

令和元年6月6日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00625

研究課題名(和文)皮膚内代謝を基盤としたシックハウス症候群発現リスク評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of assessment method for onset risk of sick house syndrome based on skin metabolism

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シックハウス症候群(SHS)の原因物質であるフタル酸エステル(PE)経皮暴露による発症リスク評価法の確立を目的に、ヒト神経障害標的エステラーゼ(NTE)遺伝子導入マウスやヒト組織を用いて、皮膚内NTE活性が高いほどPEは代謝を受けやすく、経皮吸収量が増大することや、皮膚内NET活性は単核球中活性に相関することを示した。また、皮膚内総エステラーゼ活性に寄与するNTE以外の酵素の探索を行い、カルボキシルエステラーゼ2(CES2)は、エステル化合物への親和性が高く、表皮に局在し、分布量が大きく、かつその個体差も大きいことから、皮膚内CES2活性の予測がSHS発症リスク評価へ利用できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シックハウス症候群(SHS)の原因物質が次々と指摘され、その防御対策も進んでいるにも拘らず、未だ多くの患者がその症状に苦しんでいる。本研究は原因物質の暴露経路として見落とされがちな経皮経路に着目し、原因物質の一つであるフタル酸エステルが皮膚内代謝活性に依存して経皮吸収されることを明らかとした。また、その皮膚内代謝を決定づける酵素を探索し、カルボキシルエステラーゼ2が候補酵素として見出された。今後、この酵素の多型や皮膚内分布量を血液検査等から推定できれば、シックハウス症候群の発症リスクを予測できる可能性がある。また、SHS発症を予防するための行動指針や新たな治療法確立の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish an assessment method for the onset risk of sick house syndrome following dermal exposure of phthalate esters (PE). Several tissues of human neuropathy target esterase (NTE) gene transgenic mice and human were used. The NTE activity in the skin was, the higher PE was metabolized, resulting the higher percutaneous absorption of PE. The NTE activity in the skin correlated to that in the peripheral blood mononuclear cells. Other esterase which mainly determines the esterase activity in the skin was also searched, because the contribution of NTE to the activity was small. Carboxylesterase 2 (CES2) was a probable candidate, because it located in the epidermis, had high affinities to many ester compounds, and distributed large amount with large interindividual difference. The onset risk of sick house syndrome following dermal exposure of PE can be assessed by CES2 activity in the 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 皮膚内代謝 発症リスク評価法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) シックハウス症候群 (SHS) の原因物質が次々に指摘され、その防御対策として室内濃度基準の策定や食器や玩具への使用規制が進められているにも関わらず、患者数は横ばい傾向にある。

(2) SHS の原因物質の一つであるフタル酸エステル (PE) は脂溶性が著しく高いため、経皮暴露後容易に角質層に分配・拡散し、表皮内で加水分解されて極性の活性代謝物として角質層以下の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吸収されない。

(3) SHS 患者の神経障害標的エステラーゼ (NTE) の単核球中活性は健常人に比べて高い。

(4) ヒト NTE 遺伝子 (*PNPLA6*) 導入マウスは野生型マウスに比べて皮膚内 NTE 活性が高く、PE の皮膚透過性も高い。

これらのことから、皮膚内のエステラーゼ活性が高いヒトほど PE の経皮吸収性が高く、SHS 発症リスクも高いという新たな暴露シナリオが考えらる。

#### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、エステル化合物の経皮吸収における皮膚内代謝酵素の役割を明らかにし、SHS 原因物質の一つである PE の経皮暴露に対するリスクファクター評価法を確立することにある。そのために、以下の研究目的を掲げた。

(1) 皮膚内 NTE 活性が高いほど PE の経皮吸収性が高いことを確認し、ヒト皮膚内の NTE 活性を血液サンプルから予測する方法を確立する。

(2) NTE 以外で PE の皮膚内代謝に寄与するエステラーゼを探索する。

(3) (1)と(2)の結果を踏まえて、PE 皮膚内代謝を決定づける酵素の活性を血液サンプルから予測する方法を確立する。

#### 3. 研究の方法

(1) *PNPLA6* 導入マウスの PE 皮膚透過性が高い原因から皮膚バリアー能の低下を排除するため、皮膚内で代謝されない硝酸イソソルビドの皮膚透過性を野生型マウスと比較する。皮膚透過性の比較には摘出皮膚と拡散セルを用いた *in vitro* 透過実験を行い、透過した薬物量を HPLC により定量する。

(2) ヒト皮膚内 NTE 活性を予測するため、皮膚移植患者の余剰皮膚と血液を用いて皮膚内 NTE 活性と単核球活性の相関について検討する。また、NTE 遺伝子には活性の異なる SNP が存在することから SNP 解析を行い、NTE 活性との関連性について評価する。

