

**原 著** 会長賞受賞論文**シックハウス症候群原因物質の経皮吸収に及ぼす  
NTE 活性の影響**

畑 中 朋 美<sup>1,4)</sup> 萩 野 瑛里奈<sup>2)</sup> 山 村 勇 貴<sup>2)</sup>  
本 杉 奈 美<sup>1)</sup> 竹 内 絵 理<sup>3)</sup> 坂 部 貢<sup>1)</sup>  
杉 野 雅 浩<sup>4)</sup> 従 二 和 彦<sup>4)</sup> 木 村 穰<sup>1)</sup>

- 1) 東海大学医学部
- 2) 東海大学工学部
- 3) 東海大学創造科学技術研究機構
- 4) 城西大学薬学部

**Influence of NTE activity in skin on percutaneous  
absorption of sick house syndrome related substances**

Tomomi Hatanaka<sup>1,4)</sup> Erina Ogino<sup>2)</sup> Yuki Yamamura<sup>2)</sup> Nami Motosugi<sup>1)</sup>  
Eri Takeuchi<sup>3)</sup> Kou Sakabe<sup>1)</sup> Masahiro Sugino<sup>4)</sup> Kazuhiko Juni<sup>4)</sup> Minoru Kimura<sup>1)</sup>

- 1) School of Medicine, Tokai University
- 2) School of Engineering, Tokai University
- 3) Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University
- 4) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University

**要約**

プラスチックの可塑剤であり、内分泌攪乱物質として知られるフタル酸エステルは、シックハウス症候群の原因物質の一つである。皮膚に曝露すると皮膚内を拡散しつつ活性代謝物のモノエステルに代謝されて体内に吸収されるが、代謝酵素を阻害すると体循環系に移行せず、皮膚内の代謝活性に依存した経皮吸収性を示す。我々は、シックハウス症候群患者は健常人に比べて単核球中の neuropathy target esterase (NTE) 活性が高いことを既に報告している。エステラーゼの基質特異性は一般に低いため、もし患者の皮膚内 NTE 活性が高いならば、フタル酸エステルの代謝活性も高く、その結果、高い経皮吸収性を示す可能性がある。

受付：平成27年11月10日 採用：平成27年11月12日

別刷請求宛先：畑中朋美

〒259-1193 伊勢原市下糟屋143 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

Reprint Requests to Tomomi Hatanaka, Department of Molecular Life Science, School of Medicine, Tokai University, 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, 259-1193, Japan

そこで本研究では、ヒトの NTE 遺伝子である *PNPLA6* 遺伝子導入マウスを用い、皮膚内の NTE 活性がフタル酸エステルの皮膚透過性に及ぼす影響を評価した。遺伝子導入マウスの背部皮膚中の NTE 活性は野生型マウスより有意に高く、野生型との差は脳よりも著しく大きかった。遺伝子はマウスの皮膚内顆粒層に主に発現し、その顆粒層は野生型マウスに比べて強いエステラーゼ活性を示した。フタル酸エステルを遺伝子導入マウスの摘出皮膚に曝露すると、真皮側に代謝物であるモノエステルが認められ、その量は野生型マウスより高かった。以上のことから、皮膚中の高 NTE 活性はフタル酸エステルの高経皮吸収性を招くことが示唆された。(臨床環境 24 : 88-93, 2015)

《キーワード》フタル酸エステル、NTE 活性、シックハウス症候群、経皮吸収

## Abstract

When the skin is exposed to the phthalates, which are plasticizers, endocrine disruptors and causative agents of sick building syndrome, the simultaneous diffusion and metabolism in skin occur and the active monoester metabolites reach the systemic blood circulation. On the other hands, phthalates are not absorbed into blood circulation, when the metabolic enzyme, i.e. esterase, is inhibited in skin. Thus, percutaneous absorption of phthalates depends on the metabolic activity in skin. In previous study, we reported that the patients with sick building syndrome have significantly higher enzymatic activity of neuropathy target esterase (NTE) in the mononuclear cells than healthy subjects. Because the substrate specificity of esterase is not generally definite, phthalates would be hydrolyzed by NTE. High NTE activity in skin of patients may cause an extensive metabolism of phthalate and then abundant absorption into the body.

