

反応試薬：2,4-Dinitrophenyl hydrazine Hydrochloride (DNPH)

HPLC条件：Wakosil-(II)5C18

測定波長360nm,

移動相：0.2M酢酸／アセトニトリル  
 =35／65

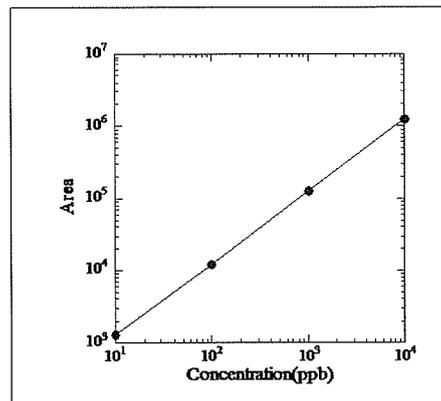
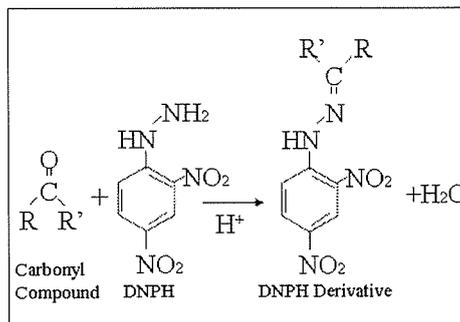
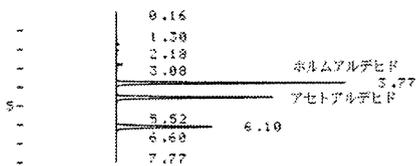


