4 min) → 0 : 10 (4 - 8 min) → 3 : 7 (8 - 12 min) → 3 : 7 (12 - 15 min)	280	<i>i</i> OP : 3.0 min, di- <i>i</i> OP : 12 min

\*  $\lambda$ : wave length detected, \*\* *Rt*: retention time

Arrows mean changing method for mobile phase

### 第3節 結果

#### 1. フタル酸ジエステル類皮膚曝露後の皮膚透過性および皮膚中濃度

Figure 7はヘアレスラット皮膚 (A) およびヒト皮膚 (B) に di-BP を適用後の単位面積当たりの累積透過量-時間プロファイルを示す。ラットおよびヒトの全層皮膚 (a) に di-BP を適用した時、di-BP の累積皮膚透過量は透過実験開始 12 時間後でも定量下限 (1 nmol/mL) 以下であった (open circle)。なお、Human 全層皮膚を介した透過実験では 36 時間目まで延長して行ったが、di-BP は検出されなかった。しかし、di-BP の代謝物と考えられるモノエステル体の BP がレシーバー中に検出され、透過実験開始 12 時間後の BP 累積全層皮膚透過量はラットおよびヒト皮膚それぞれ約 65 nmol/cm<sup>2</sup> および 50 nmol/cm<sup>2</sup> となった (Fig. 7a)。角層除去皮膚に di-BP を適用した時 (b) も、ヘアレスラット皮膚 (A)、ヒト皮膚 (B) を介した di-BP の累積透過量は試験開始 6 時間以降でも定量下限値以下であった。一方で、全層皮膚と同様に、ヘアレスラット角層除去皮膚 (A) およびヒト角層除去皮膚 (B) を介した透過実験でもモノエステル体の BP が検出され、その BP 累積皮膚透過量は試験開始 6 時間後にはそれぞれ約 25 および 30 nmol/cm<sup>2</sup> であった (Fig. 7b)。また、BP の累積皮膚透過量は、全層皮膚 (a) および角層除去皮膚 (b) どちらを介した場合でも同程度であった。

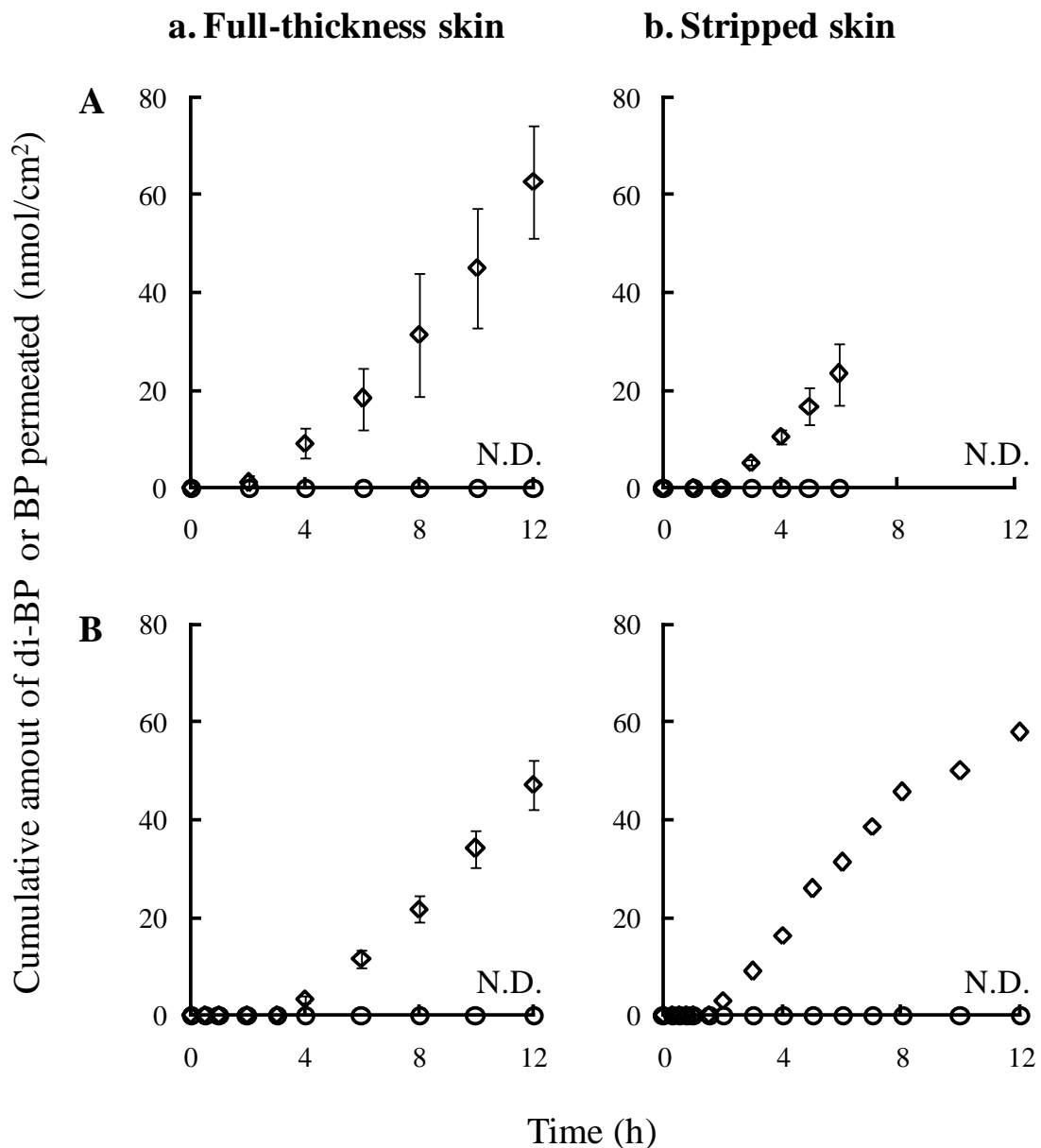


Fig. 7 Skin permeation profile of di-BP and its metabolite (BP)

Time course of the cumulative amount of di-BP (open circle) and BP (open diamond) that permeated through hairless rat (A) or human (B) full-thickness skin (a) or stripped skin (b) after application of di-BP. N.D. means “not detected”. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (n = 2-4).

Figure 8 に皮膚透過性試験後の di-BP および BP の皮膚中濃度を示す。Figure 8 中の DFP 処理群は、皮膚エステラーゼ阻害剤の DFP 溶液で水和処理した皮膚を用いて実験を行った時の di-BP および BP の皮膚中濃度を示す。DPF 処理をしなかったラット皮膚 (A) およびヒト皮膚 (B) からは di-BP は検出されず、BP のみが検出された。また、その量はラット (A) およびヒト (B) の全層皮膚 (a)、角層除去皮膚 (b) いずれの皮膚を用いた時でも大きな差はなく、200-300 nmol/g 程度であった。一方で、エステラーゼ阻害のため DFP 処理を行ったヘアレスラット皮膚からは BP は検出されず、di-BP のみが全層皮膚 (a) および角層除去皮膚 (b) から検出された。また、その値はそれぞれ約 700 および 800 nmol/g であり、角層を除去することによってわずかに増えたが大きな差はなかった。このことより、di-BP は皮膚に浸透するものの、皮膚内のエステラーゼにより代謝され、モノエステル体の BP を生成することがわかった。また、DFP 処理をした皮膚中のジエステル体およびモノエステル体を合わせた全フタル酸総量は DFP 処理をしていない皮膚中の全フタル酸量よりも多くなった。