In the present study, the influence of NTE activity in skin on the percutaneous absorption of phthalates was evaluated using transgenic mice that highly expressed human *PNPLA6* gene encoding NTE. NTE activity in skin was significantly higher in the transgenic mice than wild-type ones and the difference of NTE activity between two types of mice was larger in skin compared with brain. The *PNPLA6* gene was mainly expressed at the stratum granulosum in skin and esterase activity was also observed in the same layer. After application of benzylbutyl phthalate to skin surface of *PNPLA6* mice, the active monoester metabolites permeated through the skin and the amount of metabolites was significantly higher compared with wild-type mice. These results suggest that high NTE activity in skin cause high percutaneous absorption of phthalates. (Jpn J Clin Ecol 24 : 88-93, 2015)

《Key words》phthalates, NTE activity, sick building syndrome, percutaneous absorption

## I. はじめに

フタル酸エステルは、日用品、医薬品、建材、遊具等のポリ塩化ビニル製品に可塑剤や溶媒として広範かつ大量に使用されている化合物群である<sup>1)</sup>。共有結合されずにプラスチック内に存在し、時間の経過とともに製品から遊離して生活環境に分散するため<sup>2)</sup>、我々は日常的にこれらの化合物に曝されている<sup>3)</sup>。一部は内分泌攪乱物質、いわゆる環境ホルモンとして知られており、シックハウス症候群の原因物質の一つと考えられている<sup>4)</sup>。

フタル酸エステルの体内への吸収は主に経口も

しくは経気道経路によるものとされ、わが国では厚生労働省により食品や幼児用玩具への使用が規制されるとともに、室内空気濃度の指針値が定められている<sup>5)</sup>。これらの吸収経路に加えて、一般には外因性物質に対する防御バリアーであると考えられている皮膚からの吸収も無視できない<sup>6)</sup>。フタル酸エステルのジエステル体を皮膚に曝露すると、その高い脂溶性のため容易に角層に分配する(図1)。その後、表皮中のエステラーゼにより活性代謝物であるモノエステル体に加水分解され<sup>7,8)</sup>、極性を得ることにより水分に富んだ角層以下の層

を拡散して血液中に吸収される。しかし、皮膚内のエステラーゼを阻害すると脂溶性の高いジエステル体は角層以下の層に分配できず、角層中に留まって体循環系に移行しない。このように、フタル酸エステルは皮膚内の代謝活性に依存した経皮吸収性を示す。

一方、我々はシックハウス症候群と有機リン曝露後の遅発性神経障害に関与するとされる神経障害標的エステラーゼ (NTE) の関連に注目してきた<sup>9,10</sup>。それらの研究を通じて、シックハウス症候群患者は健常人に比べて単核球中 NTE 活性が高いことを明らかにしてきた<sup>8</sup>。エステラーゼの基質特異性は一般に低いため、もし患者の皮膚内 NTE 活性も高いならば、フタル酸エステルの代謝活性も高く、その結果、高い経皮吸収性を示す可能性がある。そこで本研究では、我々が作製したヒト NTE を発現するマウスを用い<sup>11</sup>、皮膚内の NTE 活性がフタル酸ベンジルブチルの皮膚透過性に及ぼす影響について評価した。

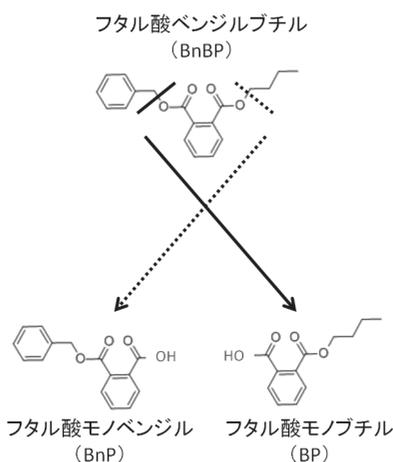


図1 フタル酸ベンジルブチルとその活性代謝物

## II. 実験方法

### 1. 実験動物

本研究では、我々が作製した NTE 遺伝子をコードするヒト *PNPLA6* を導入したマウス (TG) を用い<sup>11</sup>、その特性を野生型マウス (WT) と比較した。遺伝子導入マウス作製の際、第 6 染色体の ROSA26 配座に変異 loxP 配列を持つマウスの受精卵を用いた。目的遺伝子である *PNPLA6*