図2 HPLCによる気中濃度の測定

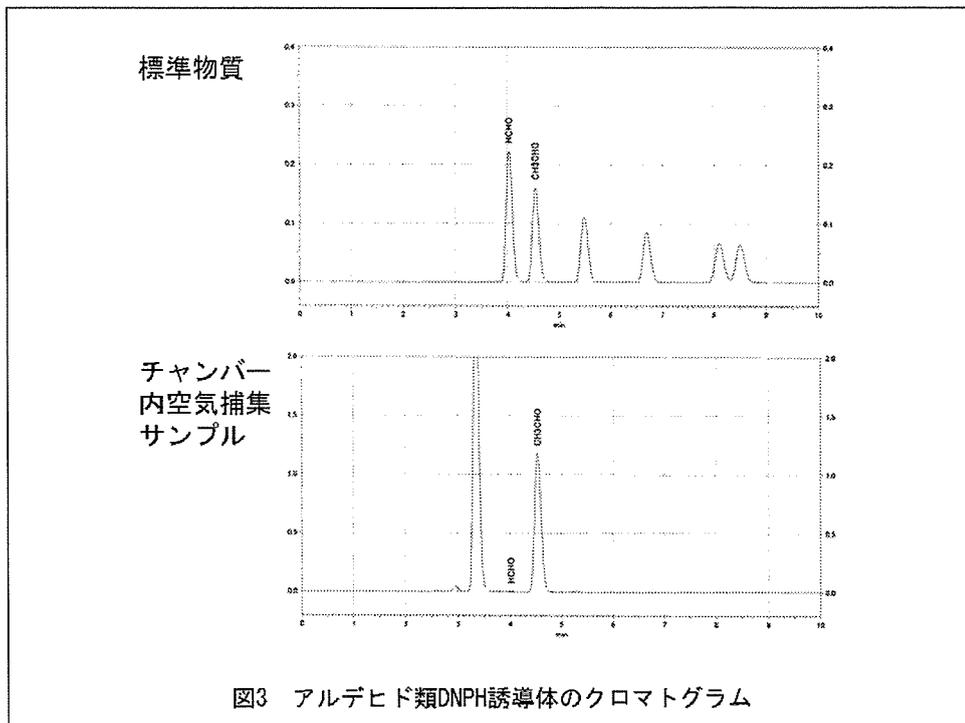


図3 アルデヒド類DNP誘導体のクロマトグラム

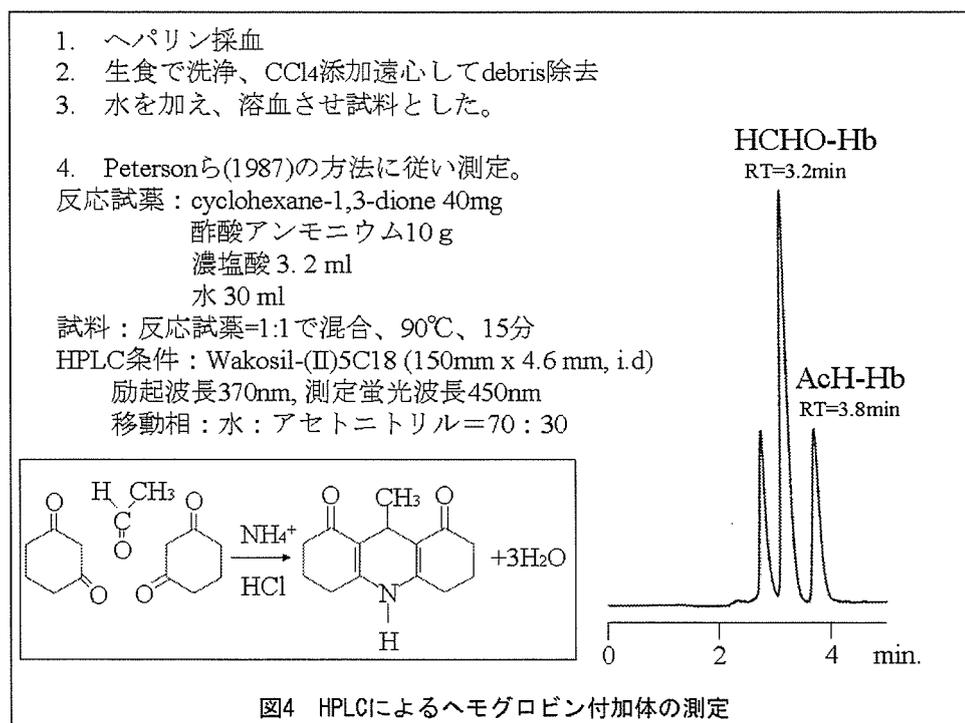


図4 HPLCによるヘモグロビン付加体の測定

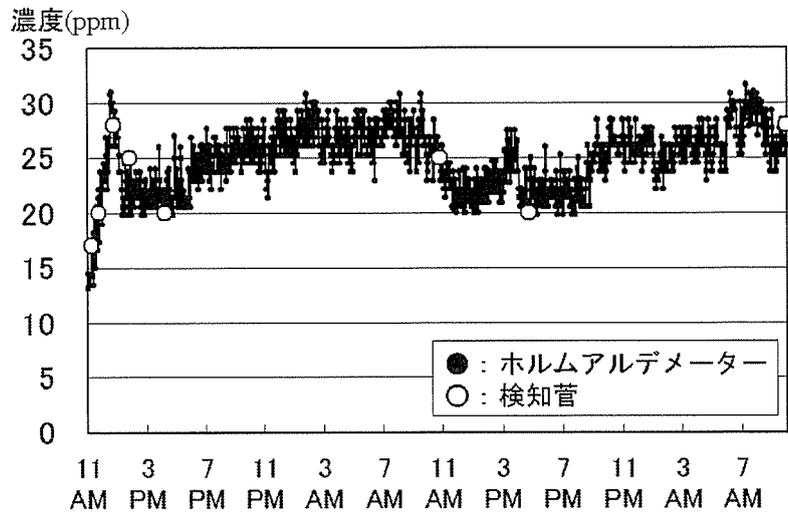


図5 25ppmチャンバー内濃度の経時変化

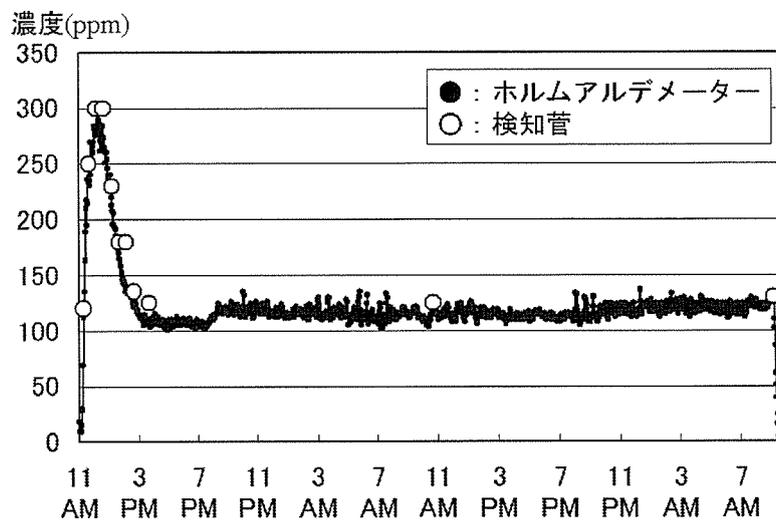