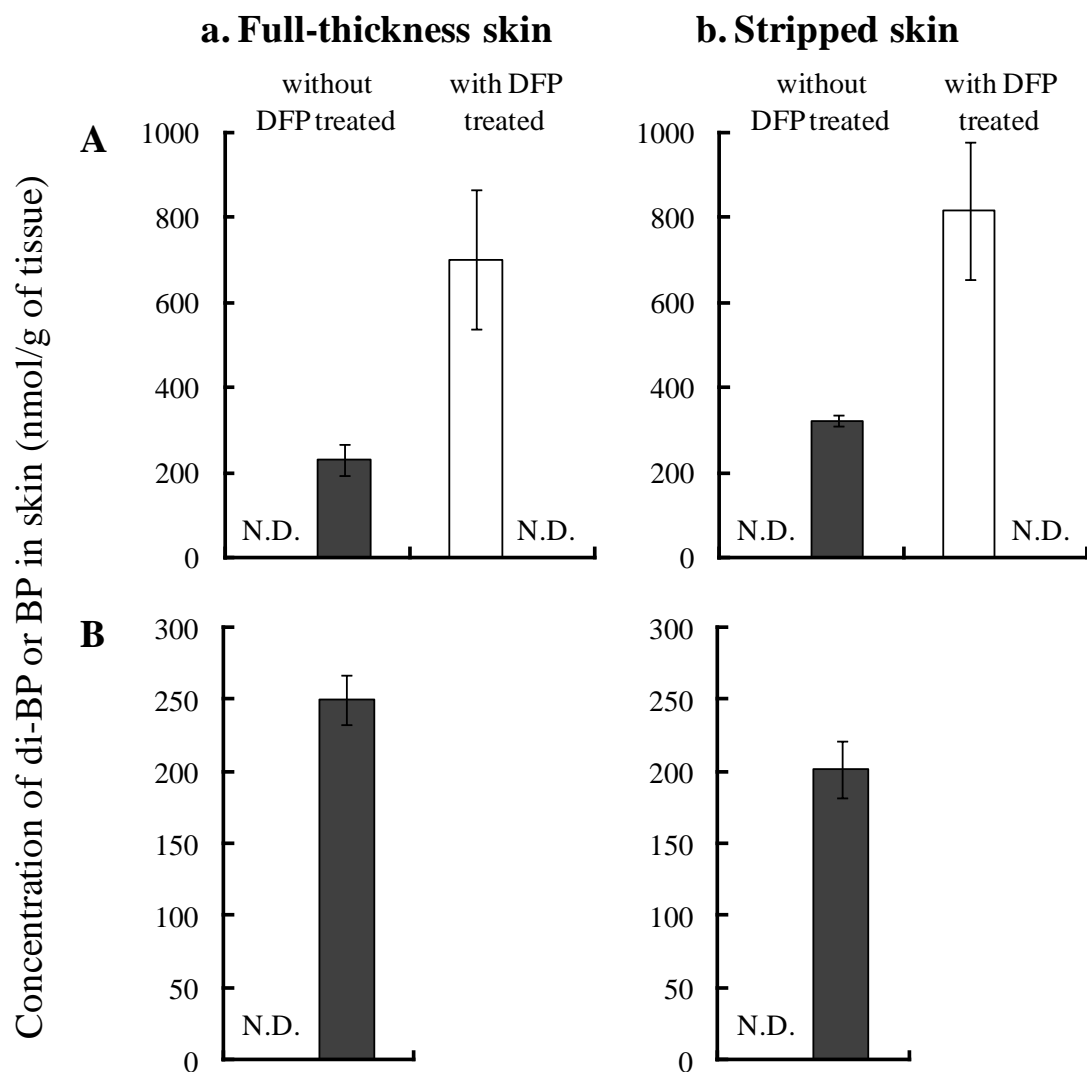


Fig. 8 Concentration of di-BP (□) and its metabolite (BP) (■) in hairless rat (A) and human (B) skin after permeation experiment of di-BP through full-thickness (a) or stripped (b) skin. DFP treated skin was pretreated with DFP to inhibit esterase activity in skin. N.D. means “not detected”. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (n= 3).

Figure 9 はヘアレスラット皮膚 (A) およびヒト皮膚 (B) に BnBP を適用した後のレシーバー中の単位面積当たりの皮膚累積透過量-時間プロファイルを示す。エステラーゼ阻害のため DFP 処理をした皮膚を介した透過実験からは、どのフタル酸エステル類も検出されなかった (closed circle)。また、DFP 処理をしていないヘアレスラット皮膚およびヒト皮膚に BnBP を適用した時、全層皮膚 (a)、角層除去皮膚 (b) とともに透過実験開始後 24、12 時間後でも BnBP のレシーバー中濃度は定量下限値 (5 nmol/mL) 以下であった (open circle)。なお、ヒト全層皮膚を介した透過実験を 36 時間まで延長して行ったが、BnBP は定量できなかった。しかし、ラット (A) およびヒト (B) の全層皮膚 (a)、角層除去皮膚 (b) いずれの皮膚を介した BnBP 透過実験からも、BnBP の代謝物と考えられる BnP (open triangle) および BP (open diamond) がレシーバー液から検出された。しかし、全層皮膚 (a) を用いた時も、角層除去皮膚 (b) を用いた時も、モノエステル体の透過量には大きな差は見られなかった。ヘアレスラットラット皮膚 (A) を介した透過実験で検出されたモノエステル体は BnP < BP、また、ヒト皮膚 (B) を介した透過実験で検出されたモノエステル体は BP < BnP であり、ヘアレスラット皮膚とヒト皮膚で主に透過する代謝物質が異なった。ヘアレスラット皮膚 (A) を介する 24 時間の累積透過量は BnP が 25 nmol/cm<sup>2</sup>、BP が 200 nmol/cm<sup>2</sup> (全層皮膚; a)、また、ヒト皮膚 (B) を介する 24 時間累積透過量は、BnP が 35 nmol/cm<sup>2</sup>、BP が 5 nmol/cm<sup>2</sup> (全層皮膚; a) 程度となった。一方、DFP 処理をしたヘアレスラット皮膚を用いたとき、ジエステル体の BnBP、モノエステル体の BnP および BP のいずれも皮膚透過は検出できなかった。



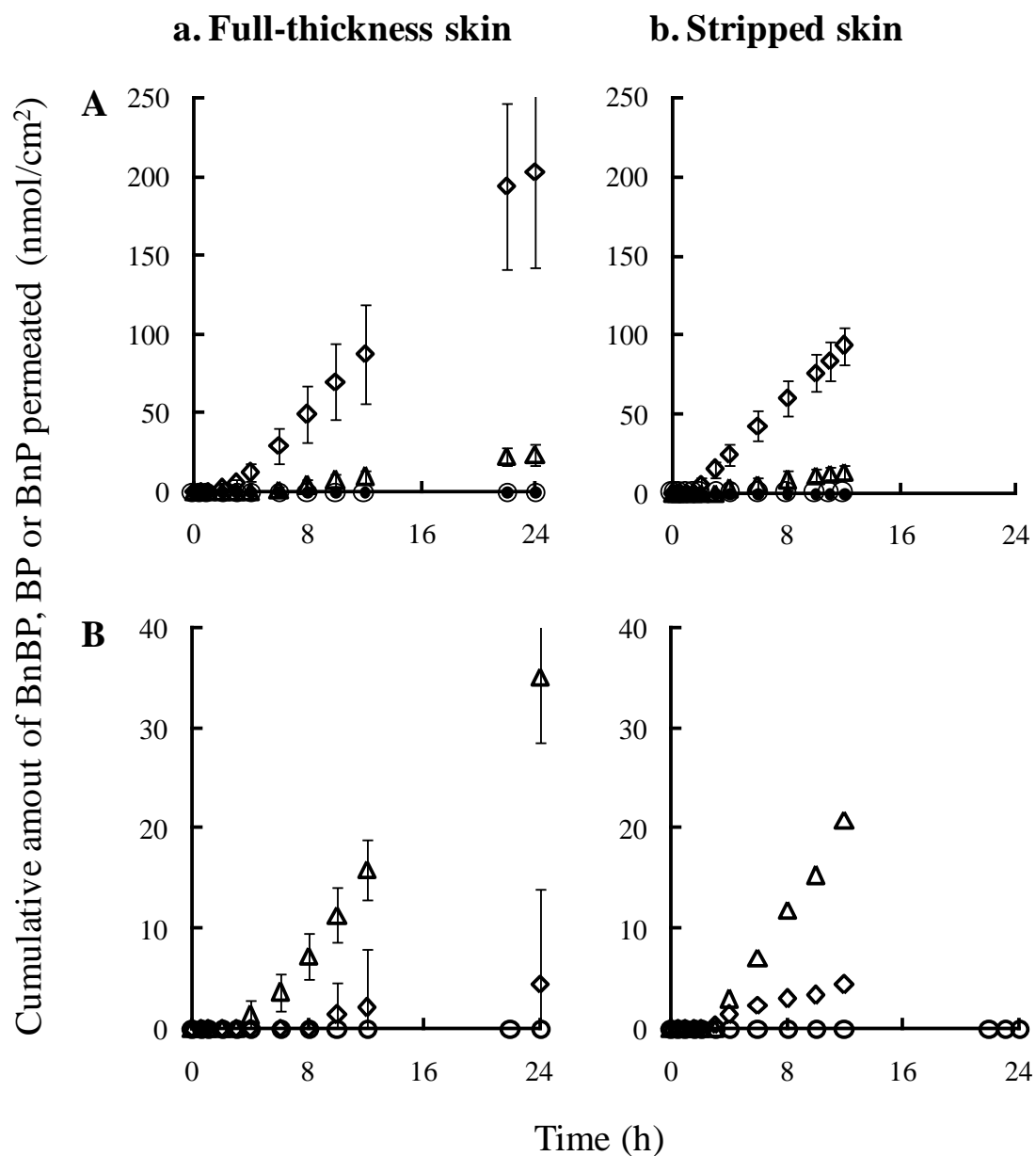


Fig. 9 Skin permeation profile of BnBP and its metabolite (BnP and BP)

Time course of the cumulative amount of BnBP (open circle), BnP (open triangle) and BP (open diamond) that permeated through hairless rat (A) or human (B) full-thickness skin (a) or stripped skin (b) after application of BnBP. No phthalates were determined when the skin was pretreated with esterase inhibitor of DFP (closed circle). Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (n = 2-4).

