

令和4年度化学物質安全対策

「大学・公的研究機関と連携した化学物質管理高度化推進事業」

消費者製品に含まれる化学物質の経皮曝露を 含めた包括的リスク評価スキームの構築

調査報告書（公表用）

令和5年3月

静岡県公立大学法人 静岡県立大学

目次

はじめに.....	5
実施体制.....	6
1. 自動車シート中リン系難燃剤の実態調査.....	7
1.1. 実験方法.....	7
1.1.1. 使用器具・試薬.....	7
1.1.2. サンプル情報.....	7
1.1.3. 前処理法.....	9
1.1.4. リン系難燃剤の分析法.....	9
1.2. 結果と考察.....	9
1.2.1. 自動車シート中リン系難燃剤の実態調査.....	9
2. 人工皮膚を用いた自動車シート中リン系難燃剤の皮膚透過試験.....	12
2.1. 実験方法.....	12
2.1.1. 使用器具・試薬.....	12
2.1.2. 測定対象としたリン系難燃剤.....	12
2.1.4. 皮膚透過試験法.....	22
2.1.5. レセプター溶液の分析方法.....	22
2.1.6. リン系難燃剤の分析条件.....	22
2.2. 結果と考察.....	30
2.2.1. 皮膚透過試験の結果.....	30
3. 経皮曝露量の推算のためのシミュレーションモデルの構築.....	32
3.1. 実験方法.....	32
3.1.1. 実験試薬および器具.....	32
3.1.2. サンプル.....	32
3.1.2.1. 衣服を介した移行試験のサンプル.....	32
3.1.2.2. 洗濯した衣服のサンプル.....	32
3.1.3. 衣服中 PFRs の分析方法.....	33
3.2. 衣服を介したシリコーンシートへの PFRs の移行量推定モデル.....	33
3.3. 結果と考察.....	34
3.3.1. 衣服を介した場合の自動車シート中 PFRs の移行試験の結果.....	34
3.3.2. 洗濯による PFRs 除去性能の評価結果.....	35
3.3.3. 経皮曝露量および衣服に移行した難燃剤量のシミュレーション結果.....	37
4. 自動車シート中難燃剤の経皮曝露量評価のフィールドテスト.....	41
4.1. 自動車シートに含まれる難燃剤の尿中代謝物測定のための分析法検討.....	41
4.1.1. リン系難燃剤及び代謝物等の分析法検討.....	41
4.1.1.1. 実験方法.....	45
4.1.1.1.1. 使用器具・試薬.....	45

4.1.1.1.2. 分析方法.....	46
4.1.1.2. 結果と考察.....	47
4.1.1.2.1. クロマトグラムの確認.....	47
4.1.1.2.2. 検量線の確認.....	48
4.1.1.2.3. 固相抽出カラムの溶出条件の検討.....	49
4.1.1.2.4. 試料採取容器の検討.....	49
4.1.2. 生体試料収集のための準備.....	50
4.2. リン系難燃剤の有害性情報及び経皮曝露による影響の情報収集.....	50
4.2.1. 化学物質の経皮曝露における動態.....	50
4.2.1.1. 一般的な動態.....	50
4.2.1.1.1. 吸収.....	50
4.2.1.1.2. 分布.....	51
4.2.1.1.3. 代謝及び排泄.....	51
4.2.1.2. 薬物代謝の種類.....	51
4.2.1.3. 皮膚構造の特異性.....	52
4.2.1.4. ヒト皮膚における化学物質の透過性.....	53
4.2.1.5. 経皮吸収に影響する因子.....	54
4.2.1.6. 皮膚における代謝.....	55
4.2.1.7. 皮膚代謝の重要性.....	56
4.2.2. 皮膚代謝に関与する酵素.....	57
4.2.2.1. アルコール脱水素酵素.....	57
4.2.2.2. フラビン依存性モノオキシゲナーゼ.....	58
4.2.2.3. アルデヒド脱水素酵素.....	59
4.2.2.4. カルボキシルエステラーゼ.....	60
4.2.2.5. シトクロム P450.....	61
4.2.3. リン系難燃剤の皮膚代謝事例等.....	61
4.2.3.1. ヒト皮膚亜細胞画分を用いた代謝.....	61
4.2.3.1.1. 実験方法.....	62
4.2.3.1.1.1. <i>in vitro</i> 代謝処理.....	62
4.2.3.1.1.2. 分析前処理.....	62
4.2.3.1.1.3. 機器分析.....	62
4.2.3.1.2. 実験結果.....	62
4.2.3.1.3. 本事例を踏まえた尿中代謝物測定結果の解釈における留意点.....	64
4.2.3.2. 皮膚からの試料採取及び代謝物分析法.....	65
4.2.3.2.1. 皮膚からの試料採取法.....	65
4.2.3.2.2. 代謝物の分析法.....	65
4.3. まとめ.....	66
参考文献.....	68

調査結果の発表状況.....	70
国内学会.....	70
国際会議.....	70
受賞.....	70

はじめに

室内に存在する化学物質のなかでも難燃剤は、身の回りの製品に数%オーダーと高濃度で含有している。また、難燃剤は部材に物理的に混合するため、製品中から容易に拡散・放散することが報告されている。既存のリスク評価スキームでは、難燃剤が準揮発性有機化合物（SVOC）に分類されることから、室内空気を介した経気曝露とハウスダストを介した経口曝露が主要な曝露経路とされている¹⁻⁷。しかし近年、主要な難燃剤の一種であるリン系難燃剤のような、分子量が400程度以下でかつ両親媒性の化学物質が皮膚と接触した場合、化学物質は皮膚を透過し血液中に移行することが報告されている^{2,8-11}。また、3種類のリン系難燃剤を溶媒に溶かしたものをヒトの皮膚サンプルに塗布し、その皮膚透過量を実測した結果、24時間で塗布した量の10-30%が皮膚を透過したと報告されている¹²。しかし、上記の研究ではリン系難燃剤が3種と限定されており、また、塗布した負荷（濃度）も限られ、実際の製品からの経皮曝露量は測定されていないという課題が挙げられる。以上に加え、リン系難燃剤は人体と長時間直接接する機会の多い自動車シートなどの消費者製品に含まれていることを考えると^{13,14}、リン系難燃剤の曝露経路の一つとして、経皮曝露を考慮すべきである^{15,16}。実際、海外においては経皮曝露に関する研究が盛んに行われているものの、我が国においては限られているのが現状である。

既存の経皮曝露量推算スキームは、実情を反映していない実験系で得られた経皮吸収速度に関するパラメータを用いているため、正確性に課題があると考えられる。また、製品との短時間接触における化学物質の皮膚への蓄積の影響が考慮できないため、経皮曝露量の過小評価の可能性が考えられる。以上のように、製品からの化学物質の経皮曝露量を推算するニーズはあるものの、経皮曝露量の推定に必要なパラメータに関する情報の欠如や推算モデルの課題から、正確な評価ができていないのが現状である。

本研究では、ヒトとの接触面積多く、難燃剤が高濃度含まれている自動車シートを対象に、難燃剤の包括的なリスク評価スキームを構築することを目的として下記の研究を行う。

1. 自動車シート中リン系難燃剤の実態調査

リン系難燃剤（PFRs）の一斉分析法を開発し、それを用いて自動車シート中のリン系難燃剤の定性・定量分析を行う。

2. 人工皮膚を用いた自動車シート中リン系難燃剤の皮膚透過試験

実際の製品（自動車シート）を人工皮膚に直接接触させることで、製品からの経皮曝露量の実測を行う。

3. 経皮曝露量の推算のためのシミュレーションモデルの構築

フィックの拡散方程式を基に、製品－皮膚間の経皮曝露量推算のためのシミュレーションモデルを構築する。

4. 自動車シート中難燃剤の経皮曝露量評価のフィールドテスト

自動車シートに含まれる難燃剤の尿中代謝物濃度を測定し、自動車の乗車時間や含有難燃剤濃度、自宅やオフィスなどの室内空気やハウスダスト中の難燃剤濃度などの影響について、定量的に考察を行う。また、難燃剤の有害性情報の収集も行う。

実施体制

研究統括：

徳村 雅弘（静岡県立大学 食品栄養科学部 助教）

自動車シート中難燃剤の経皮曝露量評価のフィールドテスト

澤井 淳（いであ株式会社 環境創造研究所 リスク評価部）

山本 潤（いであ株式会社 環境創造研究所 環境化学部）

羽山 真介（いであ株式会社 環境創造研究所 環境化学部）

鈴木 まゆみ（いであ株式会社 環境創造研究所 環境化学部）

戸田 美沙（いであ株式会社 環境創造研究所 リスク評価部）

1. 自動車シート中リン系難燃剤の実態調査

1.1. 実験方法

1.1.1. 使用器具・試薬

本研究では、テトラヒドロフラン（高速液体クロマトグラフ用，純度：99.9%，富士フィルム和光純薬株式会社），ジクロロメタン 濃縮 300（残留農薬・PCB 試験用，純度：99.5%，富士フィルム和光純薬株式会社），トルエン 濃縮 300（残留農薬・PCB 試験用，純度：99.7%，富士フィルム和光純薬株式会社），アセトニトリル（高速液体クロマトグラフ用，純度：99.9%，シグマアルドリッチ），メタノール（高速液体クロマトグラフ用，純度：99.9%，シグマアルドリッチ）及び Milli-Q 水を用いた。

1.1.2. サンプル情報

本研究で採取した自動車シートのリストを表 1.1 に示す。

表 1.1 自動車シートのリスト

論文投稿データにつき掲載不可

1.1.3. 前処理法

本研究では自動車シートを生地 (Fabric) とクッション部分 (PUF) に分けて分析を行った。サンプル 0.1 g を自動車シートから切断して試験管に入れ、テトラヒドロフラン (THF) 5 mL で超音波抽出し、その後トルエン 5 mL を加えて再度、超音波抽出を行ってから遠心分離した。上澄み 10 μ L を分取し、マトリクススパイク及びシリンジスパイクを添加し、アセトニトリルで 1 mL に定容した。

1.1.4. リン系難燃剤の分析法

リン系難燃剤 (PFRs) の分析は、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて行った。詳細は後述する。

1.2. 結果と考察

1.2.1. 自動車シート中リン系難燃剤の実態調査

本研究で測定した自動車シート中リン系難燃剤の測定結果を表 1.2 及び 1.3 に示す。

表 1.2 自動車シート中リン系難燃剤の測定結果 (Fabric)

論文投稿データにつき掲載不可

表 1.3 自動車シート中リン系難燃剤の測定結果 (PUF)

論文投稿データにつき掲載不可

2. 人工皮膚を用いた自動車シート中リン系難燃剤の皮膚透過試験

2.1. 実験方法

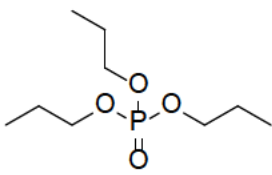
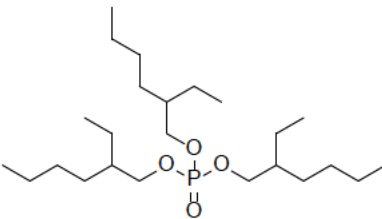
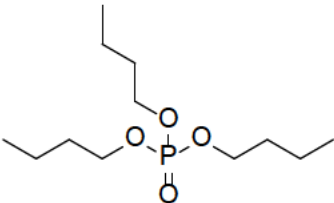
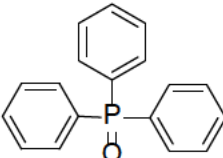
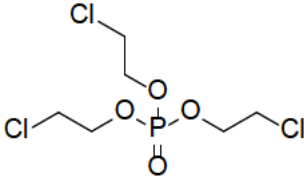
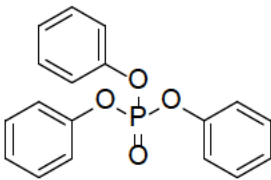
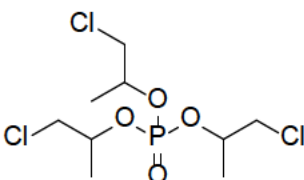
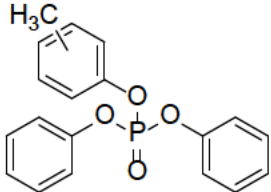
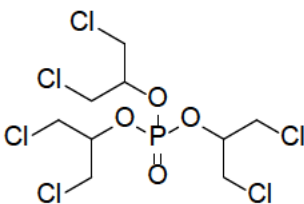
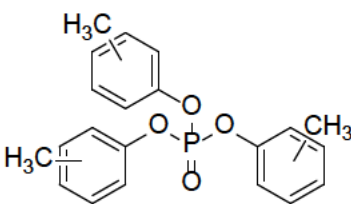
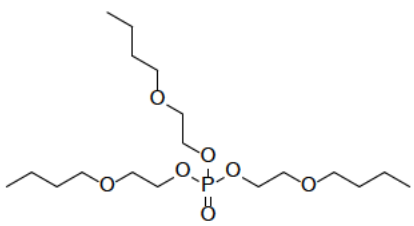
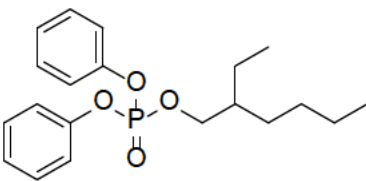
2.1.1. 使用器具・試薬

TPP, TBP, TCEP, TCPP, TDCPP, TBOEP, TEHP, TPhPO, TPhP, CsDPhP, TCsP, EHDPhP は、東京化学工業から購入した。DEG-BDCIPP は、大八化学工業株式会社から購入した。人工皮膚 (EPISKIN) は、ニコダームリサーチ株式会社から購入した。Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM 培地) 及びアセトニトリル, メタノールは Sigma-Aldrich から購入した。Q-sep 前処理チューブは島津製作所から, EMR-Lipid カラム (Captiva EMR-Lipid 600 mg/6 mL SPE Tube) は Agilent technology から購入した。皮膚透過試験に用いた衣服 (綿 100%, 厚さ約 1 mm) は UNIQLO から購入した。ウシ血清アルブミン (BSA), アセトン 300, トルエン 300, ヘキサン 300, 酢酸エチルは富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。すべての実験では, Milli-Q 水を使用した。

2.1.2. 測定対象としたリン系難燃剤

本研究で測定対象としたリン系難燃剤は, 表 2.1 および 2.2 に示す 14 種類である。

表 2.1 測定対象としたリン系難燃剤 14 種類の化学構造

物質	化学構造	物質	化学構造
リン酸トリプロピル TPP		リン酸トリリス 2-エチル ヘキシル TEHP	
リン酸トリブチル TBP		トリフェニル ホスフィン オキシド TPhPO	
リン酸トリス 2-クロ ロエチル TCEP		リン酸トリ フェニル TPhP	
リン酸トリス 2-クロ ロイソ プロピル TCPP		リン酸クレ ジルジフェ ニル CsDPhP	
リン酸トリス 1,3- ジクロロ- 2-プロピ ル TDCPP		リン酸トリ クレジル TCsP	
リン酸トリス 2-ブ トキシエ チル TBOEP		リン酸 2-エ チルヘキシ ルジフェニ ル EHDPhP	

