

201035028A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

家庭用品から放散される揮発性有機化合物の  
気道刺激性及び感作性を指標とするリスク評価

平成 22 年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者 香川(田中) 聡子

平成 23 (2011) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究年度終了報告書	
家庭用品から放散される揮発性有機化合物の気道刺激性及び感作性を 指標とするリスク評価 香川(田中) 聡子	・・・ 1
II. 分担研究年度終了報告書	
1. 生活環境化学物質の気道刺激性に関する研究	・・・ 9
ーヒト TRP イオンチャネルを活性化する室内環境化学物質のスクリー ニングー 香川(田中) 聡子、神野 透人、古川 容子、新井 悦恵	
2. 生活環境化学物質の感作性に関する研究	・・・ 65
五十嵐 良明	
3. 家庭用品から放散する揮発性有機化合物の同定及び暴露評価に関する 研究	・・・ 79
神野 透人、香川(田中) 聡子、古川 容子、田中 研次	
4. 生活環境化学物質の気道刺激・感作のメカニズムに関する研究	・・・ 99
ー1,2-ナフトキノンに対する Nrf2-Keap1 システムの防御的役割に関す る研究ー 熊谷 嘉人、新開 泰弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 126
IV. 研究成果の刊行物・別刷	・・・ 127

## I. 総括研究年度終了報告書



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究年度終了報告書

家庭用品から放散される揮発性有機化合物の気道刺激性及び感作性を指標とする  
リスク評価

研究代表者 香川(田中) 聡子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官

研究要旨: 本研究は、シックハウス症候群やアレルギー性鼻炎、気管支喘息の発症・増悪要因と考えられる室内環境化学物質として、特に家庭用品から放散される様々な揮発性有機化合物の気道刺激性及び気道感作性を明らかにするとともに、家庭用品からの放散速度を基に算出した推計暴露量を考慮に入れて生活環境中での健康リスクの蓋然性を判定することにより、指針値策定等のリスク管理が必要と考えられる室内空気中の揮発性有機化合物を特定することを目的とする。初年度である平成 22 年度は気道刺激性の *in vitro* 評価法として、化学物質刺激等の侵害受容に關与する Transient Receptor Potential (TRP) イオンチャネルの活性化を指標として、家庭用品から放散される可能性のある化学物質及び室内空气中に実際に存在することが報告されている物質を含む揮発性有機化合物計 97 物質について TRP イオンチャネル活性化の有無、濃度依存性を検討した。その結果、家庭用品から放散することが確認された Butyl acrylate、及び、溶剤として広く使用されシックハウス症候群との因果関係も指摘されている 2-Ethyl-1-hexanol や Texanol をはじめ、実際に室内環境中に存在する消毒副生成物や微生物由来揮発性有機化合物が TRP イオンチャネルを活性化することを明らかにした。また、皮膚感作性試験として開発されたマウスのリンパ節活性化反応を指標とした Non-RI LLNA-DA 法及び THP-1 細胞の細胞表面抗原 CD86 及び CD54 の発現強度の増加を指標とする h-CLAT 法によってアクリル酸及びメタクリル酸並びにそのエステル類 14 種について評価した。その結果、ほとんどの物質に皮膚感作性を検出し、遊離アクリル酸やアルキル鎖の炭素数が多いエステルがより強い反応を引き起こすことが明らかになった。さらに、これら化学物質による刺激性及び感作性のメカニズムを明らかにする目的で、モデル化合物として 1,2-ナフトキノンを用いて検討した結果、毒性防御の生体応答システムとして Nrf2-Keap1 系の重要性を明らかにした。家庭用品から放散される揮発性有機化合物 (VOCs) の評価試験では、一般家庭室内における使用頻度や容積から室内環境への負荷の大きい家庭用品としてカーテン (遮光・防音等の機能付き) やフロアマットを対象として  $\mu$ CTE (Micro-Chamber/Thermal Extractor) 法による放散試験と GC/TOFMS 測定・デコンボリューション解析を適用した結果、N,N-Dimethylformamide、Cyclohexanone、Toluene 及び Butylated hydroxytoluene の他に、2-Ethylhexyl acrylate などのアクリル酸エステル類や Ethanone 化合物など、従来は室内空気中での存在が問題とされていない化合物が比較的高い放散速度でこれらの家庭用品から揮散することが明らかになった。

研究分担者: 五十嵐 良明 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部第二室長)、神野透人(国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部第一室長)

研究協力者: 熊谷 嘉人(筑波大学大学院人間総合科学研究科教授)、新開 泰弘(筑波大学大学院人間総合科学研究科助教)、古川 容子(国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部)、新井 悦恵 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部)

## A. 研究目的

室内環境中の化学物質が発症の原因あるいは増悪因子となり得る疾病として、いわゆるシックハウス症候群、アレルギー性鼻炎や気管支喘息等の疾病があるが、その発症メカニズムの詳細は十分に解明されていない。本研究では、家庭用品から放散される様々な揮発性有機化合物について、気道刺激性及び気道感作性を明らかにするとともに、家庭用品からの放散速度から算出した推計暴露量を考慮に入れて生活環境中での健康リスクの蓋然性を判定する。

1997-2002 年に揮発性/準揮発性有機化合物 13 物質に室内濃度指針値、総揮発性有機化合物に暫定目標値が策定された。この先駆的な施策は室内空気質に対する国民の関心の高まりと相まって、2003 年の改正建築基準法の施行を経て、我が国の室内空気質の改善に重要な役割を果たした。しかしながら、指針値策定から 8 年以上が経過した今、この間の代替溶剤等への転換や生活様式の変化を踏まえた揮発性有機化合物暴露の再評価、指針値の追加・見直しの議論が必要な状況にあると考えられる。

このような背景から、本研究では家庭用品からの化学物質放散をマイクロチャンパー

法等の手法により定量化し、経気道暴露濃度/暴露量を推計する。また、有害作用として侵害刺激受容体の活性化による気道刺激性及び呼吸器/皮膚感作性について定量的な評価を実施する。さらに、推計暴露量と有害作用の強度を考慮に入れて生活環境中での健康リスクを判定し、指針値の策定等によるリスク管理が必要な室内空気中の揮発性有機化合物を特定したプライオリティーリストを作成することを目的とする。

