

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12210

研究課題名（和文）皮膚内エステラーゼ活性を指標とするシックハウス症候群発症リスク評価法の構築

研究課題名（英文）Risk assessment method of sick building syndrome onset based on esterase activity in skin

研究代表者

畑中 朋美（Hatanaka, Tomomi）

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：10198749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：シックハウス症候群（SHS）の原因物質の1つであるフタル酸エステル(PE)は皮膚内で加水分解されることにより活性代謝物として経皮吸収される。SHS発症リスク評価法を確立するため、PEの皮膚内代謝を担う酵素を探索し、経皮吸収性との関連を評価した。遺伝子ノックアウトマウスを用い、PEの皮膚内代謝に対する神経障害標的エステラーゼの寄与は小さいことを確認した。種々エステラーゼ阻害剤を用いたヒト皮膚代謝実験から、PEの皮膚内代謝は主にカルボキシルエステラーゼ（CES）により触媒されることが示唆された。PEをヒト皮膚に適用した後の活性代謝物の吸収量は、皮膚内の加水分解活性やCES分布量と相関した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フタル酸エステル(PE)は皮膚内で加水分解されることにより活性代謝物として経皮吸収される。本研究では、この加水分解反応はカルボキシルエステラーゼ（CES）が主に担い、CESの皮膚内分布量が大きいほどPEの活性代謝物の吸収量が大きいことを明らかにした。CESには発現量の異なるサブタイプが存在が報告されており、今後、遺伝子型とPEの皮膚内加水分解活性や経皮吸収量との関係が明らかになれば、シックハウス症候群（SHS）発症リスク評価に応用できる。また、CES阻害剤が発症予防に利用できる可能性もある。未だ多くの患者がその症状に苦しんでいるSHSの診断や治療に、新たな方法論を提示できると考える。

研究成果の概要（英文）：Phthalate esters (PE), adjuvants of sick house syndrome (SHS), are transdermally absorbed as active metabolites following hydrolysis by cutaneous esterase. Cutaneous metabolic enzymes of PE were searched and the relationship to transdermal absorption was investigated to establish an assessment method for the onset risk of SHS. Experiments using gene knockout mouse, human excised skin and several kinds of esterase inhibitors suggested that not neuropathy target esterase but carboxylesterase mainly contributes dermal metabolism of PE. Absorption of active metabolite after applying PE to human skin was correlated to hydrolysis activity and CES content in skin.

研究分野：医療系薬学

キーワード：シックハウス症候群 フタル酸エステル 経皮吸収 エステラーゼ リスク評価 カルボキシルエステラーゼ 神経障害標的エステラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) シックハウス症候群のアジュバントの一つであるフタル酸エステルは、呼吸を介した経肺経路や飲食を通じた経口経路に加えて、接触により皮膚からも体内へ吸収される。
- (2) フタル酸エステル暴露の防御策として、経肺経路には室内濃度指針値が策定され、経口経路には食器や玩具への使用が規制されているにも関わらず、経皮経路に関する情報は少なく、何ら防御策は講じられていない。
- (3) フタル酸エステルは分子量が低く、脂溶性が著しく高いため、容易に角質層に分配・拡散し、その後、表皮内で加水分解されて極性の活性代謝物となることにより、角質層以下の水に富んだ組織を拡散して血液中に吸収されるが、皮膚内代謝を阻害すると角質層中に留まり、体内へは吸収されない。
- (4) シックハウス症候群患者の単核球中神経障害標的エステラーゼ (NTE) 活性は、健常人に比べて有意に高く、また、高い皮膚内 NTE 活性を示す *PNPLA6* 遺伝子導入マウスのフタル酸エステル経皮吸収量は野生型マウスに比べて有意に高い。しかし、皮膚内エステラーゼ活性に占める NTE 活性の割合は 10% 程度である。
- (5) 皮膚内のエステラーゼ活性は主に角質層以下の表皮に局在し、同部位内のカルボキシルエステラーゼ (CES) の分布量は他のエステラーゼに比べて数百倍高く、かつ、個体差も約 25 倍と大きい。
- (6) フタル酸エステルはヒト皮膚ホモジネート中で Michaelis-Menten 型の加水分解挙動を示すが、CES でも同様の代謝挙動得られるとともに、他のエステラーゼと比べ、フタル酸エステルに対して高い親和性を示す。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、フタル酸エステルの皮膚内代謝と経皮吸収における CES の役割を明確化し、シックハウス症候群の新たな診断法や治療法へ応用することにある。コロナ禍の手術数激減により、ヒト皮膚入手が一時困難となったため、当初の計画を一部変更し、以下の研究目的を掲げた。