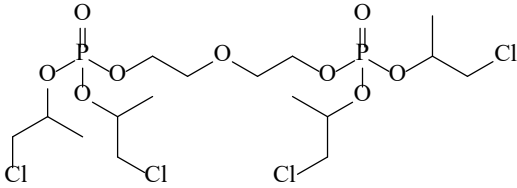
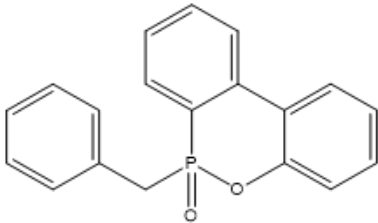
リン酸ジエチレングリコールビス (1-クロロ-2-プロピル) DEG-BDCIPP	
6-ベンジルベンゾ[c][2,1]ベンゾキサホスフィニン 6-オキシド BzIDOPO	

表 2.2 測定対象としたリン系難燃剤

Compounds	Abbreviation	CAS	Molecular formula	Molecular weight
Tripropyl phosphate	TPP	513-08-6	C ₉ H ₂₁ O ₄ P	224.23
Tributyl phosphate	TBP	126-73-8	C ₁₂ H ₂₇ O ₄ P	266.32
Tris(2-chloroethyl) phosphate	TCEP	115-96-8	C ₆ H ₁₂ Cl ₃ O ₄ P	285.48
Tris(2-chloroisopropyl) phosphate	TCPP	13674-84-5	C ₉ H ₁₈ Cl ₃ O ₄ P	327.57
Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate	TDCPP	13674-87-8	C ₉ H ₁₅ Cl ₆ O ₄ P	430.89
Tris(2-butoxyethyl) phosphate	TBOEP	78-51-3	C ₁₈ H ₃₉ O ₇ P	398.48
Tris(2-ethylhexyl) phosphate	TEHP	78-42-2	C ₂₄ H ₅₁ O ₄ P	434.64
Triphenyl phosphine oxide	TPhPO	791-28-6	C ₁₈ H ₁₅ OP	278.29
Triphenyl phosphate	TPhP	115-86-6	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P	326.29
Cresyl diphenyl phosphate	CsDPhP	26444-49-5	C ₁₉ H ₁₇ O ₄ P	340.31
Tricresyl phosphate	TCsP	1330-78-5	C ₂₁ H ₂₁ O ₄ P	368.37
2-Ethylhexyl diphenyl phosphate	EHDPhP	1241-94-7	C ₂₀ H ₂₇ O ₄ P	362.41
Diethylene glycol bis (di (2-chloroisopropyl) phosphate)	DEG-BDCIPP	52186-00-2	C ₁₆ H ₃₂ C ₁₄ O ₉ P ₂	572.18

6-benzylbenzo[c][2,1]benzoxaphosphinine 6-oxide	BzlDOPO	113504-81-7	C ₁₉ H ₁₅ O ₂ P	306.29
--	---------	-------------	--	--------

2.1.3. 皮膚透過試験に用いた自動車シート

本研究で使用了た自動車シート中 PFRs 濃度を表 2.3 に示す。また、使用了た自動車シートの写真を図 2.1 に示す。

表 2.3 皮膚透過試験で用いた自動車シート

論文投稿データにつき掲載不可



左：F1，右：F2



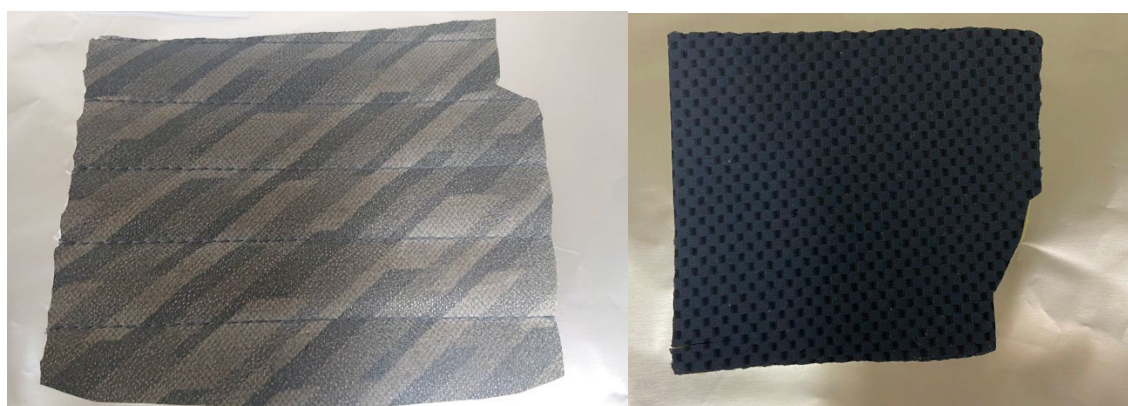
左：F3，右：F4



左：F5，右：F6



左：F7，右：F8



左：F9，右：F10



左：F11，右：F12



左 : F13, 右 : F14



F15

図 2.1 自動車シートの写真

2.1.4. 皮膚透過試験法

レセプター溶液は、5% BSA 溶液となるように調製した。皮膚細胞がついたインサートセルを、レセプター溶液 2 mL を入れた培養セルに取り付け、37°C 5% CO₂ インキュベーター内で平衡化を行った。その後、皮膚表面に自動車シートを接触させ、振とうしながらインキュベーター内で透過試験を行った。適当な時間ごとにレセプター溶液を回収した。

2.1.5. レセプター溶液の分析方法

2 mL のレセプター溶液が入った試験管に、PFRs の混合標準液 100 µL, 抽出溶媒（酢酸エチル：ヘキサン(1：1)）2 mL を添加した。1 分間ボルテックスし、遠心分離（3000 rpm, 3 min）を行い、上清を分取した。この操作を 3 回行い、上清を、窒素パージを用いて濃縮し、アセトニトリルで置換し、内標準物質を添加した。

2.1.6. リン系難燃剤の分析条件

LC-MS/MS を用いたリン系難燃剤の分析条件と分析対象物質ごとのトランジションのパラメータを表 2.4 及び表 2.5 にそれぞれ示す。

表 2.4 LC-MS/MS の分析条件

HPCL		
Equipment	Ultimate 3000 LC systems (Thermo Scientific)	
Column	Accucore Vanquish C18 Column (Internal diameter 2.1 mm, Length 100 mm, Grain Diameter 1.5 μm)	
Mobile phase	A : Water	
	B : acetonitrile / Methanol (1:4)	
Flow rate	0.3 mL min ⁻¹	
Column open temperature	50°C	
Injection volume	10 μL	
Gradient	0~0.5 min	A:95%, B:5%
	~7.0 min	B:100%
	~15 min	B:101%
	~15.1 min	A:95%, B:5%
	~17 min	A:95%, B:6%

MS/MS	
Equipment	TSQ Endura (Thermo Scientific)
Ion source	APCI
Ionization mode	Positive
Positive Ion Discharge Current (μA)	4
Negative Ion Discharge Current (μA)	4
Seath Gas (Arbitrary unit)	25
Aux Gas (Arbitrary unit)	5
Sweep gas (Arbitrary unit)	0
Ion Transfer Tube Temp (°C)	250
Vaporizer Temp (°C)	300
Positive Ion Discharge Current (μA)	4
Negative Ion Discharge Current (μA)	4

表 2.5 トランジションのパラメータ

Compound	Start Time (min)	End Time (min)	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
TMP	0	14	Positive	141.025	79.217	23	69
	0	14	Positive	141.028	109.086	18	69
TEP	0	14	Positive	183.104	99.114	20	73
	0	14	Positive	183.105	127.145	12	73
TPP	0	14	Positive	225.126	81.191	46	74
	0	14	Positive	225.127	99.116	20	74
TBP	0	14	Positive	267.177	81.155	53	76
	0	14	Positive	267.178	99.088	19	76
TPhPO	0	14	Positive	279.11	77.214	48	148

	0	14	Positive	279.15	201.036	28	148
TCEP	0	14	Positive	286.954	99.089	26	97
	0	14	Positive	286.955	125.06	19	97
TCPP	0	14	Positive	327.002	81.142	59	97
	0	14	Positive	327.003	99.119	25	97
TPhP	0	14	Positive	327.14	215.205	28	166
	0	14	Positive	327.15	250.98	28	166
CsDPhP	0	14	Positive	341.076	152.084	39	114
	0	14	Positive	341.078	229.033	29	114
EHDPhP	0	14	Positive	363.15	77.226	45	88

	0	14	Positive	363.19	251.019	12	88
TPCP	0	14	Positive	369.12	165.074	44	142
	0	14	Positive	369.14	243.028	30	142
TBOEP	0	14	Positive	399.227	99.094	30	141
	0	14	Positive	399.229	143.052	21	141
TDCPP	0	14	Positive	430.877	81.153	51	109
	0	14	Positive	430.878	99.101	28	109
DEG-BDCIPP	5.5	8.5	Positive	572.96	169	28	185
	5.5	8.5	Positive	572.96	244.929	21	185
TEHP	0	14	Positive	435.327	71.186	22	116

	0	14	Positive	435.329	99.107	19	116
TEHP- d_{51}	0	14	Positive	486.654	102.122	22	144
	0	14	Positive	486.655	103.14	18	144
TPCP- d_{21}	0.08	10.08	Positive	390.225	98.207	40	138
	0.08	10.08	Positive	390.227	175.137	36	138
TPhP- d_{15}	0.22	8.22	Positive	342.153	160.138	44	109
	0.22	8.22	Positive	342.154	223.058	30	109
TBP- d_{27}	0	14	Positive	294.328	83.173	59	94
	0	14	Positive	294.329	102.099	22	94
TCEP- d_{12}	0	14	Positive	299.004	83.102	58	108

	0	14	Positive	299.005	102.103	28	108
TBOEP- d_{12}	0	14	Positive	411.177	308.365	13	132
	0	14	Positive	411.178	205.143	16	132
$^{13}\text{C}_6\text{-HBBz}$	0	15	Negative	494.604	79.104	30	152
	0	15	Negative	494.605	81.113	30	152

2.2. 結果と考察

2.2.1. 皮膚透過試験の結果

図 2.2 に自動車シート中 PFRs の皮膚透過試験の結果を示す。本実験で使用した自動車シートに含まれる PFRs のうち、TCPP, TCEP, TDCPP, DEG-BDCIPP, TBOEP の皮膚透過速度が比較的早い傾向にあった。最も皮膚透過速度の早かった自動車シートは、すべての PFRs において、非ファブリック材であった。一方、TPhP ($< 1.8 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$), TCsP ($< 0.0068 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$), CsDPhP ($< 1.5 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$), EHDPHP ($< 0.030 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$), BzIDPOPO ($< 0.051 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) の皮膚透過速度は、比較的遅い傾向にあった。

図 2.3 に PFRs の皮膚透過速度と $\text{Log } K_{ow}$ の関係を示す。本実験で対象とした自動車シートと PFRs においては、皮膚透過速度と $\text{Log } K_{ow}$ に相関関係はみられなかった。これは、PFRs の $\text{Log } K_{ow}$ と比較して、自動車シートの素材の方が、皮膚透過速度により強い影響を与えるためだと考えられる。

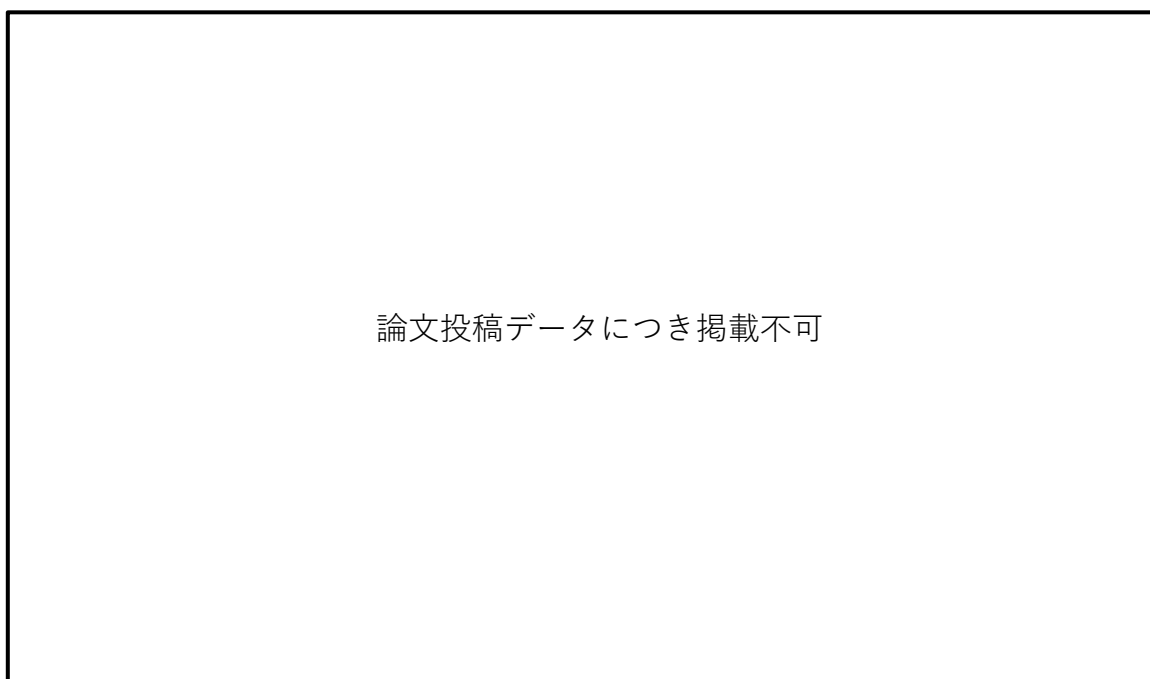


図 2.2 自動車シート中 PFRs の皮膚透過試験結果

論文投稿データにつき掲載不可

図 2.3 PFRs の皮膚透過速度と $\text{Log } K_{\text{ow}}$ の関係

3. 経皮曝露量の推算のためのシミュレーションモデルの構築

本研究では、経皮曝露量の推算のためのシミュレーションモデルを精緻化するために、衣服を介した PFRs の移行試験を行った。また、14 種類の PFRs を対象物質とし、混合標準溶液を添加した衣服を洗濯、乾燥させることで、洗濯による PFRs の除去性能を評価し、複数の曝露シナリオを構築し、洗濯の影響を考慮した経皮曝露量の推定を行った。

3.1. 実験方法

3.1.1. 実験試薬および器具

TMP, TEP, TPP, TBP, TCEP, TCPP, TDCPP, TBOEP, TEHP, TPhPO, TPhP, CsDPhP, TCsP, EHDPHP は、東京化成工業株式会社（東京都）から購入した。TBP-*d*₂₇, TEHP-*d*₅₁, TPhP-*d*₁₅, TCsP-*d*₂₁, TCEP-*d*₁₂ は、林純薬工業株式会社（大阪府）から購入した。アセトニトリル、メタノールは Sigma-Aldrich（アメリカ合衆国）から購入した。綿製の衣服（綿 100%, 厚さ約 0.40 mm）は UNIQLO（日本）から購入した。ポリエステル製の衣服（ポリエステル 100%, 厚さ約 0.30 mm）は AOKI（日本）から購入した。アセトン 300, トルエン 300, ヘキサン 300, ジクロロメタン 300 は富士フイルム和光純薬株式会社（大阪府）から購入した。シリンジフィルター（φ13 mm, 0.22 μm）はアズワン株式会社から購入した。ディスポシリンジ（10 mL）は大阪ケミカル株式会社から購入した。洗濯機は小型洗濯機 SR-W020-RD（イー・エム・エー株式会社）を購入した。洗剤はアタック ZERO 液体洗剤（花王株式会社）を購入した。