を含む導入ベクター (図2) と Cre 発現 mRNA を同時に顕微注入し<sup>12</sup>、Cre-loxP の相同組換え系を利用して、遺伝子の挿入位置とコピー数を制御した。NTE の ubiquitous な強発現を期待して CAG promoter が、またレポーターとして EGFP 遺伝子がそれぞれ組み込まれている。さらに、FLPe マウスを掛け合わせるにより、遺伝子の発現抑制領域を FLPe-FRT 系を利用して除去し、最終的な *PNPLA6* 遺伝子導入マウスとした。



図2 *PNPLA6* 遺伝子導入ベクター

### 2. 酵素活性の測定

マウスを頸椎脱臼後除毛して皮膚と脳を摘出し、液体窒素で凍結した後、測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。氷冷下で各組織を細断した後、Tris-EDTA buffer (50 mM Tri HCL, 0.2 mM EDTA, pH 8.0) で 10 % ホモジネート溶液を調製し (1,000 rpm, 3 min)、遠心分離 (2,000 rpm, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) して上清を得た。各組織のホモジネート上清中の NTE 活性は常法に従い、paraoxon に耐性で、mipaflox に阻害されるエステラーゼ活性とし、吉草酸フェニルの代謝物であるフェノールの比色定量により評価した<sup>13</sup>。

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性は、AChE 選択性基質である MATP+ と検出試薬 DTNB を用いた Ellman 法により測定した<sup>14,15</sup>。

### 3. 皮膚切片の観察

摘出したマウス皮膚を 4 % PFA で固定した後 OTC compound に包埋し、ドライアイス・アセトンで凍結して  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。Cryostat で  $10\ \mu\text{m}$  厚の切片を作製し、一次抗体に rabbit anti-GFP antibody、二次抗体に Alexa594-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody を用いて EGFP の抗体染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510-META, Carl Zeiss Microscopy) を用いて皮膚切片上での EGFP の局在を観察し、導入遺伝子の発現を確認した。

また、摘出したマウス皮膚を直ちに OTC

compound に包埋し、ドライアイス・アセトンで凍結して  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。10  $\mu\text{m}$  厚の切片に FID を適用し、加水分解産物である FITC の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、発現した遺伝子の皮膚切片上での総エステラーゼ活性を評価した。

#### 4. 皮膚透過実験

マウスの摘出皮膚を  $32^{\circ}\text{C}$  に保った有効適用面積  $0.87\text{ cm}^2$  の横型拡散セル (図3) に挟み、角層側に 0.4 mM フタル酸ベンジルブチル 10% DMSO/PBS 溶液を適用した後、真皮側の 10% DMSO/PBS を経時的に採取し、フタル酸ベンジルブチル、フタル酸ベンジルおよびフタル酸ブチルの透過量を測定した<sup>16)</sup>。定量は Cadenza CD-C18 column ( $4.6 \times 75\text{ mm}$ ,  $3\ \mu\text{m}$ , Imtakt Corporation) と 5% リン酸溶液:アセトニトリルの gradient elution system を用いた逆相 HPLC で行い、UV 280 nm で検出した。

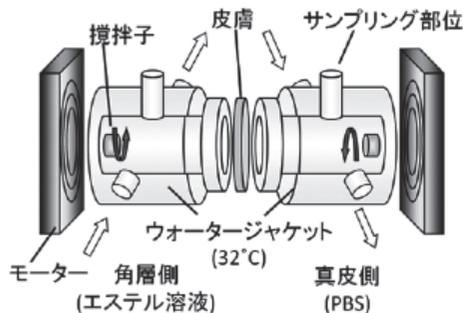


図3 横型拡散セル

### Ⅲ. 結果と考察

#### 1. *PNPLA6* 遺伝子導入マウスの皮膚内 NTE 活性

図4は *PNPLA6* 遺伝子導入マウスの皮膚および脳内の NTE 活性と脳内の AChE 活性を示している。皮膚の NTE 活性は脳より低いものの、遺伝子導入マウスの皮膚は野生型に比べて有意に高い NTE 活性を示した。また、TG と WT のマウス間の差は、脳内が約5倍であるのに対して皮膚では約60倍と著しく大きかった。一方、導入遺伝子とは無関係な脳内の AChE 活性には両者間の差は認められなかった。