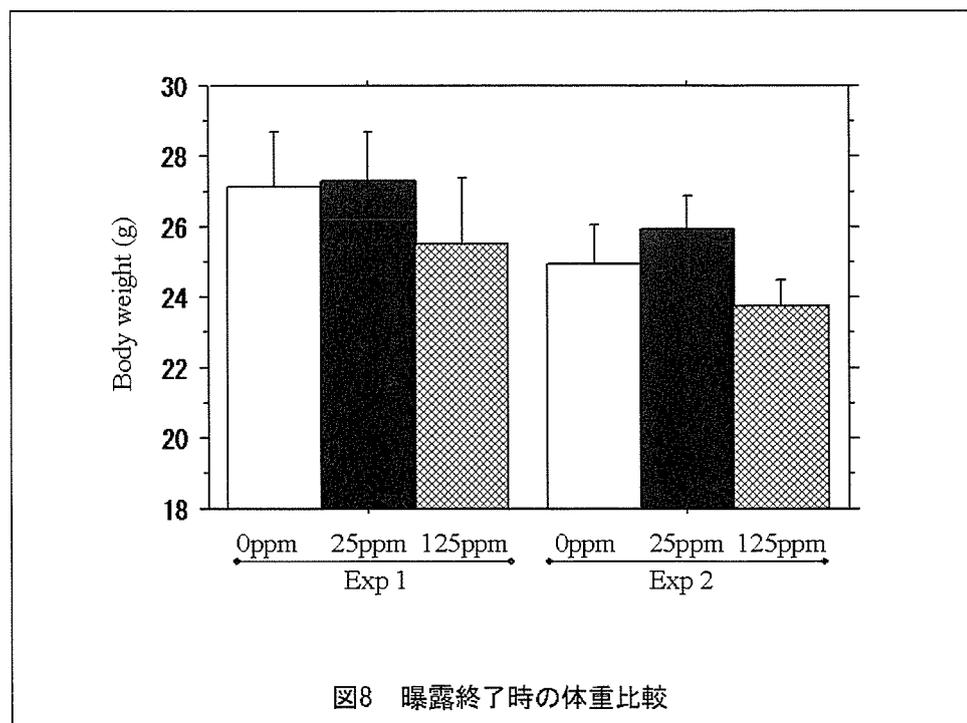
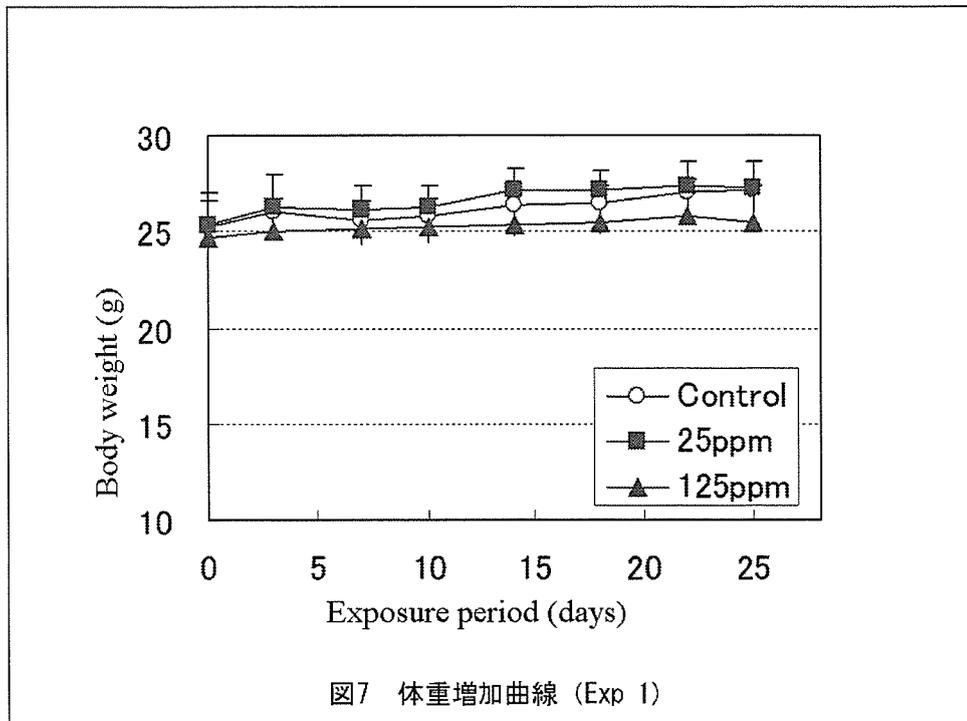
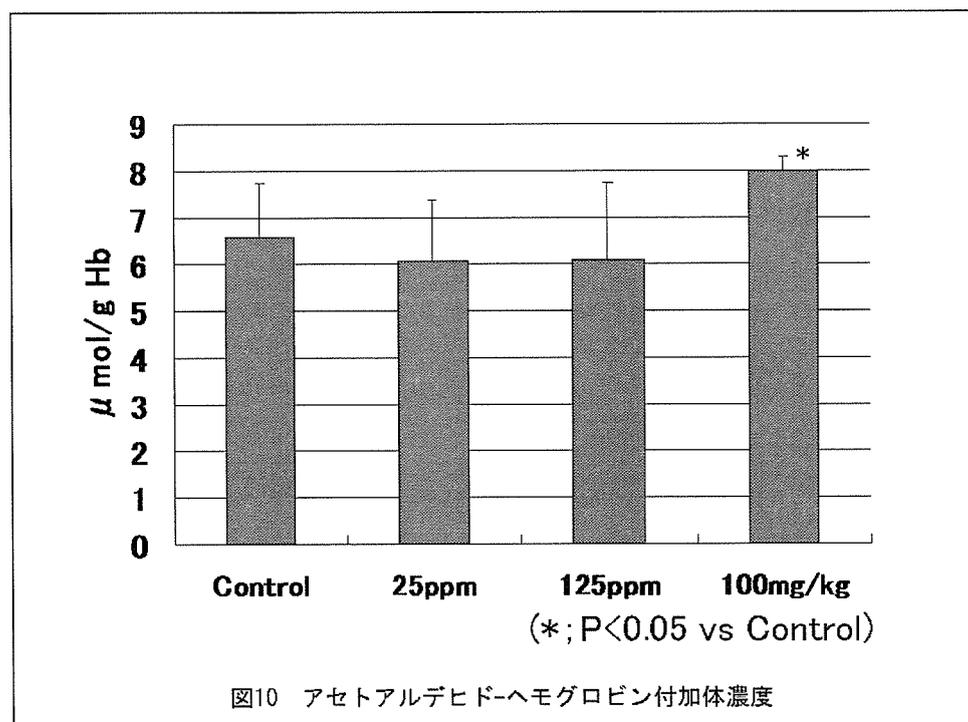
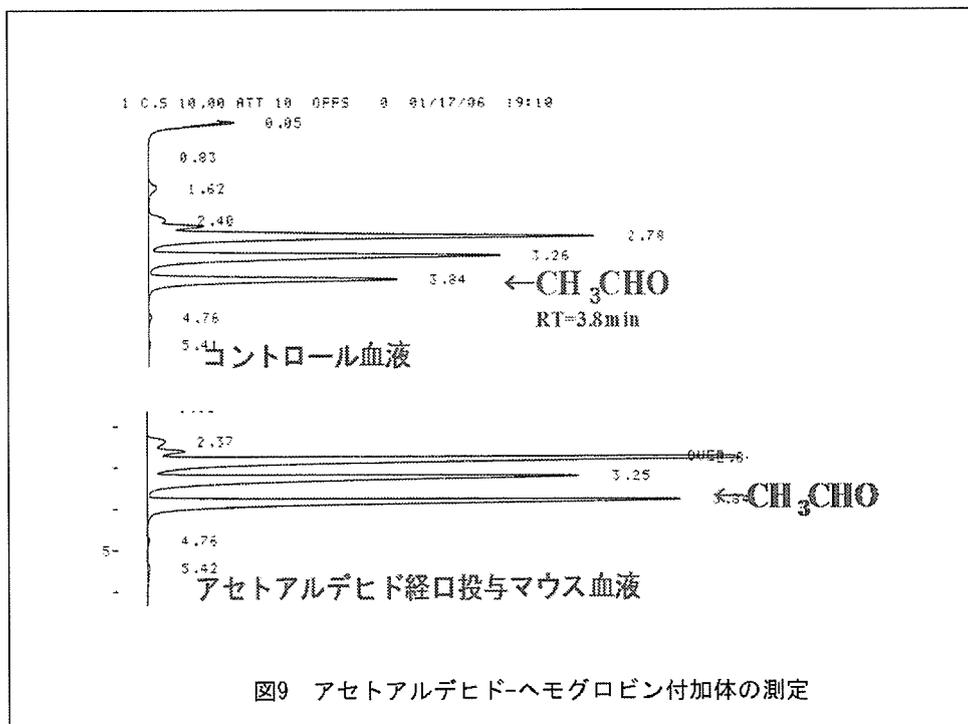
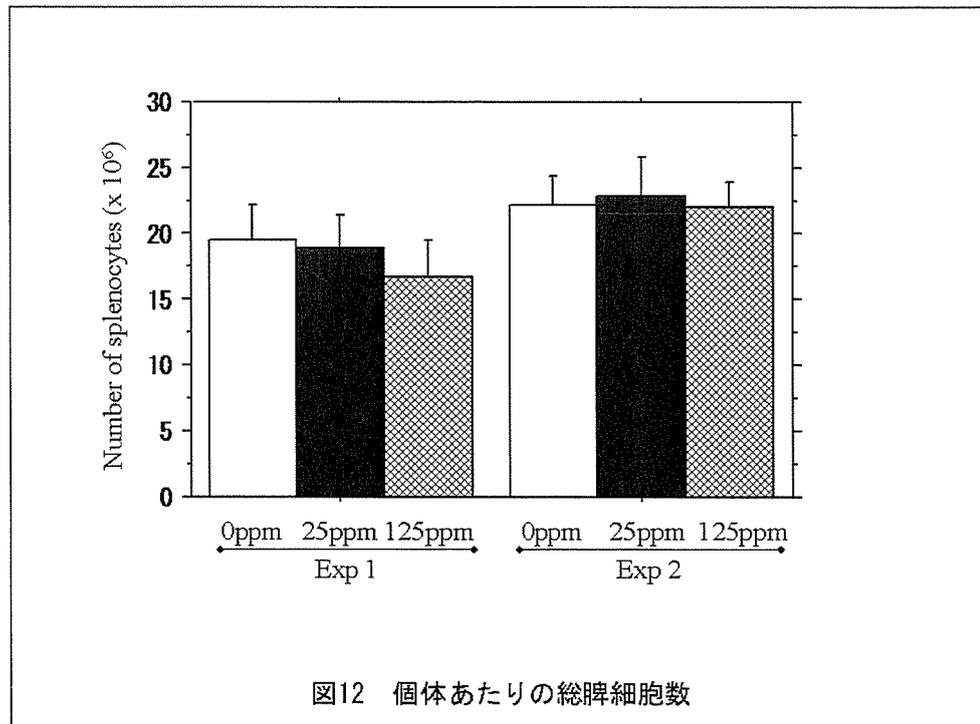
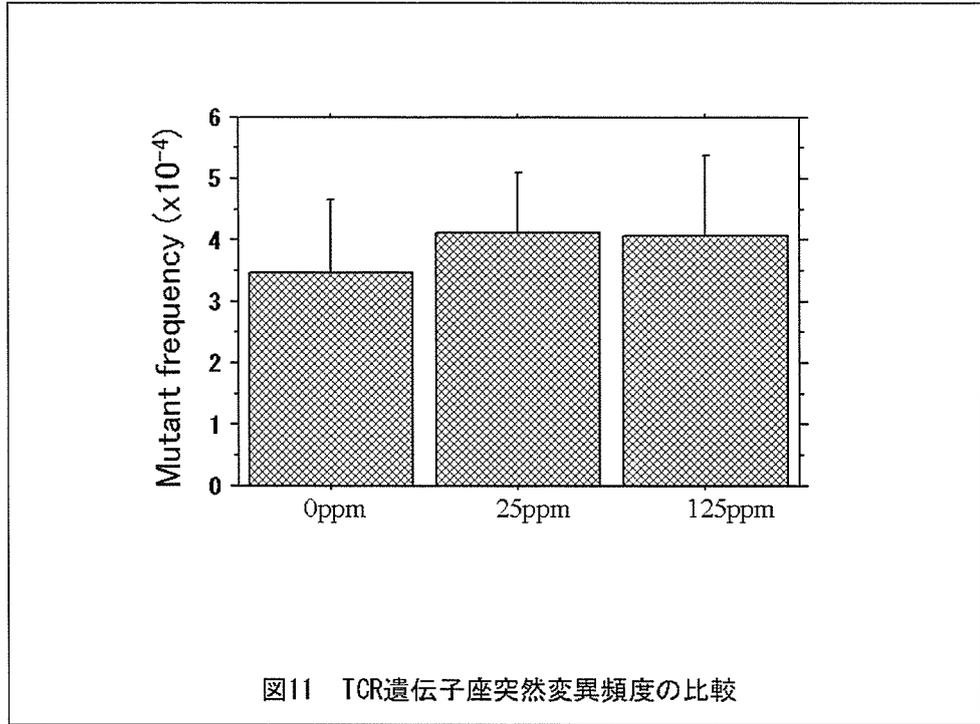