本研究代表者らは、既に医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室の委託事業として実施した放散試験において液晶テレビから約 30  $\mu\text{g}$  トルエン相当/unit/h の速度でアクリル酸エステル類が放散されることを確認している。液晶テレビは現在急速に普及しており、家具や建材に使用されるアクリル樹脂塗料からも残存モノマーが揮散する可能性があることから、複数の家庭用品に由来するアクリル酸/メタクリル酸エステル類の暴露を喫緊に評価する必要があると判断した。そこで本年度は、塗料や粘・接着剤、アクリル樹脂等の原料として利用されており、既に呼吸器/皮膚感作性が確認されている物質も含まれているアクリル酸/メタクリル酸エステル類を主要な対象化合物として検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1 生活環境化学物質の気道刺激性に関する研究

温度刺激や機械刺激、化学物質刺激の侵害受容に関与する Transient Receptor Potential (TRP) イオンチャンネルに着目し、ヒト TRPA1 及び TRPV1 を安定的に発現する Flp-In 293 細胞株の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加を指標とするハイスループットアッセイ系を確立し、家庭用品から放散される可能性

のある化合物群として、アクリル酸/メタクリル酸エステル類をはじめとする 49 物質、及び実際に室内環境中で検出されることが報告されている微生物由来揮発性有機化合物や消毒副生成物を含む 48 物質合計 97 物質についてヒト TRPA1 及び TRPV1 に対する活性化能を評価した。

#### B-2 生活環境化学物質の感作性に関する研究

気道感作性については現時点で確立した実験動物による評価系は存在しないため、本研究ではマウスを用いるリンパ節反応試験 (LLNA; OECD テストガイドライン 429) を主に、THP-1 細胞の細胞表面抗原 CD86 及び CD54 の発現強度の増加を指標とする human Cell Line Activation Test (h-CLAT) によってアクリル酸及びメタクリル酸並びにそのエステル類 14 種について評価した。

#### B-3 家庭用品から放散する揮発性有機化合物の同定及び暴露評価に関する研究

遮光、防音あるいは遮熱加工等の表記のある機能カーテン 12 製品並びに床用マット 12 製品を対象として、 $\mu$ -CTE (Micro-Chamber/Thermal Extractor) チャンバーを用いる超小形チャンバー法によって放散試験を実施した。サンプリングした放散ガスについて加熱脱離-GC/TOFMS による TVOC の定量、デコンボリューション解析による未同定 VOCs の暫定的な同定を行った。

#### B-4 生活環境化学物質の気道刺激・感作のメカニズムに関する研究

大気中に存在する揮発性有機化合物 1,2-ナフトキノン (1,2-NQ) をモデル化合物として、NF-E2-related factor 2 (Nrf2) - Keap1 システムの防御的役割を明らかにす

るために、先ず 1,2-NQ を認識する抗体を作製してその反応特異性を検討し、マウス初代肝細胞を用いた細胞応答試験および毒性試験を行った。

#### C. 研究結果

##### C-1 生活環境化学物質の気道刺激性に関する研究

本年度の主要対象化合物としたアクリル酸/メタクリル酸とそのエステル類 14 物質について TRP イオンチャネル活性化能を評価した結果、Butyl acrylate がヒト TRPA1 を活性化することが明らかとなった。本年度はアクリル酸/メタクリル酸とそのエステル類以外に家庭用品から放散する可能性のある物質として、可塑剤/難燃剤リン酸トリエステル類、可塑剤フタル酸エステル類及びその代謝生成物、及び実際に室内空気中の汚染化学物質として微生物由来揮発性有機化合物、消毒副生成物等合計 97 物質について検討した。その結果、可塑剤/難燃剤として使用されているリン酸トリエステル類の中で、主にポリウレタン発泡材に難燃剤として用いられる Tris(2-chloroisopropyl) phosphate や一般家庭のハウスダスト中からも比較的高濃度で検出される Tris(butoxyethyl) phosphate が TRPV1 及び TRPA1 を活性化することが明らかになった。また、可塑剤として広く用いられている TXIB も活性化の程度は弱いながら、比較的低濃度で TRPV1 を活性化することが判明した。可塑剤フタル酸エステル類に関しては、ハウスダスト中で極めて高濃度で検出される Bis(2-ethylhexyl) phthalate にイオンチャネルの活性化能は認められなかったが、その加水分解物でハウスダスト中に検出される Monoethylhexyl phthalate が TRPA1 を活性化することが明らかになった。溶剤として



も広く使用されシックハウス症候群との因果関係が指摘されている 2-Ethyl-1-hexanol や Texanol も TRPA1 を活性化することが明らかになった。また、実際に室内環境中に存在する消毒副生成物や微生物由来揮発性有機化合物、大気環境汚染物質であるナフトキノン類の中にも比較的low濃度領域でこれらイオンチャネルを活性化する物質が見いだされた。以上の結果から、家庭用品から放散され、また、実際に室内環境中で検出されるこれら化合物が、TRPV1 及び TRPA1 の活性化を介して気道の刺激を引き起こす可能性が考えられる。

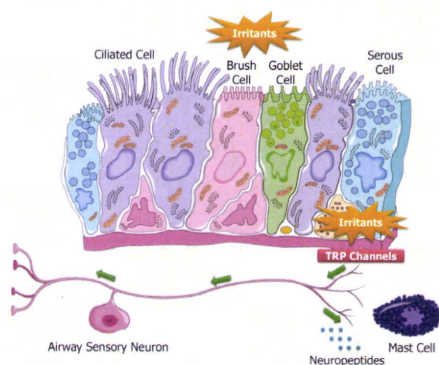


Fig. 1 Schematic presentation of airway hypersensitivity mediated by TRP ion channels.

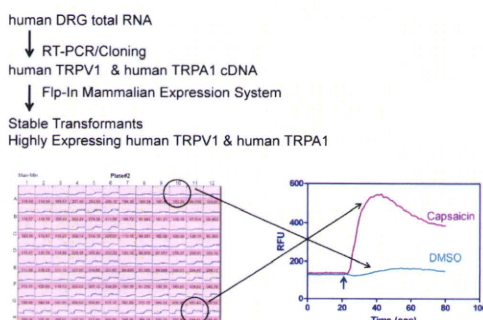


Fig. 2 High-throughput assay for TRP activation.