(3) 既存 DNA データベースからヒト皮膚内で発現しているエステラーゼとして、異物代謝酵素カルボキシエステラーゼ (CES1 および CES2) とエステラーゼ D (ESD)、角質細胞間脂質代謝酵素スフィンゴミエリンホスフォジエステラーゼ 1 (SMPD1)、ステロイドスルファターゼ (STS) およびグルコセレブロシダーゼ (GBA) を取り上げ、その皮膚内分布を抗体染色により評価した。また、皮膚内のエステラーゼ活性部位を FID の加水分解産物である FITC の蛍光により検出し、酵素の皮膚内分布と比較した。

(4) 上述の酵素 CES1、CES2、ESD、SMPD1、STS および GBA の皮膚内分布量を評価する。凍結破砕した皮膚のウエスタンブロッティング後のバンド強度を、市販酵素と比較することにより皮膚内酵素量を定量化する。

(5) エステル化合物の上述の酵素 CES1、CES2、ESD、SMPD1、STS および GBA による加水分解挙動をヒト皮膚内代謝挙動と比較する。サリチル酸メチル、アセチルサリチル酸、ニコチン酸エチル、パラニトロ安息香酸エチル、ヒドロキシ安息香酸メチルおよびアミノ安息香酸エチルを基質として用い、代謝産物の生成速度を種々濃度で測定する。また、ヒト皮膚内代謝挙動を種々エステラーゼの代謝挙動の総和と仮定して重回帰分析を行い、ヒト皮膚内代謝における寄与率を算出する。

#### 4. 研究成果

(1) *PNPLA6* 導入マウスの硝酸イソソルビドの皮膚透過性は野生型マウスと同等であり、皮膚バリアー機能には差は認められなかった。このことから、遺伝子導入マウスの高い PE 皮膚透過性は、皮膚内の NTE 活性が高く、PE が皮膚内で極性を持つ活性代謝物に加水分解されるため、血液中に吸収されやすくなったものと考えられる。したがって、皮膚内の代謝活性に依

存した PE の新たな暴露シナリオが確認された。

(2) SHS 以外の皮膚移植患者の皮膚内 NTE 活性は定量限界に近い低値を示したが、ヒトの単核球や *PNPLA6* 導入マウスの皮膚や脳を用いた代謝実験から、NTE 活性はパラオキソン抵抗性エステラーゼ活性で近似できることを見出した。皮膚内パラオキソン抵抗性エステラーゼ活性と単核球中 NTE 活性は高い相関を示し(図 1)、単核球中 NTE 活性が高い SHS 患者は皮膚内 NTE 活性も高いものと推察された。しかし、本被検者の *PMPLA6* 内 SNP の出現頻度は健常人とほぼ等しく、NTE 活性と遺伝子多型の関係は不明であった。また、皮膚内の総エステラーゼ活性に占める NTE 活性の割合は 10%程度であった。

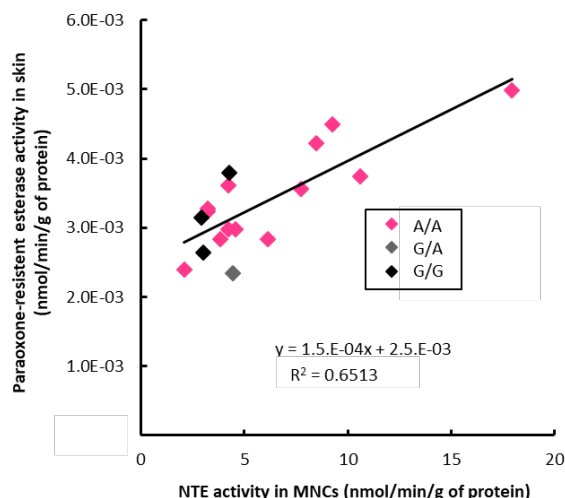


図1 皮膚内パラオキソン耐性エステラーゼ性と単核球中NTE活性の関係

(3) 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、CES2、SMPD1 および STS は同じ部位に局在した(図 2)。一方、CES1、ESD および GBA は皮膚全体に分布した。PE は角質層直下の表皮中で加水分解されて活性代謝物となり血液中に移行することから、CES2、SMPD1 および STS がこの代謝に寄与している可能性が示唆された。

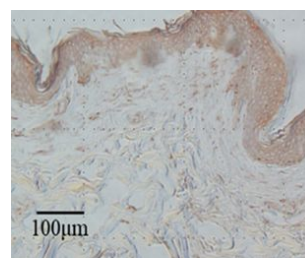


図2 CES2の皮膚内分布

(4) CES1 と CES2 の皮膚内分布量は他の酵素に比べて数倍から数百倍高く、PE の皮膚内代謝に寄与する可能性が示唆された。また、その皮膚内分布量の個体差は 25 倍と大きかったが、年齢や性別の影響は認められず、SHS 患者の高い PE 皮膚透過性の原因として CES 分布量の違いが関与する可能性が示唆された。