図6 125ppmチャンバー内濃度の経時変化







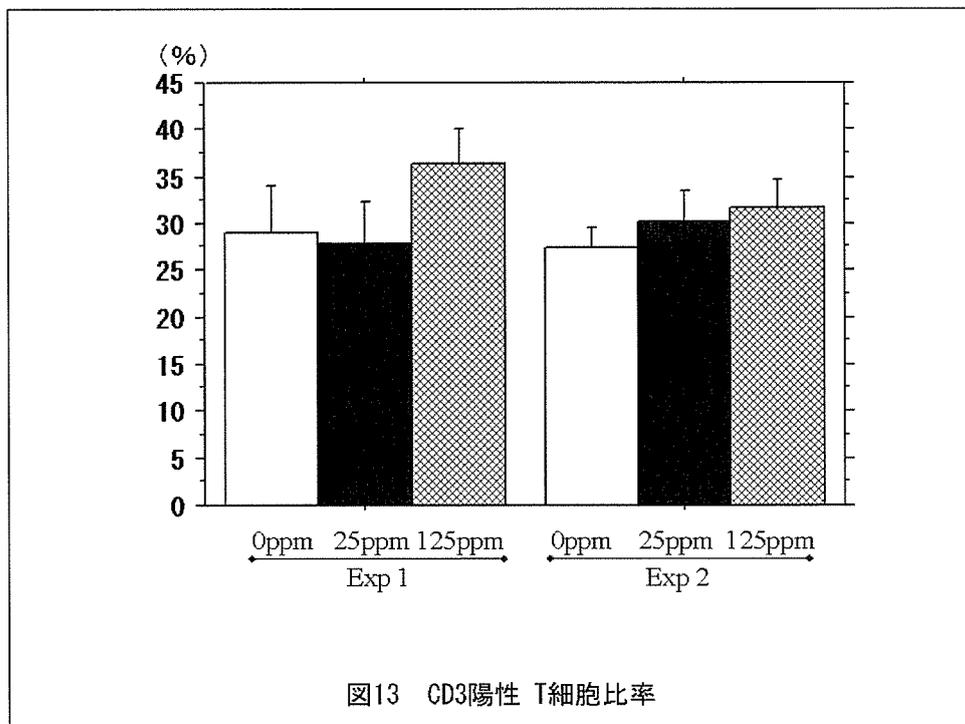


図13 CD3陽性 T細胞比率

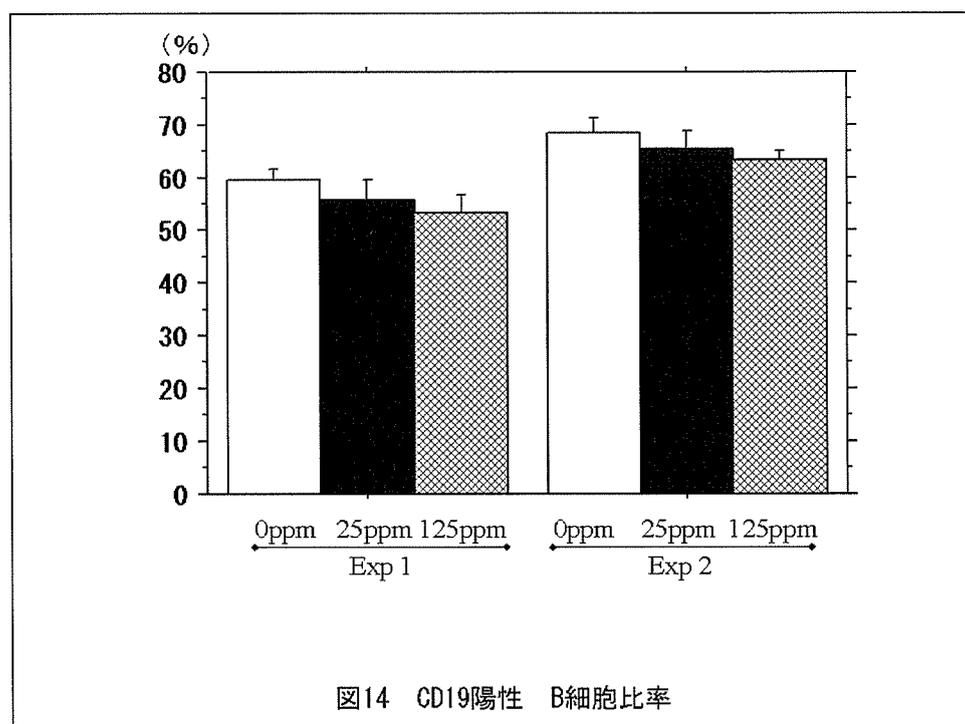


図14 CD19陽性 B細胞比率

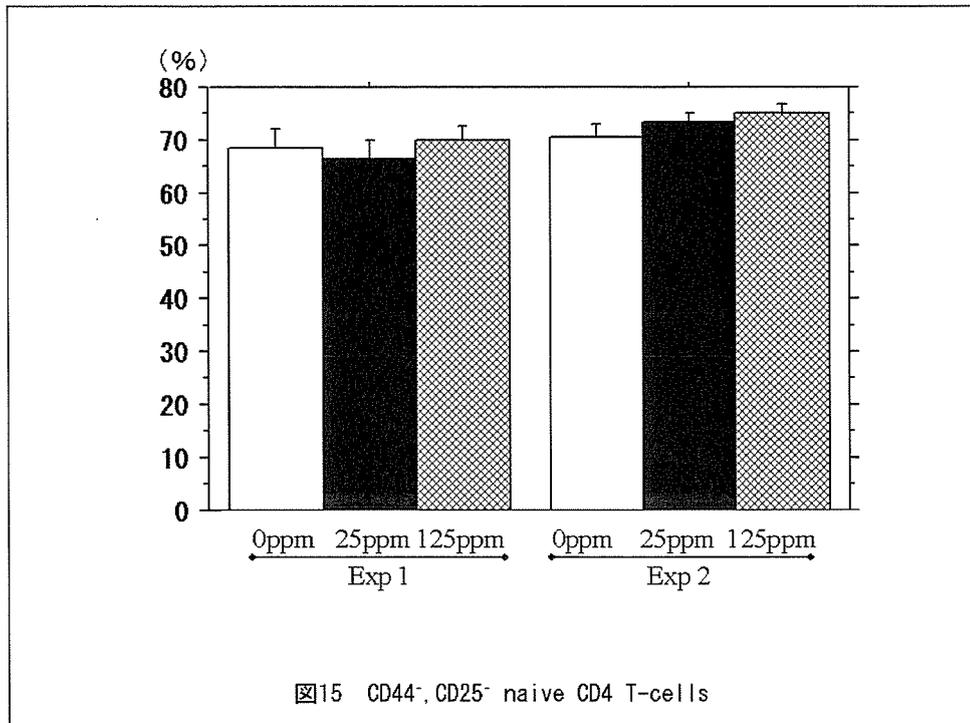


图15 CD44<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup> naive CD4 T-cells