### C-2 生活環境化学物質の感作性に関する研究

LLNA-DA 法では、メタクリル酸エステル類のうち Butyl methacrylate (MB)、2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate (M2-DE)、2-Ethylhexyl methacrylate (M2-EH)、2-Hydroxyethyl methacrylate (M2-HE) が感作性陽性と判定され、アクリル酸エステル類はほとんどが陽性と判定された。全体的にメタクリル酸エステル類よりアクリル酸エステル類の方が高い SI 値を示した。メタクリル酸エステル類はいずれも陽性対照物質の  $\alpha$ -Hexyl cinnamaldehyde と同程度か、あるいはそれ以下の反応を示した。メタクリル酸エステル類のいくつかについては h-CLAT 法でも感作性陽性と評価された。細胞表面抗原 CD54 及び CD86 の発現増加率または陽性基準の増加率を示す最低濃度を求めてメタクリル酸エステル類の感作性強度を順序づけたが、h-CLAT 法と LLNA-DA 法との間に感作性強度順序の明らかな一致性は認めなかった。試験物質の水への溶解度及びその細胞毒性強度がそれぞれの試験法での結果に影響している可能性が示唆された。

### C-3 家庭用品から放散する揮発性有機化合物の同定及び暴露評価に関する研究

$\mu$ CTE 法による放散試験と GC/TOFMS 測定・デコンボリューション解析の結果、N,N-Dimethylformamide、Cyclohexanone、Toluene 及び Butylated hydroxytoluene の他に、2-Ethylhexyl acrylate などのアクリル酸エステル類や Ethanone 化合物など、従来は室内空気中での存在が問題とされていない化合物が比較的高い放散速度でこれらの家庭用品から揮散することが明らかになった。特に、前者の化合物群の中には皮膚感



作性が疑われる化合物が含まれており、免疫交差性を考慮した健康影響の評価並びに室内環境における複合的な暴露量の評価を進める必要性が示された。

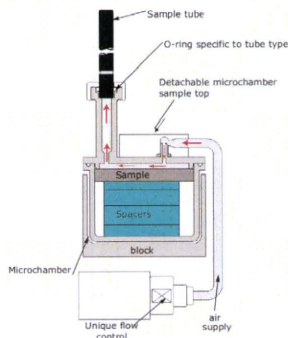


Fig. 3 High-throughput screening for volatile organic compounds emitted from household products.

#### C-4 生活環境化学物質の気道刺激・感作のメカニズムに関する研究

1,2-NQ をマウス初代肝細胞に曝露すると Keap1 への共有結合に伴い、転写因子 Nrf2 が活性化され、さらに、下流の解毒酵素群の発現誘導が引き起こされることが判明した。Nrf2 欠損マウスより単離した初代肝細胞では、1,2-NQ による細胞内タンパク質への化学修飾が野生型より増加し、その毒性も増強した。一方、Keap1 欠損細胞では 1,2-NQ に

よる細胞内タンパク質への共有結合が野生型より減少し、その毒性も抑制された。以上の結果より、1,2-NQ に対する毒性防御の細胞応答システムとして、Nrf2-Keap1 系が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

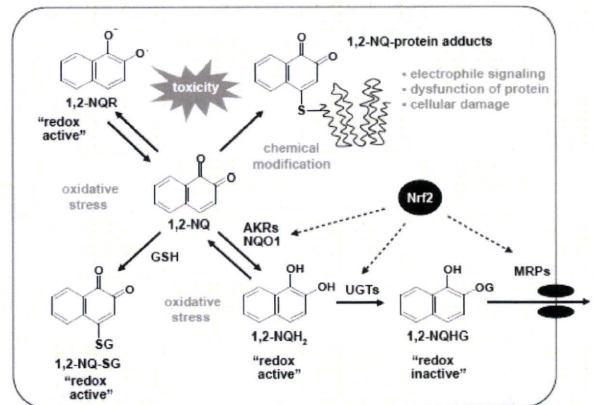


Fig. 4 Role of Nrf2 in the metabolic activation associated with oxidative stress and detoxification of 1,2-NQ.

1,2-NQR, semiquinone radical of 1,2-NQ; 1,2-NQ-SG, GSH adduct of 1,2-NQ; 1,2-NQH<sub>2</sub>, 1,2-dihydroxynaphthalene; 1,2-NQHG, monoglucuronide of 1,2-NQH<sub>2</sub>.

#### D. 考察

本研究では、指針値の策定等によるリスク管理が必要な室内空気中の揮発性有機化合物を特定したプライオリティーリストを作成することを最終的な目標として、家庭用品から放散される化学物質をマイクロチャンバー法/GC/TOFMS 測定・デコンボリューション解析手法により定量化し、経気道暴露濃度/暴露量を推計すると共に、本年度はアクリル酸/メタクリル酸エステル類を評価対象物質として、侵害刺激受容体の活性化による気道刺激性及び呼吸器/皮膚感作性について定量的な評価を実施した。

本研究で神野らが実施した家庭用品から放散される化学物質の GC/TOFMS 測定・デコンボリューション解析の結果では、



N,N-Dimethylformamide、Cyclohexanone、Toluene 及び Butylated hydroxytoluene の他に、従来は室内空気中での存在が問題とされていない 2-Ethylhexyl acrylate などのアクリル酸エステル類や Ethanone 化合物などが比較的高い放散速度でこれらの家庭用品から揮散することが明らかになった。本研究で放散試験の対象とした家庭用品は遮光、防音あるいは遮熱加工等の表記のある機能カーテン 12 製品並びに床用マット 12 製品であったが、神野らは平成 22 年度に実施した大形チャンバー法を用いた放散試験結果において、薄型テレビ、パーソナルコンピューター及びプリンターそれぞれ 3 製品合計 9 製品すべてから 2-Ethylhexyl acrylate が最大で 1665 µg/unit/h (印刷動作中のプリンター)で放散されること、9 製品中 7 製品から最大で 626 µg/unit/h (印刷動作中のプリンター)放散されること報告している(厚生労働省 化学物質安全対策費)。2-Ethylhexyl acrylate については、実際に五十嵐が実施した感作性に関する試験法である LLNA-DA 法及び h-CLAT 法において共に感作性陽性と評価された。また、香川らが気道刺激性の評価試験として実施した侵害刺激受容体・TRP イオンチャンネル活性化物質のスクリーニングにおいても、Butyl acrylate がヒト TRPA1 を活性化することが明らかになった。従って、実際に家庭用品から放散されるこれらアクリル酸エステル類・メタクリル酸エステル類が TRP イオンチャンネルを介した感覚神経あるいは気道の刺激を引き起こす可能性が考えられる。

