

Fig. 22 Dose-response analysis of human TRPV1 and TRPA1 activation by naphthoquinones.

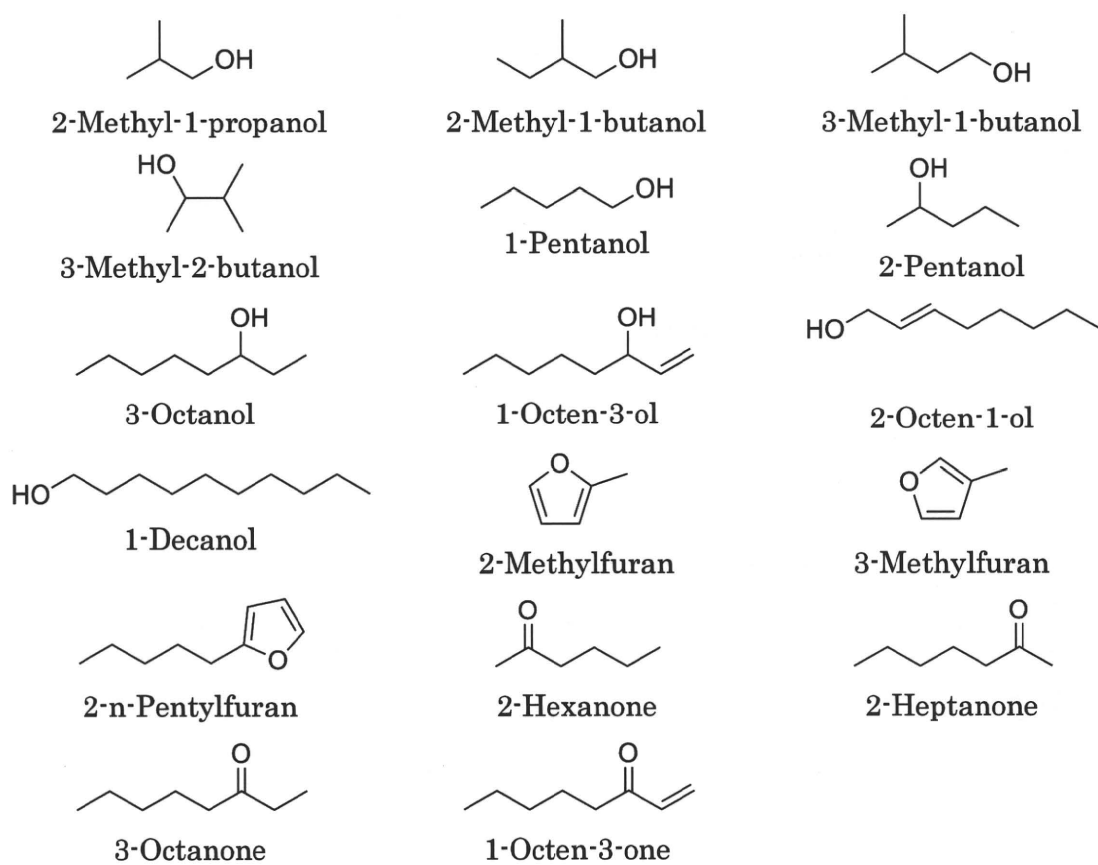


Fig. 23 Chemical structures of microbial volatile organic compounds. in this study.

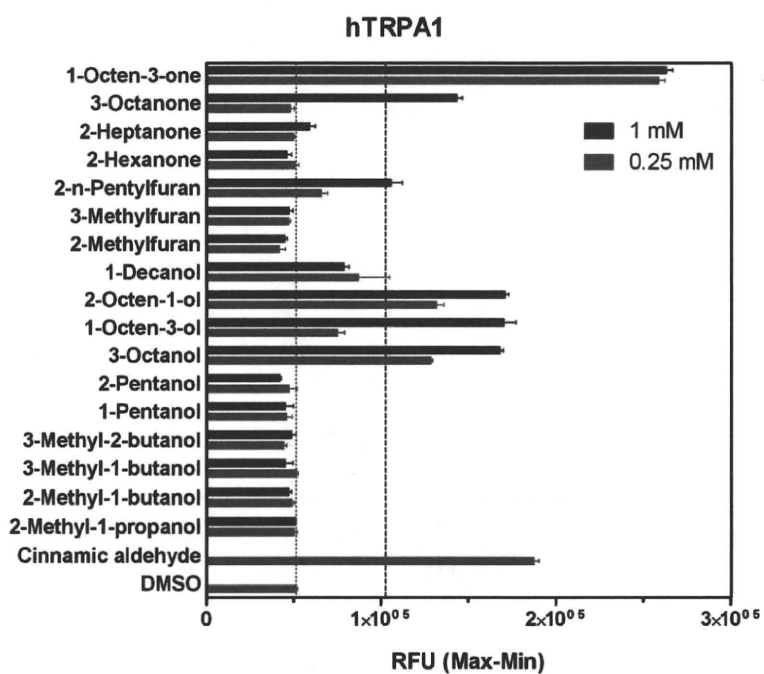
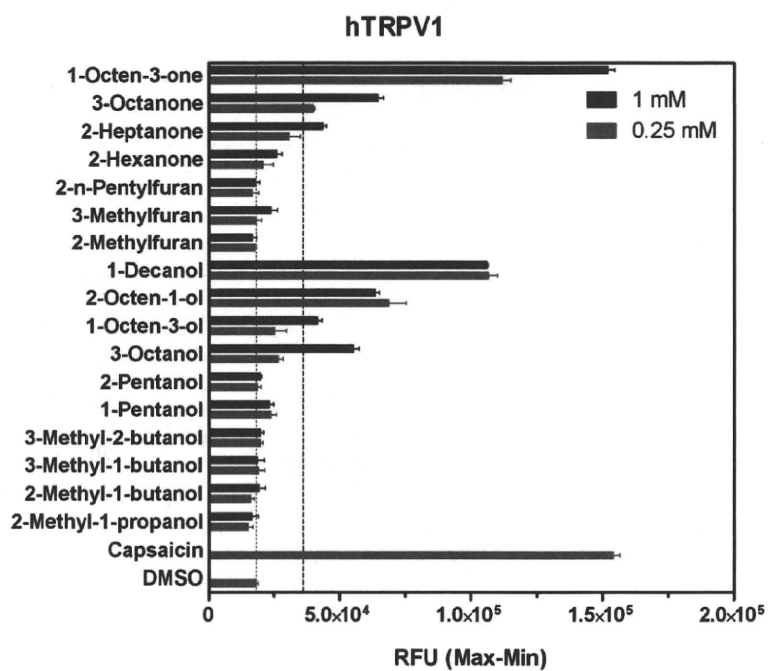


Fig. 24 Activation of human TRPV1 and TRPA1 by microbial volatile organic compounds.