3.1.2. サンプル

3.1.2.1. 衣服を介した移行試験のサンプル

Hammel et al.¹⁷ のシリコーンリストバンドを用いた試験を参考に、シリコーンシートの洗浄を行った。シリコーンシート（2.5 cm × 2.5 cm）は使用前にアセトン：ヘキサン（1:1, v/v）で 15 分×2 回超音波洗浄を行った。洗浄したシリコーンシートは、乾燥させてから使用した。自動車シートの上に衣服、シリコーンシートの順で置き、さらに 30 g cm⁻² のおもりをのせ、衣服を介した自動車シートからシリコーンシートへの PFRs 移行試験を行った。おもりは、容器に水を入れて調節した。なお、おもりの重さは、産業技術総合研究所の「消費者製品に含まれる化学物質の室内暴露評価に係る調査」の調査報告書¹⁸に記載されている、日本人の身体表面積を参考に、臀部と大腿部の合計 2200 cm²、体重 50 kg（成人）を考慮して設定した。移行試験は、25°C に保ったインキュベーター内で行い、4, 24, 168, 336 h 経過後にシリコーンシートおよび衣服のサンプリングを行った。

3.1.2.2. 洗濯した衣服のサンプル

PFRs 混合標準溶液を添加した衣服（3.0 cm × 3.0 cm）を模擬汚染衣服として使用した。洗濯は使用した液体洗剤の仕様書通りに、15 L の水道水に 5 mL の洗剤を添加し、洗濯機の仕様書通りに 8 分間行った。その後、洗濯水は排水した。洗濯した衣服は 6 分間中間脱水した。4 L の水道水で 3 分間のすすぎをし、排水した。すすぎは 2 回繰り返した。3 分間脱水

し、一晩乾燥させた。

3.1.3. 衣服中 PFRs の分析方法

衣服中の PFRs の前処理として、Miyake et al.¹⁹ のポリエステル製品中の PFRs の抽出法を参考に、衣服 (3.0 cm × 3.0 cm) を入れた試験管内に 7 mL のジクロロメタンを添加し、20 分間超音波抽出した。メンブレンフィルター (φ13 mm, 0.22 μm) を用いて濾過した抽出液を、窒素パージを用いて 100 μL まで濃縮した。この濃縮液にアセトニトリル 880 μL, 内標準物質 (TBP-*d*₂₇) 20 μL 添加し、最終液量を 1 mL とした。PFRs の濃度は、LC-MS/MS の APCI 法を使用して測定した。

3.2. 衣服を介したシリコンシートへの PFRs の移行量推定モデル

衣服を介した場合の製品中 PFRs の移行経路として、PFRs が製品から直接、衣服に移行することで衣服に蓄積し、シリコンシートに移行することを想定した。この経路での移行速度を移行試験により評価した。製品中 PFRs の衣服を介したシリコンシートへの移行を表現するために、本研究では以下のモデルを構築した。

製品から衣服への PFRs の移行は、次の式 (3.1) のように表せられる。

$$\frac{dC_c}{dt} = k_c(C_c^* - C_c) - k_s(C_s^* - C_s)\frac{A_s}{A_c} \quad (3.1)$$

ここで、 C_c は衣服中の PFRs 濃度 (ng cm⁻²)、 t は移行試験時間 (h)、 k_c は衣服の PFRs 移行速度定数 (h⁻¹)、 C_c^* は衣服中の PFRs 濃度 (ng cm⁻²)、 k_s はシリコンシートの PFRs の移行速度定数 (h⁻¹)、 C_s^* はシリコンシート中の平衡 PFRs 濃度 (ng cm⁻²)、 C_s はシリコンシート中の PFRs 濃度 (ng cm⁻²)、 A_c は衣服の面積 (cm²)、 A_s はシリコンシートの面積 (cm²) である。

また、衣服中の平衡 PFRs 濃度 (ng cm⁻²) は、次の式 (3.2) で与えられる。

$$C_c^* = K_c C_{car seat} \quad (3.2)$$

ここで、 K_c は衣服の平衡定数 (－) である。

衣服からシリコンシートへの PFRs の移行は、次の式 (3.3) のように表せる。

$$\frac{dC_s}{dt} = k_s(C_s^* - C_s) \quad (3.3)$$

また、シリコンシート中の平衡 PFRs 濃度 (ng cm⁻²) は、次の平衡式 (3.4) で与えられる。

$$C_s^* = K_s C_c \quad (3.4)$$

ここで、 K_s はシリコンシートとの平衡定数（－）である。

常微分方程式を数値的に解くことで、衣服とシリコンシート中の PFRs の濃度変化を接触時間の関数として推定することができる。常微分方程式を解くために、4 次 Runge-Kutta 法を適用した。衣服の PFRs 移行速度定数 (k_c) およびシリコンシートの PFRs の移行速度定数 (k_s)、衣服の平衡定数 (K_c)、シリコンシートの平衡定数 (K_s) は、移行試験の実験データを用いてパラメータフィッティング（誤差最小二乗法）することで得られた。

3.3. 結果と考察

3.3.1. 衣服を介した場合の自動車シート中 PFRs の移行試験の結果

製品とシリコンシートを直接接触させた場合、ポリエステル製の衣服を介した場合、綿製の衣服を介した場合の自動車シートからシリコンシートへの PFRs 移行試験の結果を図 3.1 に示す。自動車シートに含まれる全ての PFRs において、直接接触させた場合よりも衣服を介した場合の方が、シリコンシートへの移行速度は低くなり、衣服が PFRs の移行を阻害する可能性があることが示唆された。衣服の透過率を、直接接触を基準として、衣服を介したシリコンシートへの移行量により算出した。24 h における PFRs の透過率は、ポリエステル製の衣服で TCPP (54%) > TCEP (22%) > CsDPhP (17%) > TPhP (16%)、綿製の衣服で TCPP (7.5%) > TCEP (2.1%) > TPhP (0.62%) > CsDPhP (0.37%) となった。綿製の衣服よりポリエステル製の衣服を介した場合の方が、衣服の透過率は高かった。Saini et al.²⁰ は、綿製およびポリエステル製の布地 (35 × 35 cm²) を 30 日間オフィスに吊るし、室内空気中の PFRs の布地への蓄積を調査した。その結果、TCEP を除いた 7 種類の PFRs において、ポリエステル製よりも綿製の方が最大で 7 倍蓄積量は多くなった ($p < 0.05$)。本研究の結果は、この既往研究と同様の結果であった。衣服の素材の種類や厚みの違いが影響を及ぼした可能性が考えられるため、衣服の性状が及ぼす移行速度への影響はより詳細な検討が必要である。

論文投稿データにつき掲載不可

図 3.1 24 h の移行試験の結果

3.3.2. 洗濯による PFRs 除去性能の評価結果

洗濯による PFRs の除去性能を評価するため、衣服に PFRs 混合標準溶液を 10 ng および 100 ng 添加した。なお、添加量は、衣服を介した移行試験において、製品から衣服に移行した量 (2.5–95 ng) を参考にした。その後、PFRs 混合標準溶液を添加した衣服を洗濯した。洗濯による PFRs の残存率を図 3.2 に示す。10 ng 添加時における、洗濯後の PFRs 残存率は、TBOEP, TBP, TCEP, TEP, TMP, TPhPO, TPP (0%) – TCsP (22%) の範囲だった。100 ng 添加時における、洗濯後の残存率は、TEP, TMP, TPP (0%) – CsDPhP, TCsP (13%) の範囲だった。

論文投稿データにつき掲載不可

図 3.2 洗濯後の衣服における PFRs 残存率

また、洗濯後の衣服への残存率と PFRs の $\text{Log } K_{ow}$ の関係を図 3.3 に示す。 $\text{Log } K_{ow}$ が高いほど衣服への残存率が高くなった ($p < 0.05$)。Saini et al.²⁰ は化学物質が蓄積している綿製およびポリエステル製の衣服を洗濯し、洗濯水への放出率を調べた。その結果、 $\text{Log } K_{ow} < 4$ の PFRs (TBP, TCPP, TDCPP) は 80%以上, TPhP ($\text{Log } K_{ow} = 4.59$) および EHDPHP ($\text{Log } K_{ow} = 5.73$) はそれぞれ 50%, 15%除去されることが明らかとなった。 $\text{Log } K_{ow}$ が低い方が除去されることが示唆され、本研究でも同様の傾向が確認された。

論文投稿データにつき掲載不可

図 3.3 衣服への残存率と Log K_{ow} の関係

3.3.3. 経皮曝露量および衣服に移行した難燃剤量のシミュレーション結果

1 日当たりの平均自動車乗車時間を製品評価技術基盤機構の「室内暴露にかかわる生活・行動パターン情報 自動車の運転時間」より²¹, 1.3 時間とした。自動車を通勤に使用することを想定して, 0.65 時間 (往路), 8 時間の非接触時間を挟み (勤務中), さらに 0.65 時間乗車 (復路) を 30 日間繰り返す曝露シナリオを用いた。この曝露シナリオで, 30 日間衣服を着用せずに乗車するシナリオ (Scenario 1), 30 日間洗濯しない衣服を毎日着用して乗車するシナリオ (Scenario 2), 30 日間 1 回着用の度に洗濯した衣服を毎日着用して乗車するシナリオ (Scenario 3) を構築した。構築した Scenario 1, 2, 3 を図 3.4 に示す。なお, Scenario 3 において, 洗濯による除去率は PFRs 混合標準溶液を 10 ng および 100 ng 添加した結果の平均を用いた。

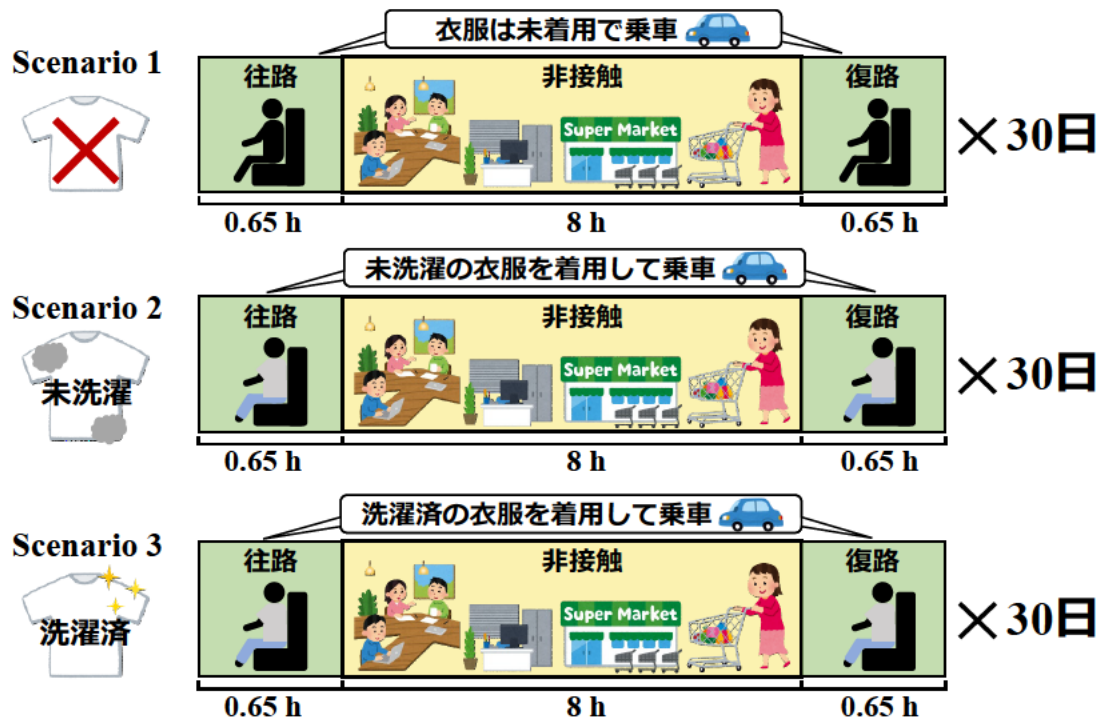


図 3.4 衣服への蓄積を考慮した曝露シナリオ

接触面積は、産業技術総合研究所の「消費者製品に含まれる化学物質の室内曝露評価に係る調査」の調査報告書に記載されている¹⁸、日本人の身体表面積から大腿部や背中などの自動車シートとの接触部分を算出した。経皮曝露量推算に用いた参考パラメータを表 3.1 に記す。

表 3.1 経皮曝露量推算に用いた参考パラメータ

1 日当たりの曝露に関する参考パラメータ	
全身表面積 ¹⁸	16,000 cm ²
自動車シートとの接触面積 ¹⁸ (身体部位別表面積の全身に対する比率 (%))	
背部 : 7.3%, 腰部 : 2.7% 臀部 : 8.2% 大腿部 (1/2) : 5.5%	3700 cm ²
1 日当たりの自動車乗車時間 ²¹	1.3 h
体重 (成人) ²²	50 kg

Scenario 1, 2, 3 におけるシミュレーション結果を図 3.5 に示す。30 日後の経皮曝露量は、Scenario 1 (4300 ng kg⁻¹) > Scenario 2 (330) > Scenario 3 (27) の順で多かった。Scenario 1 と比較して Scenario 2 では約 92%，Scenario 3 では約 99%の経皮曝露量が抑制された。そのため、衣服による透過阻害の影響を強く受けていることが示唆された。Scenario 3 では洗濯による衣服に蓄積した PFRs の約 90%の除去性能を考慮したため、Scenario 2 よりも曝露量は少なかった。また、衣服中の PFRs 量は、Scenario 2, 3 とともに、繰り返し着用の度に徐々に増加した。

論文投稿データにつき掲載不可

図 3.5 シミュレーション結果（a：Scenario 1，b：Scenario 2，c：Scenario 3）

Scenario 1 から 3 における，1 日当たりの平均曝露量と 30 日目の曝露量の比較を図 3.6 に示す。Scenario 1 および 3 における 1 日当たりの平均曝露量と 30 日目の曝露量は同等であったが，Scenario 2 においては，1 日当たりの平均曝露量よりも 30 日目の曝露量が約 1.5 倍多い値を示した。このことから，製品から移行した難燃剤は衣服に蓄積し，製品と非接触の間も衣服に蓄積した難燃剤によって曝露し続けることが懸念された。製品評価技術基盤機構の「室内暴露にかかわる生活・行動パターン情報 洗濯 （1）洗濯一般」²³に記載された，衣服の種類ごとの洗濯頻度より，インナー類や Y シャツ，ブラウスは，1 回（日）着用したら洗濯する人の割合が高いと報告されている。一方，ズボンやスカート，セーター等は数（2 から 4）回（日）着用したら洗濯する人の割合が高いと報告されている。衣服のカテゴリによる洗濯頻度の違いや衣服の繊維による難燃剤の移行速度や衣服への蓄積程度の違いが経皮曝露量に影響を及ぼすと考えられるため，様々な曝露シナリオを検討することや様々な繊維の衣服を用いた移行試験を行うことで経皮曝露量は変化する可能性があると考えられる。

論文投稿データにつき掲載不可

図 3.6 自動車シートからの PFRs 移行に及ぼす衣服の影響
(30 日間のシミュレーション結果)