香川らはアクリル酸/メタクリル酸エステル類以外に室内に存在する可能性のある物質や室内環境汚染物質としてシックハウス症候群との因果関係が指摘されている 2-Ethyl-1-hexanol や Texanol を含む 97 物

質について TRP イオンチャンネルの活性化能を検討した。その結果、43 物質が TRPV1 及び TRPA1 のいずれか又は両チャンネルの活性化を引き起こすことが明らかとなった。これら化合物が複数種類同時に同一室内を汚染している状況は容易に想定できる。この場合には、TRPV1 又は TRPA1 をターゲットとして相加的及び相乗的な影響が引き起こされることが予想される。

以上本研究によって結果は、指針値の策定等によるリスク管理が必要な室内空気中の揮発性有機化合物を特定したプライオリティリストを作成するうえで重要となるのみならず、未だ十分に解明されていないシックハウス症候群や本態性多種化学物質過敏状態の発症メカニズムを明らかにする上でも極めて重要な情報であると考えられる。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### F-1. 論文発表

- 1) Ohkawara, S., Tanaka-Kagawa, T., Furukawa, Y., Nishimura, T. and Jinno, H.: Activation of the Human Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 by Essential Oils. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1434-1437, 2010
- 2) Ohkawara, S., Tanaka-Kagawa, T., Furukawa, Y., Nishimura, T. and Jinno, H.: Development of a SYBR Green Real-time Polymerase Chain Reaction Assay for Quantitative Detection of Human N-methyl-D-aspartate Receptors Subtype 1 Splice Variants. *J. Health Sci.*, **56**, 527-533, 2010

- 3) Miura, T. and Kumagai, Y.:  
Immunochemical method to detect proteins that undergo selective modification by 1,2-naphthoquinone derived from naphthalene through metabolic activation. *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 843-852, 2010
- 4) Miura, T., Shinkai, Y., Jiang, HY., Iwamoto, N., Sumi, D., Taguchi, K., Yamamoto, M., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Cho, AK. and Kumagai, Y.: Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chem. Res. Toxicol.*, **24**, 559-567, 2011

#### F-2. 学会発表

- 1) 神野 透人, 古川 容子, 大河原 晋, 西村 哲治, 香川(田中) 聡子: ハロアセトニトリル類によるヒト侵害刺激受容体 TRPA1 及び TRPV1 の活性化. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010.6)
- 2) 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 大河原 晋, 西村 哲治, 神野 透人: Microbial Volatile Organic Compounds によるヒト侵害刺激受容体 TRPA1 及び TRPV1 の活性. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010.6)
- 3) 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 大河原 晋, 西村 哲治, 神野 透人: 室内環境化学物質による TRP イオンチャネルの活性化. 第 19 回日本臨床環境医学会学術集会 (2010.7)
- 4) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 西村 哲治: 計算化学による半揮発性有機化合物の室内環境動態予測に関する研究. フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010.9)
- 5) 大河原 晋, 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 西村 哲治, 神野 透人: ナフトキノン及びフェナントラキノンによる侵害受容体 TRP イオンチャネルの活性化. フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010.9)
- 6) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 古川 容子, 埴岡 伸光, 西村 哲治, 成松 鎮雄, 神野 透人: リン酸エステル系可塑剤・難燃剤の TRP イオンチャネルに対する影響. フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010.9)
- 7) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 西村 哲治: フラックス発生量測定法による大形木製家具から放散されるアルデヒド類の定量的評価手法に関する研究. 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
- 8) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 西村 哲治: フラックス発生量測定法による大形木製家具から放散される VOC の定量的評価手法に関する研究. 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
- 9) 古川 容子, 香川(田中) 聡子, 神野 透人, 西村 哲治: 繊維製品中の難燃剤の DART-TOFMS を用いた迅速スクリーニング法の開発. 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
- 10) 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 神野 透人, 西村 哲治: 大形チャンバー法を用いた大形木製家具からのアルデヒド類及び VOC の放散に関する研究. 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)



- 11) Jinno H., Furukawa Y.,  
Tanaka-Kagawa T. and Nishimura T.:  
Screening of Flame Retardants in  
Textiles by DART-TOFMS. The 2nd  
Korea-Japan Symposium on  
Environmental Chemistry (2010.11)
- 12) Tanaka-Kagawa T. Jinno H.,  
Furukawa Y. and Nishimura T.: Field  
Survey on the Phthalates in House  
Dust and Residential Air. The 2nd  
Korea-Japan Symposium on  
Environmental Chemistry (2010.11)
- 13) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 古川 容子,  
西村 哲治: 大形家具から放散されるアル  
デヒド類及び揮発性有機化合物のフラ  
ックス発生量測定法による予測. 平成  
22 年度室内環境学会学術大会  
(2010.12)
- 14) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 古川 容  
子, 西村 哲治, 神野 透人: TXIB 及び  
Texanol によるヒト侵害刺激受容器  
TRP イオンチャネルの活性化. 平成 22  
年度室内環境学会学術大会 (2010.12)
- 15) 古川 容子, 香川(田中) 聡子, 田中 研次,  
神野 透人, 西村 哲治: 機能カーテンか  
ら放散される揮発性有機化合物—  
GC/TOFMS による網羅的解析. 平成 22  
年度室内環境学会学術大会 (2010.12)
- 16) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 古川 容子,  
西村 哲治: 家庭用品からの準揮発性有  
機化合物の放散に関する研究. 日本薬学  
会第 131 年会 (2011.3)
- 17) 竹香川(田中) 聡子, 古川 容子, 大河原  
晋, 西村 哲治, 神野 透人: 室内環境化  
学物質 Texanol 及び TXIB によるヒト侵  
害刺激受容器 TRP イオンチャネルの活  
性化. 日本薬学会第 131 年会 (2011.3)
- 18) 成田 一輝, 千葉 弘太郎, 中森 俊輔,  
香川(田中) 聡子, 神野 透人, 小林 義  
典: ストレス誘発性冷えモデルに対  
する Capsiate の冷え改善効果. 日  
本薬学会第 131 年会 (2011.3)
- 19) Shinkai, Y., Kumagai, Y., Kimura, T.,  
Yamamoto, C., Yamamoto M., Jinno,  
H., Tanaka-Kagawa, T. and Kaji, T.:  
The Keap1-Nrf2 system regulates  
metallothionein expression and  
protects vascular endothelial cells  
from cadmium cytotoxicity. Society of  
Toxicology 50<sup>th</sup> Annual Meeting  
(2011.3)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含  
む)
- G-1. 特許取得  
なし
- G-2. 実用新案登録  
なし