Figure 10 に皮膚透過試験後のヘアレスラット皮膚 (A) およびヒト皮膚 (B) 中の BnBP、BnP および BP の濃度を示す。透過実験終了後のヘアレスラット皮膚 (A) からは BnBP、BnP および BP が検出された。モノエステル体の量は BnP < BP であり、透過実験で得られた順序と同じであった。また、DFP 処理をした皮膚からは、ジエステル体の BnBP のみが検出された。DFP 処理をした皮膚中の全フタル酸量は、DFP 処理をしていない皮膚中の全フタル酸量に比べて高くなった。透過実験終了後のヒト皮膚 (B) からは、BnP および BP のみが検出された。その量は BP < BnP であり、透過実験で得られた透過量の順序と同じであった。このことから、di-BP を皮膚透過実験と同様に、BnBP は皮膚に浸透するものの、皮膚内のエステラーゼにより代謝され、BnP および BP を生成することがわかった。さらに、大変興味深いことに、ヘアレスラットとヒト皮膚では皮膚中での代謝活性と主な代謝主生成物が異なることがわかった。

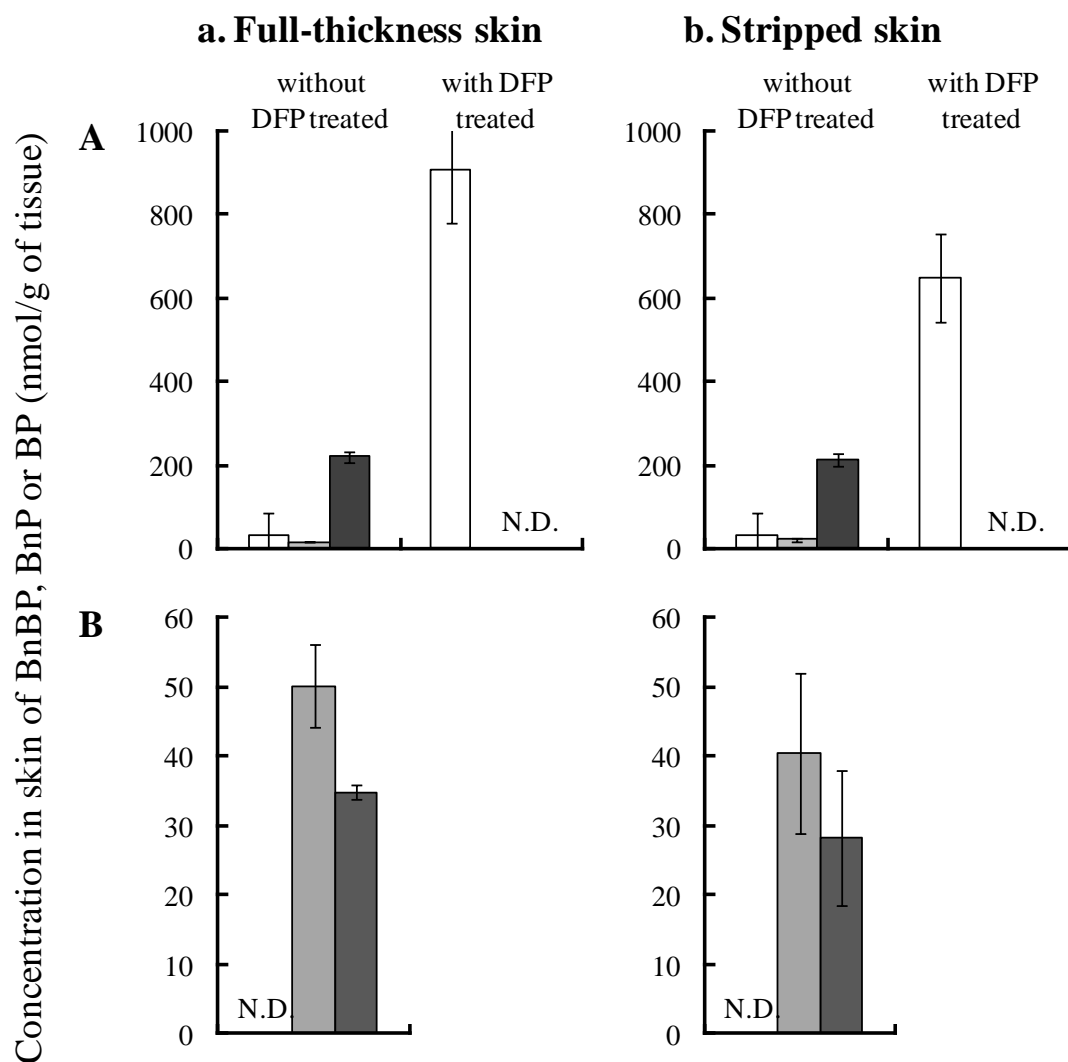


Fig. 10 Concentration of BnBP ( $\square$ ) and its metabolites of BnP ( $\blacksquare$ ) and BP ( $\blacksquare$ ) in hairless rat (A) and human (B) skin after permeation experiment of BnBP through full-thickness (a) or stripped (b) skin. DFP treated skin was pretreated with DFP to inhibit esterase activity in skin. N.D. means “not detected”. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

一方で、ヘアレスラットおよびヒト皮膚に di-*i*OP を 24 時間適用しても、di-*i*OP は DFP 処理の有無に関わらず全層皮膚および角層除去皮膚ともに透過せず、皮膚中にも検出されなかった。また、この時の  $P_{ul}$  は、式 (6) より  $1.1 \times 10^{-10}$  cm/s 以下であると計算された (定量下限値 2.56 nmol/mL)。このことから、di-*i*OP は本研究に用いた他のフタル酸ジエステル類とは異なり皮膚へほとんど移行しないことがわかった。

Table 7 には、式 (1) または式 (7) を用いて算出した各種皮膚を介したフタル酸エステル類の透過係数と移行係数 ( $P$ ,  $P_m$ , および  $P_{ul}$ ) をそれぞれ示す。透過が見られなかったジエステル類の透過係数 ( $P_{ul}$ ) は  $10^{-10}$  から  $10^{-11}$  (cm/s) オーダーと計算された。この値は  $P_{des}$  以下であったことから、今回実験に用いたフタル酸ジエステル類は未変化体としては皮膚を透過しないと間違った解釈に至る可能性がある。しかしながら、代謝物と考えられたモノエステル体が皮膚を透過し、その代謝物の皮膚深部移行係数 ( $P_m$ ) は式 (7) より、おおよそ  $10^{-6}$  (cm/s) オーダーと計算された。このことから、ジエステル体は角層のみ透過し、生きた表皮に移行直後にモノエステル体に代謝され、これが皮膚内を速やかに拡散したと予想された。なお、すべての実験において、ジエステル体から 2 つのエステル結合が切断されて生じると考えられるフタル酸 (PA) は検出されなかった。

Table 7 Permeability coefficients of phthalates through human and hairless rat skin

Applied chemical	Permeated chemical	Species	$P_{\text{full-thickness}}$ (cm/s)	$P_{\text{stripped}}$ (cm/s)
di-BP	di-BP	Human	$P_{ul} < 5.1 \times 10^{-10}$	$P_{ul} < 2.6 \times 10^{-10}$
		Hairless rat	$P_{ul} < 5.1 \times 10^{-10}$	$P_{ul} < 2.6 \times 10^{-10}$
di-BP	BP	Human	$P_m: 8.6 \times 10^{-6}$	$P_m: 7.2 \times 10^{-6}$
		Hairless rat	$P_m: 7.3 \times 10^{-5}$	$P_m: 6.8 \times 10^{-5}$
BnBP	BnBP	Human	$P_{ul} < 4.6 \times 10^{-11}$	$P_{ul} < 1.8 \times 10^{-9}$
		Hairless rat	$P_{ul} < 4.7 \times 10^{-11}$	$P_{ul} < 1.8 \times 10^{-9}$
BnBP	BP	Human	$P_m: 2.7 \times 10^{-7}$	$P_m: 2.5 \times 10^{-7}$
		Hairless rat	$P_m: 6.0 \times 10^{-6}$	$P_m: 3.5 \times 10^{-6}$
BnBP	BnP	Human	$P_m: 1.1 \times 10^{-6}$	$P_m: 1.5 \times 10^{-6}$
		Hairless rat	$P_m: 9.2 \times 10^{-7}$	$P_m: 9.0 \times 10^{-7}$
di- <i>i</i> OP	di- <i>i</i> OP	Human	$P_{ul} < 1.1 \times 10^{-10}$	$P_{ul} < 1.4 \times 10^{-10}$
		Hairless rat	$P_{ul} < 1.1 \times 10^{-10}$	$P_{ul} < 1.4 \times 10^{-10}$
di- <i>i</i> OP	<i>i</i> OP	Human	-*	-*
		Hairless rat	-*	-*