4. 自動車シート中難燃剤の経皮曝露量評価のフィールドテスト

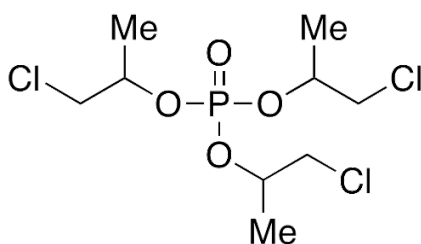
4.1. 自動車シートに含まれる難燃剤の尿中代謝物測定のための分析法検討

4.1.1. リン系難燃剤及び代謝物等の分析法検討

令和3年度に、難燃剤の尿中代謝物やその測定法について文献を用いて情報収集し、分析法を検討するという目標に対し6種類のリン系難燃剤及び4種類の難燃剤代謝物・分解物の選定、対象物質の標準試薬の入手、分析機器の条件設定を行い、良好なピーク形状が得られることの確認まで行った。令和4年度は、令和3年度に検討した分析機器の条件をベースに分析法を確立することを目標に、表4.1、図4.1の候補物質について、クロマトグラムの確認、検量線の確認、固相抽出カラムの溶出条件の検討、試料採取容器の検討を行った。

表 4.1 候補物質

対象物質	代謝物・分解物
Tris(1-chloro-2-propyl)phosphate (TCPP)	Bis-(1-chloro-2-propyl) phosphate (BCIPP)
Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP)	Bis(2-chloroethyl) phosphate (BCEP)
Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP)	Bis(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (BDCPP)
Triphenyl phosphate (TPhP)	Diphenyl phosphate (DPHP) 4-hydroxy diphenyl (4HO-DPHP)
Tricresyl phosphate (TCsP)	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid Di- <i>p</i> -tolyl phosphate
Cresyl diphenyl phosphate (CsDPhP)	—

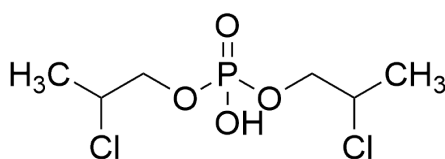
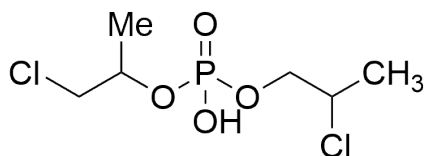
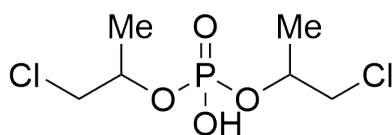


Tris(1-chloro-2-propyl)phosphate (TCPP)

CAS : 13674-84-5

$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{O}_4\text{P}$

MW : 327.57

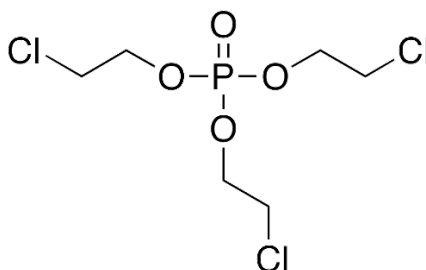


Bis-(1-chloro-2-propyl) phosphate (BCIPP)

CAS : 789440-10-4

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{O}_4\text{P}$

MW : 251.04

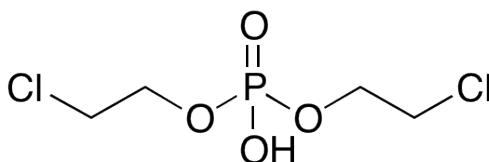


Tris (2-chloroethyl)phosphate (TCEP)

CAS : 115-96-8

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{Cl}_3\text{O}_4\text{P}$

MW : 285.48

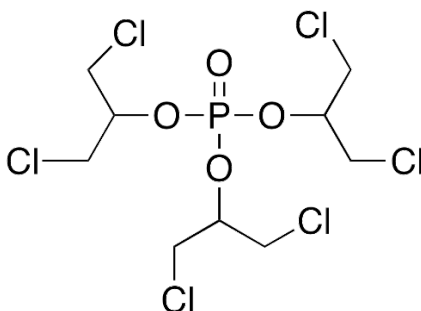


Bis(2-chloroethyl) phosphate (BCEP)

CAS : 3040-56-0

$C_4H_9Cl_2O_4P$

MW : 222.99

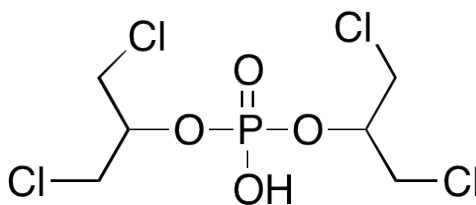


Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP)

CAS : 13674-87-8

$C_9H_{15}Cl_6O_4P$

MW : 430.89

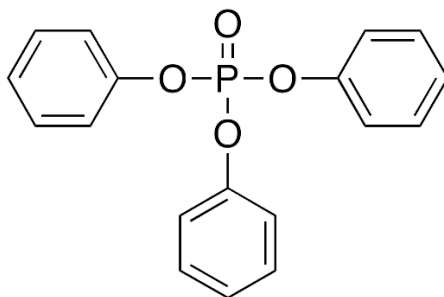


Bis(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (BDCPP)

CAS : 72236-72-7

$C_6H_{11}Cl_4O_4P$

MW : 319.93

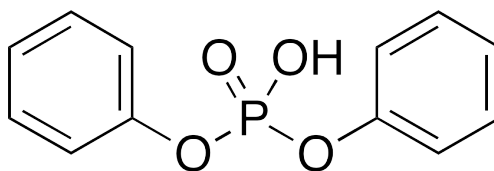


Triphenyl phosphate (TPhP)

CAS : 115-86-6

$C_{18}H_{15}O_4P$

MW : 326.28

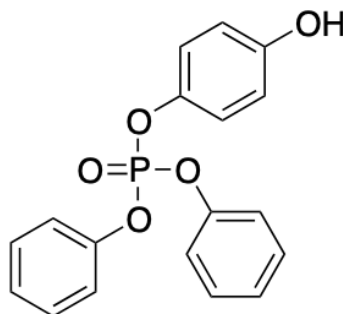


Diphenyl phosphate (DHP)

CAS : 838-85-7

$C_{12}H_{11}O_4P$

MW : 250.19

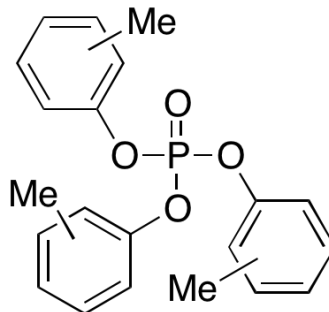


4-Hydroxyphenyl diphenyl phosphate (4HO-DHP)

CAS : 56806-74-7

$C_{18}H_{15}O_5P$

MW : 342.28

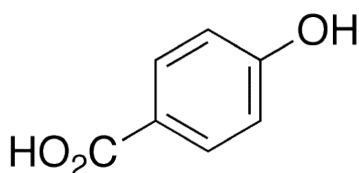


Tricresyl phosphate (TCsP)

CAS : 1330-78-5

$C_{21}H_{21}O_4P$

MW : 368.36

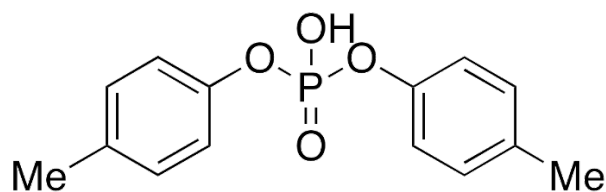


p-Hydroxybenzoic acid

CAS : 99-96-7

$C_7H_6O_3$

MW : 138.12

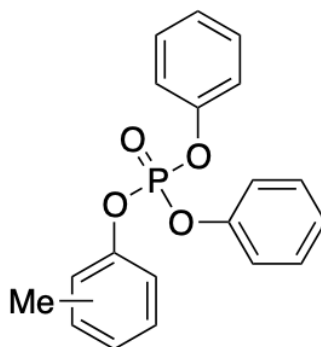


Di-*p*-tolyl phosphate

CAS : 843-24-3

$C_{14}H_{15}O_4P$

MW : 278.24



Cresyl diphenyl phosphate (CsDPhP)

CAS : 26444-49-5

$C_{19}H_{17}O_4P$

MW : 340.31

図 4.1 候補物質の構造式など

4.1.1.1. 実験方法

4.1.1.1.1. 使用器具・試薬

標準試薬のうち, TCPP, TDCPP, TPhP, *p*-Hydroxybenzoic acid は, 富士フィルム和光純薬株式会社。TCEP, BCIPP, BCEP, BDCPP, 4HO-DPHP, Di-*p*-tolyl phosphate は, Toronto research chemicals 社。TCsP, CsDPhP, DPHP は AccuStandard 社製を用いた。

本研究では, アセトン濃縮 300 (残留農薬・PCB 試験用, 純度 99.5%, 富士フィルム和光純薬株式会社), 超純水 (LC/MS 用, 富士フィルム和光純薬株式会社), ぎ酸 ((LC/MS 用, 純度約 99%, 富士フィルム和光純薬株式会社), アンモニア ((試薬特級, 純度約 99%, 富士フィルム和光純薬株式会社) メタノール (高速液体クロマトグラフィー用, 純度 99.8%, 関東化学株式会社) を用いた。また, 固相抽出の検討に Oasis HLB 3cc 60mg Vac Cartridge (Waters 社), Oasis WAX 96Well plate 30 μ m(30mg) (Waters 社), Oasis MAX 96Well plate 30 μ m(30mg) (Waters 社), Oasis WCX 96Well plate 30 μ m(30mg) (Waters 社), Oasis MCX 96Well plate 30 μ m(30mg) (Waters 社) を使用し, 容器への吸着確認には, GL-SPE 濃縮管 0.5mL & 1.0mL メス/10mL (ジーエルサイエンス株式会社), プラスチックチューブ ポリプロピレン製 (アズワン株式会社) を用いた。

4.1.1.1.2. 分析方法

今回の分析では、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて測定を実施した。表 4.2 に測定条件を示す。

表 4.2 測定条件

[LC 条件]		
LC 機種：ACQUITY UPLC I-Class Binary Solvent Manager (BSM)		
分析カラム：BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 $\times$ 50 mm（Waters 社製）		
移動相：A：超純水（0.1%ギ酸），B：メタノール		
流速：0.2 mL/min		
注入量：10 μ L		
カラム温度：40°C		
移動相・グラジエント条件：下表参照		
[グラジエント条件]		
Time (min)	LC-pump	
	%A	%B
	超純水	メタノール
	(0.1%ギ酸)	
0.0	99	1
20.0	1	99
25.0	1	99
25.1	99	1
32.0	99	1

〔MS 条件〕		
MS 機種：API-7500		
測定モード：ESI-Positive/Negative SRM		
モニターイオン：		
(Positive)		
TCPP	327.0>174.9 (定量)	327.0>250.9 (確認)
TCEP	285.0>62.9 (定量)	285.0>222.9 (確認)
TDCPP	447.9>430.8 (定量)	447.9>98.9 (確認)
TPhP	327.0>214.9 (定量)	327.0>152.0 (確認)
DPHP	251.0>77.0 (定量)	251.0>173.9 (確認)
TCsP	369.0>165.0 (定量)	369.0>90.9 (確認)
CsDPhP	341.0>152.0 (定量)	341.0>90.9 (確認)
Di-p-tolyl phosphate	279.0>91.0 (定量)	279.0>181.0 (確認)
(Negative)		
BCIPP	249.0>35.0 (定量)	249.0>62.9 (確認)
BCEP	221.0>35.0 (定量)	221.0>177.0 (確認)
BDCPP	318.9>35.0 (定量)	317.0>35.0 (確認)
DPHP	249.0>93.0 (定量)	249.0>78.9 (確認)
4HO-DPHP	341.0>249.0 (定量)	341.0>93.0 (確認)
p-hydroxybenzoic Acid	137.0>65.0 (定量)	137.0>93.0 (確認)

4.1.1.2. 結果と考察

4.1.1.2.1. クロマトグラムの確認

今回の測定で得られたクロマトグラムを図 4.2 に示す (TCPP のみ 50 ng/mL。他の項目は 10 ng/mL)。各項目で良好なピーク形状であった。

論文投稿データにつき掲載不可

図 4.2 リン系難燃剤及びその代謝物のクロマトグラム

4.1.1.2.2. 検量線の確認

今回の測定で得られた検量線を図 4.3 に示す。各項目で相関係数 0.995 以上であった。

論文投稿データにつき掲載不可

図 4.3 リン系難燃剤及びその代謝物の検量線

4.1.1.2.3. 固相抽出カラムの溶出条件の検討

試料前処理に使用する固相（HLB, MCX, WCX, MAX, WAX）について溶出条件の確認を行った。HLB はメタノール 3 mL ずつ 2 分画（1st Fr, 2nd Fr）、MCX, WAX はメタノール 2 mL（1st Fr）と 5%アンモニア含有メタノール 2 mL の 2 分画（2nd Fr, 3rd Fr）（計 3 分画）、MAX, WCX はメタノール 2 mL（1st Fr）と 2%ギ酸含有メタノール 2 mL の 2 分画（2nd Fr, 3rd Fr）（計 3 分画）で比較を行った。結果を図 4.4 に示す。TCsP 以外は、全体的に WAX で良好な回収率が得られた。

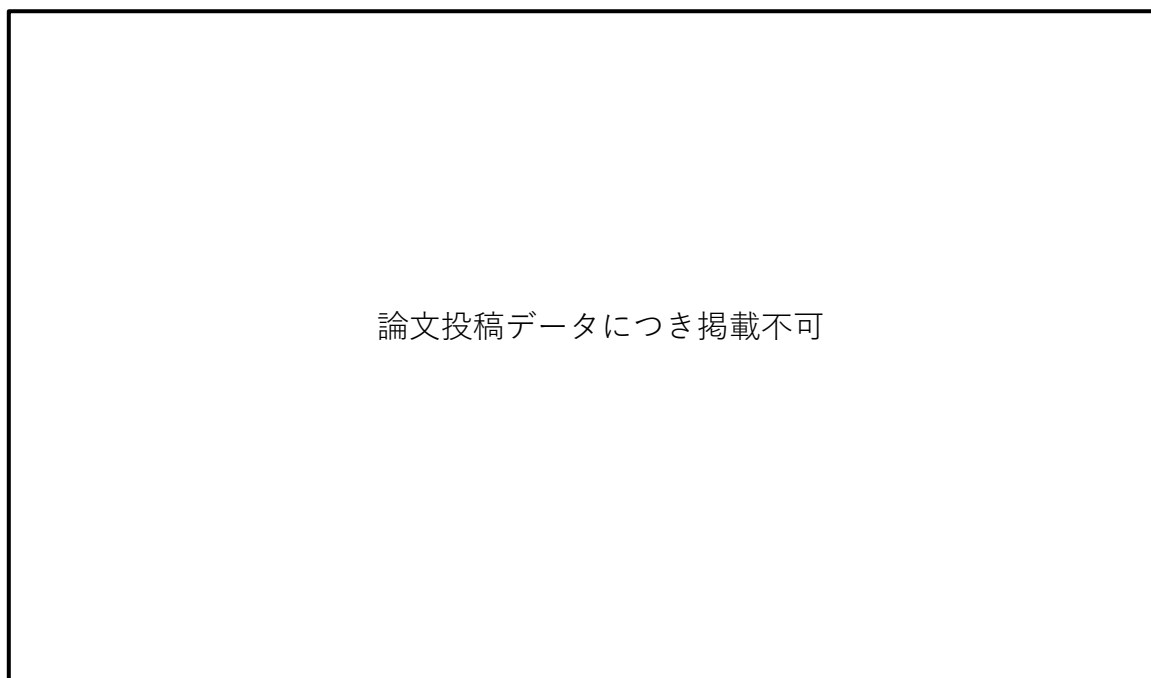


図 4.4 リン系難燃剤及びその代謝物の固相抽出

4.1.1.2.4. 試料採取容器の検討

試料採取に関して容器の選択を行う際の参考として対象物質の吸着に関してガラス容器とポリプロピレン容器について確認を行った。それぞれの容器に対象物質を 10 ng 添加し、そのまま測定容器に移し替えて測定したもの（試料液）とメタノールで洗いこんで測定したもの（洗いこみ）で回収率を図 4.5 に示す。対象物質により容器への吸着が確認されたため、メタノールなどの溶媒を用いた洗い込みが必要となることが明らかとなった。