## II. 分担研究年度終了報告書



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究年度終了報告書

家庭用品から放散される揮発性有機化合物の気道刺激性及び感作性を指標とする  
リスク評価

生活環境化学物質の気道刺激性に関する研究  
ーヒト TRP イオンチャネルを活性化する室内環境化学物質のスクリーニングー

研究分担者 香川(田中) 聡子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官  
研究代表者 神野 透人 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室長  
研究協力者 古川 容子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室  
研究協力者 新井 悦恵 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室

研究要旨：家庭用品から放散される様々な揮発性有機化合物について、気道刺激性の有無や濃度依存性を明らかにする目的で、温度刺激や機械刺激、化学物質刺激の侵害受容に関与する Transient Receptor Potential (TRP) イオンチャネルの活性化を指標として 97 物質について評価した。その結果、実際に液晶テレビやパーソナルコンピューターから放散することが確認された Butyl acrylate がヒト TRPA1 を、また、可塑剤/難燃剤として使用されているリン酸トリエステル類の中で、主にポリウレタン発泡材に難燃剤として用いられる Tris(2-chloroisopropyl) phosphate や一般家庭のハウスダスト中からも比較的高濃度で検出される Tris(butoxyethyl) phosphate が TRPV1 及び TRPA1 を活性化することが明らかになった。また、可塑剤として広く用いられている TXIB も活性化の程度は弱いながら、比較的低濃度で TRPV1 を活性化することが判明した。可塑剤フタル酸エステル類に関しては、ハウスダスト中で極めて高濃度で検出される Bis(2-ethylhexyl) phthalate にイオンチャネルの活性化能は認められなかったが、その加水分解物でハウスダスト中に検出される Monoethylhexyl phthalate が TRPA1 を活性化することが明らかになった。溶剤としても広く使用されシックハウス症候群との因果関係が指摘されている 2-Ethyl-1-hexanol や Texanol も TRPA1 を活性化することが明らかになった。また、実際に室内環境中に存在する消毒副生成物や微生物由来揮発性有機化合物、大気環境汚染物質であるナフトキノン類の中にも比較的低濃度領域でこれらイオンチャネルを活性化する物質が見いだされた。以上の結果から、家庭用品から放散され、また、実際に室内環境中で検出されるこれら化合物が、TRPV1 及び TRPA1 の活性化を介して気道の刺激を引き起こす可能性が考えられる。

## A. 研究目的

室内環境中の化学物質が発症の原因あるいは増悪因子となり得る疾病として、いわゆるシックハウス症候群や化学物質過敏症の他に、アレルギー性鼻炎や気管支喘息、アトピー性皮膚炎等の疾病がある。これらの疾病への関与が疑われる典型的な化学物質として 1999 年に室内濃度指針値が策定されたホルムアルデヒドが挙げられるが、その他の室内環境化学物質について特に経気道暴露による免疫毒性の観点からリスク評価を行った例は極めて限られている。そこで、本研究では、家庭用品から放散される様々な揮発性有機化合物について、気道刺激性の有無や濃度依存性を明らかにすることを目的とする。

気道刺激性に関しては、これまでに確立された *in vitro* の評価手法がないために、本研究では Transient Receptor Potential (TRP) イオンチャネルの活性化を指標とする。TRP イオンチャネルは末梢神経などに発現し、温度刺激や機械刺激、化学物質刺激の侵害受容に関与する一群の 6 回膜貫通型陽イオンチャネルである。最近の研究で、TRP イオンチャネルサブファミリーの一つである TRPA1 は、ホルムアルデヒド、アクロレイン、パラベン類、ニコチンなど多様な生活環境化学物質によって活性化され、気管支喘息における気道の炎症及び過反応性に重要な役割を果たすことが動物実験によって明らかにされている (Fig. 1)<sup>2, 3)</sup>。本研究では樹立したヒト TRPV1 及び TRPA1 発現細胞株を用いてハイスループットアッセイ系を構築し、3 年間の研

究期間内に延べ 150 化合物についてスクリーニング試験を実施することを目標とする。

本年度の研究ではまず、評価の対象とする化学物質としてアクリル酸/メタクリル酸エステル類を選定した。これら化合物は、塗料や粘・接着剤、アクリル樹脂等の原料として利用されており、既に呼吸器/皮膚感作性が確認されている物質も含まれている。また、厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室の委託事業として実施した放散試験において液晶テレビから約 30 µg トルエン相当/unit/h の速度でアクリル酸エステル類が放散されることを確認している。液晶テレビは現在急速に普及しており、家具や建材に使用されるアクリル樹脂塗料からも残存モノマーが揮散する可能性があることから、複数の家庭用品に由来するアクリル酸/メタクリル酸エステル類の暴露を喫緊に評価する必要があると判断した。また、Dimethyl fumarate は欧州向けの中国製ソファーに防かび剤として使用されて皮膚障害を生じた物質であり、アクリル酸エステルと構造類似性を有することからフマル酸エステル類も対象物質に含めることとした。

これら以外に、家庭用品から放散する可能性のある物質として、可塑剤/難燃剤リン酸トリエステル類、可塑剤フタル酸エステル類及びその代謝生成物、及び実際に室内空気中の汚染化学物質として微生物由来揮発性有機化合物、消毒副生成物等合計 97 物質を対象としてヒト TRPV1 及び TRPA1 活性化物質のスクリーニングを行い、一部の物質については