\*di-*i*OP was not metabolized in human or hairless rat skin

## 2. フタル酸モノエステル類皮膚曝露後の皮膚透過性および皮膚中濃度

Figure 11 にヘアレスラット全層皮膚 (a) および角層除去皮膚 (b) にフタル酸モノエステル体である BP、BnP および iOP を適用した時の単位面積当たりの 12 時間目 (全層皮膚; a)、および 6 時間目 (角層除去皮膚; b) の累積透過量を示す。全層皮膚を介した 12 時間の透過実験後、レシーバー中に検出されたフタル酸エステルは BP だけであった。透過実験時間を 24 時間に延長すると、BnP は検出されたが、iOP は検出されなかった。一方で、角層除去皮膚を介した透過実験では、BP、BnP、そして少量ではあるが iOP も 6 時間後のレシーバー溶液から検出された。また、ジエステル体の透過実験結果と異なり、モノエステル体の透過量は皮膚の角層除去処理によって増大した。ヘアレスラット皮膚を介したフタル酸モノエステルの透過係数を Table 8 にまとめて示す。どのモノエステル体も、透過係数は  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  cm/s オーダーを示し、かなり速い速度で皮膚を透過することがわかった。このことからフタル酸モノエステル類 (BnP, BP) の全層皮膚、角層除去皮膚透過性は極めて良好であり、iOP もわずかではあるが角層除去皮膚を透過することがわかった。

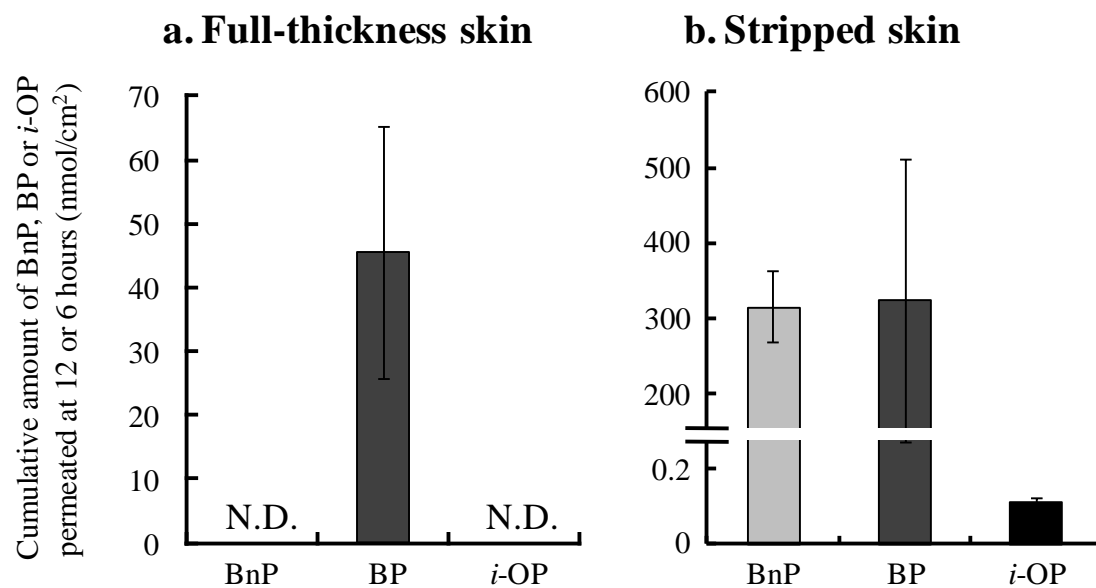


Fig. 11 Cumulative amount of BnP (■), BP (■) or *i*OP (■) that permeated through hairless rat skin a; Cumulative amount of mono-phthalates through hairless rat full-thickness skin at 12 h. b; Cumulative amount of mono-phthalates through hairless rat stripped skin at 6 h. N.D. means “not detected”. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (n = 3-5).

Table 8 Permeability coefficients of mono-phthalates through hairless rat skin

Applied chemical	Permeated chemical	Species	$P_{\text{full-thickness}}$ (cm/s)	$P_{\text{stipped}}$ (cm/s)
BP	BP	Hairless rat	$P: 2.4 \times 10^{-7}$	$P: 6.8 \times 10^{-5}$
BnP	BnP	Hairless rat	$P: 3.9 \times 10^{-8}$	$P: 4.4 \times 10^{-6}$
iOP	iOP	Hairless rat	$P_{ul} < 4.8 \times 10^{-11}$	$P: 4.5 \times 10^{-5}$

### 3. ヒトおよびヘアレスラット皮膚中の代謝パラメータ

Table 9 に皮膚ホモジネート代謝実験により得られた代謝パラメータを示す。エステラーゼ阻害のために DFP 処理をした皮膚からはモノエステル体が検出されなくなったことから、モノエステル体の生成にエステラーゼが関係していると考えられた。di-BP は皮膚中エステラーゼによって代謝を受け、ヘアレスラットおよびヒト皮膚ともに BP を生成することがわかった。その変換速度の指標である  $V_{\text{max}}/K_m$  値はラット皮膚およびヒト皮膚それぞれ、 $1.6 \times 10^{-2}$ 、 $3.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$  であり、ラット皮膚中の生成速度がヒト皮膚中のそれよりも速かった。また、ジエステル体の BnBP からモノエステル体の BnP または BP への変換速度の指標である  $V_{\text{max}}/K_m$  値は、ヘアレスラット皮膚ホモジネート中ではそれぞれ  $2.8 \times 10^{-3}$ 、 $9.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$  (BnP < BP) であり、ヒト皮膚ホモジネート中ではそれぞれ  $8.0 \times 10^{-4}$ 、 $1.6 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$  (BP < BnP) であり、種によ



って基質への親和性と代謝速度が異なることが示唆された。また、生成量の大小関係は、透過実験や皮膚中濃度測定で得られた生成量の大小関係と同じであった。また、**di-iOP** はヘアレスラット皮膚・ヒト皮膚それぞれのホモジネート中の酵素により **iOP** を生成せず、**di-iOP** は代謝を受けないことがわかった。一方、モノエステル体の **BP**、**BnP** および **iOP** は皮膚ホモジネート中で **PA** を生成せず、モノエステル体以降には代謝されないことがわかった。

Table 9 Enzymatic parameters of  $K_m$  and  $V_{max}$  for the metabolism of di-BP to BP, of BnBP to BP and BnP, of di-*i*OP to *i*OP of BP to PA, of BnP to PA and of *i*OP to PA calculated from Hanes-Woolf plot. N.D. means that products were not determined.

Substrate	Products		$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ $\text{mg protein}^{-1}$ )	$V_{max}/K_m$ ( $\text{min}^{-1} \text{mg}$ $\text{protein}^{-1}$ )
di-BP	BP	Hairless rat skin	18.2	$2.9 \times 10^{-1}$	$1.6 \times 10^{-2}$
		Human skin	13.2	$4.1 \times 10^{-2}$	$3.1 \times 10^{-3}$
BnBP	BP	Hairless rat skin	14.8	$1.3 \times 10^{-1}$	$9.1 \times 10^{-3}$
		BnP	18.7	$5.2 \times 10^{-2}$	$2.8 \times 10^{-3}$
	Human skin	BP	165	$2.6 \times 10^{-3}$	$1.6 \times 10^{-5}$
		BnP	58.5	$4.7 \times 10^{-2}$	$8.0 \times 10^{-4}$
di- <i>i</i> OP	<i>i</i> OP	Hairless rat skin		N.D.	
		Human skin		N.D.	
BP	PA	Hairless rat skin		N.D.	
		Human skin		N.D.	
BnP	PA	Hairless rat skin		N.D.	
		Human skin		N.D.	
<i>i</i> OP	PA	Hairless rat skin		N.D.	
		Human skin		N.D.	