- (1) フタル酸エステルの *PNPLA6* ヘテロノックアウトマウスの皮膚ホモジネート中の加水分解活性を野生型マウスと比較し、フタル酸エステルの皮膚内代謝に及ぼす NTE の影響を評価する。
- (2) ヒト皮膚ホモジネート中のフタル酸エステル加水分解速度に及ぼす種々エステラーゼ阻害剤の影響を評価し、フタル酸エステルの皮膚内代謝における CES の役割を明確化する。
- (3) フタル酸エステルのヒト皮膚透過性を評価し、その個体差と皮膚内エステラーゼ活性や CES 分布量との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 皮膚内代謝実験

PNPLA6 ヘテロノックアウトマウス摘出皮膚、もしくは手術時に摘出された正常ヒト皮膚の余剰部位を用いてホモジネートを作成した。皮膚ホモジネート液にフタル酸ジブチル (DBP) を添加して生成されるフタル酸モノブチル (BP) を HPLC により定量し、生成速度を算出した。また、

DBP と同時に種々エステラーゼ阻害剤を添加し、BP 生成速度を非添加時と比較した。

(2) 皮膚内酵素分布量の測定

PNPLA6 ヘテロノックアウトマウスもしくはヒト皮膚のホモジネート液を作成し、既知量の組換えタンパク質とともにウエスタンブローディングを行い、皮膚中の PNPLA6 および CES 分布量を測定した。

(3) フタル酸エステルの皮膚透過実験

ヒト皮膚と拡散セルを用いた *in vitro* 透過実験により、DBP 適用後の DBP および BP 皮膚透過量と皮膚中濃度を HPLC により測定した。なお、透過実験後、テープストリッピング法により皮膚から角質層を剥離し、角質層と角質層以下の皮膚中濃度を別個に測定した。また、同じ皮膚の一部を用い、(1)の方法によりエステラーゼ活性を、(2)の方法により CES 分布量をそれぞれ測定した。

4. 研究成果

(1) PNPLA6 ヘテロノックアウトマウスの皮膚内 PNPLA6 分布量と DBP 加水分解速度

PNPLA6 ヘテロノックアウトマウスの皮膚内 PNPLA6 分布量は野生型マウスの約半分であったが、DBP の加水分解速度に差はなく、フタル酸エステルの皮膚内代謝に対する NTE の寄与は小さいことが確認された (図 1)。

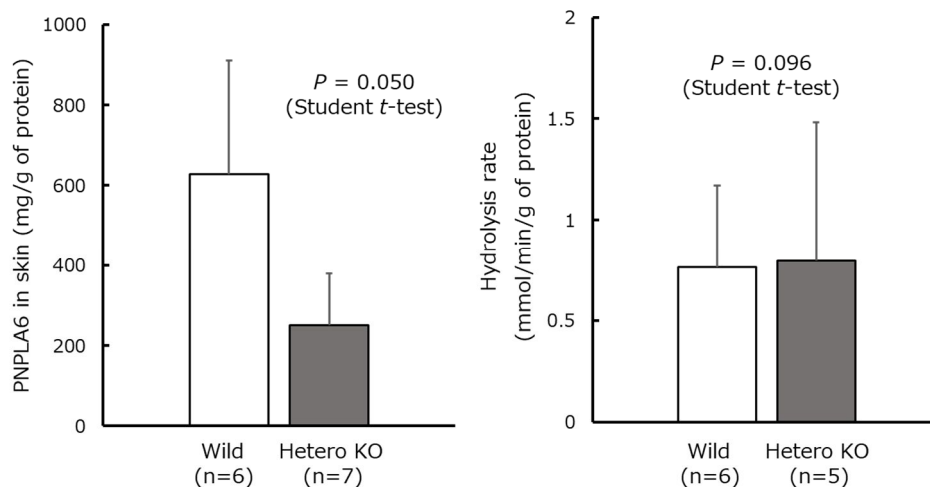


図 1 PNPLA6 ヘテロノックアウトマウスの皮膚内 PNPLA6 量と DBP 加水分解速度

(2) ヒト皮膚ホモジネート中の DBP 加水分解速度に及ぼす種々エステラーゼ阻害剤の影響

フタル酸エステルのヒト皮膚ホモジネート中の加水分解速度は、個体間で十数倍変動した。また、この加水分解速度は、paraoxonase1 (PON1) 阻害剤である ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) の併用により変化しなかったが、セリンプロテアーゼ (CES, PON1, butyrylcholinesterase を含む) 阻害剤であるパラオキソンや、不可逆的セリンプロテアーゼ阻害剤である phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、特異的 CES 阻害剤である bis(p-nitrophenyl) phosphate (BNPP) により低下した (図 2)。これらのことから、フタル酸エステルの皮膚内代謝を主に担うエステラーゼは CES であることが示唆された。