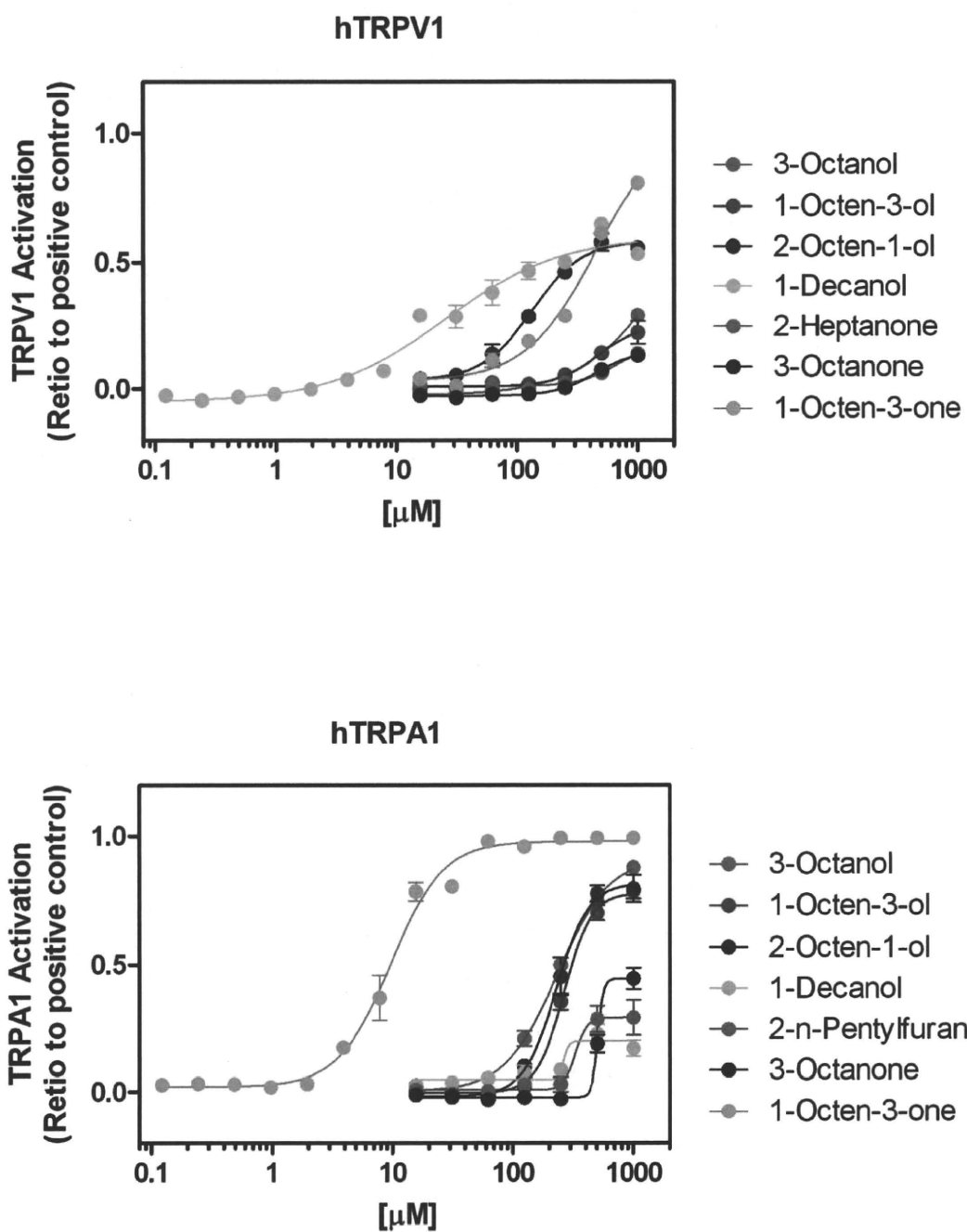


Fig. 25 Dose-response analysis of human TRPV1 and TRPA1 activation by microbial volatile organic compounds.