## 第4節 考察

可塑剤として様々な製品に使用されるフタル酸ジエステル類 (di-BP、BnBP、di-iOP) の皮膚曝露後の安全性評価を目指し、それらの皮膚透過性、および皮膚内代謝能から皮膚移行性を評価した。

フタル酸ジエステル体の di-BP、BnBP を皮膚に適用しそれらの皮膚透過性・皮膚中濃度を試験したところ、ジエステル体は皮膚を透過せず (Figs. 7 and 9)、皮膚深部に浸透することもなかった (Figs. 8 and 10)。しかし一方で、フタル酸ジエステル体を適用するとモノエステル体 BP、BnP が皮膚透過し (Figs. 7 and 9)、皮膚中にこれらの存在が認められた (Figs. 8 and 10)。これは、角層を透過したジエステル体が酵素リッチな生きた表皮に到達したところで代謝を受けモノエステル体となり、生きた表皮・真皮中を拡散し、レシーバー溶液中へ放出されたためと考えられた。これに対し、ジエステル体 di-iOP を皮膚に適用しても、その皮膚透過性および皮膚移行性はともに認められなかった。この要因として、di-iOP の脂溶性が di-BP や BnBP に比べても非常に高い (ClogP: 8.71) ため、適用溶液への溶解性が低く適用濃度が十分確保できなかった (適用濃度: 256 nmol/mL) こと、また高すぎる油水分配率のため、皮膚への十分な分配性が確保できなかったことが挙げられた。今回試験した3種ジエステル体の透過係数  $P_{ul}$  は計算上全て  $10^{-9}$  cm/s 以下であったが、しかし式 (3) から計算したモノエステル体の皮膚深部移行係数  $P_m$  は  $10^{-9}$  cm/s 以上であった。以前、Sugibayashi は皮膚透過係数が  $10^{-9}$  cm/s 以下の物質について、理論的に角層を透過しないと報告した<sup>8)</sup>が、透過係数が  $10^{-9}$  cm/s 以下の代謝を受ける物質全てをこの理論に当てはめることはできないことが今回明らかとなった。すなわち、フタル酸ジエステルを適用したとき、モノエステル体の皮膚透過が観察された。したがって、ジ

エステル体は  $10^{-9}$  cm/s 以上の速度で角層を透過し、生きた表皮・真皮に到達していることがわかった。ジエステル体自体レシーバー液中に見られなかったのは、その高すぎる脂溶性のため、普段、皮膚透過の律速段階になるとは考え難い生きた表皮・真皮が透過バリアとして働いたことが原因と考えられた。また、di-BP や BnBP の全層皮膚および角層除去皮膚を介した透過実験で、一般に透過の律速段階と言われている角層を除去した皮膚と全層皮膚のモノエステル体の透過量に大きな差が見られなかったが、これは、皮膚内でフタル酸ジエステル体が代謝を受ける個所まで浸透する速度よりも、代謝反応の方が遅く、モノエステル体の生成速度が律速となったため、透過量が変わらなかったのではないかと考えられた。

エステル基を有する化学物質の皮膚中で起こる代謝には、主にエステラーゼが関与することが報告されている<sup>53), 54), 59), 60)</sup>。今回使用した3つのジエステル物質のうち2つの化合物は1つのエステル基が分解しモノエステル体を生成した。しかし、エステラーゼ阻害薬である DFP を用いてあらかじめ皮膚を処理した場合、モノエステル体の皮膚透過が観察されなくなり、皮膚中からも検出されなくなった。このことから、フタル酸ジエステルは皮膚中に存在するエステラーゼにより代謝を受け、モノエステル体を生成したと考えられた。DFP 処理をした全層皮膚中の総フタル酸量は、DFP 処理をしていない全層皮膚中の総フタル酸量よりも高い値を示した (Figs. 8 and 10) が、これは DFP 処理した皮膚の角層中を拡散したジエステル体がエステラーゼが本来存在する個所に到達しても代謝されないため、角層中に滞留したことが原因ではないかと考えられた。角層除去皮膚でも同様に DFP 処理した皮膚中の総フタル酸濃度が高い値を示したが、これは皮膚に DFP 処理したことにより生きた表皮に分配したフタル酸ジエステル体が代謝されず、また拡散もできず、生きた表皮の表面に滞留したこと

が原因ではないかと考えられた。

さらに、全層皮膚へモノエステル体である **BnP** や **BP** を適用した時、ジエステル体である **BnBP** や **di-BP** を適用した時よりも、**BnP** や **BP** の皮膚透過性が低くなった (Fig. 11)。この原因は、モノエステル体はジエステル体に比べ脂溶性が低いため (Table 5)、基剤から角層への分配性が低下し、皮膚透過速度が減少したためと考えられた。また、生成したモノエステル体の皮膚中拡散性を評価するため、モノエステル体を角層除去皮膚に適用し、その角層除去皮膚透過性を評価した。その結果、**BnP** および **BP** は非常に速やかに角層除去皮膚を透過した (Fig. 11 and Table 8)。このことから、生きた表皮・真皮中でジエステル体から代謝生成したモノエステル体は速やかに生きた表皮・真皮中を拡散してレシーバー溶液中に移行することがわかった。一方、モノエステル体の *iOP* は、角層除去皮膚でわずかに皮膚を透過するにとどまった (Fig. 11)。

また、**BnBP** から生成する 2 種類の代謝物それぞれの、皮膚深部移行係数 ( $P_m$ ) と、皮内酵素活性パラメータの一つである  $V_{max}/K_m$  との関係を調べたところ、ラットおよびヒトいずれの場合でも、それぞれのモノエステル体へ変換される代謝パラメータの  $V_{max}/K_m$  値が大きい (Table 9) と、 $P_m$  も大きかった (Table 7)。それぞれのモノエステル体の皮膚透過係数  $P$  自体も大きな値を示した (Table 8) ことを考えると、ジエステル体を適用した時のモノエステル体の皮膚深部への移行量は、代謝能に依存すると考えられた。すなわち、今回用いたフタル酸ジエステル類の代謝物の皮膚深部への移行性の順序は、皮膚内の代謝能  $V_{max}/K_m$  値により予測可能であった。言い換えると、皮膚中に存在するエステラーゼの基質 (フタル酸ジエステル) 特異性が、主な移行物質 (フタル酸モノエステル) を決定する因子であることがわかった。また、**di-iOP** のモノエステル体である *iOP* は皮膚中から検出されなかったが、これは **di-iOP** の脂溶性が高すぎて、**di-iOP**

自体が皮膚へ移行しなかったことが原因ではないかと考えられた。また、**di-iOP**の側鎖が立体障害を起こし、皮膚中エステラーゼとの親和性が他の2つの化合物と比べて低く、代謝が起こらなかつたとも考えられた。なお、**di-iOP**を経口摂取した場合、**di-iOP**は代謝を受け*iOP*さらには**PA**を生成することが明らかとなっている<sup>61)</sup>が、これは肝臓にエステラーゼが顕著に高く発現するためと推察された。

ヘアレスラット皮膚は、ヒト皮膚に比べ高いカルボキシエステラーゼ活性(**CES**活性)が観察され、より多くのモノエステル体が生成した(**Figs. 9 and 10**)。さらに、異なる側鎖を持つフタル酸ジエステル類の**BnBP**の主な代謝物は、ラット皮膚では**BP**、ヒト皮膚では**BnP**となり、種により異なつた(**Fig. 10 and Table 9**)。また、**di-iOP**の代謝物はどちらの皮膚からも検出されなかつた(**Table 9**)。一般に、ヘアレスラットにはヒトよりも高い**CES**の発現が見られることが報告されており<sup>62-64)</sup>、ヘアレスラット皮膚に適用・分配したジエステル体はヒト皮膚より速やかにモノエステル体に変換されたため、ヘアレスラットとヒト皮膚の総モノエステル体の皮膚深部移行量の違いが生じたと考えられた。また、**CES**ファミリーには**CES1-CES5**およびその類似酵素が知られており<sup>65)</sup>、その中でも**CES1**や**CES2**が皮膚内に発現することが知られている<sup>59), 60), 66)</sup>。これら二つの酵素は基質特異性が異なり、**CES1**はアルコール基に比べてアシル基がかさ高い構造を有するものを主な基質とし、**CES2**はアルコール基に比べてアシル基が小さい構造を有するものを主な基質としている<sup>67-69)</sup>。ヒトの場合、ヒトカルボキシエステラーゼ2(**hCE-2**)が小腸、肝臓、腎臓などの臓器に分布することが知られている<sup>69, 70)</sup>。今回得られた代謝物の生成比とフタル酸エステル類の構造式から判断すると、ヒト皮膚中でのフタル酸エステル類の代謝は、主に**hCE-2**によるものであると推察された。同様に、ラット皮膚中でのフタル酸エステル類

の代謝には、主に CES1 が関わりと考えられた。

以上の結果より、皮膚中で代謝を受ける可能性のある化学物質の安全性・有効性評価を行う時、皮膚中での変換・代謝を考慮し、さらにはヘアレスラット皮膚とヒト皮膚のエステラーゼ活性の違いを把握することが正しい毒性および有効性評価をするために必要であることがわかった。また、皮膚ホモジネートを用いて皮内代謝速度を調べることで、フタル酸ジエステルのような脂溶性の高い物質から生成した代謝物の皮膚深部移行性や、皮膚中代謝物量の大小関係を明らかにすることが可能であることが示された。既に物質の物理化学的性質から皮膚透過係数を予測した報告<sup>39, 71)</sup>、および皮膚透過係数から皮膚中化学物質濃度を予測した報告<sup>72, 73)</sup>が知られているが、さらに、この予測式に皮膚代謝の項を組み込むことで、代謝により生じた物質の皮膚中濃度が予測可能であると考えられた。さらに、代謝能はラットとヒト間で異なることがあるため、種差を考慮することでヒト以外の動物種を用いて代謝を受ける化合物の有効性・安全性を予測できるのではないかと考えられた。