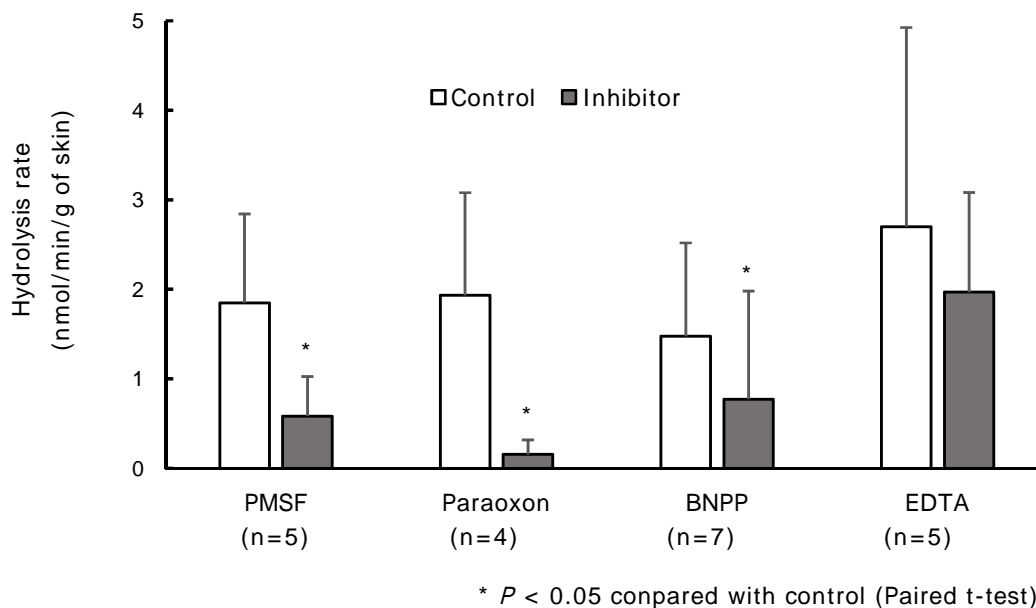


図2 ヒト皮膚ホモジネート中の DBP 加水分解速度に及ぼす種々エステラーゼ阻害剤の影響

(3) DBP のヒト皮膚透過性と皮膚内代謝の関係

ヒト皮膚に DBP を適用 24 時間後、角質層中には主に DBP が存在したが、角質層以下では BP 濃度が DBP 濃度を上回り、真皮側には主に BP が透過した(図 3)。DBP と BP の皮膚内濃度や透過量、およびその濃度比は個体間で著しく変動し、フタル酸エステルの経皮吸収性の大きな個体差が確認された。DBP の皮膚透過に関する指標と皮膚内代謝の指標との関係を分析したところ、例数を増やしたさらなる検討が必要であるが、BP の皮膚中濃度やその濃度比は、ホモジネート中の DBP 加水分解速度や皮膚内 CES2 濃度と正の相関を示した(図 4)。