(5) エステル化合物はヒト皮膚ホモジネート中で Michaelis-Menten 型の代謝挙動を示した。CES1 と CES2 はヒト皮膚と同様に Michaelis-Menten 型の代謝挙動を示したが、他のエステラーゼは一次代謝挙動を示し、基質に対する親和性が低かった。ヒト皮膚内代謝挙動を種々エステラーゼの代謝挙動の総和と仮定して重回帰分析すると、皮膚内代謝の変動の 70% が CES2 により説明できることが明らかとなった。

以上のことから、PE の皮膚内代謝は主に CES2 が担っていると推測された。また、CES2 には代謝活性の異なる多型の報告がないことから、NTE の場合と同様に、単核球中の CES2 活性から皮膚中活性が予測できれば、SHS 発症リスクを評価可能と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Hatanaka T, Yamamoto S, Kamei M, Kadhum WR, Todo H, Sugibayashi K. In silico estimation of skin concentration of dermally metabolized chemicals. *Int J Pharm Sci Dev Res*. 査読有、3, 2017, 7-16.

Sugino M, Hatanaka T, Todo H, Mashimo Y, Suzuki T, Kobayashi M, Hosoya O, Jinno H, Juni K, Sugibayashi K. Safety evaluation of dermal exposure to phthalates: Metabolic-dependent percutaneous absorption. *Toxicol Appl Pharmacol*. 査読有、328, 2017, 10-17.

畑中朋美、シックハウス症候群患者のフタル酸エステル経皮吸収における神経障害標的エステラーゼの役割、*埼玉県薬剤師会雑誌*、査読無、3, 2019, 12-16.

[学会発表](計 8 件)

井上貴暁、中里優花、Wesam R Kadhum、藤堂浩明、畑中朋美、杉林堅次、ヒトおよびヘアレスラットに局所適用したエステル化合物の皮膚中代謝挙動の種差に関する研究、日本薬剤学会第 31 回年会、2016 年 5 月 19 日~21 日、岐阜

畑中朋美、杉野雅浩、従二和彦、内堀雅博、太田嘉英、今川孝太郎、赤松 正、宮坂宗男、坂部貢、木村 穰、ヒトにおけるフタル酸エステルの経皮吸収から見たシックハウス症候群に

について、第 25 回日本臨床環境医学会学術集会、2016 年 6 月 17 日～18 日、郡山

木村 穰、加藤 明、本杉奈美、大久保朋一、畑中朋美、坂部 貢、田中正史、ヒト Neuropathy Target Esterase 遺伝子導入マウスを用いたシックハウス症候群関連物質の生体影響の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日、横浜

畑中朋美、中里優花、井上貴暁、田中 享、藤堂浩明、杉林堅次、内堀雅博、太田嘉英、今川孝太郎、赤松 正、宮坂宗男、坂部 貢、木村 穰、ヒト皮膚におけるエステル化合物の経皮吸収挙動 - carboxylesterase 皮膚内代謝の影響、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日、横浜

井上貴暁、中里優花、太田嘉英、赤松 正、宮坂宗男、木村 穰、Wesam R. Kadhum、田中 享、藤堂浩明、杉林堅次、畑中朋美、エステル化合物の経皮吸収に寄与する加水分解酵素の組織学的解析、日本薬剤学会第 32 回年会、2017 年 5 月 11 日～13 日、大宮

畑中朋美、井上貴暁、田中 享、藤堂浩明、杉林堅次、内堀雅博、青山謙一、太田嘉英、今川孝太郎、赤松 正、宮坂宗男、坂部 貢、木村 穰、エステル化合物の経皮吸収における carboxylesterase の役割—シックハウス症候群との関連性—、第 26 回日本臨床環境医学会学術集会、2017 年 6 月 24 日～25 日、東京

畑中朋美、皮膚代謝評価におけるヒト化モデルマウス利用の可能性、製剤種差検討会第 6 回事例報告会、2018 年 7 月 5 日、京都

小林 鈴、鹿倉愛里彩、田村真由美、武内智春、井上貴暁、藤堂浩明、杉林堅次、青山謙一、太田嘉英、今川孝太郎、赤松 正、木村 穰、畑中朋美、エステル化合物の代謝に寄与する加水分解酵素の皮膚中濃度、日本薬学会第 139 年会、2019 年 3 月 20 日～23 日、千葉

〔図書〕(計 1 件)

Sugibayashi K, Skin permeation and disposition of therapeutic and cosmeceutical compounds. Springer Japan, 2017, 428

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：木村 穰

ローマ字氏名：Kimura Minoru

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 10146706

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮坂宗男

ローマ字氏名：Miyasaka Muneo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。