## 第5節 小括

di-BP、BnBP、di-iOP に代表されるフタル酸ジエステル類の皮膚透過性および皮膚中濃度を検討した結果、ジエステル体はわずかに皮膚（主に角層）へ移行するが生きた表皮中で速やかに代謝されるため、ジエステル体そのものが全身循環系へ移行することはほぼ無いと考えられた。しかし、皮膚中エステラーゼにより生成したモノエステル体は生きた表皮・真皮はもちろん全身循環系へも移行する可能性が示された。皮膚中で代謝を受ける可能性の高い化学物質に関して安全性の評価を行うには、皮膚透過性・皮膚中濃度だけでなく、酵素発現の動物間種差を考慮することが必要であった。さらに、代謝生成物の皮膚毒性に関する評価を加えることで、より正確な安全性評価が可能になると考えられた。

以上より、本研究が、フタル酸エステル類に代表される、脂溶性の高い代謝を受ける化学物質の経皮吸収性評価手法の開発に有用であると示唆された。



## 総括的考察

家庭内製品中に含有される様々な化学物質の皮膚曝露により、皮膚毒性等の有害作用が起こる可能性がある。しかし、一般生活者は日常生活の中で化学物質に曝露されていることに気が付きにくい。そのため、化学物質の曝露評価を行うことは、一般生活者の安全性を確保するために重要である。そこで今回、化学物質皮膚曝露後の皮膚中濃度を調査することで、安全性評価法確立のための基礎的データを集めた。この得られたデータから、化学物質の皮膚透過係数や皮内代謝性を実験から求めることで皮膚中の化学物質の濃度の予測が可能であった。しかし、様々な化学物質一つ一つの皮膚透過係数を算出することは、現実的ではない。そこで、その化学物質の性質から皮膚中への移行量を推定することが安全性の評価に役立つと考えられた。第1編および第2編を通して得られたデータを参考に、Fig. 12 に得られた化学物質の皮膚透過係数や皮内代謝性のデータから、その後に行うべき安全性評価法を正しく選択するためのダイアグラムを示す。このダイアグラムを用いた評価は、今回用いたような脂溶性の化学物質の評価をする時のみ成り立つ。

今回研究に用いた各化学物質から得られたデータを、このダイアグラムに従って分類した。*p*-クレゾールは皮膚内で代謝を受けず、皮膚透過係数は角層落屑速度以上であったことから、このような特徴を示す化学物質の安全性を評価するには、局所毒性評価のみならず、全身毒性評価も必要と考えられた。ダイアジノンやレスメトリンは皮膚内で代謝を受けず、皮膚透過係数は角層落屑速度以下であったことから、このような特徴を示す化学物質の安全性を評価するには、局所毒性評価が必要であるが、一方で全身循環器系へはあまり移行しない

と考えられたことから、全身毒性評価は回避できると考えられた。また、フタル酸ジエステルの di-BP や BnBP は皮膚内で代謝を受け、皮膚透過係数はモノエステル体の生成を考慮すると角層落屑速度以上であった。すなわち、ジエステル体の皮膚透過係数は落屑速度以下であったが、代謝生成物のモノエステル体の皮膚深部への移行が見られたことから、ジエステル体は角層を落屑速度以上の速さで透過することがわかった。また、全層皮膚と角層除去皮膚の結果を比べても大きな差はなかったことから、これら化学物質の皮膚透過過程における律速段階は、生きた表皮および真皮中の拡散であると考えられた。このような特徴を示す化学物質の安全性を評価するには、まずはヒトと動物間の発現酵素種の種差を考えなければならない。その上で、ジエステル体および代謝物のモノエステル体それぞれの局所毒性評価および全身毒性評価を行う必要がある。また、di-iOP は、今回行った検討では皮膚内の酵素により代謝を受けず皮膚透過係数は角層落屑速度以下であった。このような特徴を示す化学物質の安全性を評価するには、局所毒性評価が必要であり、全身毒性評価は回避できると考えられた。

これまで示したようにこのダイアグラムを用いることで、ある化学物質の皮膚透過係数から、その化学物質が皮膚曝露した時の安全性評価のためにどのような試験法が必要になるかを判断できると考えられた。さらに、皮膚透過係数から皮膚中濃度を予測する式を加え、かつ濃度と毒性発現の関係を明らかにすることによって、安全性評価の推敲が行われるべきだと考えられた。

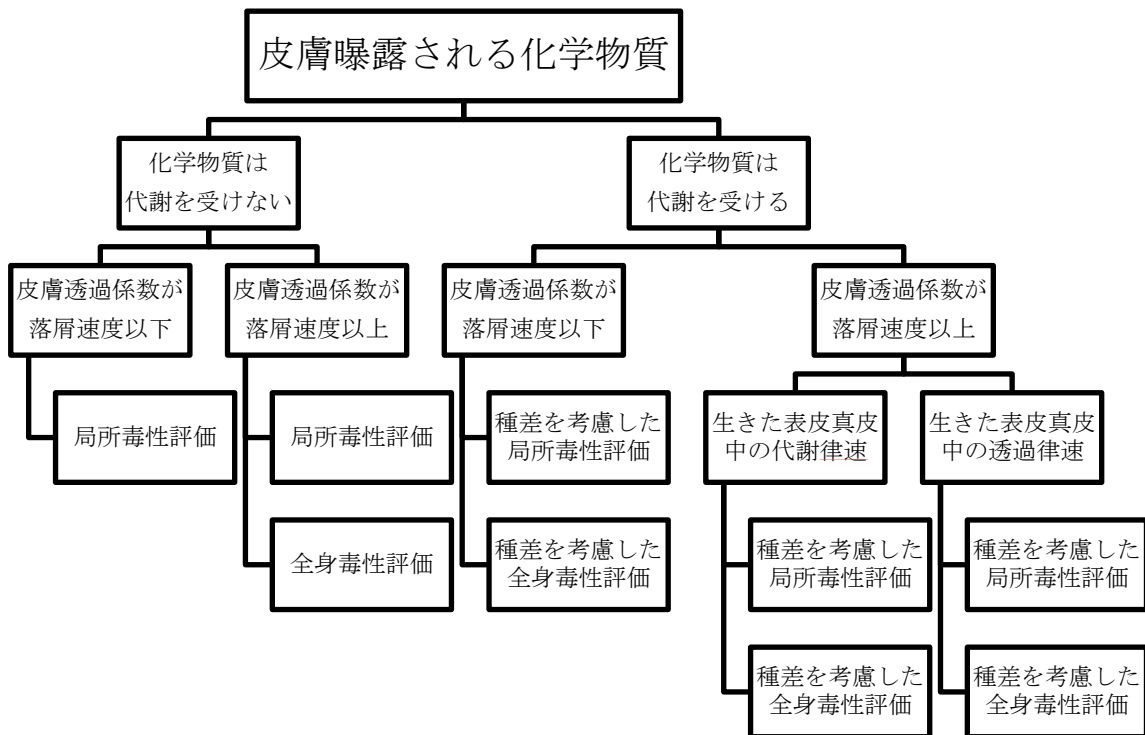


Fig. 12 Flow diagram for safety evaluation of topically exposed chemical compounds  
 This diagram can only use for lipophilic compounds, because the contribution of appendix route (hair follicles and sweat glands) cannot be ignored especially for hydrophilic and high-molecular weight compounds.