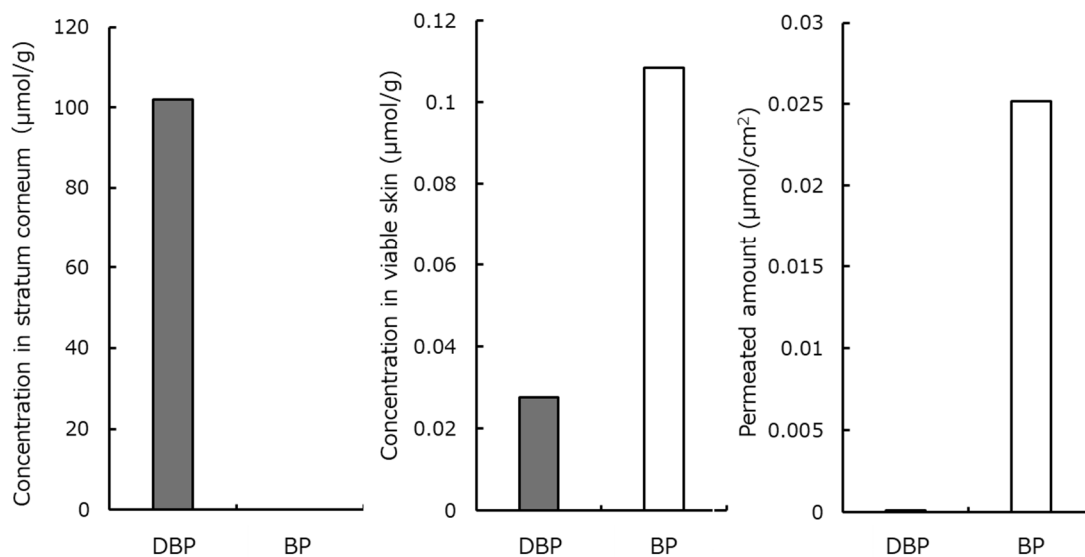


図3 DBP 皮膚適用 24 時間後の皮膚透過挙動の典型例

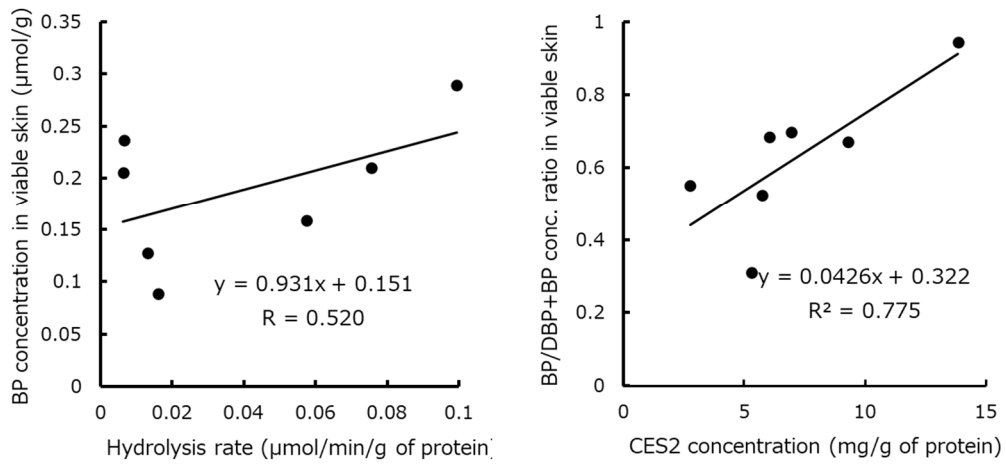


図4 DBPの皮膚透過挙動と皮膚内代謝の関係

(4) CESの遺伝子多型

データベース検索により、CES活性が著しく異なる遺伝子多型は発見されなかったが、CES1には発現量の異なるディプロタイプが存在した。遺伝子型により皮膚内のCES分布量、ひいては加水分解活性が異なり、この差がフタル酸エステルの皮膚内代謝ならびに皮膚透過性に影響する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 畑中朋美、武内智春、大山 翠	4. 巻 41
2. 論文標題 フタル酸エステルの経皮吸収におけるエステラーゼの機能解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 518-522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 畑中朋美、武内智春、大山 翠	4. 巻 41
2. 論文標題 フタル酸エステルの皮膚からの吸収に果たすエステラーゼの役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 1265-1269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 畑中朋美	4. 巻 31
2. 論文標題 Carboxylesteraseと化学物質の経皮吸収	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床環境医学	6. 最初と最後の頁 70-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 畑中朋美、大山 翠、武内智春、馬淵智生、木村 穰
2. 発表標題 フタル酸エステルの経皮吸収におけるエステラーゼの機能解析
3. 学会等名 第29回日本臨床環境医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畑中朋美、鳴嶋 涼、野津尚記、大山 翠、武内智春、坂部 貢、加藤 明、木村 稔、馬淵智生
2. 発表標題 フタル酸ジブチルの皮膚内代謝に及ぼすカルボキシルエステラーゼと神経障害標的エステラーゼの影響
3. 学会等名 第30回日本臨床環境医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	馬淵 智生 (Mabuchi Tomotaka) (30408059)	東海大学・医学部・教授 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------