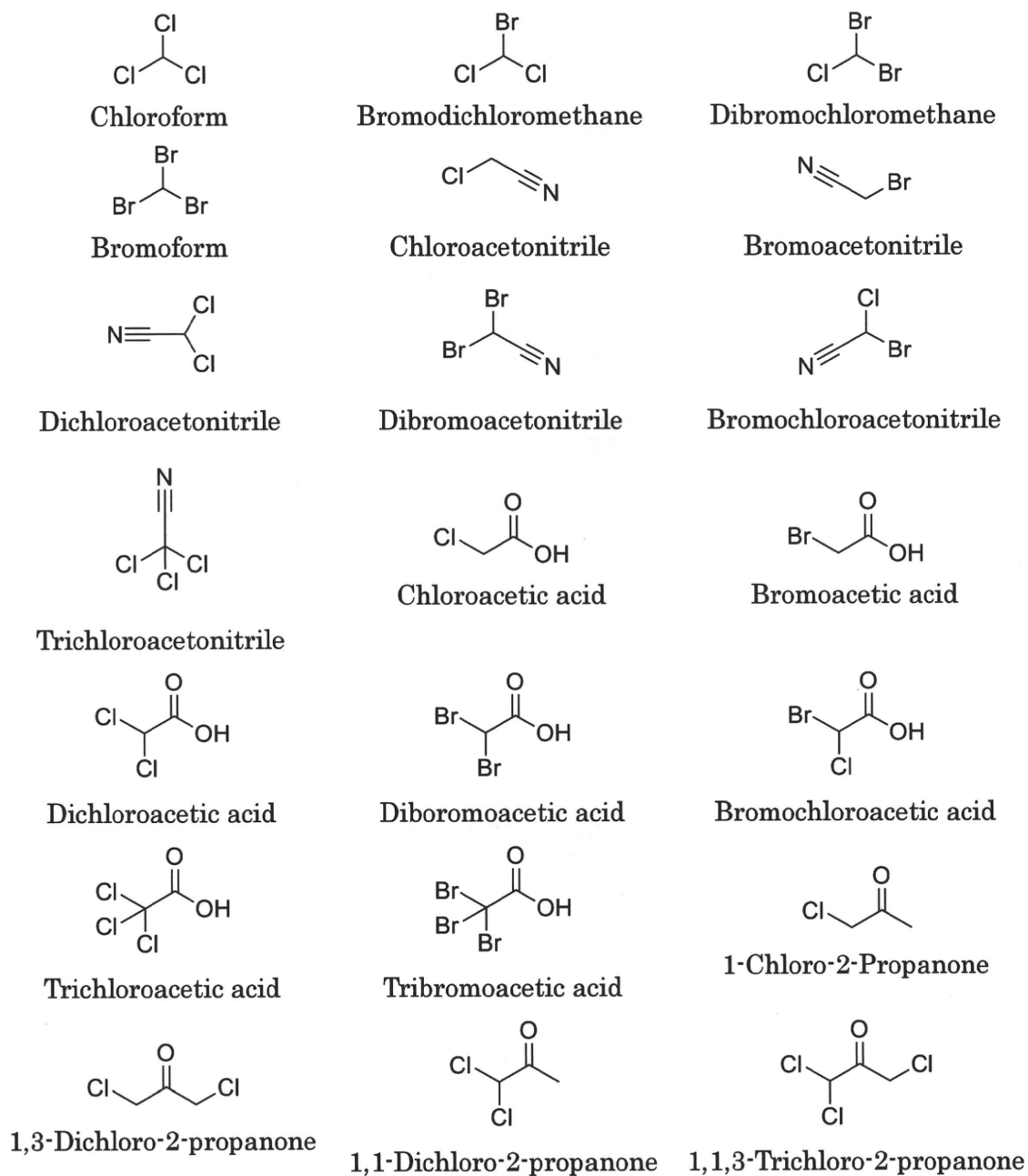


Fig. 26 Chemical structures of disinfection by-products in this study.

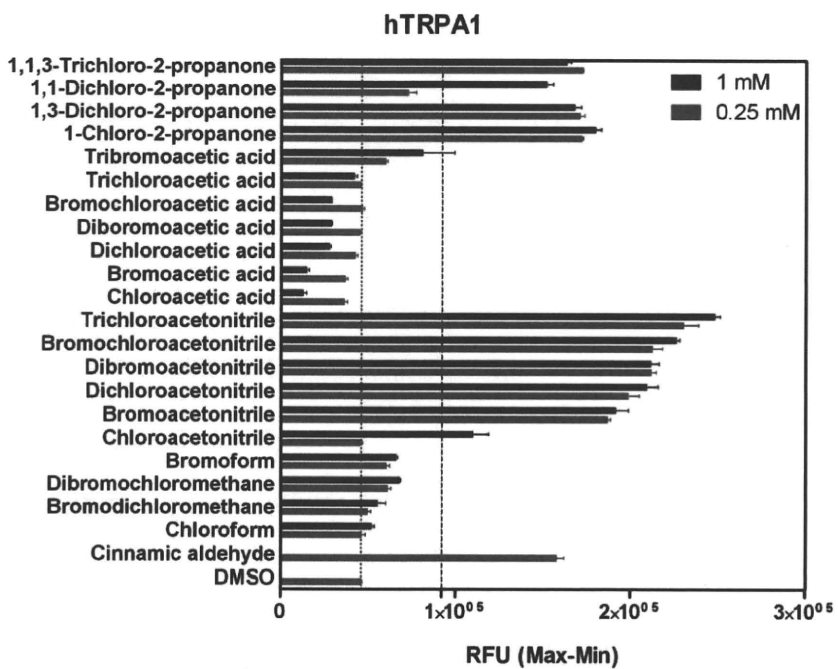
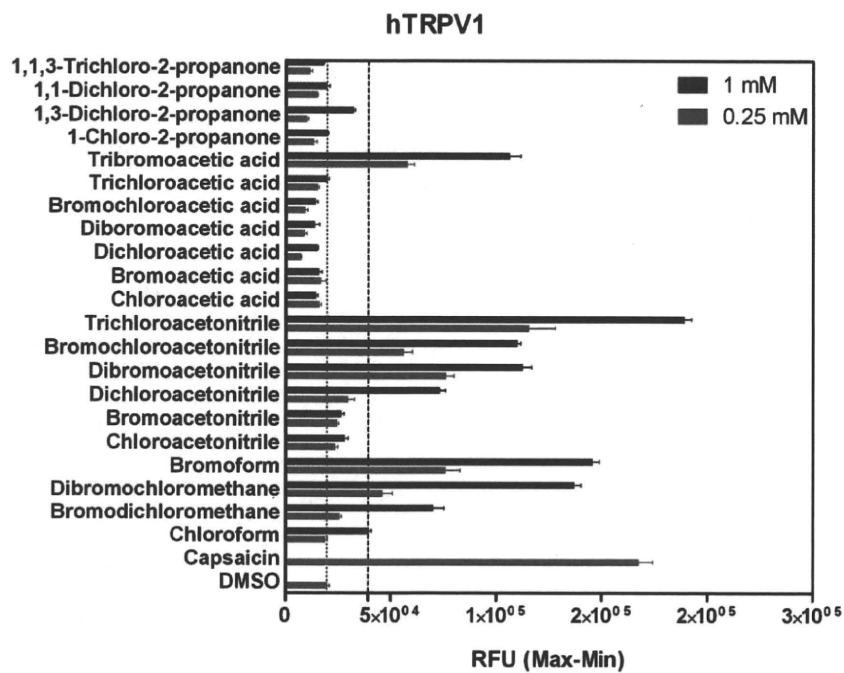


Fig. 27 Activation of human TRPV1 and TRPA1 by disinfection by-products.