その活性化様式の濃度依存性を検討した。      ンパク質の発現を確認した。

## B. 研究方法

### B-1. ヒト TRPV1 及び TRPA1 安定発現細胞株の樹立

ヒト後根神経節 Total RNA より RT-PCR によって増幅した TRPV1 及び TRPA1 cDNA を pENTR/D-TOPO Vector にクローニングした。先ず、得られた pENTR/hTRPV1、pENTR/hTRPA1 から Gateway LR 反応により pECFP-DEST/TRPV1、pECFP-DEST/TRPA1 並びに pcDNA-DEST40/TRPV1、pcDNA-DEST40/TRPA1 を構築し、HEK293 細胞に一過性に発現させて、hTRPV1 及び hTRPA1 がタンパク質レベルで発現することを確認した後に、安定発現細胞株の樹立を目的として、pENTR/hTRPV1、pENTR/hTRPA1 から Gateway LR 反応により pEF5/FRT/V5-DEST Vector にサブクローニングし、得られた Plasmid を Lipofectamine LTX (Invitrogen)を用いて pOG44 Vector とともに Flp-In 293 細胞に Co-transfection した。48 時間後から Hygromycin B を添加した選択培地中で培養を行って耐性細胞株を選択し、ヒト TRPV1 及び TRPA1 安定発現細胞株を樹立した (hTRPV1/Flp-In 293, hTRPA1/Flp-In 293)。

得られたクローンの細胞タンパク質を 10% Polyacrylamide Gel を用いて SDS-PAGE で分離した後に PVDF メンブレンに転写し、HRP 標識抗 V5 抗体で免疫染色を行って TRPV1 及び TRPA1 タ

### B-2.イオンチャネル活性化評価法

樹立したヒト TRPV1 及び TRPA1 安定発現細胞を用いて細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の増加を指標として被検物質による TRPV1 及び TRPA1 イオンチャネルの活性化を評価した。細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の測定には FLIPR Calcium 5 Assay Kit (Molecular Devices, Inc.)を用いた。96-well plate に hTRPV1/Flp-In 293 又は TRPA1/Flp-In 293 を 1well あたり  $4 \times 10^4$  個播種した。24 時間培養後に、培地を除去し Calcium indicator (Calcium 5)を添加して 37°C で 1 時間インキュベーションした。FlexStation 3 (Molecular Devices, Inc.)において、被検物質添加後の蛍光強度の経時的な変化を励起波長 485 nm、蛍光波長 525 nm の条件で測定した。活性化の程度は、相対蛍光強度 (Relative fluorescence units)の差、あるいはそれぞれのイオンチャネルの典型的な活性化物質である Capsaicin (TRPV1) 及び Cinnamic aldehyde (TRPA1) による活性化能に対する比率で示した。評価に用いる化合物は、可能な限り高純度の試薬を入手した。

### B-3.統計的解析手法

結果の解析は Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。

## C. 結果及び考察

### C-1.ヒト TRPV1 及び TRPA1 活性化物質

ハイスループットアッセイ系の確立 TRPV1 及び TRPA1 cDNA をヒト後根

神経節 Total RNA よりクローニングして、それぞれのタンパク質の C 末端側に蛍光タンパク質 ECFP を融合させ、細胞内局在観察用ベクターを構築した (pECFP-DEST/TRPV1、pECFP-DEST/TRPA1)。これらベクターを HEK293 細胞に導入し一過性に発現させて蛍光顕微鏡で観察した。その結果、ヒト TRPV1 及び TRPA1 がそれぞれ細胞膜に存在することが確認された (Fig. 2)。さらに、V5 タグタンパク質発現ベクター pcDNA-DEST40/TRPV1 及び pcDNA-DEST40/TRPA1 構築し HEK293 細胞に導入して 48 時間後の細胞を RIPA buffer で可溶化して HRP 標識抗 V5 抗体を用いる Western blotting を行った。その結果、ヒト TRPV1 及び TRPA1 それぞれが相当する分子量のタンパク質として発現することが確認できた (Fig. 2)。

このように目的とするタンパク質が発現することが確認されたので、クローニングした cDNA を用いて安定発現細胞株を樹立し、FLIPR Calcium 5 Assay Kit を用いて細胞内カルシウム濃度の上昇を指標とするイオンチャネル活性化のハイスループットアッセイ法を確立した (Fig. 3)。確立したアッセイ法によって、イオンチャネルの典型的な活性化物質 Capsaicin (TRPV1) 及び Cinnamic aldehyde (TRPA1) の活性化能を評価した。Capsaicin 及び Cinnamic aldehyde による活性化の濃度依存性を調べた結果、EC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.017  $\mu$ M (Capsaicin)、22  $\mu$ M (Cinnamic aldehyde) であり、これまでに報告されている値に匹敵する値

であった (Fig.4)。

以上の結果から、本研究で確立したヒト TRPV1 及び TRPA1 活性化物質ハイスループットアッセイ系は、これらイオンチャネルを活性化する室内環境化学物質をスクリーニングする方法として有用であることが確認できた。

## C-2. ヒト TRP イオンチャネルを活性化する室内環境化学物質のスクリーニング

本研究で評価の対象とした化学物質のリストを Table 1 に示す。先ず家庭用品から放散される可能性のある化合物群として、接着剤やアクリル樹脂等の原料として使用されているアクリル酸/メタクリル酸とそのエステル類 14 物質と試薬中に含まれる安定化剤 1 物質、皮革製品等の防かび剤として使用される Dimethyl fumarate をはじめとするフマル酸エステル類 6 物質、可塑剤/難燃剤リン酸トリエステル類 11 物質、可塑剤として使用されるフタル酸エステル/アジピン酸エステル類とその加水分解物 14 物質、可塑剤 TXIB、溶剤 Texanol 及びその類縁化合物を含む合計 49 物質を選定した。

また、環境化学物質として金属化合物及びナフトキノロン類 10 物質、及び実際に室内環境中で検出されることが報告されている物質として微生物由来揮発性有機化合物 (Microbial Volatile Organic Compounds; MVOC) 17 物質、及びトリハロメタンやハロアセトニトリルなどの消毒副生成物 (Disinfection by-product) 21 物質、合計 48 物質を選定した。



#### <アクリル酸及びメタクリル酸をそのエステル類>

アクリル酸及びメタクリル酸とそのエステル類 14 物質について、ヒト TRPV1 及び TRPA1 に対する活性化能を評価した。尚、試薬中に安定化剤として含まれる *p*-Methoxyphenol についても評価した。それぞれの化学構造式を Fig. 5 に示す。その結果、TRPV1 に対する活性化能は本研究で対象とした 14 物質には認められなかったが、Butyl acrylate 及び Butyl methacrylate が TRPA1 を活性化する作用を有することが明らかになった (Fig. 6 & Fig. 7)。尚、いずれの物質によっても TRPV1 及び TRPA1 を発現しない Flp-In 293 細胞への  $Ca^{2+}$  の流入は認められなかった。