NTE は有機リンにより誘発される遅発性神経障害の標的として同定された分子であり<sup>17)</sup>、本来神経細胞内の小胞体膜中に高濃度で存在する<sup>18)</sup>。そのため、本研究でも野生型マウスでは皮膚に比べて脳内で高い活性が得られたと考えられる。*PNPLA6* マウスの場合、遺伝子導入の際に全身性に ubiquitous な高発現が期待される CAG promoter が用いられたため<sup>19)</sup>、皮膚内でも高い NTE 活性が得られたものと推察される。脳内の AChE 活性にマウス間で差はなく、*PNPLA6* 遺伝子導入は AChE の発現には影響しないことが確認された。

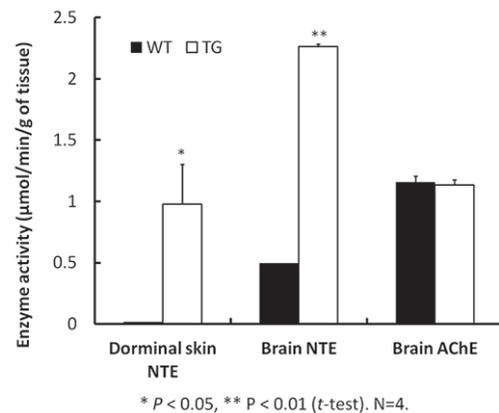


図4 *PNPLA6* マウスの皮膚および脳内の NTE および AChE 活性

#### 2. マウス皮膚内での *PNPLA6* 遺伝子の発現

*PNPLA6* マウスの皮膚内の高い NTE 活性が導入した遺伝子に起因するか検討するため、皮膚の垂直切片を作成して遺伝子の発現を評価した。レポータータンパク質である EGFP の蛍光が主に角層直下の顆粒層に観察され、この EGFP の局在は GFP 抗体による抗体染色によっても確認された (図5a)。このことから、遺伝子導入マウスの皮膚内では主に顆粒層で *PNPLA6* が発現していると考えられた。なお、野生型マウスの皮膚では遺伝子導入マウスのような蛍光は観察されなかった。

発現した *PNPLA6* がエステラーゼ活性を有するか確認するため、遺伝子導入マウス皮膚の新鮮凍結切片に FID を適用し、加水分解により生じる FITC の蛍光を観察した。FITC は EGFP ととも

に顆粒層に共局在し (図5b)、発現した遺伝子はエステラーゼ活性を持つ酵素、すなわち NTE であると推察された。なお、野生型マウスにもエステラーゼ活性は存在したが、その活性は遺伝子導入マウスに比べて著しく低いものだった。

皮膚の最外層には脱核した角化細胞である角質細胞とその周辺帯に結合した細胞間脂質ラメラからなる角層が存在し<sup>20)</sup>、水分の蒸発や異物の侵入に対するバリアーとして機能している<sup>21)</sup>。表皮の最下層にある基底層から分化した角化細胞が成熟しながら有棘層、顆粒層と上層に移行して角質細胞となるが、有棘層上部と顆粒層には角層の細胞間脂質の材料となる前駆体脂質と多くの酵素を含むラメラ小体が存在し、皮膚内で最も高い代謝活性を示す<sup>22)</sup>。NTE は現在では paration-like phospholipase domain-containing protein の一つ、すなわち PNPLA6 であることが知られており<sup>23)</sup>、膜脂質代謝、特に lysophospholipid の加水分解に重要な酵素である<sup>24)</sup>。皮膚内顆粒層に局在する PNPLA6 の発現と脂質代謝との何らかの関連が示唆される。