論文投稿データにつき掲載不可

図 4.5 リン系難燃剤及びその代謝物の容器への吸着

4.1.2. 生体試料収集のための準備

曝露状況の異なる被験者サンプルを収集するためには、事前に研究倫理審査を受ける必要がある。人を対象とする生命科学・医学系研究に携わる全ての関係者に対して、「人間の尊厳及び人権保護」、「研究の適正な推進」のため遵守すべき事項が、省庁（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）や大学においてガイドラインとしてまとめられている。本研究では、静岡県立大学の「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針ガイダンス」に従い、研究計画書、説明文書、同意書、同意撤回書を作成した。また、静岡県立大学の倫理審査委員会に前述の文書及び研究倫理審査申請書を提出し、倫理審査を依頼した。事前審査及び9月に開催された本審査（審査委員会）における指摘事項を反映し、2月の迅速審査において承認が得られた。今後、研究計画書に基づき、尿試料を採取し、リン系難燃剤の代謝物濃度測定方法検討に用いる予定である。

4.2. リン系難燃剤の有害性情報及び経皮曝露による影響の情報収集

4.2.1. 化学物質の経皮曝露における動態

Quantin, et al.²⁴が皮膚を介した吸収、分布、代謝、排泄について整理している。以下に概要を記載する。

4.2.1.1. 一般的な動態

4.2.1.1.1. 吸収

吸収は化学物質が体内に入り込む最初の制限ステップである。その物理化学的特性（分子量、イオン化状態、溶解度）と曝露源に応じて、化学物質は異なる経路（主に経皮、経口、

吸入)で吸収される可能性がある。皮膚からであれ、腸壁からであれ、体質や通過する膜の厚さによって吸収のされ方が異なる。また、分子の大きさによって、吸収の重要性は変わり、小さいものほど受動的に吸収されやすくなる。膜は主に脂質でできているため、吸収を促進するためには分子の親油性も重要である。イオン化した物質は膜孔以外での吸収は弱い。体内に吸収された後、化学物質は血液系を介して臓器や組織に分配されることになる。薬理学では、物質の吸収の度合いが外用量と内用量の差に最も影響を与えるパラメータであると考えられている。

4.2.1.1.2. 分布

生体内で分布する間に、異なる器官や組織に対する化学物質の親和性は、その物理化学的性質に依存する。分布を変化させる主な要因は、生物利用可能性に影響を与える血漿タンパク質への結合である。血漿タンパク質は血液中に大量に存在し(約 60 g/L)、循環しているあらゆる化学物質と結合する可能性がある。化学物質が血流に分配されるとき、投与量の一定割合がタンパク質、主にアルブミンと結合する可能性がある。遊離型のみが組織へ拡散し、生物学的活性を持つことができる。したがって、この血漿タンパク質との結合を評価することで、曝露量が活性割合で解釈できるようになる。

4.2.1.1.3. 代謝及び排泄

体内に吸収された化学物質を排除するために、様々な代謝過程が関与する。代謝は、酵素反応による基質の生成物又は代謝物への生体内変換を意味する。このプロセスの主な機能は、排泄のステップを促進することである。最終的な目標は、物質の親油性を下げ、水溶性を高めて、主に尿、糞便、胆汁などの生理的排泄物中に排出されるようにすることである。この過程は皮膚、肺、腎臓など様々な組織に存在するが、血流量(1,500 mL/分)、質量(体重の約 2%)、酵素含量の多さから肝臓が主要な解毒臓器である。その変換過程は、肝細胞や胆管細胞において、酵素による官能基付与や基質の抱合反応によって行われる。チトクローム P450 ファミリー(CYP)の豊富なアイソザイムは、基本的な代謝酵素系を提供する。しかし、他の異なる、並行する、あるいは補完する代謝経路が重要な役割を担っている可能性がある。

4.2.1.2. 薬物代謝の種類

細胞内レベルでは、CYP ファミリーの酵素は平滑小胞体の膜に発現し、その他の酵素は細胞質内に可溶である。この区別は重要であり、細胞内分画法で酵素を分離しようとする場合には考慮しなければならない。これらの酵素が引き起こす変換過程によって、代謝は第 I 相反応と第 II 相反応に分けられる。

第 I 相代謝では、排泄される分子は、官能基がヒドロキシル (-OH)、アミン (-NH₂)、カルボキシル (-COOH) である誘導体に変換される。第 2 相代謝では、基質の新しい官能基を利用して、水溶性の高い物質を結合させ、排泄を促進させる。第 I 相反応の酵素は主に CYP アイソフォームで代表されるが、アルコールデヒドロゲナーゼ、モノオキシゲナーゼ、ペル

オキシダーゼなど他の第 I 相酵素も存在する。一方、グルタチオン S 転移酵素 (GST)、グルクロン酸転移酵素 (UGT)、硫酸転移酵素 (SULT) は、それぞれグルタチオン、グルクロン酸、硫酸誘導体のような水溶性化合物を抱合する能力を持つ第 II 相酵素であり、このような酵素の働きを利用して、水溶性化合物の排泄を促進する。代謝酵素は、1 つの酵素が様々な基質を利用し、代謝することができるため、複数の基質特異性を持っている。代謝は一般に毒性の低い分子になる。しかし、最初の分子よりも毒性の高い代謝物を生成することもある。第 0 相と第 III 相のステップには、流入と流出のトランスポーターが関与し、基質の輸送と代謝物の排泄に中心的な役割を果たす。

論文投稿データにつき掲載不可

図 4.6 生体内における化学物質の代謝

4.2.1.3. 皮膚構造の特異性

皮膚は、ほぼ全身を覆う器官で、その表面は成人で $1.5\text{--}2\text{ m}^2$ 、体重の約 15% に相当する。皮膚は、外部環境との重要な接点であり、生物にとって物理的かつ重要なバリアーを構成している。しかし、この保護壁は完全に不浸透性ではなく、程度の差こそあれ、多くの物質の通過を許容している。皮膚は、表皮、真皮、皮下組織の 3 層で構成されている。表皮の最外層は角層 (SC) と呼ばれ、皮膚への浸透の主要なバリアーと考えられている。角質層は、親水性のケラチンで満たされた無核細胞である角質細胞が、コルネオデスモソームという接合部で互いに強固に接着し、厚さ $10\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$ の何層にも重なった構造をしている。角質層の構造は、親水性タンパク質を充填した細胞を、セメントの役割をする脂質が取り囲み、細胞膜タンパク質と共有結合で結合したレンガとモルタルの壁と模式的に表現される。角質層は、局所的に適用された物質の貯蔵庫としての機能でも知られており、皮膚の水分補給に関与している。ケラチノサイトは表皮の主要な細胞であるが、他の細胞集団は感覚、免疫、光防御

に関わっている。真皮-表皮接合部は、表皮をその下の真皮から分離している。表皮を浸透した透過性のある化学物質は血管のある真皮に到達する可能性がある。また、栄養分や免疫反応に関与する細胞に対して透過性がある。

4.2.1.4. ヒト皮膚における化学物質の透過性

経皮吸収は、外部環境から皮膚を通して血流に化学物質が移行することと定義される。浸透は吸収の最初のステップであり、皮膚のある層に物質が入り込むことである。表皮を透過する能力を持つ化学物質は、全身に接続された多数の皮膚末梢血管を経由して、全身循環することが可能となる。ある化学物質が皮膚に接触すると、まず角質層と相互作用する。物質が皮膚に浸透する経路は3つある（図 4.7）。

- [1] 細胞内経路：ケラチンで満たされた親水性の角質細胞と、脂質の多い細胞間の疎水性の空間へ交互に移動する。
- [2] 細胞間経路：水相と脂質相からなる細胞間質の中で、物質が角質細胞の周りを回っている。
- [3] 毛包内経路：毛包、汗腺、皮脂腺に入り、角質細胞や細胞間質を経由する。

これら3つの経路が皮膚吸収の役割を果たしており、親油性分子と親水性分子の両方の拡散を可能にする細胞間経路が優勢（90-99%）である。

細胞間経路では、細胞の周囲を拡散し、親水性又は親油性の細胞間成分への親和性に応じて浸透することができる。これは、化学物質が吸収されるまでの時間は長いですが、より効率的な経路となる。細胞内経路は、細胞間経路の 350 μm に比べ 25 μm と短いですが、分子が親水性区画と親油性区画を通過する必要がある。同様に、体毛が覆っている総表面積は 1%未満であるため、毛包内経路は無視できる程度である。毛包内経路は、*in vitro* モデルでは一般的に存在しないため、あまり研究されていない。

論文投稿データにつき掲載不可

図 4.7 皮膚からの化学物質の吸収経路

4.2.1.5. 経皮吸収に影響する因子

経皮吸収は、様々な要因によって影響される。

化学物質性状（分子量，オクタノール/水分配係数，剤形，揮発性など）

溶媒（親水性／親油性，浸透促進効果）

曝露条件（投与量，部位，表面積，頻度，曝露期間）

個人（年齢，肌の状態，肌の潤い，閉塞（血管），肌フローラ）

上記の様々な要因を考慮することで，化学物質が皮膚膜を通過する際の挙動を予測することが可能である。以下の基準が重要である。

1. 分子量は 500 以下であることが望ましい。もちろん，他の特性がこの値を変化させる可能性があるため，厳密なカットオフ値ではない。
2. オクタノール／水分配係数を表す $\text{Log } P$ は，1～2 の範囲に収める必要がある。
3. 分子を非イオン化の状態に保つ必要がある。 $\text{p}K_a$ が重要な役割を果たす。
4. 極性又は非極性環境が，浸透性に異なる作用を及ぼす。非極性環境は浸透性を高める傾向がある。

実験的には，経皮浸透性を分類するために 2 つのパラメータが考慮される。測定した定常浸透速度 J_{ss} は $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ で表し，透過係数 K_p は cm/h で表す。両パラメーターは，分子の透過性に関する挙動を比較し，予測するのに有効である。

エンハンサーの使用により，物理的方法（イオン導入，電気穿孔法，超音波）又は化学的方法（共配合で別の物質の皮膚浸透性を高める化合物）により，皮膚浸透性が劇的に増加する可能性がある。このような方法は，脂質層の組織化，角質細胞の細胞内タンパク質との相互作用，角質層における成分の分布，親水性物質の拡散を助長する極性チャネルを形成する

角質層の水和等に影響を与える可能性がある。このエンハンサー効果は、物質の生物利用可能性を高める限りにおいて考慮されるべきものであり、リスク評価において考慮されなければならない。この効果は、皮膚バリアーを通過しにくい治療用薬物の場合には活用すべきであるが、毒性の可能性を持つ物質の場合には回避する必要がある。

4.2.1.6. 皮膚における代謝

親油性を含む特定の物理化学的特性を持つ物質は、人間の皮膚から受動的に吸収されることがある。しかし、皮膚は単なる物理的バリアーではなく、吸収された化学物質と相互作用し、体外への排泄を促進する内因性酵素活性を有している。身体規模では、皮膚の代謝は、内因性及び外来性の全分子を処理する肝代謝に比べて影響が小さい。しかし、皮膚代謝のメカニズムは、局所的又は全身的な毒性に影響を与える可能性がある。

ほとんどの肝解毒酵素は皮膚に存在し、表皮にある酵素活性によって活性化される。肝臓と皮膚の活性の比較を試みた事例もあり、第 I 相の肝臓活性の 0.1~28%、第 II 相の肝臓活性の 0.6~50%が皮膚に存在すると考えられている。

第 I 相の酵素としては、主にシトクロム P450 ファミリーの酵素に代表され、様々な基質に対して酸化・還元反応を起こすことが知られている。シトクロム P450 ファミリーの酵素をコードする遺伝子と酵素そのものを CYP と呼ぶ。皮膚に存在する CYP は、肝臓に比べ圧倒的に少なくなっている。しかし、多くの研究により、皮膚における CYP の同定、位置確認、及び活性測定が行われている。健常者及び未曝露のヒト皮膚における CYP mRNA の存在が証明されているが、酵素活性の観点からは、これらの酵素は皮膚では活性がないという説もある。一方、皮膚では、発がん物質や薬物の代謝に関与する CYP (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2E1, CYP2D6, CYP3A4/5) に相当する酵素活性が確認されている。

CYP 以外にも第 I 相酵素があり、フラビンモノオキシゲナーゼ (FMO) も分子状酸素を利用して窒素、硫黄、リン化合物を酸化する。この反応を促進するためには、NADPH も必要である。表皮や皮脂腺、毛包などの皮膚付属器には CYP と同レベルで存在し、これらの酵素は同じ基質に対して CYP と競合する可能性がある。

アルコール及びアルデヒド脱水素酵素 (ADH 及び ALDH) は、アルコール誘導体からアルデヒド、さらにカルボン酸への酸化を触媒する。CYP や FMO とは異なり、酸化剤の供給源は酸素分子ではなく、ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド (NAD) 分子である。アルコールデヒドロゲナーゼはヒトの皮膚に存在し、アルデヒド感作性誘導体の生成への関与が強く疑われている。

モノアミン酸化酵素 (MAOs) は皮膚にも存在し、肝臓のものとは異なる。MAO は、一次アミンを酸化的に脱アミノ化してアルデヒドに変換することができる。

ヒト皮膚で同定されたエステラーゼは、ある種の生体外物質のエステル機能の加水分解と、対応するアルコール及び酸への生体内変換に大きく関与している。主にシトクロム P450 ファミリーの酵素に代表され、その関連メカニズムは、様々な基質の酸化反応や還元反応に関与している。

第 II 相代謝は、第 I 相で機能化された分子を、排泄物への溶解を容易にするために親水性

基質に変換し、排泄させることを目的としている。酵素触媒のレベルでは、これらは本質的に、第Ⅰ相代謝物の親電子機能と求核性基質の間の転移酵素による共役反応である。ヒトの皮膚には幅広い第Ⅱ相酵素が発現しており、それらは肝臓のレベルと比較して第Ⅰ相よりも豊富である。

UDP グルクロン酸転移酵素 (UGT) は、分子の酸素、窒素、硫黄の機能にグルクロン酸を付加して、グルクロン酸抱合体を形成する触媒作用がある。CYP と同様に、UGT は小胞体の膜に発現している。UGT 活性は、ヒトの皮膚、表皮、さらには角質層でもよく観察される。

硫酸転移酵素は、第Ⅰ相であらかじめ活性化された基質に対する硫酸基の抱合反応機構に関与しており、内因性ステロイドや外来生物の硫酸抱合反応が皮膚で行われることがある。一般に、Phase II は生体外物質を不活性化する機構と考えられているが、硫酸転移酵素も物質を変換し活性化することができることが示されている。ミノキシジルは、ヒトの皮膚で硫酸転移酵素により活性代謝物である硫酸ミノキシジルに活性化される。

N-アセチルトランスフェラーゼは皮膚に存在し、その活性は芳香族アミンのような特定の異生物に選択的である。この経路は *p*-アミノ安息香酸の解毒機構を表している。