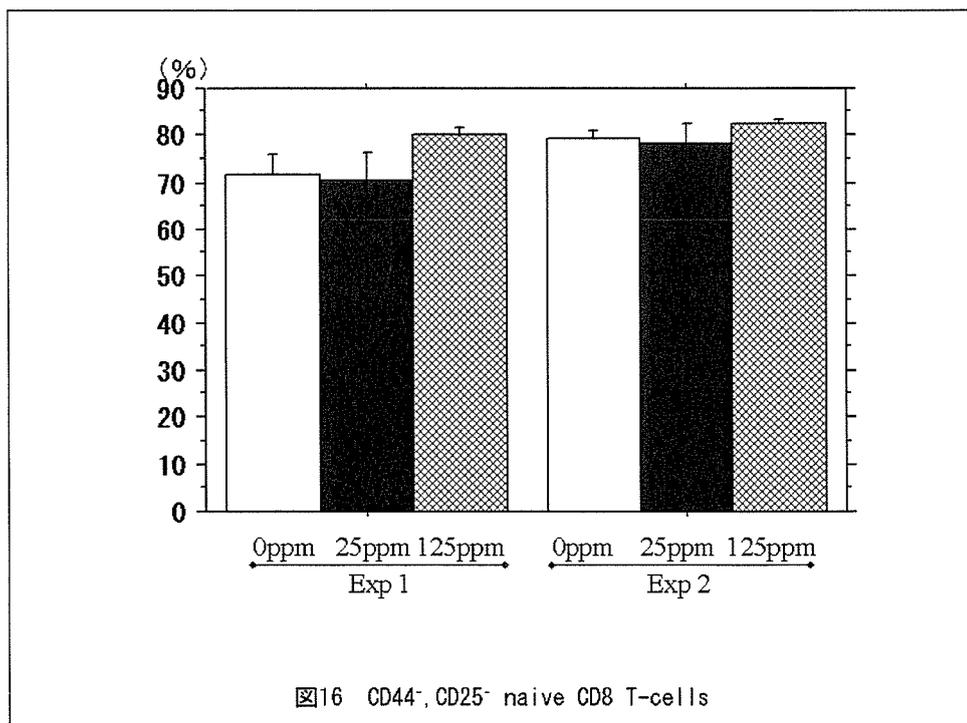
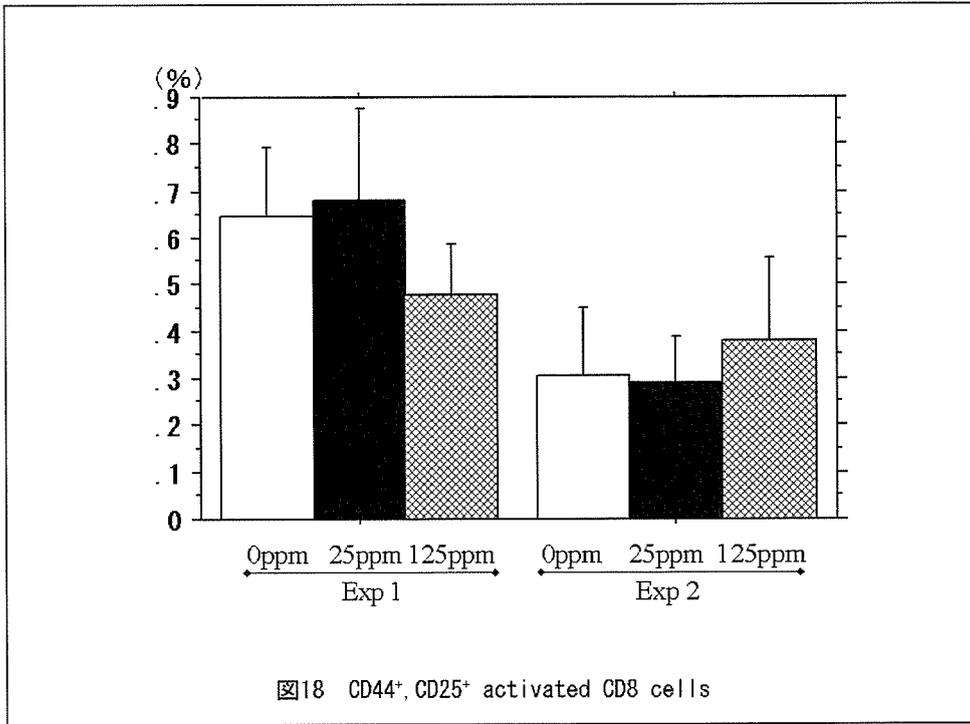
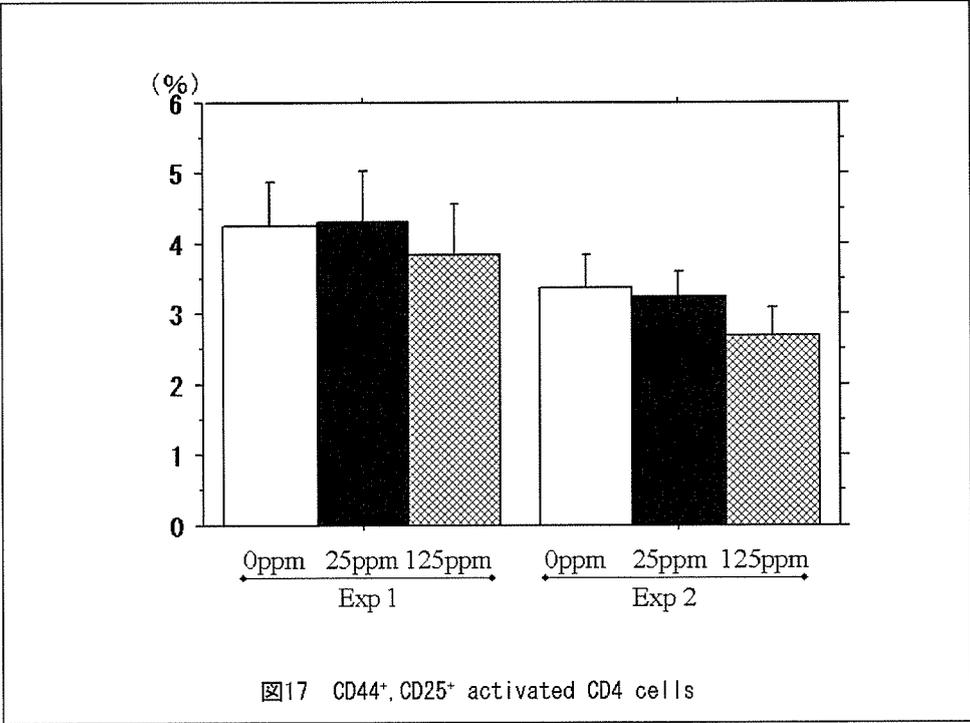
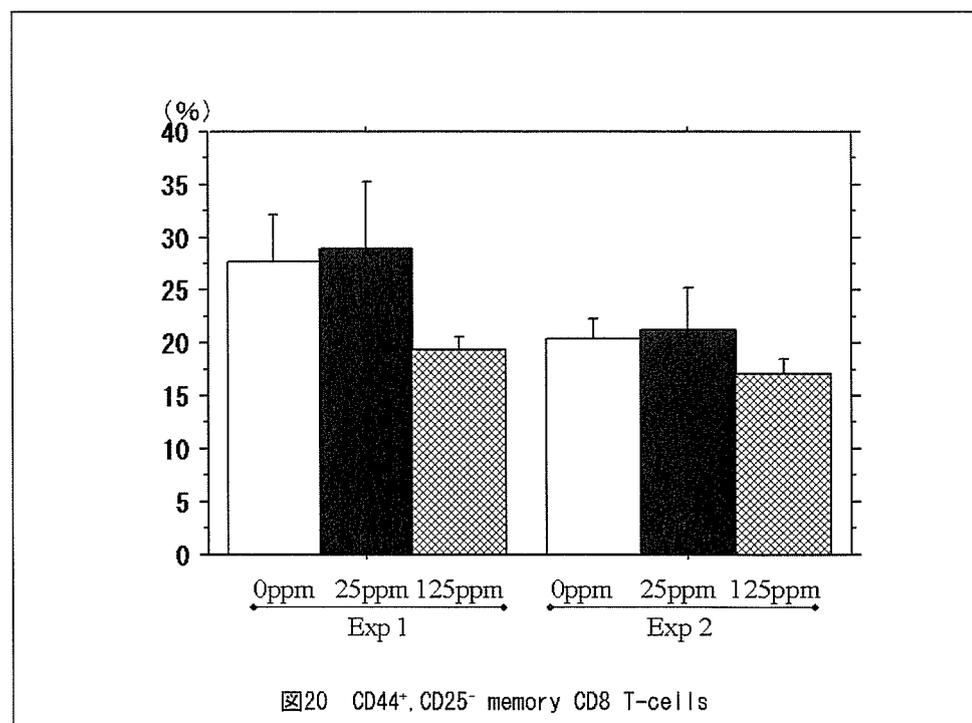
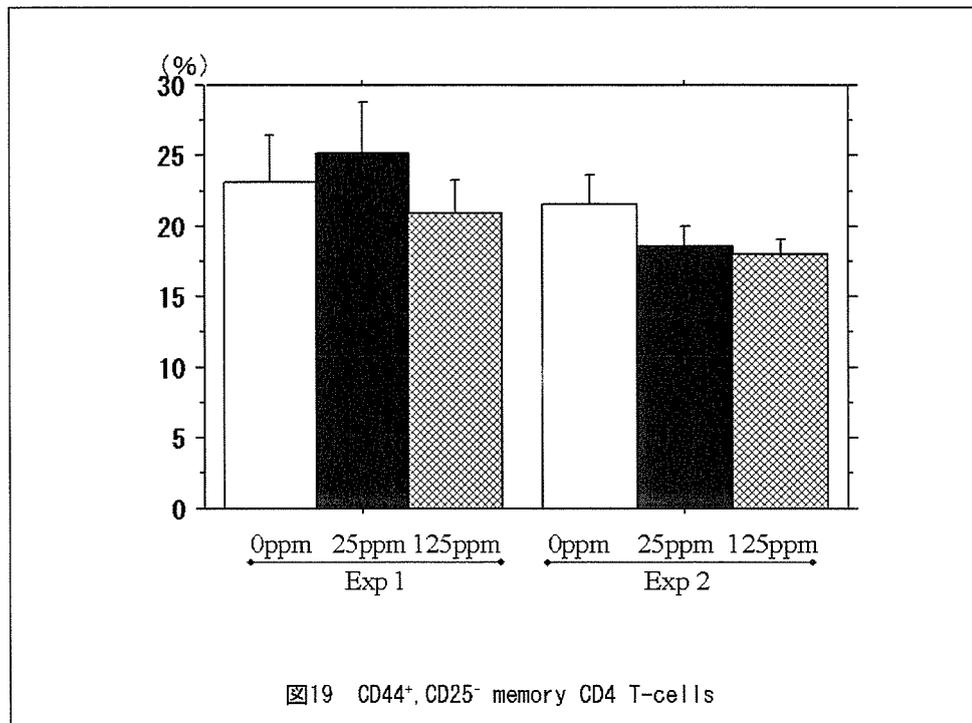
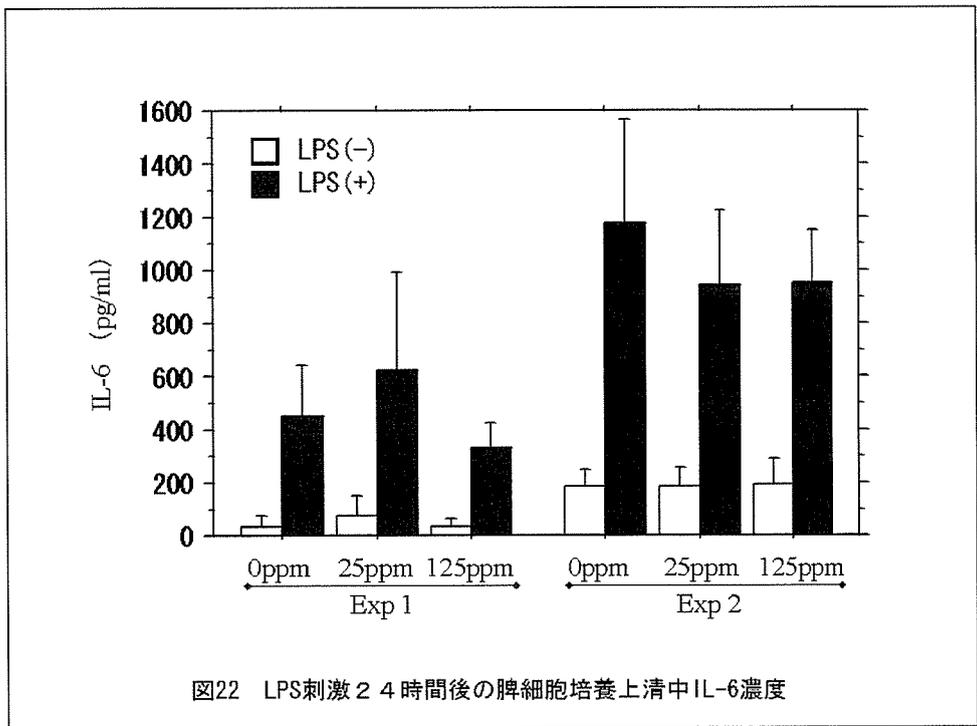
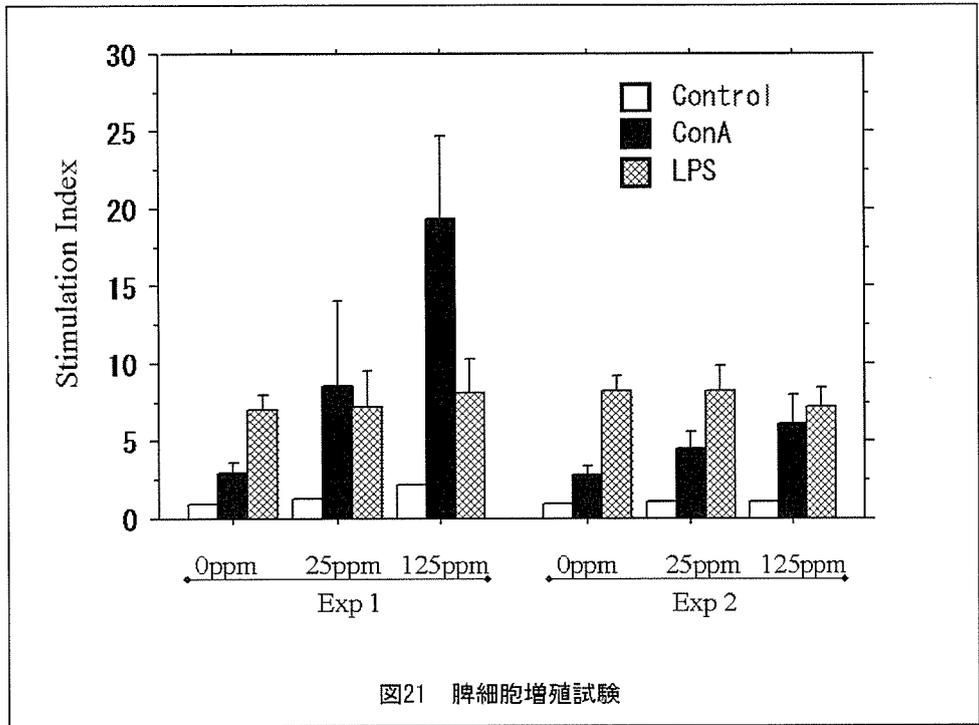


图16 CD44<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup> naive CD8 T-cells







### Ⅲ－２． １． 家庭用品中化学物質による過敏症の発現機構に関する研究

分担研究者 安藤 正典 武蔵野大学 薬学部 薬学研究所 環境化学研究室 教授  
協力研究者 大河原 晋 武蔵野大学 薬学部 薬学研究所 環境化学研究室 助手  
神野 透人 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 第一室長  
香川 聡子 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 協力研究員