## 結論

近年、様々な化学物質が合成され、我々の身近な製品にも広く利用されるようになった。そのため、我々は常にこの化学物質による曝露を受けていると考えられる。皮膚に曝露された一部の化学物質は皮膚へ分配し、皮膚内を拡散する可能性が十分考えられ、皮膚内に浸透した化学物質は、毒性等の有害な作用を引き起こすことが懸念される。有害作用発現部位での毒性反応は、直接反応や間接反応により化学物質濃度との関係性が説明できる。このことから、今回、化学物質皮膚曝露後の皮膚中濃度や血中濃度を、皮膚透過係数を用いて予測することを目的とした。具体的には、種々化学物質の *in vitro* 皮膚透過試験結果から皮膚透過係数を算出し、それを角層落屑速度と比較し、化学物質の皮膚移行量との関係性を調査した。モデル化学物質には、家庭内で我々が曝露する可能性があり、代謝を受けないと考えられる殺虫成分 3 種と代謝を受けると考えられるエステル基を有する可塑剤 3 種を選択した。

第一編では、殺虫成分として用いられる *p*-クレゾール、ダイアジノン、およびレスメトリンをモデル化学物質として用いて、その皮膚透過性を調査した。*In vitro* 皮膚透過実験の結果、ほとんど皮膚透過の見られなかった 2 つの化合物（ダイアジノン、レスメトリン）は皮膚中にもほとんど検出されなかった。これら 2 つの化合物の皮膚透過係数は落屑速度以下であった。一方で透過係数が比較的大きかった *p*-クレゾールは皮膚中にも検出された。この化合物について培養細胞を用いた傷害性試験を行った結果、経皮曝露された *p*-クレゾールは皮膚を傷害し得ることが示された。すなわち、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* における経皮吸収性が予測できた。特に、皮膚透過係数が角層落屑速度以下の化学物質はほとんど皮膚へ移行しな

いこともわかった。また、皮膚中や全身中に多量移行しうる化学物質については、培養細胞を用いた傷害性試験を行うことで、50%毒性発現濃度より皮膚局所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。この方法は、*in vitro* 実験のみで評価可能であり、また安全性評価のための基礎的な研究にも有用であると考えられた<sup>74)</sup>。

第二編では、可塑剤として用いられるフタル酸ジエステル類の皮膚透過性を調査した。この化学物質はエステル基を有するため、皮膚中でエステラーゼ等の酵素により分解を受ける可能性が考えられた。その結果、フタル酸ジエステル類自体は皮膚を透過せず、皮膚透過係数は落屑速度以下と算出可能であったが、一部の代謝・生成されたフタル酸モノエステル体が皮膚深部に移行した。したがって、フタル酸ジエステル類の皮膚透過係数と角層落屑速度の比較により皮膚移行性の予測はできなかった。それは、代謝物の生成量を予測できないこと、および生きた表皮および真皮が透過に対するバリアとして働く場合があることがあるからであると推測した。したがって、このような化学物質の評価のためには、親化合物の皮膚透過係数のみならず、代謝物の皮膚深部移行係数両方を求めることが重要であった。また、フタル酸ジエステル類の側鎖の化学構造によって皮膚中代謝能に差があったが、代謝物の皮膚深部移行係数( $P_m$ )と代謝パラメータ( $V_{max}/K_m$ )の大小関係が一致していたことから、代謝物の透過係数によってそれぞれの代謝物の生成量の予測が可能となることも明らかとなった。さらに、皮膚内の代謝能にヒトとヘアレスラット間で種差があり、ヘアレスラットの代謝活性はヒトよりも強かった。また、基質特異性も異なったが、これは発現する酵素の分子種が異なるためということがわかった。以上の結果より、代謝を受けるフタル酸ジエステル類皮膚曝露後の皮内移行性も、種差を考慮しつつ、皮膚深部移行係数によって予測が

可能であると示された。これも第 1 編と同様に、代謝を受ける物質の安全性評価のための基礎的な研究にも有用であると考えられた。

以上、第 1 編および第 2 編の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。

## 謝辞

本研究に臨み終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座教授 杉林堅次 先生に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行に当たり終始有益なご指導、ご助言を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座准教授 藤堂浩明 先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、学位論文の査読をしていただいた城西大学薬学部製剤学講座教授 夏目秀視 先生ならびに城西大学薬学部衛生化学講座教授 工藤なをみ 先生に深謝いたします。

さらに、本研究の遂行にあたり有益なご意見並びに実験のご協力をいただいた城西大学薬学部薬剤学講座教授 従二和彦 先生に感謝の意を表します。

最後に、本研究の実施にご協力いただきました、城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座 中田圭一 修士、鈴木貴雅 修士、増茂裕子 修士、をはじめとする関係諸氏、ならびに城西大学薬学部薬剤学講座関係諸氏に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Mani U., Lal K., Singh P. K., Murthy R. C., Inhalation Exposure of Formulated Fenvalerate (20% EC): Toxicologic alterations in kidney of rats, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **79**, 15-19(2007).
- 2) Tomalik-Scharte D., Lazar A., Meins J., Bastian B., Ihrig M., Wachall B., Jetter A., Tantcheva-Poo I., Mahrle G., Fuhr U., Dermal absorption of permethrin following topical administration, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **61**, 399–404 (2005).
- 3) Walters K. A. (ed.), Roberts M. S. (2002), “Dermatological and Transdermal Formulations.”, *The structure and function of skin*, ed. by Walters K. A., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1–39.
- 4) Scheuplein R. J., Blank I. H., Permeability of the skin. *Physiol. Rev.*, **51**, 702-747 (1971).
- 5) Matoltsy A. G., Balsamo C. A., A study of the components of the cornified epithelium of human skin. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**, 339-360 (1955).
- 6) Plewig G., Marples R. R., Regional differences of cell sizes in the human stratum corneum. I. *J. Invest. Dermatol.*, **54**, 13-18 (1970).
- 7) Suzuki Y., Nomura J., Hori J., Koyama J., Takahashi M., Horii I., Detection and characterization of endogenous protease associated with desquamation of stratum corneum. *Arch. Dermatol. Res.*, **285**, 372-377 (1993).
- 8) Sugibayashi K., Margin of safety and exposure of nanomaterials used in cosmetics. *Fragrance J.*, **36**, 38-41 (2008).
- 9) National Institute of Occupational Safety and Health, NIOSH. “International Chemical Safety Cards, ICSC.”: <<http://www.cdc.gov/niosh/ipcs/icstart.html>>.



- 10) Eaton D. L., Klaassen C. D. (2008) “Casarett and Doull’s Toxicology: The Basic Science of Poisons,” 7th ed., Unit 1 Chap. 2, ed. by Klaassen C. D., McGraw-Hill Medical, New York, pp. 11-43.
- 11) Rice R. H., Mauro T. M. (2008) “Casarett and Doull’s Toxicology: The Basic Science of Poisons,” 7th ed., Unit 4 Chap. 19, ed. by Klaassen C. D., McGraw-Hill Medical, New York, pp. 741-760.
- 12) Kano S., Sugibayashi K., Kinetic analysis on the skin disposition of cytotoxicity as an index of skin irritation produced by cetylpyridinium chloride: Comparison of *in vitro* data using a three-dimensional cultured human skin model with *in vivo* results in hairless mice. *Pharm. Res.*, **23**, 329–335 (2006).
- 13) Sato K., Oda T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Estimation of blood concentration of drugs after topical application from *in vitro* skin permeation data. I. Prediction by convolution and confirmation by deconvolution. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2232–2238 (1988).
- 14) Sato K., Oda T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Estimation of blood concentration of drugs after topical application from *in vitro* skin permeation data. II. Approach by using diffusion model and compartment model. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2624–2632 (1988).
- 15) Hatanaka T., Katayama K., Koizumi T., Sugibayashi K., Morimoto Y., *In vitro–in vivo* correlation of percutaneous absorption: Isosorbide dinitrate and morphine hydrochloride. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 826–830 (1994).
- 16) Herkenne C., Naik A., Kalia Y. N., Hadgraft J., Guy R. H., Ibuprofen transport into and through skin from topical formulations: *in vitro–in vivo* comparison. *J. Invest. Dermatol.*, **127** 135-142 (2007).

- 17) Kimura E., Kawano Y., Todo H., Ikarashi Y., Sugibayashi K., Measurement of skin permeation/penetration of nanoparticles for their safety evaluation. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1476-1486 (2012).
- 18) Hasler-Nguyen N., Shelton D., Ponard G., Schaffrik M., Mallefet P., Evaluation of the in vitro skin permeation of antiviral drugs from penciclovir 1% cream and acyclovir 5% cream used to treat herpes simplex virus infection. *BMC Dermatol.*, **9**, (2009).
- 19) Fang J. Y., Fang C. L., Sung K. C., Chen H. Y., Effect of low frequency ultrasound on the *in vitro* percutaneous absorption of clobetasol 17-propionate. *Int. J. Pharmaceut.*, **191**, 33-42 (1999).
- 20) Schmook F. P., Meingassner J. G., Billich A., Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharmaceut.*, **215**, 51-56 (2001).
- 21) Ansari M., Kazemipour M., Aklamli M., The study of drug permeation through natural membranes. *Int. J. Pharmaceut.*, **327**, 6-11 (2006).
- 22) Johnson M. E., Blankschtein D., Langer R., Permeation of steroids through human skin. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1144-1146 (1995).
- 23) Meingassner J. G., Aschauer H., Stuetz A., Billich A., Pimecrolimus permeates less than tacrolimus through normal, inflamed, or corticosteroid-pretreated skin. *Exp. Dermatol.* **14**, 752-757 (2005).
- 24) Mitragotri S., Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J. Control. Release* **86**, 69-92 (2003).