最後に、グルタチオン・トランスフェラーゼ (GST) は、ヒトの皮膚で機能している。GST は、還元型グルタチオンを求核性の高い親電子性代謝物に転移させる。GST のアイソフォーム π は、他のフォーム (α , μ , θ , α) が主に見られる肝臓とは異なり、皮膚に最も多く存在するものである。

4.2.1.7. 皮膚代謝の重要性

一般に、第Ⅰ相代謝は、第Ⅱ相代謝が抱合によって代謝物の反応性を低下させるとき、反応性で毒性の可能性のある誘導体の形成と関連している。生理活性化という用語は、親物質よりも反応性が高く、場合によっては毒性を持つ形態を生成する代謝ステップの結果を表すために用いられる。皮膚の代謝は、病理学的事象の発生に寄与することが認識されている (図 4.8)。これは主に、アレルギー性接触皮膚炎の第一段階である感作反応を引き起こす、皮膚に吸収されやすい小分子の活性化に関するものである。遺伝毒性や発がん性などの他の毒性も、皮膚の代謝物によって引き起こされる可能性があるが、感作性に関連する問題ほど一般的ではない。

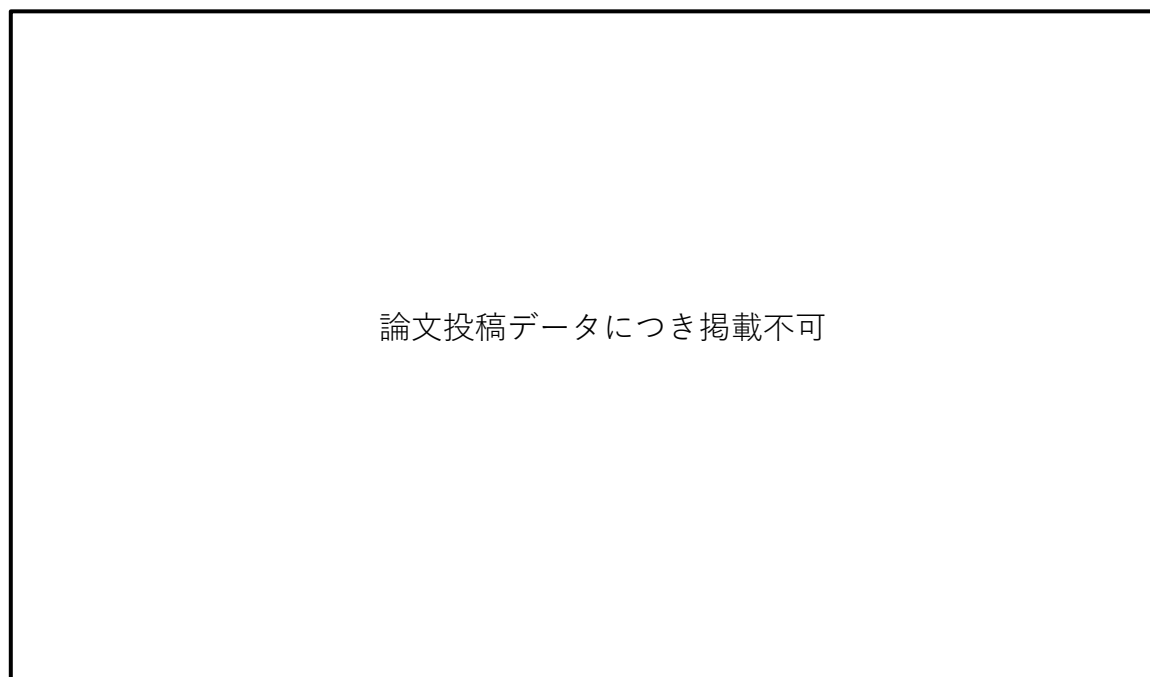
皮膚感作は、アレルギー性接触皮膚炎の最初のステップである。そのメカニズムは、抗原性を有する低分子量物質であるハプテンが表皮に到達し、皮膚タンパク質と結合して免疫原性複合体を形成する能力に依存している。この結合は、リジンやシステインのような親電子性と求核性の構造 (硫黄と窒素に富むアミノ酸) の間で起こる。皮膚代謝の役割は、適切な官能基がないために皮膚タンパク質と結合できないプロハプテンを、結合可能なハプテンに活性化することができるため、ここで最も重要である。免疫原性複合体の形成後、一連の反応により抗原特異的 T 細胞の増殖が起こる。そして、2 回目の抗原への曝露により、病態の第 2 段階である炎症反応が起こる。

上記のハプテン活性化を可能にする生体内変換メカニズムは、科学界で広く受け入れられ

ている仮説のようである。香水に含まれる芳香族化合物のようなオイゲノールとその誘導体は、プロハプテンのモデルを構成し、CYP の基質として同定されている。ゲラニオールや桂皮アルコールのような他のアルコール性不飽和誘導体は、対応するアルデヒドに酸化され、皮膚タンパク質と免疫原性の複合体を形成することができる。吸収された物質の代謝動態を知ることの重要性は、メカニズムを活性化し、毒性のある炎症反応を引き起こす可能性のある反応性挙動を予測するために理にかなっている。

多環芳香族炭化水素 (PAHs) は環境中に存在し、懸念が高まっている。PAHs は薬物代謝酵素によって活性化された後、発がん性を獲得する。ベンゾ[a]ピレン (B[a]P) の代謝経路はよく知られており、CYP の作用を示す良い例となっている。

CYP 1A1 と CYP 1B1 の両方が活性化されると、エポキシド中間体が生成され、第二段階でエポキシドヒドロラーゼにより、より活性が高く、DNA との相互作用に関与するジオールエポキシドに変換されて、遺伝毒性作用が発現することになる。この例は、7, 12-ジメチルベンゾ[a]アントラセンなど、他の多くの PAH 構造にも当てはまることが実証されている。



論文投稿データにつき掲載不可

図 4.8 物質代謝による活性化と解毒のバランス

4.2.2. 皮膚代謝に関与する酵素

Pyo and Maibach²⁵ が皮膚酵素について整理している。以下に概要を記載する。

4.2.2.1. アルコール脱水素酵素

ヒトでは、アルコール脱水素酵素 (ADH) ファミリーの 5 つの酵素クラスが知られている。ADH1 (サブユニット α , β , γ), ADH2, ADH3, ADH4, ADH5 である。ADH ファミリーの最も代表的なものは ADH1 であり、一級及び二級脂肪族アルコールをアルデヒドに酸

化する酵素である（図 4.9）。

この生体内変換の主な目的は、浸透した異物の無毒化である。例えば、エタノールは肝臓の ADH1 によってアセトアルデヒドに無毒化される。しかし、逆にメタノールが同じ酵素で代謝され、毒性のあるホルムアルデヒドになることもある。したがって、この 2 つの現象は、薬物投与後にも現れる可能性がある。生体内変換は、薬物を不活性にしたり、より強力にしたり、あるいは毒物にしたりすることがある。この事実は、薬物に対する皮膚酵素活性の調査を重要なものになっている。

ADH は、ヒトのケラチノサイトと毛根細胞の両方で発見された。ヒト皮膚における各種アルコールに対する ADH 活性を、*in vitro* では摘出ヒト皮膚を用いた酵素アッセイで、*in vivo* では臨床的に正常な 12 人の被験者を用いた急性パッチテストで比較されている。酵素活性は、*in vitro* では生成された NADH の量（図 4.9）で、*in vivo* では紅斑の発生量で表された。

ADH の活性は、異なるアルコールに対して変化した。生体内変換速度は炭素鎖の長さが長くなるにつれて明らかに増加した。例えば、ペンタノール（C5）はエタノール（C2）よりも ADH1 によって 3 倍も触媒された。また、枝分かれの程度が大きくなると、生変換率は低下することがわかった。したがって、アルコールの生体内変換率は、炭素鎖の長さや分岐の程度に依存し、炭素鎖の長さが長くなり、分岐の程度が小さくなると、代謝的な生体内変換率が高くなることがわかった。

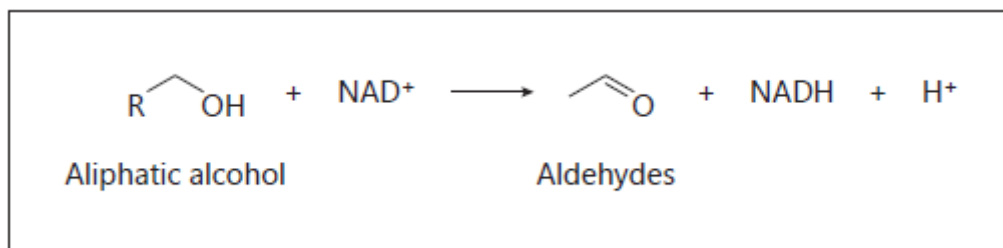


図 4.9 アルコール脱水素酵素が触媒となる脂肪族アルコールのアルデヒドへの酸化反応

4.2.2.2. フラビン依存性モノオキシゲナーゼ

フラビン依存性モノオキシゲナーゼ（FMO）は、酸化のための主要な酵素クラスである。ヒトの皮膚では、CYP ファミリーよりも高い転写レベルを持つ。両者の主な違いは酸化の進め方であり、CYP は酸素を含むヘム補欠基を用いるのに対し、FMO はフラビンアデニンジヌクレオチドを用いて基質の酸化を行う。FMO は主に、アミン、スルフィド、リンなどの求核性ヘテロ原子含有化合物を生合成する（図 4.10, 4.11）。

ヒトの体内には、5 つのアイソフォームが存在する。この 5 つのアイソフォームのうち、どのアイソフォームが皮膚で発現しているかは、議論のあるところである。これまでのところ、ヒトの皮膚では、FMO3 の存在が決定的であると証明されている。

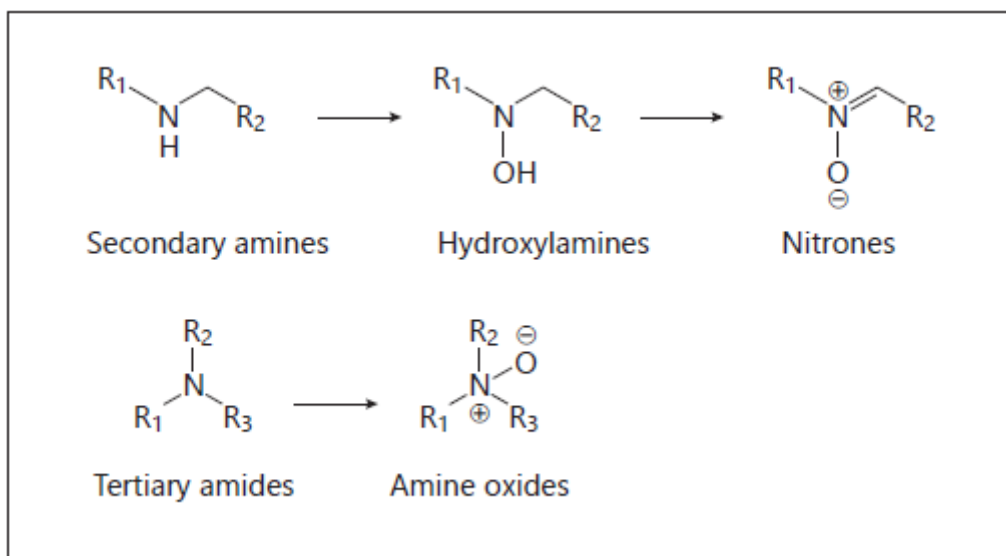


図 4.10 フラビン依存性モノオキシゲナーゼによって触媒される 3 級及び 2 級アミンの N-酸化

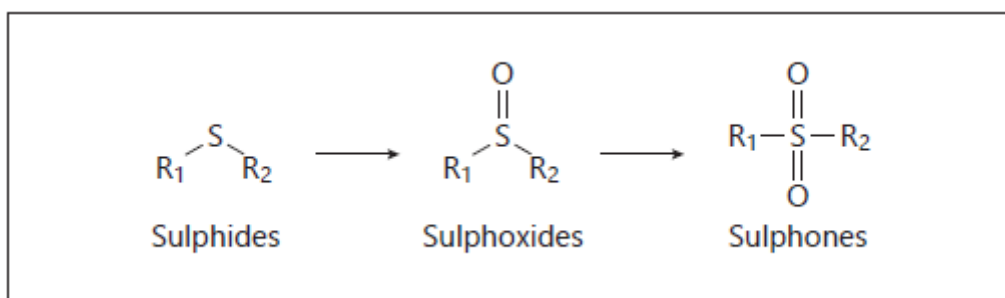


図 4.11 フラビン依存性モノオキシゲナーゼによって触媒されるスルフィドのスルホンへの S-酸化

4.2.2.3. アルデヒド脱水素酵素

アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) は、アルデヒドをカルボン酸に変換する (図 4.12)。ALDH は、人体全体で 12 種類のクラスが見つかっている。摘出したヒトの皮膚では、ALDH1 と ALDH3 のみがウェスタンブロット分析及び免疫組織化学的に検出された。ALDH1 はアルドホスファミドに高い親和性を持ち、過酸化物質アルデヒドの解毒に重要な役割を果たす。一方、ALDH3 は芳香族アルデヒドや中鎖脂肪酸アルデヒド (脂肪酸アルデヒド) を優先的に酸化する。肝臓での ALDH の活性に比べ、皮膚での活性は 22 倍も低いことが報告されている。また、性別や部位によって ALDH 活性に差があることも報告されているが、これらの事実の他に、皮膚における ALDH に関する知見はほとんどない。

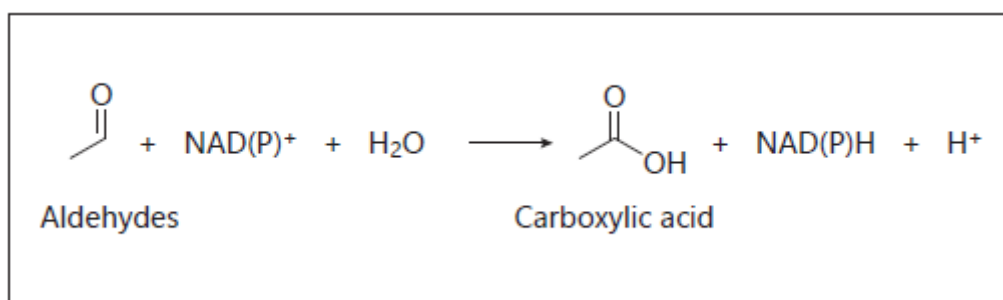


図 4.12 アルデヒド脱水素酵素が触媒となるアルデヒドのカルボン酸への酸化

4.2.2.4. カルボキシエステラーゼ

カルボキシエステラーゼ (CE) は、アルコールと酸性残基への水の分子内付加によってカルボン酸エステルを加水分解する (カルボン酸エステル + H₂O ⇌ アルコール + カルボン酸)。アルコールはさらに酸化されてアルデヒドとなり、カルボキシレートは第 II 相代謝で抱合体化される。CE ファミリーは 5 つのクラスに分類される。ヒトの肝臓では、CE1 と CE2 のアイソザイムが見つかっているが、ヒト皮膚では、今のところ CE2 アイソザイムの存在のみがヒトケラチノサイトで確認されている。シトクロム P450 (CYP) 酵素の他に、CE 酵素ファミリーは、より詳細に研究されている皮膚酵素の 1 つである。これは、皮膚に適用される薬物の生体内変換や異物代謝に、このファミリーが重要であることを反映している。CE 活性は、フルオレセイン二酢酸をモデル基質として、ヒトケラチノサイトのホモジネートで評価され、3.7 nmol/min/mg protein の加水分解活性が測定された。代わりに酢酸 *p*-ニトロフェニルをモデル基質として使用すると、はるかに高い加水分解活性が測定された。ヒト皮膚細胞質画分では、45 nmol/min/mg protein が加水分解され、12 倍の加水分解活性があることになる。