著者らはこれまでに家庭用品から放散される揮発性有機化合物の評価試験を実施し、パーソナルコンピューターやテレビ等多種多様な家庭用品からある種のアクリル酸エステル類・メタクリル酸エステル類が放散することを見いだしている。平成 22 年度には薄型テレビから放散されるアクリル酸及びメタクリル酸エステル類 6 物質について大形チャンバー法を用いて定量的に評価した結果、調査した 3 製品すべてから Butyl acrylate (0.4  $\mu\text{g}/\text{unit}/\text{h}$  - 1.8  $\mu\text{g}/\text{unit}/\text{h}$ ) が放散されること、印刷動作中のプリンターからは最大で 626  $\mu\text{g}/\text{unit}/\text{h}$  の速度で放散されることを報告した (厚生労働省 化学物質安全対策費)<sup>4)</sup>。実際に家庭用品から放散されるこれらアクリル酸エステル類・メタクリル酸エステル類が TRPA1 を介した感覚神経あるいは気道の刺激を引き起

こす可能性が考えられる。

#### <フマル酸エステル類>

建材、家具や皮革製品などの防腐剤・乾燥剤として使用されている Dimethyl fumarate による皮膚炎の発症事例が報告されている。本研究では Dimethyl fumarate をはじめとするフマル酸エステル類 6 物質についてヒト TRPV1 及び TRPA1 に対する活性化能を評価した。それぞれの化学構造式を Fig. 8 に示す。その結果、TRPV1 に対する顕著な活性化能は本研究で対象とした 6 物質には認められなかったが、Diethyl fumarate が TRPA1 を活性化する作用を有することが明らかになった (Fig. 9)。尚、Diethyl fumarate によって TRPV1 及び TRPA1 を発現しない Flp-In 293 細胞への  $Ca^{2+}$  の流入は認められなかった。

#### <リン酸トリエステル類>

リン酸エステル類は可塑剤あるいは難燃剤としてプラスチック製品や繊維製品等に幅広く使用されており、製品からの放散・溶出によって室内環境中へ移行すると考えられる。実際に一般家庭の室内空気やハウスダスト中からもリン酸エステル類が検出されており<sup>5)</sup>、室内環境中での暴露による健康影響が懸念されている。リン酸トリエステル類 11 化合物についてヒト TRPV1 及び TRPA1 に対する活性化能を評価した。それぞれの化学構造式を Fig. 10 に示す。その結果、TRPV1 に対しては Tributyl phosphate、Tris(2-chloroisopropyl) phosphate 及び Tris(butoxyethyl) phosphate が、TRPA1

に対しては Tributyl phosphate 及び Tris(butoxyethyl) phosphate が顕著な活性化作用を示すことが明らかになった (Fig. 11)。中でも、Tributyl phosphate 処理によって、TRPV1 及び TRPA1 のいずれも典型的な陽性対照物質である Capsaicin や Cinnamic aldehyde と同等もしくはそれ以上の活性化が観察された (Fig. 11)。尚、いずれの物質によっても TRPV1 及び TRPA1 を発現しない Flp-In 293 細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入は認められなかった。Tripropyl phosphate Tributyl phosphate、Tris(2-chloroisopropyl) phosphate 及び Tris(butoxyethyl) phosphate について、活性化の濃度依存性を検討した結果、Tributyl phosphate 及び Tris(butoxyethyl) phosphate が  $10 \mu\text{M}$  を超える濃度で濃度依存的な顕著な活性化を示すことが判明した (Fig. 12)。Tributyl phosphate の TRPV1 に対する  $\text{EC}_{50}$  値は  $12.7 \mu\text{M}$ 、TRPA1 に対する  $\text{EC}_{50}$  値  $19.4 \mu\text{M}$  であった (Table 2)。また、Tris(butoxyethyl) phosphate の TRPV1 に対する  $\text{EC}_{50}$  値は  $22.9 \mu\text{M}$ 、TRPA1 に対する  $\text{EC}_{50}$  値  $58.0 \mu\text{M}$  であった (Table 2)。

平成 22 年度に実施したハウスダスト中のリン酸トリエステル類濃度の実態調査の結果、一般家庭室内から採取したハウスダスト中から Tris(butoxyethyl) phosphate が高頻度に検出され、中央値及び最大値はそれぞれ  $0.019 \text{ mg/g Dust}$ 、 $2.76 \text{ mg/g Dust}$  であった<sup>5)</sup>。Tris(butoxyethyl) phosphate は床ワックスの可塑剤に用いられることから、フローリングのワックスがけによってハウス

ダスト中に極めて高濃度に検出された可能性が考えられる。このことより、家庭用品として用いられ、実際に室内環境中でハウスダスト中からも検出されるリン酸トリエステル類によって TRPV1 及び TRPA1 の活性化を介して感覚神経あるいは気道の刺激を引き起こされる可能性が考えられる。

#### <フタル酸エステル/アジピン酸エステル類とその加水分解物>

可塑剤として使用されるフタル酸エステル/アジピン酸エステル類 10 物質とその加水分解物であるフタル酸モノエステル類及び 2-Ethyl-1-hexanol 計 14 物質についてヒト TRPV1 及び TRPA1 に対する活性化能を評価した。それぞれの化学構造式を Fig. 13-1 及び Fig. 13-2 に示す。その結果、TRPV1 に対して Monoethylhexyl phthalate 及び 2-Ethyl-1-hexanol が弱いながらも活性化作用を有することが判明した (Fig. 14)。また、TRPA1 対しては Diethyl phthalate、Di-n-octyl phthalate、Monobutyl phthalate、Monobenzyl phthalate、Monoethylhexyl phthalate 及び 2-Ethyl-1-hexanol が活性化作用を示すことが明らかになった (Fig. 14)。特に、Diethyl phthalate、Monoethylhexyl phthalate、2-Ethyl-1-hexanol については今回評価した最低濃度である  $0.25 \text{ mM}$  においても典型的な活性化物質である Cinnamic aldehyde と同等もしくはそれ以上の活性化が観察された。尚、いずれの物質によっても TRPV1 及び TRPA1 を発現しない Flp-In 293 細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  の流