**研究要旨** NMDA 受容体のサブタイプの一つである NR1splice variants を高感度かつ迅速に分別定量するために、SYBR Green リアルタイム PCR を用いた定量法の開発を行った。その結果、variant 特異的プライマーと定量用スタンダードの組み合わせの場合のみ指数関数的に増幅する蛍光シグナルが確認された。また、その PCR 反応溶液をアガロース電気泳動により確認したところ、目的とする長さのバンドが確認でき、非特異的なバンドは検出されなかった。さらに、PCR 反応終了後に融解曲線分析を行なったところ、単一のピークが確認できた。これらの結果から、構築したプライマーによって N 末領域ならびに C 末領域の NR1 splice variant を少なくとも 500 倍の選択性で識別できることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体は、学習や記憶など中枢系の本質的な機能に対して重要な役割を引き起こす。近年、本態性多種化学物質過敏症の発症機序のひとつとして化学物質によるこの受容体の活性化が指摘された。従って、この受容体を指標とした迅速かつ簡便な定量法の開発は家庭用品から排出される化学物質のリスクを評価する上で重要であると考えられる。そこで今回、NMDA 受容体のサブタイプである NR1 splice variant の SYBR Green リアルタイム PCR による分別定量法の開発を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 定量用プラスミドの構築

マウス海馬由来 totalRNA から、逆転写反応により cDNA を合成した。NR1 遺伝子の N 末と C 末領域を増幅させるプライマーを用いて

PCR 法により 8 種の splice variants に相当するフラグメントを増幅した。各フラグメントを pCR4-TOPO ベクターにサブクローニングし、塩基配列を確認した後に、定量用のスタンダードとして用いた。それぞれのリアルタイム PCR による mRNA 発現量の定量には SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いた。

##### 2. 老化促進モデルマウスの脳各部位における NR1-splice variant mRNA の相対定量

5 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP8 の脳から、海馬、大脳皮質、小脳、嗅球および視床/視床下部の 5 つの部位を摘出した。各部位より精製した total RNA を用い逆転写反応により cDNA を合成した。この cDNA を適宜希釈し、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) 存在下にてリアルタイム PCR を行い、定量用プラスミドを用いて作成した検量線から mRNA 発現量の定量

を行った。得られた定量結果は Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (Applied Biosystems 社) を用いた 18S ribosomal RNA の発現量で補正した。

### C. 研究結果および考察

C 末側 4 種および N 末側 2 種の variant に特異的な領域約 100 bp を増幅させるプライマーを設計し(Fig.1, Table.1)、定量用スタンダードを鋳型としてリアルタイム PCR を行った。その結果、variant 特異的プライマーと定量用スタンダードの組み合わせの場合のみ指数関数的に増幅する蛍光シグナルが確認された。また、その PCR 反応溶液をアガロース電気泳動により確認したところ、目的とする長さのバンドが確認でき、非特異的なバンドは検出されなかった。さらに、PCR 反応終了後に、融解曲線分析を行なったところ、単一のピークが確認できた(Fig.2,3)。これらの結果から、構築したプライマーによって N 末領域ならびに C 末領域の NR1 splice variant を少なくとも 500 倍の選択性で識別できることが明らかとなった。

次に、スタンダードを段階希釈して作成した検量線をもとに、SAMP8 および SAMR1 マウスの脳における NR1 splice variant の発現量を比較した(Fig.4)。その結果、いずれの variant の発現量にも有意な差は認められなかったことから、SAMP8 に出現する記憶・学習障害は NR1 splice variant の構成比の変化を伴わない可能性が示唆された。また、脳の各部位におけるこれら variant の発現量の割合は、今までに有効な定量法として報告されている Northern blot 法

および Competitive PCR 法とほぼ同じ定量結果が認められた。したがって、今回開発した SYBR Green Real-Time PCR 法は、従来の方法に比べ高感度かつ迅速に識別、定量できることが明らかとなった。

### D. 結論

本研究において、さまざまな神経疾患の発現に重要な役割を果たす可能性が示されている NMDA Receptor の Splice Variant を高感度かつ迅速に識別、定量する方法を確立した。本分析法は、室内環境化学物質に起因する本態性多種化学物質過敏状態等の発症メカニズムを明らかにする上で有効な方法となると考えられる。

### E. 健康危機情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

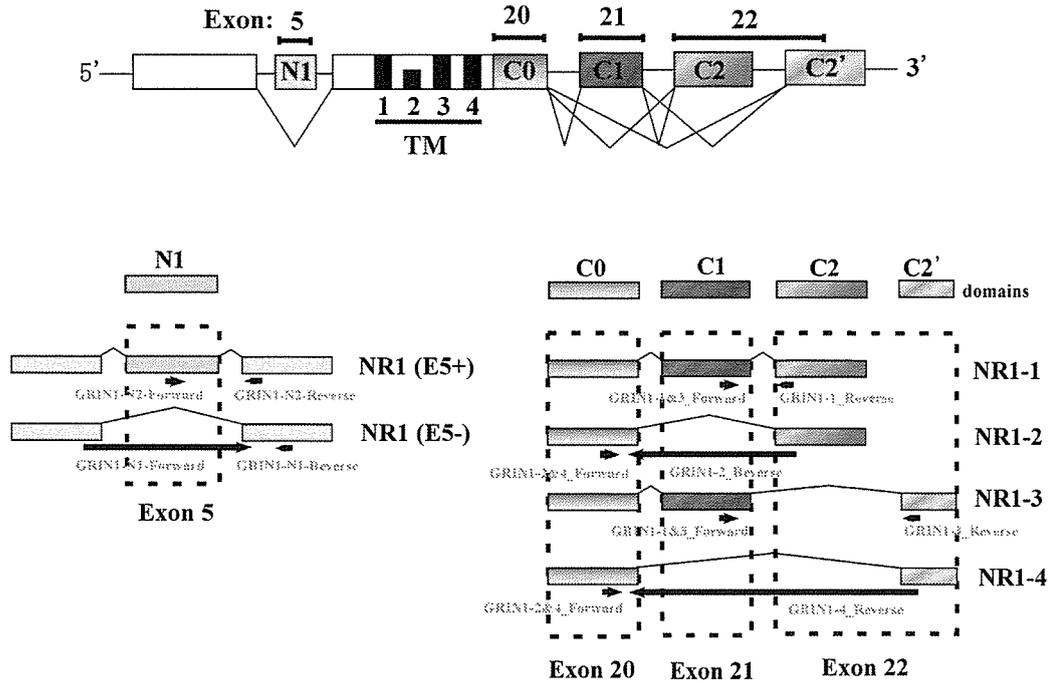
なし

#### 2. 学会発表

- 1) SYBR Green Real-Time PCR によるマウス NMDA 受容体 Splice Variants の分別定量 大河原 晋、神野 透人、香川(田中) 聡子、徳永 裕司、安藤 正典、フォーラム 2005 衛生薬学・環境トキシコロジー

### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

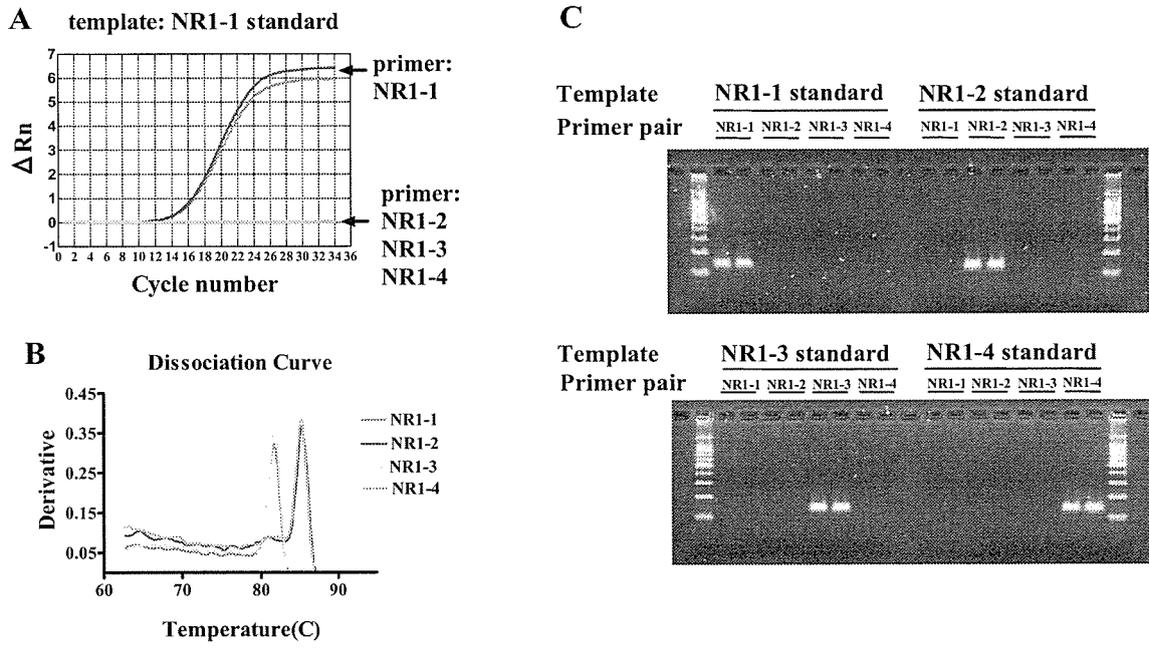
なし



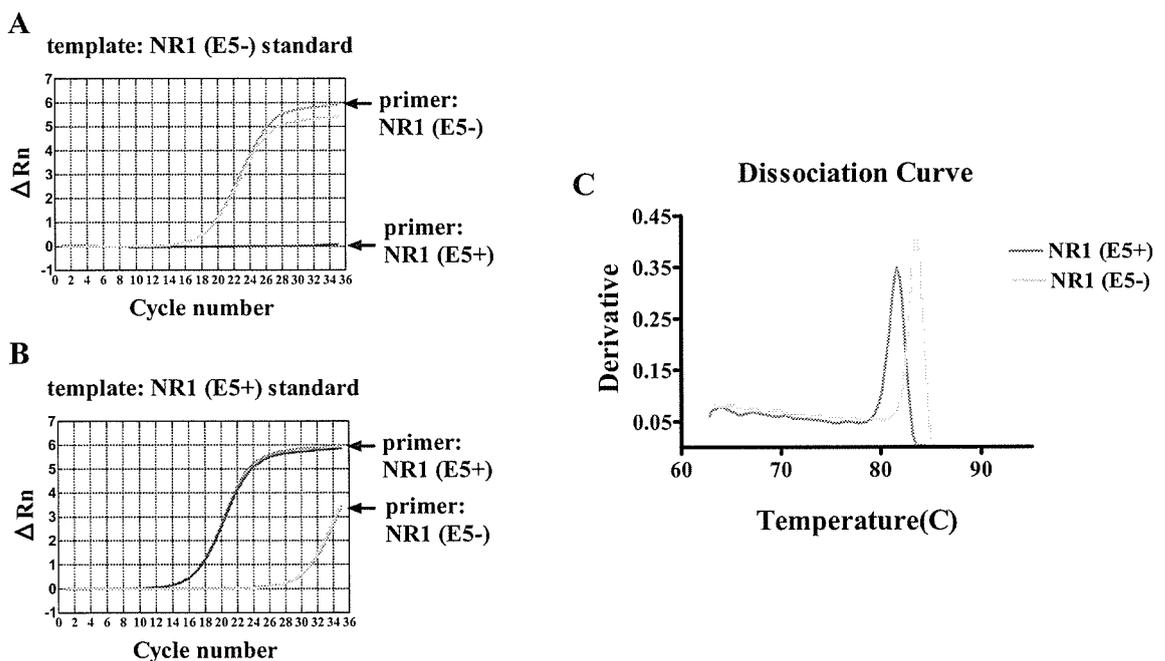
**Fig.1 Location of primers specific for each splice variant in NR1 gene**

**Table 1 Primer sequences designed for each splice variant in NR1 gene**

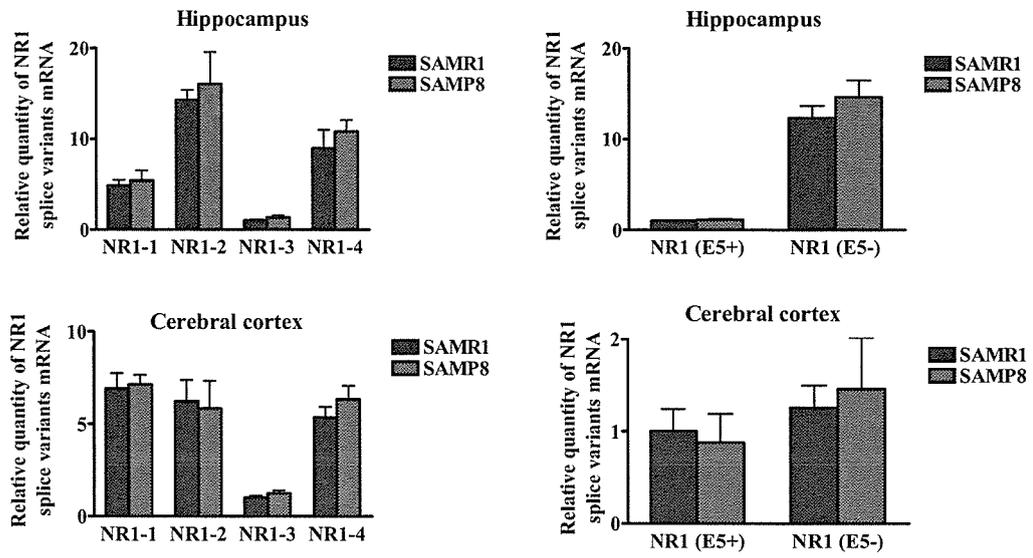
mRNA target	Primer name	Primer sequence	Amplicon size
mNR1-1	mGRIN1-1&3_Forward	5'-GATAGAAAGAGTGGTAGAGCAGAGC-3'	122bp
	mGRIN1-1_Reverse	5'-ACCCCCGGTGCTCGTG-3'	
mNR1-2	mGRIN1-2&4_Forward	5'-CTGGGATCTTCCTCATTTCATC-3'	123 bp
	mGRIN1-2_Reverse	5'-CCCCCGGTGCTCTGCA-3'	
mNR1-3	mGRIN1-1&3_Forward	5'-GATAGAAAGAGTGGTAGAGCAGAGC-3'	126 bp
	mGRIN1-3_Reverse	5'-CAGTGGGATGGTACTGCGTG-3'	
mNR1-4	mGRIN1-2&4_Forward	5'-CTGGGATCTTCCTCATTTCATC-3'	128 bp
	mGRIN1-4_Reverse	5'-CAGTGGGATGGTACTGCTGC-3'	
NR1 E5(+)	GRIN1-N2-Forward	5'-AACTATGAAAACCTCGACCAACTG-3'	102 bp
	GRIN1-N2-Reverse	5'-GGTCCCTGGGTCAAAGTGC-3'	
NR1 E5(-)	GRIN1-N1-Forward	5'-GGAGCGTGAGTCCAAGGC-3'	117 bp
	GRIN1-N1-Reverse	5'-GGCAGAAAGGATGATGACCC-3'	



**Fig 2 Specificity of real-time PCR primers. (A)** Amplification plots of SYBR green real-time PCR for NR1 splice variants (NR1-1~4). **(B)**Melting curve analysis of SYBR Green real-time PCR product of NR1 splice variants (NR1-1~4) after 40 cycles. **(C)** Agarose gel electrophoresis of SYBR Green real-time PCR product of NR1 splice variants (NR1-1~4) after 40 cycles.



**Fig 3 Specificity of real-time PCR primers. (A)** Fluorescent data showing specificity of real-time PCR for NR1(E5-). **(B)** Fluorescent data showing specificity of real-time PCR for NR1(E5+). **(C)** Melting curve analysis of SYBR Green real-time PCR product of NR1 splice variants (NR1(E5-), NR1(E5+)) after 40 cycles.



**Fig 4** Relative quantification of mRNA expression levels of NR1 splice variants mRNA in hippocampus and cerebral cortex of SAMR1 and SAMP8.

## IV. 家庭用品由来化学物質の暴露のシナリオの作成と

### 推計モデル開発の開発に関する研究

#### 1. 家庭用品等の放散測定設備・装置および評価手法の開発

東北文化学園大学大学院 健康社会システム研究科 野崎 淳夫

#### 2. 居住状態における室内化学物質濃度予測手法の開発

東北文化学園大学大学院 健康社会システム研究科 野崎 淳夫

#### 3. 家庭用品中放散性化学物質の総合暴露評価の

シナリオ開発と具体的推定に関する研究

武蔵野大学 薬学部 薬学研究所 環境化学研究室 安藤 正典

## IV. 家庭用品由来化学物質の暴露のシナリオの作成と

### 推計モデルの開発に関する研究

分担研究者 安藤 正典 武蔵野大学 薬学部 薬学研究所 環境化学研究室 教授  
野崎 淳夫 東北文化学園大学大学院 健康社会システム研究科 教授

家庭用品中放散性化学物質の室内での濃度は、室内空間を形成する建築資材からも発生している。このことから、家庭用品に由来する化学物質の室内の濃度予測は計測のみで求めることはできない。この予測モデルの構築が不可欠である一方、人によって暴露によるリスクが極端に異なり、動物実験データを基にしたヒトでの用量－反応評価における基本的不確実係数（種差：10、個体差：10、全体：100）よりもさらに大きな不確実性が発生していることとなる。したがって、暴露によるリスクについて評価するには新たな評価を行う必要があることから、低濃度（平均的）あるいは高濃度暴露におけるリスクの考え方を構築するため、家庭用品から放散される化学物質の室内における放散濃度、頻度、期間などの違いによる暴露評価を行うこととした。さらに、室内空気による化学物質の暴露は人の行動パターンによって大きく左右されて暴露量に反映されることから、我が国における各施設、居室、移動媒体、大気などでの存在状況を把握し、行動パターンを予測し、家庭用品からの化学物質暴露のシナリオ、推計モデルを開発することを目的とした。

本課題では、

- IV－1. 家庭用品等の放散測定設備・装置および評価手法の開発
- IV－2. 居住状態における室内化学物質濃度予測手法の開発
- IV－3. 家庭用品中放散性化学物質の総合暴露評価のシナリオ開発と具体的推定に関する研究