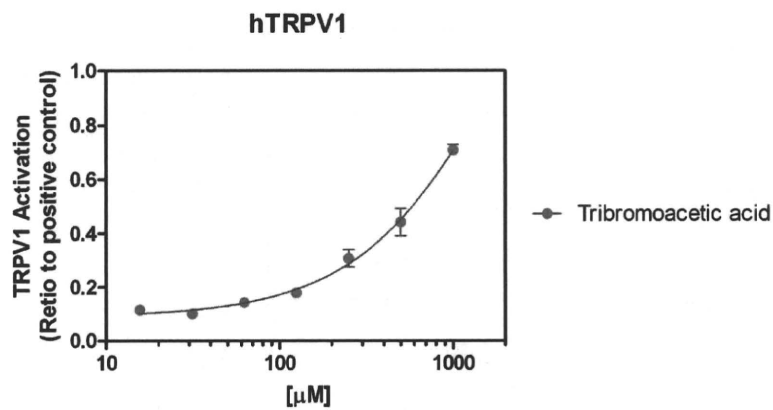
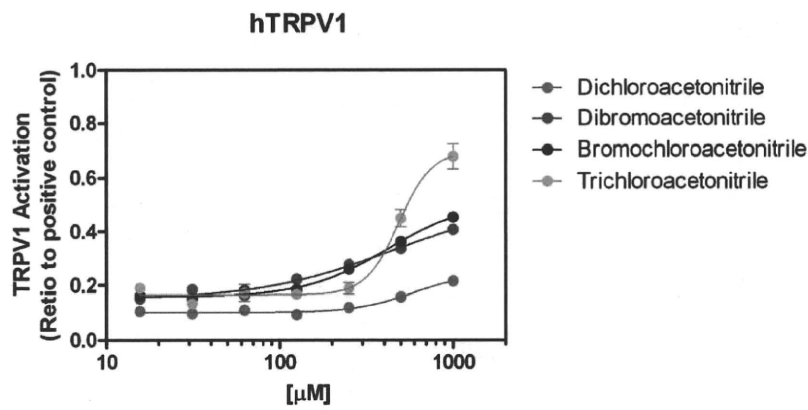
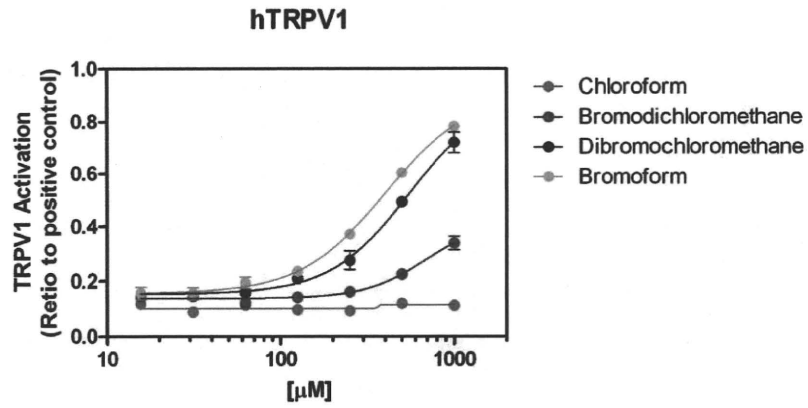


Fig. 28-1 Dose-response analysis of human TRPV1 and TRPA1 activation by disinfection by-products.

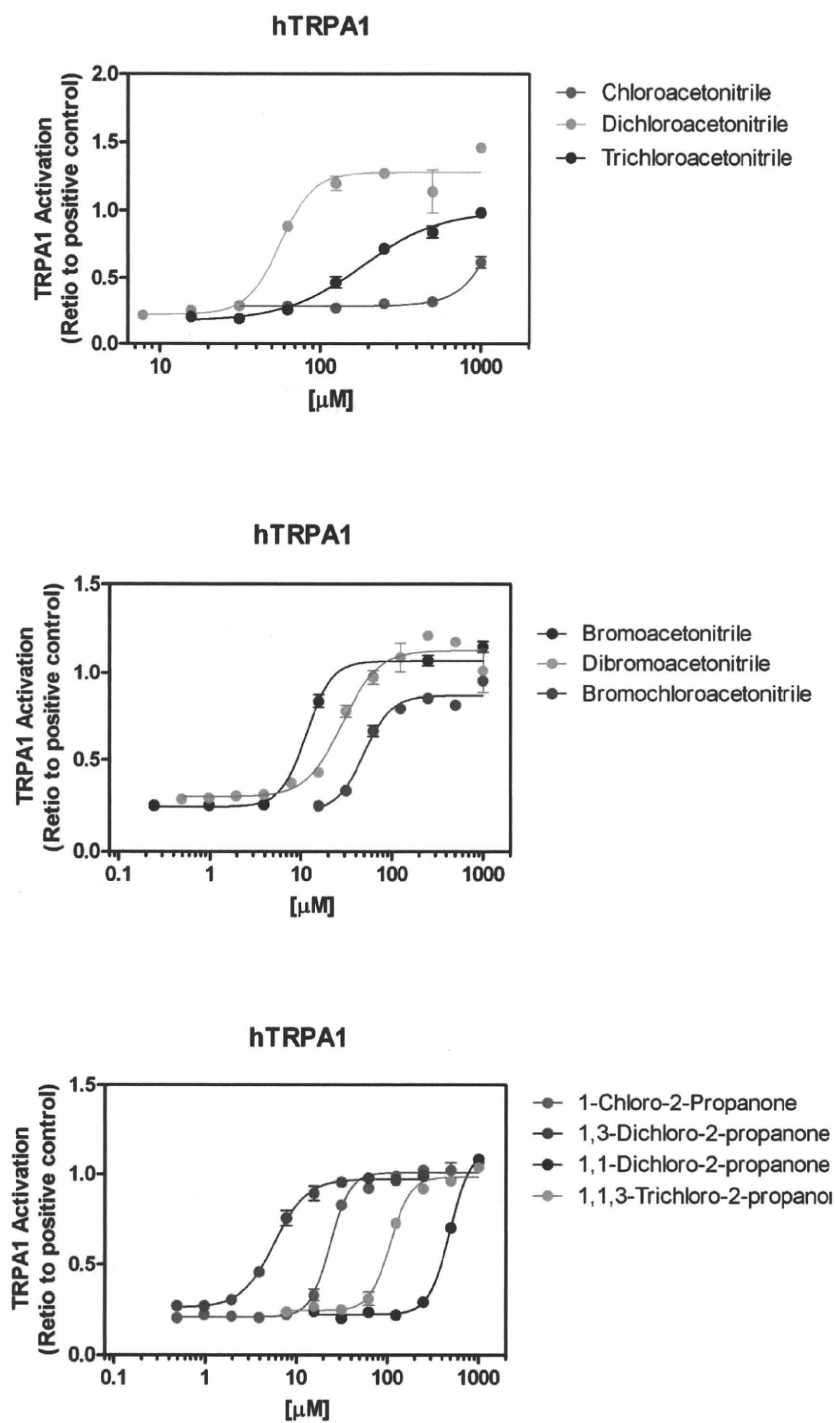


Fig. 28-2 Dose-response analysis of human TRPV1 and TRPA1 activation by disinfection by-products.