皮膚ドナーの乳房初代ケラチノサイトを用いて、加水分解活性の物質による違いが確認されている。モデル薬剤である 4-メチルウンベリフェロンヘプタン酸の生体内変換は、10~32 nmol/min/mg protein と明瞭に変化した。したがって、CE の発現は高度に多型的であった。代わりに 4-メチルウンベリフェロン-1 酢酸を用いると、0.5 nmol/min/mg protein とはるかに弱い加水分解速度が測定された。この 2 つの分子の唯一の違いは、その鎖の長さ (C2 と C7) である。ADH と同様に、炭素鎖長の長い分子がより高い速度で代謝された (図 4.13)。

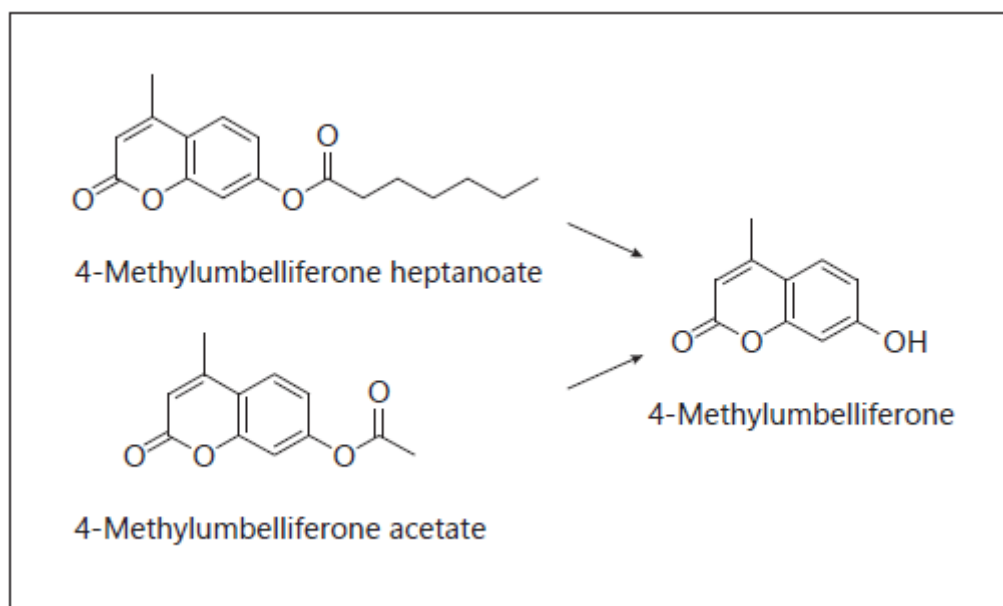


図 4.13 カルボキシエステラーゼによる 4-メチルウンベリフェロンヘプタン酸及び 4-メチルウンベリフェロン酢酸のエステル加水分解反応

4.2.2.5. シトクロム P450

CYP は、皮膚に存在する代謝酵素の中で最も大きなグループである。CYP は、酸素分子の酸素原子 1 個を浸透性の基質に転移させ、アルコールと水を生成する触媒作用がある (図 4.14)。CYP の発現は多形であると考えられている。その活性は、年齢、性別、適用部位により顕著な個人差がある。どの CYP 酵素がヒトの皮膚に存在するかはまだ解明されておらず、矛盾するデータも報告されている。これまでに CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP1A1/2, CYP2C9, CYP1B1, CYP2A6 の報告事例がある。

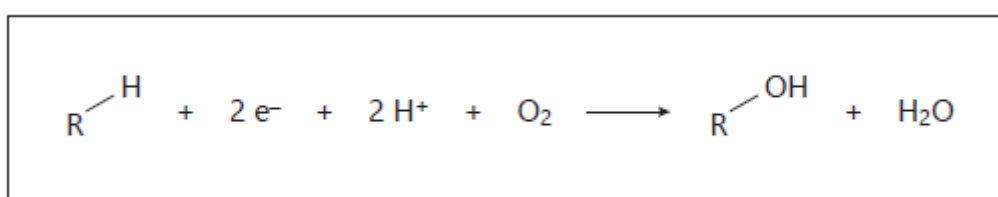


図 4.14 シトクロム P450 による酸素原子の移動に伴うアルコール及び水の生成

4.2.3. リン系難燃剤の皮膚代謝事例等

4.2.3.1. ヒト皮膚亜細胞画分を用いた代謝

Abdallah, et al.²⁶ が、in vitro のヒト皮膚 S9 画分を用いて 2,3,4,5-テトラブロモ安息香酸 2-エチルヘキシル (EH-TBB), テトラブロモフタル酸 2-エチルヘキシル (BEH-TEBP) 及びリン酸トリフェニル (TPhP) の経皮的生体内変換を調査した結果を報告している。

ヒト皮膚 S9 画分 (HS-S9) は形成手術後の 3 人の白人女性ドナー (年齢範囲 33-46 歳) の腹部皮膚から調製したプール試料で構成されており、Biopredic International 社 Saint Gre'goire,

France)から入手している。

4.2.3.1.1. 実験方法

4.2.3.1.1.1. *in vitro* 代謝処理

0.11 mg の HS-S9, William の E 培地及び 10 mL の EH-TBB 又は FM550 溶液 (EH-TBB の最終濃度 10 mM, FM550 は難燃剤 Firemaster 550 を模したもので, EH-TBB, BEH-TEBP, TPhP を 53 : 20.5 : 26.5 の比率で混合したもの) を 37 °C で 5 分間前培養し, NADPH 再生系 (最終濃度 : 2.0 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸, 10.0 mM グルコース-6-リン酸, 2 units/mL グルコース-6-リン酸脱水素酵素) を加えて最終容量を 1 mL にしている。その後, 37 °C, 5% CO₂ 及び相対湿度 98% の条件下で 60 分間培養し, 氷冷した酢酸エチル 1 mL を加えて反応を停止させている。

4.2.3.1.1.2. 分析前処理

代謝処理した EH-TBB サンプルには ¹³C- EH-TBB 及び ¹³C-TBBA をそれぞれ 20 ng 添加し, FM550 サンプルには内部標準物質として ¹³C-EH-TBB, ¹³C-TBBA, ¹³C-BEH-TEBP 及び TPhP-*d*₁₅ をそれぞれ 20 ng 添加している。スパイクした試料を 3 mL の酢酸エチルと 60 秒間混合し, その後超音波で 5 分間処理した後, 4,000 g で 5 分間遠心分離し, 有機層を回収する抽出操作を 2 回繰り返している。抽出物を窒素気流下で蒸発乾固し, QA/QC 目的の回収率測定 (シリンジ) 標準として ¹³C- α -HBCDD 20 ng を含む 100 mL のメタノールに再沈殿させている。

4.2.3.1.1.3. 機器分析

試料は, HPG-3400RS デュアルポンプ, TCC-3000 カラムオーブン, WPS-3000 オートサンプラーからなる Dionex Ultimate 3000 液体クロマトグラフと Q-Exactive Plus Orbitrap 質量分析計からなる UPLC-Orbitrap-HRMS プラットフォーム (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) で分析している。各サンプルについて, エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 及び大気圧化学イオン化 (APCI) の両モードによる Orbitrap-MS データを取得している。EH-TBB, ¹³C-EH-TBB, BEH-TEBP, ¹³C-BEH-TEBP の定量及び代謝物のスクリーニングには, ネガティブ APCI が使用されている。より汎用性の高いソフト ESI モードは, ポジティブ(+)/ネガティブ(-)切り替えモードで, 生成された代謝物のスクリーニングと同定, 及び TPhP, TPhP-*d*₁₅ の同定に使用された。

4.2.3.1.2. 実験結果

EH-TBB 試料では, (-)ESI モードでイオン質量 436.66,814 でイオン式 [C₇HBr₄O₂]⁻ の代謝物の可能性が発見され, 標準品との比較から, これが TBBA の [M-H]⁻ 分子イオンであることが確認された (図 4.15)。これは, ヒト及びラット肝ミクロソームによる EH-TBB の唯一の *in vitro* 代謝物として TBBA を報告した Roberts らの結果とも一致する。

FM550 混合試料でも, TBBA が EH-TBB の単独代謝物として同定されている。さらに,

(-)ESI モードで 249.03204 のイオン質量を持つ別の潜在的な代謝物が検出された。このイオンの化学構造は $[C_{12}H_{10}O_4P]$ であることが示唆されている。この化合物の化学構造を解明するために、(-)ESI-SIM-MS2 モードで MS/MS 実験を実施した。低、中、高の衝突エネルギーを段階的に組み合わせて適用し、多様なフラグメンテーションイオンを得た。 $m/z = 249.03204$ のイオンは、主に 3 つのイオンにフラグメンテーションされた。154.98,895, 93.03284, 78.95,728 の 3 つのイオンに分解されたこれらのフラグメントの化学式として $[C_6H_4O_4P]$, $[C_6H_5O]$, $[PO_3]$ が提案されている (図 4.16)。親イオン式と MS2 フラグメンテーションデータから、この代謝物はリン酸ジフェニル (DPhP) と同定され、TPhP の一次代謝物であると判断されている。

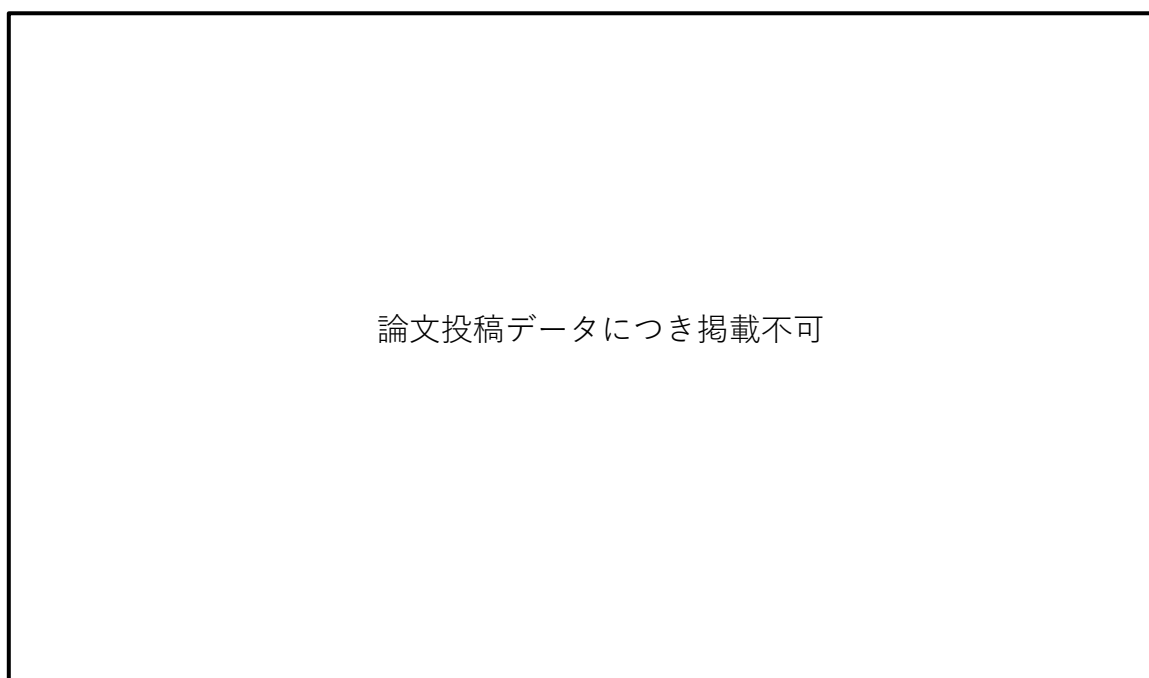


図 4.15 10 mM の EH-TBB に暴露したヒト皮膚 S9 画分 (HS-S9) において EH-TBB の唯一の代謝物として検出された TBBA

※ ^{13}C -TBBA は、TBBA の同位体識別と定量に使用される同位体標識体。

論文投稿データにつき掲載不可

図 4.16 UPLC-Orbitrap HRMS によるイオン 249.03204 の(-)ESI-MS/MS2 スペクトル

皮膚 HS-S9 画分の代謝活性をプロテオームでプロファイリングすると、肝細胞に比べてはるかに低いレベルではあるが、CYP450 とカルボキシルエステラーゼの両方が活性であることが確認されている。また、ヒト皮膚における CYP450 酵素の報告レベルは、ヒト肝臓よりも少なくとも 300 倍低いことが報告されている。一方、ヒト皮膚と肝臓のカルボキシルエステラーゼ 1 (CES1) の相対レベルは 0.62 で、有意な差はなかった ($p=0.21$)。皮膚では CYP450 酵素のレベルが低く、CES1 のレベルが肝臓と同程度であることが、酸化的代謝物が観察されなかった理由と考察されている。

さらに、この仮説を検証するため、EH-TBB, FM550 と HS-S9 を同じ条件下で NADPH 非依存的に（すなわち NADPH 補酵素なしで）*in vitro* 培養している。NADPH 非存在下では、TBBA, DPhP の生成率及び親化合物の減少率に有意な変化 ($p > 0.05$) がないことから、ヒト皮膚における主要な代謝酵素がカルボキシルエステラーゼであり、肝臓での代謝とは異なると結論付けている。

4.2.3.1.3. 本事例を踏まえた尿中代謝物測定結果の解釈における留意点

経口摂取された化学物質は消化管から吸収され、全身に循環する前に肝臓を通過するため、CYP450 をはじめとする酵素により代謝を受ける。しかし、経皮吸収された化学物質は、皮膚において代謝を受けた後、毛細血管に吸収され、全身を循環することになる。最終的には肝臓で代謝を受けるため、経口、吸入、経皮曝露による代謝物の違いはみられなくなる可能性が高いが、体内で曝露される化学物質の種類は、経皮曝露とそれ以外で異なる可能性がある。

本研究では、非侵襲的な試料の採取が可能であることから、尿中代謝物の測定を検討してい

る。既知見のように、尿中代謝物の測定により、リン系難燃剤にどの程度曝露を受けているのか把握することはできるが、代謝物のプロファイルだけからでは曝露経路の推測は困難であると考えられる。経皮曝露量の推算を行うシミュレーションモデルと組み合わせることにより、精緻なリスク評価につながっていくと考えられる。