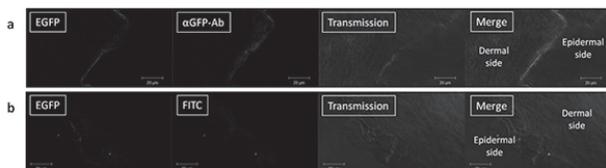


図5 PNPLA6 マウスの皮膚内の遺伝子 (a) およびエステラーゼ活性 (b) の局在

### 3. フタル酸エステルの PNPLA6 マウス皮膚透過性

PNPLA6 マウスは導入した遺伝子に由来する高い皮膚内 NTE 活性を有することが明らかとなったため、最後にフタル酸エステルの皮膚透過実験を行った。フタル酸ベンジルブチルを角層に適用24時間後、真皮側に未分解のジエステル体は検出されなかったが、活性代謝物であるモノエステル体が透過してきた (図6)。フタル酸モノベンジルの皮膚透過量は野生型に比べて有意に高く、フタル酸モノブチルの透過には有意差はなかったが、遺伝子導入マウスで高い傾向が認められた。

皮膚を透過する化合物には至適な脂溶性が存在し、 $n$ -オクタノール/水分配係数の対数值 ( $\log P$ ) として2.5付近、溶解度パラメータとして  $10 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{1/2}$  であることが報告されている<sup>25, 26)</sup>。すなわち、化合物の水溶性が高いと脂質に満ちた角層に分配しにくい、脂溶性が高すぎても角層以下の水分に満ちた表皮層に分配できないため、経皮吸収性は低下する。フタル酸ベンジルブチルの  $\log P$  値は4.97と非常に高く<sup>27)</sup>、その脂溶性からは体内へは吸収されずに角層に留まることが予想される。しかし、本研究でも観察されたように、主に顆粒層に存在するエステラーゼにより加水分解され、極性を得ることにより活性代謝物であるモノエステルとして皮膚を透過した。

フタル酸エステルの皮膚内での代謝には種差が存在し<sup>6)</sup>、ヒトに比べてラットの代謝活性は著しく高い。また、フタル酸ベンジルブチルはヒトでは主にフタル酸モノベンジルに、ラットでは主にフタル酸モノブチルに代謝される。本研究においても、PNPLA6 マウス (TG)、野生型マウス (WT) ともにフタル酸モノベンジルに比べてフタル酸モノブチルの透過量が著しく高く、ラットと同様の傾向を示すことが明らかとなった。しかし、遺伝子導入により有意に増加したのはヒトの主代謝物であるフタル酸モノベンジルの透過量であり、導入したヒト遺伝子の特性を反映した結果となった。

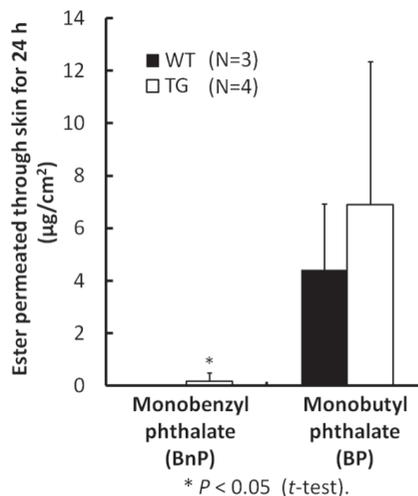


図6 PNPLA6 マウス皮膚のフタル酸エステル透過性

#### IV. まとめ

*PNPLA6* 遺伝子導入マウスを用いた本研究の結果、皮膚中の NTE 活性が高いと、フタル酸エステルの皮膚透過性も高くなると結論づけられる。今後、ヒトの皮膚と単核球の NTE 活性の関係について検討し、両者に相関が認められれば、シックハウス症候群患者におけるフタル酸エステルの経皮吸収挙動が解明されるものと考えられる。

#### 謝辞

本研究は東海大学生命科学統合支援センターの支援を受けて遂行された。特に、酵素活性の測定にご尽力いただいた大久保朋一博士および吉野美千代職員、並びに皮膚切片の観察にご協力いただいた岡田千沙博士および亀山洋子職員に深謝いたします。