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感作性に関する研究

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 室長

研究要旨：メタクリル酸エステル類及びアクリル酸エステル類は、塗料、接着剤及びプラスチック樹脂等の原料として使われており、これらを用いた家庭用品が増加している。これらの化学物質は製品から放散しており室内空気中に検出される。今後も生活環境中の濃度は増加することが予想され、健康影響が危惧される。本研究では、これらの化学物質の感作性を、マウスを用いた LLNA-DA 法、及び *in vitro* の h-CLAT 法を用いて評価した。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あった。

A. 研究目的

家庭用品からは多くの化学物質が室内環境中に放散されており、シックハウス症候群や化学物質過敏症、アレルギー性鼻炎、気管支喘息、アトピー性皮膚炎等の疾病はそれらの化学物質が原因あるいは増悪因子として関与しているのではと疑われている。こうした室内空気中の化

学物質に対する関心の高まりに応じて、1999 年にはホルムアルデヒド、2002 年には揮発性・準揮発性有機化合物 13 種の室内濃度指針値が策定された。

近年行われた空気中の化学物質の実態調査では、先に策定された揮発性物質の他にもアクリル酸エステル類等が検出されている。アクリル酸エステル類は塗料、

接着剤、及びアクリル樹脂の原料として用いられており、家具、建材及び液晶ディスプレイなどの成形樹脂として応用されている。こうした樹脂からは残存モノマーが空气中に放散する可能性が指摘されている。液晶テレビは現在急速に普及しつつあり、今後こうした製品から放散した化学物質に暴露される機会が増加すると思われる。家庭用品等の使用状況、あるいは生活様式の変化に応じた揮発性有機化合物の評価が随時必要となっている。特に、免疫毒性の観点からのリスク評価は極めて限られている。

吸入あるいは皮膚接触したときの化学物質の毒性は、短時間で生じるものとして気道及び皮膚刺激性、長期間暴露によって免疫系が関与するものとして気道及び皮膚感作が上げられる。このうち、皮膚刺激性に関しては動物あるいはヒト皮膚モデルを用いた試験法が確立しており、OECD テストガイドラインが作成されている。

皮膚感作性については動物を用いた方法が古くから用いられており、現在はモルモットの代わりにマウスを用いる local lymph node assay (LLNA) がよく用いられている。LLNA はリンパ節細胞の増殖率を放射性物質の  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込み量から測定しているが、近年 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の取り込みあるいは細胞内 ATP 量を測定する改変法 2 つが新たに OECD ガイドラインに採用された。更に、動物を用いない in vitro 試験法の開発も積極的に行われている。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) は有用な試験法としてバリデーション研究が進んでいる。

本研究では揮発性物質のリスク評価を目的とすることから、化学物質の気道感作性強度を求めることも重要である。しかしながら、即時型 (I 型) アレルギーである気道感作性については有用な確立した試験法はない。皮膚感作性物質と気道感作性物質では感作が成立する過程、特に誘導段階は同様と考えられることから、新たな試験法開発の手がかりとして、確立している皮膚感作性試験法を用いて気道感作性物質を試験し、種々の指標を比較することが有用かもしれない。

本年度は、家庭用品から放散し、今後室内空气中に検出される頻度が高くなると考えられるメタクリル酸及びアクリル酸エステル類の皮膚感作性を LLNA-DA 法及び h-CLAT 法で評価した。

## B. 研究方法

### B-1. 試薬

メタクリル酸エステル類として、methyl methacrylate (MM)、ethyl methacrylate (ME)、butyl methacrylate (MB)、2-ethylhexyl methacrylate (M2-EH)、2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (M2-DE)、2-hydroxyethyl methacrylate (M2-HE) 及び methacrylic acid (MA) を用いた。アクリル酸エステル類として、methyl acrylate (AM)、ethyl acrylate (AE)、butyl acrylate (AB)、2-ethylhexyl acrylate (A2-EH)、2-(dimethylamino)ethyl acrylate (A2-DE)、2-hydroxyethyl

acrylate (A2-HE)及び acrylic acid (AA)を用いた。Acrylonitrile はプラスチック樹脂に検出されることから選定した。Dimethyl fumarate (FD)は、既に皮膚障害事例があり、メタクリル酸エステル等とも構造類似性があることから試験した。 $\alpha$ -hexyl cinnamaldehyde (HCA)、2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)及び nickel sulfate hexahydrate ( $\text{NiSO}_4$ )、を感作性陽性対照物質として用いた。Sodium lauryl sulfate (SLS)は非感作性刺激性物質として用いた。

#### B-2. 動物

CBA/JNCRj 系マウス（雌性、7週齢）は日本チャールス・リバーから入手した。マウスは室温  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 30~70%、12 時間明暗サイクルの条件下で飼育し、餌及び飲料水は自由に摂取させ、8~9 週齢で実験に用いた。

#### B-3. 細胞

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞は ATCC から入手した。細胞は牛胎児血清 (FBS) 10%、antibiotic-antimycotic 溶液 (Invitrogen 社) 1% 及び 2-mercaptoethanol 55 nmol/ml を含有する RPMI-1640 培地 (FBS-RPMI) に入れ、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベータで培養した。

#### B-4. LLNA-DA

試験物質は、アセトン-オリーブ油 (4:1) (AOO) に溶解し、50%濃度を最高に刺激性、毒性、溶解度を基に塗布濃度を決定した。1 群当たり 4 匹のマウス

を用いた。マウスの両耳裏側に 1% SLS 溶液を塗布し、1 時間後に同部位に試験溶液を 25  $\mu\text{l}$  ずつ塗布した。この操作を 1, 2, 3 及び 7 日目の計 4 回行い 8 日目に個体ごとに耳介リンパ節を採取して重量を測定した。耳介リンパ節を押しつぶしてリンパ節細胞 (LNC) を遊離し、リン酸塩緩衝液 (PBS) 1 ml に浮遊した。細胞浮遊液 20  $\mu\text{l}$  を PBS 1.98 ml の入った試験管に入れ 100 倍に希釈した (1 個体につき 2 本調製)。この LNC 浮遊液について、市販キット (ルミフェール 250 プラス、キッコーマン) を用いて ATP 量を測定した。すなわち、LNC 浮遊液 100  $\mu\text{l}$  を ATP 抽出液 100  $\mu\text{l}$  と混合し、20 秒間後発光試薬 100  $\mu\text{l}$  を加えて攪拌し、すばやくルミノメーター (LUMITESTER C-100、キッコーマン) を用いて 10 秒間の発光量 (relative light unit, RLU) を測定した。リンパ節重量及び ATP 量 (RLU) について溶媒群に対する試験群の比を stimulation index (SI) として求め、ATP 量 (RLU) の SI 値が 3 以上のものを感作性陽性と判定した。

(倫理面への配慮)

国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を行った。実験はすべて適切な実験計画および適正な実験手技のもとで実施し、実験操作中は動物の苦痛を軽減するとともに、終了後は安楽死させた。