4.2.3.2. 皮膚からの試料採取及び代謝物分析法

Elpa, et al.²⁷が皮膚から分析試料を採取する方法及び代謝物の分析方法について整理している。

4.2.3.2.1. 皮膚からの試料採取法

ここ数年、皮膚代謝物分析のために、低侵襲から非侵襲の *in vivo* 及び *in situ*¹ サンプルング技術が考案されてきている (図 4.17)。様々な皮膚サンプルング技術が開発され、侵襲的な皮膚サンプルングのいくつかの障害に対処する特徴を備えている。皮膚組織を採取する従来技術とは異なり、皮膚排泄物 (汗、皮脂、皮膚から発散する揮発性化合物) や角質層から非侵襲的に検体を採取することが可能である。標準的な発汗サンプルングの方法は、ピロカルピンとイオン導入による発汗誘発と、それに続く「Macroduct」によるサンプルング (図 4.17 A vi) である。場合によっては、発汗は、身体運動や環境温度制御によって刺激される。これらの発汗を促す方法は、サンプルングされた汗の組成に影響を与える可能性がある。汗や皮脂 (皮膚から発散する揮発性化合物を含む) は、溶媒 (又は緩衝剤) を用いて皮膚表面を洗浄する方法 (図 4.17 A viii) や、様々な吸着材 (例: ポリジメチルシロキサン、ハイドロゲル、濾紙、綿パッド、又はポリマー濾過膜) を用いたパッチタイプのデザイン (図 4.17 A ix, xi, xii) で、皮膚と直接接触する、又は皮膚と直接接触せずに固体支持体に埋め込まれる (図 4.17 A x)。例えば、最近導入されたハイドロゲルのマイクロパッチサンプルング (図 4.17 A xii) は、MS 分析のために微量の皮膚排泄物を迅速に収集することを可能にする。ポリテトラフルオロエチレン製プレート内の空洞にハイドロゲル (アガロース) マイクロパッチを作製する。試料を採取し、化学実験室に移動した後、市販の質量分析計の開口部に設置されたサンプルインターフェースにプローブを設置する。ハイドロゲルマイクロパッチに含まれる皮膚代謝物は、流れてくるイオン化溶媒によって再抽出される。抽出液は瞬時に質量分析計のイオン源に移動し、イオン信号が記録される。記録されたマスペクトルは、正規化などの計算処理が施される。

皮膚の代謝物を採取できる低侵襲な技術もいくつか報告されている。例えば、ハイドロゲルマイクロニードルパッチは、皮膚の間質液を採取する低侵襲な技術として提案され (図 4.17 A ix)。また、テープストリッピング法 (図 3-3-3A vii) は、粘着テープを皮膚表面に貼り付け、何度も剥がすことで角質層を採取する低侵襲な手法である。

4.2.3.2.2. 代謝物の分析法

¹ 「その場で」という意味。この場合、代謝物を血液や尿の採取ではなく、皮膚代謝が行われている場所である皮膚から直接採取する手法を表している。

代謝物分析の前に、多くの場合、サンプルのクリーンアップ、抽出、分析物の前濃縮などのプロトコルを含むサンプル調製を実行する必要がある。

現在、メタボロミクスにおける主要な検出プラットフォームは、核磁気共鳴 (NMR) 分光法と質量分析 (MS)、特にクロマトグラフィー分離後に MS を用いる技術である (図 4.17 B)。NMR は最小限のサンプル調製で済むため、メタボロームフィンガープリンティングに適した方法である。しかし、NMR の感度は MS ベースのプラットフォームよりも低い。そのため、包括的かつ高感度な代謝物の同定及び定量には、「-MS」技術 (すなわち、ガスクロマトグラフ-MS (GC-MS) 及び液体クロマトグラフ-MS (LC-MS)) が使用される。多様な代謝物が含まれるため、1 つの分析プラットフォームで皮膚メタボロームを完全にカバーすることはできない。そのため、複数の分析プラットフォームが同時に使用されることもある (例 : GC-MS と LC-MS, NMR と LC-MS)。

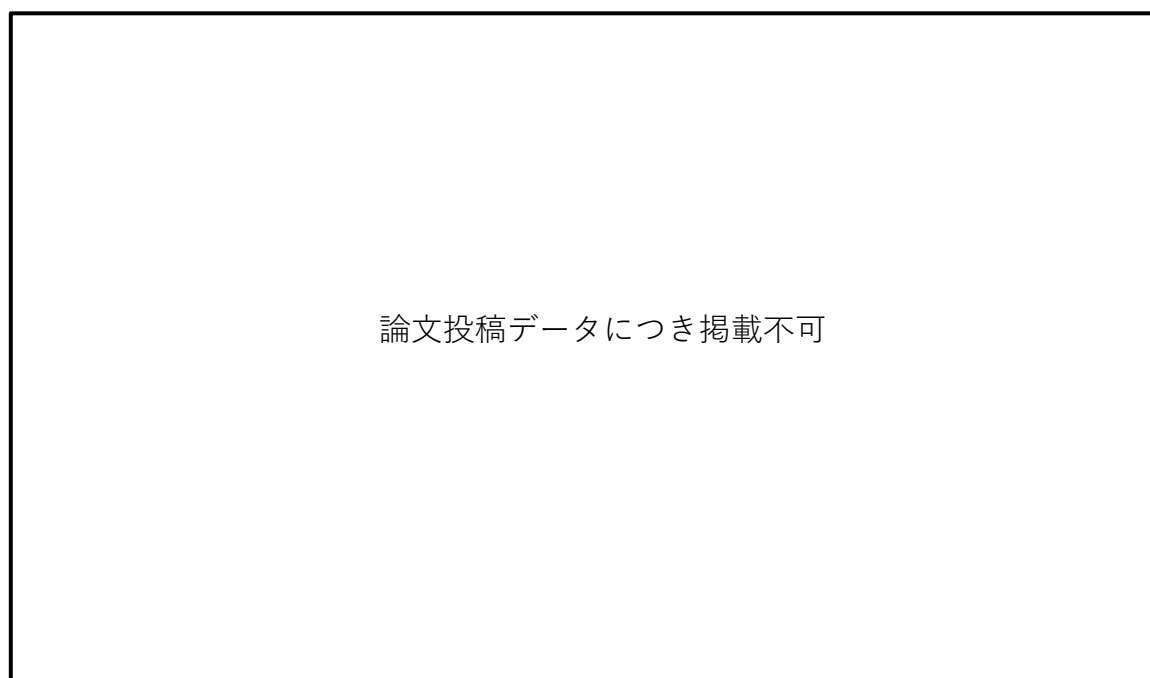


図 4.17 代表的な皮膚試料採取法 (A) 及び代謝物分析法 (B)

4.3. まとめ

難燃剤の包括的なリスク評価スキームの構築に資するため、「自動車シートに含まれる難燃剤の尿中代謝物測定のための分析法検討」及び「リン系難燃剤の有害性情報及び経皮曝露による影響の情報収集」を実施した。

リン系難燃剤の中には、発がん性、遺伝毒性、生殖毒性が確認されたものも含まれており、低用量の曝露であっても人の健康リスクの懸念が生じる可能性がある。また、化審法に基づく優先評価化学物質のリスク評価においては、原則として経口経路及び吸入経路を想定しており、経皮経路の曝露は想定していないが、欧米では消費者製品を通じた曝露、経皮経路の曝露についてもリスク評価において考慮されている。

今後、国内において、経皮曝露を考慮したリスク評価の導入を検討するうえでも、その寄与を正確に把握することが必要であり、経皮曝露も含んだ包括的なリスク評価スキームを構築するための研究が重要であると考えられる。

本業務において、精緻な曝露評価手法開発をサポートする、バイオモニタリング（尿中のリン系難燃剤及びその代謝物の測定）のための分析条件の検討、リスク評価に重要と考えられる経皮曝露特有の動態に関する情報の収集を行った。今後、実際の生体試料を用いた代謝物の測定（フィールドテスト）を行い、包括的なリスク評価スキーム構築に向けて、調査、検討を続ける必要があると考えられる。

参考文献

1. Hou, M.; Shi, Y.; Na, G.; Cai, Y., A review of organophosphate esters in indoor dust, air, hand wipes and silicone wristbands: Implications for human exposure. *Environment International* **2021**, *146*, 106261.
2. Fan, Y.; Chen, Q.; Wang, Z.; Zhang, X.; Zhao, J.; Huang, X.; Wei, P.; Hu, P.; Cao, Z., Identifying dermal exposure as the dominant pathway of children's exposure to flame retardants in kindergartens. *The Science of the total environment* **2021**, 152004.
3. Sun, Y.; Liu, L.-Y.; Sverko, E.; Li, Y.-F.; Li, H.-L.; Huo, C.-Y.; Ma, W.-L.; Song, W.-w.; Zhang, Z.-F., Organophosphate flame retardants in college dormitory dust of northern Chinese cities: Occurrence, human exposure and risk assessment. *Science of The Total Environment* **2019**.
4. Tan, H.; Chen, D.; Peng, C.; Liu, X.; Wu, Y.; Li, X.; Du, R.; Wang, B.; GUO, Y.; Zeng, E. Y., Novel and Traditional Organophosphate Esters in House Dust from South China: Association with Hand Wipes and Exposure Estimation. *Environmental Science & Technology* **2018**.
5. Phillips, A. L.; Hammel, S. C.; Hoffman, K.; Lorenzo, A. M.; Chen, A.; Webster, T. F.; Stapleton, H. M., Children's residential exposure to organophosphate ester flame retardants and plasticizers: Investigating exposure pathways in the TESIE study. *Environment International* **2018**, *116*, 176-185.
6. Nguyen, L. V.; Diamond, M. L.; Kalenge, S.; Kirkham, T. L.; Holness, D. L.; Arrandale, V. H., Occupational Exposure of Canadian Nail Salon Workers to Plasticizers Including Phthalates and Organophosphate Esters. *Environmental Science & Technology* **2022**.
7. Schreder, E. D.; Uding, N.; La Guardia, M. J., Inhalation a significant exposure route for chlorinated organophosphate flame retardants. *Chemosphere* **2016**, *150*, 499-504.
8. Tang, J.; Lin, M.; Ma, S.; Yang, Y.; Li, G.; Yu, Y.; Fan, R.; An, T., Identifying Dermal Uptake as a Significant Pathway for Human Exposure to Typical Semivolatile Organic Compounds in an E-Waste Dismantling Site: The Relationship of Contaminant Levels in Handwipes and Urine Metabolites. *Environmental Science & Technology* **2021**.
9. Gbadamosi, M. R.; Abdallah, M. A.-E.; Harrad, S., A critical review of human exposure to organophosphate esters with a focus on dietary intake. *Science of The Total Environment* **2021**, *771*, 144752.
10. Mendelsohn, E.; Hagopian, A.; Hoffman, K.; Butt, C. M.; Lorenzo, A.; Congleton, J.; Webster, T. F.; Stapleton, H. M., Nail polish as a source of exposure to triphenyl phosphate. *Environment International* **2016**, *86*, 45-51.
11. Weschler, C. J.; Nazaroff, W. W., SVOC exposure indoors: fresh look at dermal pathways. *Indoor Air* **2012**, *22*, (5), 356-77.
12. Abou-Elwafa Abdallah, M.; Pawar, G.; Harrad, S., Human dermal absorption of chlorinated organophosphate flame retardants; implications for human exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2016**, *291*, 28-37.
13. Wu, Y.; Miller, G. Z.; Gearhart, J.; Romanak, K.; Lopez-Avila, V.; Venier, M., Children's Car Seats

- Contain Legacy and Novel Flame Retardants. *Environmental Science & Technology Letters* **2018**, 6, (1), 14-20.
14. Liu, X.; Cao, Z.; Yu, G.; Wu, M.; Li, X.; Zhang, Y.; Wang, B.; Huang, J., Estimation of Exposure to Organic Flame Retardants via Hand Wipe, Surface Wipe, and Dust: Comparability of Different Assessment Strategies. *Environmental Science & Technology* **2018**, 52, (17), 9946-9953.
 15. Tay, J. H.; Sellström, U.; Papadopoulou, E.; Padilla-Sánchez, J. A.; Haug, L. S.; de Wit, C. A., Assessment of dermal exposure to halogenated flame retardants: Comparison using direct measurements from hand wipes with an indirect estimation from settled dust concentrations. *Environment International* **2018**, 115, 285-294.
 16. Abdallah, M. A.-E.; Harrad, S., Dermal contact with furniture fabrics is a significant pathway of human exposure to brominated flame retardants. *Environment International* **2018**, 118, 26-33.
 17. Hammel, S. C.; Hoffman, K.; Webster, T. F.; Anderson, K. A.; Stapleton, H. M., Measuring Personal Exposure to Organophosphate Flame Retardants Using Silicone Wristbands and Hand Wipes. *Environmental Science & Technology* **2016**, 50, (8), 4483-4491.
 18. 産業技術総合研究所, 化学物質データベース説明資料. j_icet_documentation_h.pdf
 19. Miyake, Y.; Tokumura, M.; Nakayama, H.; Wang, Q.; Amagai, T.; Ogo, S.; Kume, K.; Kobayashi, T.; Takasu, S.; Ogawa, K., Simultaneous determination of brominated and phosphate flame retardants in flame-retarded polyester curtains by a novel extraction method. *Sci. Total Environ.* **2017**, 601, 1333-1339.
 20. Saini, A.; Thaysen, C.; Jantunen, L.; McQueen, R. H.; Diamond, M. L., From Clothing to Laundry Water: Investigating the Fate of Phthalates, Brominated Flame Retardants, and Organophosphate Esters. *Environmental Science & Technology* **2016**, 50, (17), 9289-9297.
 21. 製品評価技術基盤機構, 生活・行動パターン情報 4.1. 自動車の運転時間. https://www.nite.go.jp/chem/risk/exp_4_1.pdf
 22. 製品評価技術基盤機構, ヘキサブロモシクロデカン. <https://www.nite.go.jp/data/000010128.pdf>
 23. 製品評価技術基盤機構, 室内暴露にかかわる生活・行動パターン情報 洗濯 (1) 洗濯一般. https://www.nite.go.jp/chem/risk/exp_3_8_1.pdf
 24. Quantin, P.; Stricher, M.; Catoire, S.; Ficheux, H.; Egles, C., Dermatokinetics: Advances and Experimental Models, Focus on Skin Metabolism. *Current Drug Metabolism* **2022**, 23, (5), 340-354.
 25. Pyo, S. M.; Maibach, H. I., Skin Metabolism: Relevance of Skin Enzymes for Rational Drug Design. *Skin Pharmacology and Physiology* **2019**, 32, (5), 283-294.
 26. Abdallah, M. A.-E.; Nguyen, K.-H.; Moehring, T.; Harrad, S., First insight into human extrahepatic metabolism of flame retardants: Biotransformation of EH-TBB and Firemaster-550 components by human skin subcellular fractions. *Chemosphere* **2019**, 227, 1-8.
 27. Elpa, D. P.; Chiu, H.-Y.; Wu, S.-P.; Urban, P. L., Skin Metabolomics. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2021**, 32, (2), 66-75.

調査結果の発表状況

国内学会

1. 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 高橋 亮平, 宮崎 高則, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内プラスチック製品中難燃剤の経皮曝露評価, 2022 年室内環境学会学術大会, 東京. (2022 年 12 月)
2. 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品との非接触時における皮膚中残留化学物質の経皮曝露を考慮するためのモデル構築, 環境科学会 2022 年会, Web. (2022 年 9 月)
3. 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内製品中リン系難燃剤の連続曝露と断続曝露における経皮曝露量への影響の比較, 第 30 回環境化学討論会, 富山. (2022 年 6 月)

国際会議

1. Maho Ishida, Mana Oishi, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Dermal Exposure to Phosphorus Flame Retardants in Car Seat through Actual Clothing, International Society of Exposure Science (ISES) 2022, Lisbon, Portugal. (September 2022)

受賞

1. 2022 年室内環境学会学術大会 大会長奨励賞, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 高橋 亮平, 宮崎 高則, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内プラスチック製品中難燃剤の経皮曝露評価 (2022 年 12 月)
2. 環境科学会 2022 年会 優秀発表賞 (富士電機賞), 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品との非接触時における皮膚中残留化学物質の経皮曝露を考慮するためのモデル構築 (2022 年 9 月)