入は認められなかった。

平成 21 年度に実施した実態調査によって一般家庭の居室で採取したハウスダストから Bis(2-ethylhexyl) phthalate が最高で 5.3 mg/g Dust の濃度で検出された<sup>6)</sup>。また、モノエステル体として Monobutyl phthalate 及び Monoethylhexyl phthalate もハウスダスト中から検出された<sup>7)</sup>。この濃度は、検体中のジエステル体 Dibutyl phthalate の 0 - 81%、Bis(2-ethylhexyl) phthalate では 0.20 - 6.0% に相当する量であった<sup>7)</sup>。フタル酸ジエステル類に対するモノエステル体の存在比は必ずしも大きくはないが、Monoethylhexyl phthalate のアジュバント活性は Bis(2-ethylhexyl) phthalate よりも強いことも報告されており、本研究結果より室内環境中にハウスダスト中に高濃度に存在する Bis(2-ethylhexyl) phthalate から加水分解して生じた Monoethylhexyl phthalate (Fig. 15) が、TRPA1 の活性化を介して気道過敏の亢進等を引き起こしている可能性も考えられる。また、2-Ethyl-1-hexanol は Bis(2-ethylhexyl) phthalate の加水分解生成物 (Fig. 15) として室内中に存在するほかに、床材の裏打ち剤に含まれる 2-ethylhexyl 基を有する化合物から、コンクリートとの接触によるアルカリ加水分解反応で生じる可能性が報告されている。また、低揮発性の溶剤として広く使用されていることから、室内環境汚染物質として極めて重要であり、シックハウス症候群との因果関係も指摘されている<sup>8-10)</sup>。本研究によって、2-Ethyl-1-hexanol が TRPV1 及び TRPA1 を活性化すること

が明らかとなり、これらイオンチャネルの活性化を介した気道過敏の亢進等が、シックスクール症候群等室内空気質による健康障害の発症機序を説明するうえで重要であると考えられる。

#### <TXIB 及び Texanol>

水性塗料等の溶剤として用いられる Texanol (2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate) 及び壁装材から玩具までの多岐にわたる用途においてポリ塩化ビニルの可塑剤として用いられる TXIB (2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate) は室内汚染物質として検出されることが報告されている<sup>11-13)</sup>。これら化合物についてヒト TRPV1 及び TRPA1 に対する活性化作用を評価した。それぞれの化学構造式を Fig. 16 に示す。その結果、TRPV1 に関しては Texanol 及び TXIB によって濃度依存的な活性化が認められ、Texanol に比べて TXIB により強い活性化能が認められた (Fig. 17)。TXIB の TRPV1 に対する活性化の程度は今回評価した最高濃度でも陽性対象物質 Capsaicin の約 30% と低いものであったが、その EC<sub>50</sub> 値は 60 μM であることから (Table 3)、TRPV1 に対する特異性/親和性が比較的高いと考えられる (Fig. 17)。一方、TRPA1 については Texanol が 100 μM 以上の濃度範囲で顕著な活性化能を有することが明らかになった (Fig. 17)。尚、いずれの物質によっても TRPV1 及び TRPA1 を発現しない Flp-In 293 細胞への Ca<sup>2+</sup> の流入は認められなかった。

Texanol はラテックス、エマルジョン

塗料及び接着剤の造膜助剤、浮遊選鉱剤の添加剤、紙処理剤の添加剤、可塑剤として広く使われている。また、TXIB はフレキシブルプラスチック、例えばポリ塩化ビニルレザーや靴等、特にソフト表面処理したプラスチックの可塑剤として使われている。ネイルケア、ビニール床材、玩具、スポーツ用品、トラフィックコーン、ビニールコンパウンド、ビニール手袋、壁紙の分野等幅広く使用されている。北海道の小学校で新築校舎使用後に発生した健康被害において Texanol が原因物質である可能性や<sup>14)</sup>、スウェーデンの小学校における実態調査研究でも、Texanol 及び TXIB の室内濃度と呼吸器症状に因果関係が報告されている<sup>15)</sup>。室内環境中に存在する Texanol や TXIB がこれらイオンチャネルの活性化を介して気道過敏の亢進等を引き起こしている可能性も考えられ、このようなシックスクール症候群発症の機序を説明する重要な要因であると考えられる。

#### <金属化合物>

Fig. 18 に示す重金属化合物についてヒト TRPV1 及び TRPA1 に対する影響を評価した結果、CdCl<sub>2</sub>、HgCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub> が TRPA1 を活性化することが明らかになった (Fig. 19)。また、CdCl<sub>2</sub> は TRPV1 に対しても活性化能を有することが判明した (Fig. 19)。なお、いずれの重金属類によっても TRPV1 及び TRPA1 を発現しない Flp-In 293 細胞への Ca<sup>2+</sup>の流入は認められなかった。本研究結果より、これら重金属類を含む粉塵・ハウスダストによって TRPV1 及び TRPA1 を介した気道

の刺激が引き起こされる可能性が考えられる。

#### <ナフトキノン類>

ディーゼル車排出ガス微粒子 (DEP) の暴露は、肺がん、喘息及び気管支炎等呼吸器系の疾患や虚血性心疾患等の循環器系疾患をはじめとして中枢神経系や生殖機能へも影響を及ぼすなど健康影響が危惧されている。DEP は多数の有機化合物を吸着した炭素粒子の複雑な混合物であり、炭素粒子に吸着する有機化合物としてはナフタレンやフェナントレン等の多環芳香族炭化水素や大気中光酸化反応によって生成したそれらのキノン体が主要な化合物であることが示されている。本研究では、DEP 中の多環芳香族炭化水素キノン体として 1,2-ナフトキノン、1,4-ナフトキノン、9,10-フェナントラキノン及び 9,10-アントラキノンについてヒト TRPV1 及び TRPA1 に対する活性化能を評価した。それぞれの化学構造式を Fig. 20 に示す。その結果、TRPV1 に対しては 1,2-ナフトキノン及び 1,4-ナフトキノンが (Fig. 21)、TRPA1 に対しては、1,2-ナフトキノン、1,4-ナフトキノン及び 9,10-フェナントラキノンが活性化作用を示した (Fig. 21)。尚、いずれの物質によっても TRPV1 及び TRPA1 を発現しない Flp-In 293 細胞への Ca<sup>2+</sup>の流入は認められなかった。

1,2-Naphthoquinone 及び 1,4-Naphthoquinone の TRPA1 に対する活性化に関しては、終濃度として 1 µM 処理した場合においても、代表的な活性化物質である Cinnamic aldehyde と同等か