#### B-5. 細胞毒性試験

試験物質は生理食塩水またはジメチルスルホキシド (DMSO) 溶解した後、0.22

μm フィルターを通して滅菌し、試験時、培地で希釈して指定の濃度に調整した。THP-1 細胞浮遊液(2×10<sup>6</sup> cells/ml) 80 μl を 96 穴プレートの各穴に入れ、種々の濃度の試験溶液 80 μl を加えた。試験物質の代わりに培地を加えたものをコントロールとした。試験は 1 濃度当たり 4 穴で行った。20 時間培養後、TetraColor ONE を 10 μl ずつ加えて、更に 2 時間培養した。マイクロプレートリーダーを用いて対照波長 600 nm、測定波長 450 nm における吸光度を測定した。試験溶液のコントロールに対する吸光度の比を細胞生存率(%)とし、片対数グラフより 75%の細胞生存率を示す試験物質の濃度を CV75 (μg/ml) として求めた。

#### B-6. h-CLAT

0.1~0.2×10<sup>6</sup> cell/ml の濃度で 48~72 時間前培養した THP-1 細胞を培地で 2×10<sup>6</sup> cell/ml とし、500 μl ずつ 24 穴プレートの各穴に入れた。試験物質は CV75 を基準に高濃度側に 1 濃度、低濃度側に 6 濃度を公比 1.2 で 8 段階の濃度を設定し、それぞれ 500 μl を加えた。24 時間培養後、細胞浮遊液を遠心管に移し 4℃、280 G で 3 分間遠心して細胞を回収した。0.1 % BSA 含有 PBS(BSA-PBS) 1 ml を加え、4℃、700G で 5 分間遠心する洗浄操作を 2 回行った後、0.01 % globlins, Cohn fraction II, III (Sigma-Aldrich 社) – PBS 溶液を 600 μl 加えて、氷上で 10 分間処理 (FcR ブロッキング) した後 3 本に分け、それぞれに FITC 標識抗 CD86 抗体 (clone FUN-1, BD Pharmingen 社) 6 μl、FITC 標識抗 CD54 抗体 (clone

6.5B5, DAKO 社) 3 μl または isotype control として FITC 標識マウス IgG1 (clone DAK-G01, Dako 社) 3 μl を入れ、氷上で 30 分間静置して染色した。細胞を 2 回洗浄後、BSA-PBS 400 μl に再懸濁し propidium iodide (PI) 25 μg/ml を 10 μl 加えた。フローサイトメーターを用いて 10000 個の生細胞を測定し、次式より CD54 及び CD86 抗原の相対蛍光強度 (Relative fluorescence intensity, RFI) を求めた。CD86 の RFI が 150%以上または CD54 の RFI が 200%以上を示す時、その物質を感作性ありと判定した。

$$RFI(\%) = \frac{\text{MFI of chemical - treated cells} - \text{MFI of chemical - treated Isotype control cells}}{\text{MFI of vehicle control cells} - \text{MFI of vehicle Isotype control cells}} \times 100$$

#### C. 研究結果

##### C-1. LLNA-DA 法

メタクリル酸エステル及びアクリル酸エステルのほとんどは試験する最高濃度 50 %まで AOO に溶解したことから、この濃度で試験した。しかし MA 及び AA は 50 %濃度で適用すると耳の壊死を生じたことから、A2-DE についてはマウスが死亡したことから塗布濃度を下げる必要があった。MA 及び AA は 5 %、A2-DE は 10 %で刺激性や死亡が認められないことから、これらを試験濃度とした。FD は 5%で試験した。毎回陽性対照群として HCA 25%塗布群を設けた。

感作性物質の場合、マウスのリンパ節重量及び ATP 量の増加が認められるが、その増加率 (SI 値) を比較すると、いず

れの物質とも ATP 量の SI 値の方が高い値を示した。ATP 量の SI 値が 3 を超え感作性陽性と判定されたメタクリル酸エステルは MB、M2-EH、M2-DE 及び M2-HE であった。アクリル酸エステルのうち AE、AB、A2-EH、A2-DE 及び A2-HE が感作性ありと判定された。HCA より高い SI 値を示したのは M2-DE、A2HE 及び A2-DE で、特に、A2-DE は 10% で SI 値 11.12 を示した。AA は 5% 濃度で陽性であり、MM は陰性と判定された (表 1)。ME は 2 回試験を行ったが、いずれも若干 ATP 量は増加するものの陽性基準に達しなかった。FD は 5% で SI 値 7.7 と、HCA よりも強い反応を示した。

#### C-2. 細胞毒性試験

h-CLAT の試験濃度を決定するための細胞毒性試験として、PI 染色してフローサイトメトリーで測定する方法が標準法として用いられている。今回 Tetra Color One 色素で染色、吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する方法でも同様の評価が可能かどうか検討した。本試験法で求められた SLS、NiSO<sub>4</sub> 及び DNCB の CV75 値はそれぞれ 58 µg/ml、120 µg/ml 及び 5.4 µg/ml で、文献値 60 µg/ml、150 µg/ml 及び 5 µg/ml とほぼ同等であった。よって、Tetra Color One を用いた細胞毒性試験の結果から h-CLAT の試験濃度を定めることができると判断した。

本試験によるメタクリル酸エステル類及びアクリル酸エステル類の CV75 値を表 2 に示した。A2-DE の CV75 値が 23.5 µg/ml と SLS よりも低い値を示したが、他の物質はいずれも高い値を示し、細胞

毒性は強くなかった。

#### C-3. h-CLAT

メタクリル酸エステル類の CD54 及び CD86 の相対発現率の変化を図 1 に示した。MA については CD54、CD86 いずれも陽性基準を超えた。M2-DE は CD54 のみが、MM、ME 及び 2-HE については CD86 のみが基準値を超え陽性と判定された。MB については陽性判定にならなかった。CD54 の RFI が 200%、CD86 の RFI が 150% を示す試験物質の濃度を EC200 及び EC150 として求めた (表 3)。この値が低い方から並べると、M2-DE、MA、M2-HE、ME、MM となった。

#### D. 考察

LLNA-DA は感作性物質によるリンパ節活性化反応を ATP 量の増加量で評価する。ATP の測定はルシフェリンールシフェラーゼ反応を原理としたキットを用いるため、LLNA 原法と異なり放射性物質を用いずに簡単かつ短時間に判定できる利点がある。陽性反応を示したメタクリル酸エステルは MB、M2-EH、M2-DE 及び M2-HE であり、このうち非水溶性物質は MB と M2-EH であった。塗布した化学物質が反応を誘導するためには皮膚透過が重要であり、一定の脂溶性を持つ物質が有利である。同一構造を持ちながら MM や ME に比べ MB がこうした反応を示したのも、アルキル鎖の炭素数の増加に伴い脂溶性が高くなり皮膚浸透量が増加したためと思われる。しかし、更に炭素数の増加した M2-EH は MB よりも反応性は低くなった。必ずしも脂溶性