本研究は文部科学省科学研究費挑戦的萌芽研究 15K12215, 新潟大学脳研究所共同研究費補助金 (2015-2604) の助成によって行われた。

#### 文献

- Graham PR. Phthalate ester plasticizers--why and how they are used. *Environ Health Perspect.* 3: 3-12, 1973.
- Bergé A, Cladière M, et al. Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. *Environ Sci Pollut Res Int.* 20: 8057-8076, 2013.
- Blount BC, Milgram KE, et al. Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal Chem.* 72: 4127-4134, 2000.
- Heudorf U, Mersch-Sundermann V, et al. Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health.* 210: 623-634, 2007.
- Hopf NB, Berthet A, et al. Skin permeation and metabolism of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Toxicol Lett.* 224: 47-53, 2014.
- 増茂裕子, 藤堂浩明, 他. 家庭用品から溶出するフタル酸エステル類の皮膚透過性および皮膚中濃度の評価. *日本薬学会年会要旨集132年会3号*: 224, 2012.
- Bonilla E, del Mazo J. Deregulation of the *Sod1* and *Nd1* genes in mouse fetal oocytes exposed to mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP). *Repro. Toxicol.* 30: 387-392, 2010.
- Muczynski V, Cravedi JP, et al. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human and mouse fetal testis: In vitro and in vivo approaches. *Toxicol Appl Pharmacol.* 26: 97-104, 2012.
- 松坂恭成, 青山美子, 他. 神経障害標的エステラーゼ遺伝子とシックハウス症候群. *臨床環境医学* 15: 7-14, 2006.
- Matsuzaka Y, Ohkubo T, et al. Association of sick building syndrome with neuropathy target esterase (NTE) activity in Japanese. *Environ Toxicol.* 29: 1217-1226, 2014.
- 加賀谷徹, 割田貴之, 他. Neuropathy targeting esterase (神経障害標的エステラーゼ) 遺伝子導入マウスの作製. *臨床環境医学* 23: 34-40, 2014.
- Ohtsuka M, Miura H, et al. Improvement of pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) by iCre mRNA-mediated site-specific recombination. *Transgenic Res.* 22: 873-875, 2013.
- Johnson MK. Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. *Arch Toxicol.* 37: 113-115, 1977.
- Augustinsson KB, Eriksson H. The effects of two disulphides on cholinesterase activity in the spectrophotometric assay. *Biochem J.* 139: 123-127 1974.
- Kikuchi T, Okamura T, et al. Piperidine-4-methanthiol ester derivatives for a selective acetylcholinesterase assay. *Biol Pharm Bull.* 33: 702-706, 2010.
- Hatanaka T, Yoshida S, et al. *In silico* estimation of skin concentration following the dermal exposure to chemicals. *Pharm. Res.* 32: 3965-3974, 2015.
- Johnson MK. Organophosphates and delayed neuropathy--is NTE alive and well? *Toxicol Appl Pharmacol.* 102: 385-399, 1990.
- Dudek BR, Richardson RJ. Evidence for the existence of neurotoxic esterase in neural and lymphatic tissue of the adult hen. *Biochem Pharmacol.* 31: 1117-1121, 1982.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 108: 193-199, 1991.
- Hafttek M, Callejon S, et al. Compartmentalization of the human stratum corneum by persistent tight junction-like structures. *Exp Dermatol.* 20: 617-621, 2011.
- Proksch E, Brandner JM, et al. "The skin: an indispensable barrier". *Exp Dermatol.* 17: 1063-1072, 2008.
- Kao J, Carver MP. Cutaneous metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev.* 22: 363-410, 1990.
- Kienesberger PC, Oberer M, et al. Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res.* 50: S63-S68, 2009.
- Quistad GB, Barlow C, et al. Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 7983-7987, 2003.
- Yano T, Nakagawa A, et al. Skin permeability of various non-steroidal anti-inflammatory drugs in man. *Life Sci.* 39: 1043-1050, 1986.
- Liron Z, Cohen S. Percutaneous absorption of alkanolic acids II: Application of regular solution theory. *J Pharm Sci.* 735: 38-42, 1984.
- Chem Draw Ultra 12.2® (PerkinElmer informatics, Cambridge, MA) .