について検討した。

## IV-1. 家庭用品等の放散測定設備・装置および評価手法の開発

分担研究者 野崎淳夫 東北文化学園大学大学院 健康社会システム研究科 教授

### A. はじめに

化学物質の代表的な測定法の一つに、JISで定められた「小形チャンバー法(JIS A 1901)」がある。チャンバーと呼ばれる室(容器)に、常時清浄空気を導入し、試験体の化学物質放散量を測定する手法である。

しかしながら、小形チャンバー法に用いるチャンバーで測定できるのは、化学物質発生量が大きい場合であり、今回測定対象となる家庭用品、事務用品、教材教具は発生量が微量であるため、小形チャンバー法には適用できず、チャンバーの性能向上が求められる。そこで、今回新たに気積約5[m<sup>3</sup>]の大型チャンバーを改良した。本チャンバーは、温度、相対湿度、換気回数、空気清浄度が制御可能である。

本研究では新型チャンバーの温湿度、換気回数について、制御値と実測値の符合率を検証、また、チャンバープランク濃度を測定し、大型チャンバーによる汚染物質測定法確立に資する基礎的資料の収集を行うものとする。

### B. 実験概要

#### 1. 測定項目

測定項目は、温度、相対湿度、換気回数、ホルムアルデヒドおよびVOC濃度とした。

#### 2. 使用機器

- ・光音響法測定機器 (INNOVA 社製、Air Tech Instruments 1312 Photo acoustic Multi-gas Monitor)
  - ・熱線風速計 (KANOMAX 社製、MODEL-6521 Low Velocity)
  - ・温湿度計 (SATO 社製、MODEL: SK-100THP)
- (1) HCHO(固相捕集-溶媒抽出-高速液体クロマトグラフ法)
- ・高速液体クロマトグラフ (日立社製、

Model:L-7000)

- (2) VOC(固相捕集-加熱脱着-ガスクロマトグラフ/質量分析法)

- ・加熱脱着装置 (Perkin Elmer 社製、Turbo Matrix ATD)
- ・ガスクロマトグラフ/質量分析計 (Perkin Elmer 社製、Turbo Mass Gold)

### 3. 実験室概要

今回、性能評価を行う実験チャンバーの概要を図-1、写真-1に示す。本チャンバーは、気積約5[m<sup>3</sup>]を有し、温度(10~40±1[°C])、相対湿度(10~70±1[%])、換気回数(0.5~10±0.05[1/h])、空気清浄度(ホルムアルデヒド濃度: 定量下限値以下、VOC濃度:20[μg/m<sup>3</sup>]以下)の制御が可能である。

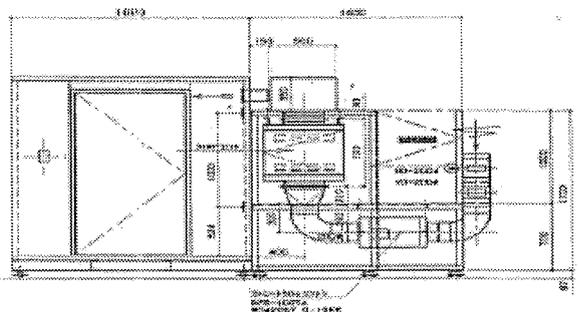


図-1 実験チャンバー概要図

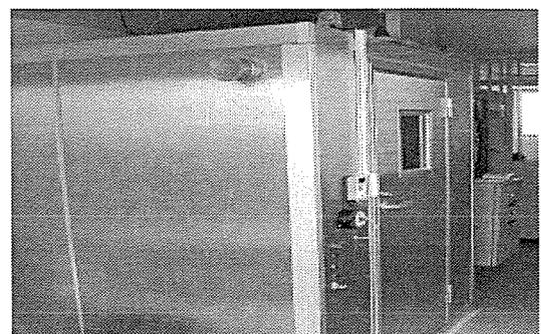


写真-1 新改良した大型実験チャンバー  
(気積:約5[m<sup>3</sup>](気積:約5[m<sup>3</sup>]))

### C. 結果及び考察

#### 1. 換気回数

換気回数については、チェンバー内に六フッ化硫黄ガス(SF<sub>6</sub>)を散布し、その減衰勾配(図-2)から算出した。算出には次式(1)を用いた。結果、設定値0.5[1/h]の場合、実測値では0.42[1/h]であった。

$$N = 2.303 \times \frac{1}{t} \times \log \left\{ \frac{C_1 - C_0}{C_2 - C_0} \right\} \quad (1)$$

*N*: 換気回数 *t*: 測定時間(h)

*C*<sub>1</sub>: 測定開始時における対象汚染物質濃度(mg/m<sup>3</sup>)

*C*<sub>2</sub>: 測定開始から *t* 時間後の対象汚染物質濃度(mg/m<sup>3</sup>)

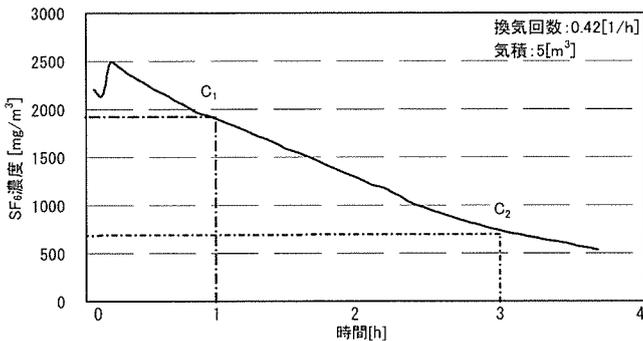


図-2 SF<sub>6</sub>濃度の経時変化

#### 2. 温度・相対湿度

温度については、給気口より取り入れた室外空気を清浄装置に通過させ、温度制御装置を用いて設定温度となるように制御する。相対湿度は、チェンバー外部から供給される純水を気化層にて加熱し、水蒸気と清浄空気を混合させ供給する。制御は相対湿度47[%]~50[%]の範囲で、空気の供給をON・OFFするプログラムを組んだ機械制御である。

温湿度の測定は、熱線風速計と温湿度計を用いて行った。測定結果を図-3に示す。

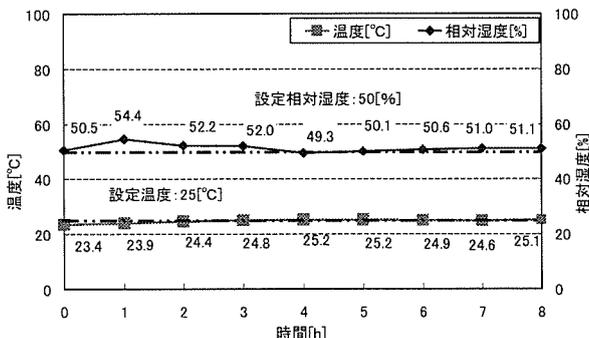


図-3 温室殿設定値と実測値の比較

### 3. 測定対象化学物質のブランク濃度

ホルムアルデヒドとVOCの初期チェンバーブランクについて測定を行った。

#### (1) アルデヒド類

アルデヒド類の初期チェンバーブランク濃度測定結果を図-4に示す。ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドともに高濃度で検出された。ただし、本測定値はチェンバー運用前のブランク濃度であるため、今後、性能を向上させることによりブランク濃度の低減を図る必要がある。

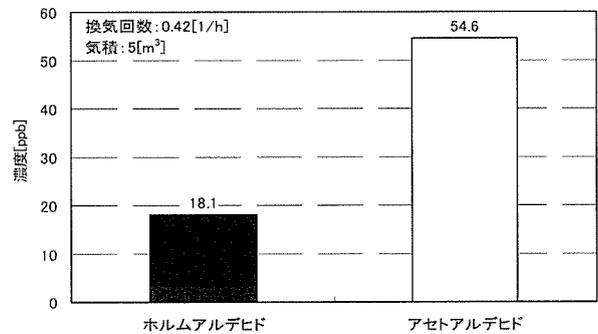


図-4 アルデヒド類のチェンバーブランク濃度

#### (2) VOC

VOCの初期チェンバーブランク濃度測定結果を図-5に示す。

多くのVOC成分が検出され、検出された濃度の総和であるTVOC濃度では882[μg/m<sup>3</sup>]となった。特にトルエンの顕著な発生が示された。

これはチェンバー改良直後のため、接合部のシーリング等の構成部材から発生する化学物質の影響によるものと考えられる。

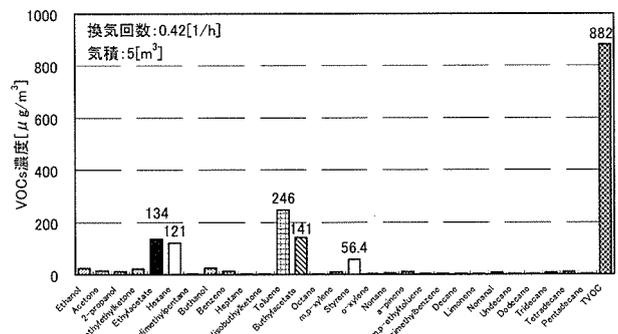


図-5 VOC成分毎のチェンバーブランク濃度

なお、アルデヒド類およびVOC濃度は、本研究で開発の対象とした凝縮装置を使用