の高い方が皮膚透過性は高いわけではなく、一定の脂溶性を有する物質が皮膚透過し反応を引き起こすと考えられた。M2-DE 及び M2-HE は、ME にヒドロキシ基やアミノ基が結合した構造を示し、若干水に溶解する。これらに対する感作性反応は、その皮膚透過量だけで説明できない。これらの官能基によってタンパク質と反応しやすくなり、抗原として認識されやすくなったのかもしれない。M2-DE の感作性強度は MB と、M2-HE は M2-EH とほぼ同程度と思われた。

アクリル酸はメタクリル酸からメチル基をとった構造である。アクリル酸エステル類は全体的にメタクリル酸エステル類より高い SI 値を示した。A-2DE は 10% で最も高い SI 値をとり最も感作性強度が強いと考えられた。AE に水酸基のついた A2-HE は、AE よりも強い反応を示し、水酸基が反応性に影響することがわかった。AM、AE、AB とアルキル基の炭素数が多くなるにつれて SI 値が大きくなり、A2-EH は AB より低い SI 値を示したことから、メタクリル酸エステルと同様に脂溶性と皮膚浸透性の増加が関係すると思われた。AA に関しては耳の壊死が起きるようにタンパク質の変性作用が高く、これが感作性にも影響した可能性が高い。Dearman らは AM、AE、AB 及び A2-EH の感作性を LLNA で評価している。感作性強度を SI 値が 3 を示す試験濃度で順序づけた結果、試験物質間で著しい強度の差は認めないものの A2-EH だけが 10% 以下で中程度、他は 10% 以上の弱い感作性物質で AB>MA>EA としている。今回の LLNA-DA では各物質とも 1 つの濃

度で行っているが、SI 値の大きさで順序づけたものとほぼ一致した。

FD は防かび剤として用いられているが、これを含有したシートを使ったソファで皮膚障害が発生したため、皮膚感作性を持つとされている物質である。本試験でも高い SI 値を示し、メタクリル酸エステル類やアクリル酸エステル類よりも強い感作性を有することが確認された。FD は分子内に二重結合及び 2 つのカルボキシル基を有する。反応性に富むこれらの構造部分が FD の強い感作誘導能に関与したものである。

h-CLAT では、細胞の活性化によって発現する細胞抗原発現量を測定する。本年度は、メタクリル酸エステル類の一部を評価した結果、試験物質によって発現する表面抗原の種類が異なった。MA については両抗原がいずれも陽性基準を超えたのに対し、M2-DE は CD54 のみが、MM、ME 及び M2-HE については CD86 のみが陽性基準を超えた。また、MB は LLNA-DA では強い反応を示したが、h-CLAT では陽性とならなかった。h-CLAT で陽性判定された MM、ME は LLNA-DA では陽性反応を示さず、結果の乖離も認められた。CD86 抗原は内皮細胞や単球に発現しており、B および T リンパ球、樹状細胞、及び上皮細胞などでは活性化されると発現が増強する。CD54 抗原は抗原提示細胞と T リンパ球との接着を媒介し、T リンパ球同士、T リンパ球と B リンパ球との相互作用、活性化した単球、リンパ球及び好中球の内皮細胞との接着にも関与している。CD54 と CD86 抗原の生体内での働きは異なり、

これらの発現は相互に関係しているわけではないのかもしれない。

CD54 の RFI が 200%、CD86 の RFI が 150%を示す試験物質の濃度を、EC200 及び EC150 として求め、低い方を感作性強度が強いと考えた。これから順序づけた感作性強度は、M2-DE>MA>M2-HE>ME>MM となった。また、CD86 の RFI の最高値から順序づけると M2-HE>ME>MM>MA の順であった。今回 h-CLAT での強度の順序づけは LLNA-DA のそれとは一致するとは言えなかった。要因として、LLNA-DA では各物質とも 1つの濃度でしか検討おらず、その SI 値で順序づけていること、更には試験物質の水溶性がそれぞれの試験法に対して影響する可能性がある。例えば水溶性物質は動物試験での適用が困難で皮膚浸透性も悪く反応が出にくい。逆に、非水溶性物質は培地中で油滴となったり結晶となって析出したりするため *in vitro* の試験が困難である。試験物質の水溶性などの物理的性質を考慮に入れた順序付け、あるいは皮膚浸透性を考慮に入れた評価が必要かもしれない。h-CLAT では 3 回の繰り返し実験による多数決で感作性の評価をすとしており、更に繰り返し実験して最終評価とする。

感作性物質を皮膚に塗布すると、ケラチノサイトや抗原提示細胞が活性化し、それに伴ってサイトカインが産生される。THP-1 細胞は NiSO<sub>4</sub> 及び DNCB を暴露すると IL-8 及び TNF- $\gamma$  を産生するとの報告がある。ケモカインは感作性の誘導段階で重要な役割を担っているとされる今後、抗原提示による細胞表面抗原の発

現量とともに、これらのケモカインが感作性の有無及び感作性強度の指標となるかどうか検討する予定である。

## E. 結論

LLNA-DA 法では、メタクリル酸エステル類のうち MB、M2-DE、M2-EH 及び M2-HE が感作性物質と判定され、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強い感作性を有すると思われた。メタクリル酸エステル類について h-CLAT 法で評価しところ、ほとんどの物質が感作性陽性と判定された。メタクリル酸エステル類の感作性強度を順序づけたところ、h-CLAT 法と LLNA-DA 法とで明らかな一致性は認めなかった。試験物質の非水溶性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ある。

## F. 引用文献

1. Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K., Ito, M. Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10 (2008)
2. Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami,

- M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A. Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26 (2008)
3. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA (2010)
4. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA (2010)
5. Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. in Vitro* 20, 767-773 (2006)
6. Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell line: human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. in Vitro* 20, 774-784 (2006)
7. Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Okamoto, K., Mizuno, M., Sato, J., Yamada, T., Yoshida, M., Ota, N., Hasegawa, S., Kodama, T., Okamoto, Y., Kuwahara, H., Kosaka, N., Sono, S., Ohno, Y. Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitization: Results of the first Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13, 55-62 (2008)
8. Dearman, R.J., Betts, C.J., Farr, C., McLaughlin, J., Berdasco, N., Wiench, K., Kimber, I. Comparative analysis of skin sensitization potency of acrylates (methyl acrylate, ethyl acrylate, butyl acrylate, and ethylhexyl acrylate) using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis* 57, 242-247 (2007)
9. Miyazawa, M., Ito, Y., Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H. Phenotypic alternations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. in Vitro* 21, 428-437 (2007)
- G. 研究発表  
なし
- H. 知的所有権の取得状況  
なし