- 25) Roy S. D., Flynn G. L., Transdermal delivery of narcotic analgesics: pH, anatomical, and subject influences on cutaneous permeability of fentanyl and sufentanil. *Pharm. Res.*, **7** 842-847 (1990).
- 26) Singh P., Boniello S., Liu P., Dinh S., Transdermal iontophoretic delivery of methylphenidate HCl in vitro. *Int. J. Pharmaceut.*, **178** 121-128 (1999).
- 27) Farahmand S., Maibach H. I., Estimating skin permeability from physicochemical characteristics of drugs: A comparison between conventional models and an in vivo-based approach. *Int. J. Pharmaceut.*, **375**, 41-47 (2009).
- 28) Zorin S., Kuylenstierna F., Thulin H., *In vitro* test of nicotine's permeability through humanskin. Risk evaluation and safety aspects. *Ann. Occup. Hyg.*, **43**, 405-413 (1999).
- 29) Minghetti P., Casiraghi A., Montanari L., Monzani M. V., *In vitro* skin permeation of sinitrodil, a member of a new class of nitrovasodilator drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **7**, 231-236 (1999).
- 30) Honey-Nguyen P. L., Arenja S., Bouwstra J. A., Skin penetration and mechanisms of action in the delivery of the D<sub>2</sub>-agonist rotigotine from surfactant-based elastic vesicle formulations. *Pharm. Res.*, **20**, 1619-1625 (2003).
- 31) Femenía-Font A., Balaguer-Fernández C., Merino V., López-Castellano A., Combination strategies for enhancing transdermal absorption of sumatriptan through skin. *Int. J. Pharmaceut.*, **323**, 125-130 (2006).
- 32) Abu-Qare A. W., Abou-Donia M.B., High performance liquid chromatographic determination of diazinon, permethrin, DEET (*N,N*-diethyl-*m*-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **370**, 403-407 (2001).
- 33) Liu W., Gan J. J., Qin S., Separation and aquatic toxicity of enantiomers of synthetic

- pyrethroid insecticides., *Chirality*, **17**, 127-133 (2005).
- 34) Bronaugh R. L., Stewart R. F., Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. V: Permeation through damaged skin, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 1062-1066 (1985).
- 35) Scott R. C., Ramsey J.D., Comparison of the *in vivo* and *in vitro* percutaneous absorption of a lipophilic molecule (cypermethrin, a pyrethroid insecticide), *J. Invest. Dermatol.*, **89**, 142-146 (1987).
- 36) Akaike H., A new look at the statistical model identification, *IEEE Trans. Automat. Control*, **19**, 716-723 (1974).
- 37) Leveque N., Raghavan S. L., Lane M. E., Hadgraft J., Use of a molecular form technique for the penetration of supersaturated solutions of salicylic acid across silicone membranes and human skin *in vitro*. *Int. J. Pharm.*, **318**, 49-54 (2006).
- 38) Potts R. O., Guy R. H., Predicting skin permeability, *Pharm. Res.*, **9**, 663-669 (1992).
- 39) Prausnitz M. R., Langer R., Transdermal drug delivery, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1261-1268 (2008).
- 40) Morimoto Y., Hatanaka T., Sugibayashi K., Omiya H., Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 634-649 (1992).
- 41) Anderson R. L., Cassidy J. M., Variation in physical dimensions and chemical composition of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, **61**, 30-32 (1973).
- 42) OECD Screening Information Data Set (ID: 15831-10-4), SIDS initial assessment report for SIAM 16, Paris, May 2003.
- 43) National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH. "The Registry of Toxic Effects of Chemical Substance, RTECS, *p*-Cresol (#: GO6475000)": <<http://www.cdc.gov/niosh-rtecs/GO62CCF8.html>>, cited May 2009.

- 44) Joel A. T., Ted S., Tee G., Michael M., Mark R., Health risks posed by use of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in PVC medical devices, A critical review, *Am. J. Ind. Med.*, **39**, 100-111 (2001).
- 45) Ted S., Human exposure to phthalates via consumer products, *Int. J. Androl.*, **29**, 134-139 (2006).
- 46) Sathyanarayana S., Karr C. J., Lozano P., Brown E., Calafat A. M., Liu F., Swan S. H., Baby care products possible sources of infant phthalate exposure, *Pediatrics*, **31**, 260-268 (2012).
- 47) Bornehag C.-G., Lundgren B., Weschler C. J., Sigsgaard T., Hagerhed-Engman L., Sundell J., Phthalates in indoor dust and their association with building characteristics, *Environ. Health. Perspect.*, **113**, 1399-1404 (2005).
- 48) Takano H., Enhancement of allergy by environmental pollutants, Importance of low-dose complicated effects of environmental pollutants, *Jpn. J. Hyg.*, **64**, 710-714 (2009).
- 49) Tsunehisa M., Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono (2-ethylhexyl) phthalate in media for *in vitro* fertilization, *Chemosphere*, **86**, 454-459 (2012).
- 50) Otsuka K., Matsumura T., Hamada M., A survey of chemical substances in residences, *J. Soc. Indoor Environ. Jap.*, **5**, 22-35 (2002).
- 51) Berger-Preis E., Levsen K., Leng G., Idel H., Sugiri D., Ranft U., Indoor pyrethroid exposure in homes with woollen textile floor coverings, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **205**, 459-472 (2002).
- 52) Berger-Preis E., Koch W., Gerling S., Kock H., Appel K. E., Use of biocidal products (insect sprays and electro-vaporizer) in indoor areas, Exposure scenarios and exposure modeling, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **212**, 505-518 (2009).

- 53) Anissimov Y. G., Roberts M. S., Modelling dermal drug distribution after topical application in human. *Pharm. Res.*, **28**, 2119–2129 (2011).
- 54) Jewell C., Prusakiewicz J. J., Ackermann C., Payne N. A., Fate G., Voorman R., Williams F. M., Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **225**, 221-228 (2007).
- 55) Wilson B. W., Walker C. R., Regulation of newly synthesized acetylcholinesterase in muscle cultures treated with diisopropylfluorophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 3194-3198 (1974).
- 56) Sugibayashi K., Hayashi T., Matsumoto K., Hasegawa T., Utility of a three-dimensional cultured skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin., *Drug Metab. Pharmacokin.*, **19**, 352-362 (2004).
- 57) Sugibayashi K., Hayashi T., Morimoto Y., Simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin after its topical application: the effect of enzyme distribution in skin. *J. Control. Release*, **62**, 201-208 (1999).
- 58) Lowry O. J., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 59) Imai T., Species difference of drug metabolism: difficulty of prediction of drug disposition in human from animal data, *Drug Delivery System*, **22**, 48-53 (2007).
- 60) 加藤隆一、鎌滝哲哉、第2版 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として、36-39、東京化学同人、(2000).
- 61) Koch H. M., Bolt H. M., Preuss R., Angerer J., New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses

- of deuterium-labelled DEHP, *Arch. Toxicol.*, **79**, 367-376 (2005).
- 62) Prusakiewica J. J., Ackermann C., Voorman R., Comparison of skin esterase activities from different species. *Pharm. Res.*, **23**, 1517-1523 (2006).
- 63) Jewell C., Ackmann C., Payne N. A., Fate G., Voorman R., Williams F. M., Specificity of procaine and ester hydrolysis by human, minipig, and rat skin and liver, *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 2015-2022 (2007).
- 64) Ngawhirunpat T., Opanasopit P., Prakongpan S., Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **58**, 645-651 (2004).
- 65) Satoh T., Hosokawa M., Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem. Biol. Interact.*, **162**, 195–211 (2006).
- 66) Satoh T., Taylor P., Bosron W. F., Sanghani P., Hosokawa M., Du B. N., Current progress on esterases: From molecular structure to function. *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 488–493 (2002).
- 67) Imai T., Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design, *Drug Metab. Pharm.*, **21**, 173-185 (2006).
- 68) 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.*, **34**, 1734-1741 (2006).
- 69) Imai T., Carboxylesterase: from drug metabolism to drug discovery. *Nihon Yakurigaku Zasshi.*, **134**, 281-284 (2009).
- 70) Taketani M., Shii M., Ohura K., Ninomiya S., Imai T., Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human, *Life Sci.*, **81**, 924-932 (2007).

- 71) Hatanaka T, Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y., Prediction of skin permeability of drugs. 1. Comparison with artificial membrane, *Chem. Pharm., Bull.*, **38**, 3452-3459 (1990).
- 72) Sugibayashi K., Todo H., Oshizaka T., Owada Y., Mathematical model to predict skin concentration of drugs: toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative, *Pharm. Res.*, **27**, 134-142 (2010).
- 73) Todo H., Oshizaka T., Kadhun W. R., Sugibayashi K., Mathematical model to predict skin concentration after topical application of drugs. *Pharmaceutics*, **5**, 634-651 (2013).
- 74) Sugino M., Todo H., Suzuki T., Nakada K., Tsuji K., Tokunaga H., Jinno H., Sugibayashi K., Safety prediction of topically exposed biocides using permeability coefficients and the desquamation rate at the stratum corneum, *J. Toxicol. Sci.*, **39**, 475-485 (2014).