表 1. メタケリル酸エステル類及びアクリル酸エスチル類の LLNA-DA による評価結果

Chemical	Concent- ration(%)	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RUL)	SI
Acetone-olive oil (4:1) (AOO)		7.1 ± 1.7	1.00 ± 0.24	28195 ± 10419	1.00 ± 0.37
α-Hexyl cinnamaldehyde (α-HCA)	25	17.7 ± 1.7	2.48 ± 0.23	140061 ± 24454	4.97 ± 0.87
Methyl methacrylate (MM)	50	7.0 ± 0.3	0.99 ± 0.05	30458 ± 8534	1.08 ± 0.30
Ethyl methacrylate (ME)	50	10.6 ± 2.5	1.48 ± 0.35	65007 ± 18738	2.31 ± 0.66
Butyl methacrylate (MB)	50	16.0 ± 1.1	2.25 ± 0.16	130459 ± 20888	4.63 ± 0.74
2-Ethylhexyl methacrylate (M2-EH)	50	13.7 ± 1.6	1.92 ± 0.23	85673 ± 18665	3.04 ± 0.66

Chemical	Concent- ration(%)	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RUL)	SI
Acetone-olive oil (4:1) (AOO)		4.9 ± 0.8	1.00 ± 0.16	21362 ± 3118	1.00 ± 0.15
α-Hexyl cinnamaldehyde (α-HCA)	25	15.8 ± 1.2	3.27 ± 0.25	163476 ± 36031	7.65 ± 1.69
2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate (M2-DE)	50	15.6 ± 2.1	3.22 ± 0.44	164252 ± 36351	7.69 ± 1.70
2-hydroxyethyl methacrylate (M2-HE)	50	9.0 ± 2.3	1.86 ± 0.48	68024 ± 22277	3.18 ± 1.04
Methacrylic acid (MA)	50	7.1 ± 0.7	1.47 ± 0.14	40525 ± 8721	1.90 ± 0.41

Chemical	Concent- ration(%)	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RUL)	SI
Acetone-olive oil (4:1) (AOO)		8.9 ± 1.3	1.00 ± 0.15	35884 ± 12094	1.00 ± 0.34
α-Hexyl cinnamaldehyde (α-HCA)	25	17.5 ± 1.3	1.97 ± 0.15	174268 ± 42881	4.86 ± 1.19
Methyl acrylate (AM)	50	12.9 ± 2.8	1.45 ± 0.31	104428 ± 15965	2.91 ± 0.44
Ethyl acrylate (AE)	50	15.5 ± 2.6	1.75 ± 0.30	133196 ± 12297	3.71 ± 0.34
Butyl acrylate (AB)	50	20.6 ± 1.3	2.32 ± 0.15	172635 ± 52343	4.81 ± 1.46
2-Ethylhexyl acrylate (A2-EH)	50	18.7 ± 2.3	2.12 ± 0.26	149719 ± 31760	4.17 ± 0.89
Acrylic acid (AA)	50	11.1 ± 1.8	1.25 ± 0.21	66959 ± 22474	1.87 ± 0.63

表 1. メタクリル酸エステル類及びアクリル酸エステルの LLNA-DA による評価結果 (続き)

Experiment 4		Experiment 5			
Chemical	Concentration(%)	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RUL)	SI
Acetone-olive oil (4:1) (A00)		7.5 ± 1.7	1.00 ± 0.22	23907 ± 10039	1.00 ± 0.42
α-Hexyl cinnamaldehyde (α-HCA)	25	16.4 ± 3.5	2.17 ± 0.47	102130 ± 28864	4.27 ± 1.21
2-Hydroxyethyl acrylate (A2-HE)	10	17.1 ± 1.7	2.26 ± 0.22	117760 ± 13227	4.93 ± 0.55
Acrylic acid (AA)	5	15.0 ± 1.0	1.99 ± 0.13	107653 ± 29799	4.50 ± 1.25
Dimethyl fumarate (FD)	5	22.5 ± 3.0	2.98 ± 0.39	184031 ± 45447	7.70 ± 1.90
Experiment 5					
Chemical	Concentration(%)	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RUL)	SI
Acetone-olive oil (4:1) (A00)		5.0 ± 0.8	1.00 ± 0.16	18335 ± 7471	1.00 ± 0.41
α-Hexyl cinnamaldehyde (α-HCA)	25	14.6 ± 0.4	2.89 ± 0.07	98219 ± 21985	5.36 ± 1.20
2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCE)	0.1	11.0 ± 1.6	2.18 ± 0.31	81018 ± 16412	4.42 ± 0.90
2-(Dimethylamino)ethyl acrylate (A2DE)	10	23.2 ± 2.6	4.60 ± 0.51	203805 ± 31182	11.12 ± 1.70
Methyl acrylate (AM)	50	10.0 ± 2.1	1.98 ± 0.42	76020 ± 22076	4.15 ± 1.20
Acrylonitrile	5	6.0 ± 0.3	1.18 ± 0.05	38691 ± 6499	2.11 ± 0.35
Methacrylic acid (MA)	5	5.9 ± 0.5	1.17 ± 0.10	26899 ± 6506	1.47 ± 0.35
Ethyl methacrylate (ME)	50	5.5 ± 0.2	1.09 ± 0.05	40241 ± 5780	2.19 ± 0.32

表 2. メタクリル酸エステル類及びアクリル酸エステル類の細胞毒性

(a) メタクリル酸エステル類

Chemical	CV75 (μg/ml)
Methyl methacrylate (MM)	>2500
Ethyl methacrylate (ME)	>2500
Butyl methacrylate (MB)	>2500
2-Ethylhexyl methacrylate (M2-EH)	Not tested
2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate (M2-DE)	379
2-Hydroxyethyl methacrylate (M2-HE)	790
Methacrylic acid (MA)	745

(b) アクリル酸エステル類

Chemical	CV75 (μg/ml)
Methyl acrylate (AM)	520
Ethyl Acrylate (AE)	1700
Butyl acrylate (AB)	600
2-Ethylhexyl acrylate (A2-EH)	290
2-(Dimethylamino)ethyl acrylate (A2-DE)	>2500
2-Hydroxyethyl acrylate (A2-HE)	23.5
Acrylic acid (AA)	420

表3. メタクリル酸エステル類の h-CLAT での結果

Chemical	Judgement	CD54 EC200 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CD86 EC150 ( $\mu\text{g/ml}$ )
Methyl methacrylate (MM)	+	-	1206
Ethyl methacrylate (ME)	+	-	1005
Butyl methacrylate (MB)	-	-	-
2-Hydroxyethyl methacrylate (M2-HE)	+	-	670
2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate (M2-DE)	+	219	-
2-Ethylhexyl methacrylate (M2-EH)	Not tested		
Methacrylic acid (MA)	+	359	517