

201133017A

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 23 年度 **総括・分担研究報告書**

研究代表者 香川(田中) 聡子

平成 24 (2012) 年 3 月



## 目 次

I. 総括研究報告書	
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. 分担研究報告書	
1. 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 香川（田中） 聡子、神野 透人	・・・ 8
2. 生活環境化学物質の感作性に関する研究 五十嵐 良明	・・・ 37
3. 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 -大気中揮発性成分 1,4-ナフトキノンに対する抗体の作製と その抗体を用いた細胞内標的タンパク質の検出- 熊谷 嘉人、新開 泰弘	・・・ 54
4. 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 神野 透人、岡元 陽子	・・・ 72
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 92
IV. 研究成果の刊行物・別刷	・・・ 93

# 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。平成23年度は気道刺激性の*in vitro*評価法として、前年度に引き続き化学物質刺激等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、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気中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105物質について評価した。その結果、家庭用品から放散することが確認されているグリコールエーテル類、溶剤や香料として広く使用されている脂肪族アルコール類がTRPV1、TRPA1のいずれか、或いは両イオンチャネルを活性化することを明らかにした。また、皮膚感作性に関する研究では、前年度LLNA:DA法で評価したアクリル酸エステル類及びメタクリル酸エステル類の皮膚感作性をh-CLATで評価し両結果を比較した。また、フマル酸エステル類及びマレイン酸エステル類の感作性をLLNA:DAで評価し、それらの構造活性相関について考察した。さらに、気道刺激・感作メカニズムに関する分子毒性学的な研究では、1,4-ナフトキノンに対する抗体を作製し、その細胞内標的分子を探索した。また、化学物質の放散に関する研究では、家庭用品からの放散化学物質を同定しその放散速度を迅速に評価するための手法として、前年度に構築した超小形チャンバー $\mu$ CTEを用いるハイスループット評価法を用い、家庭用カーペット20製品について放散化学物質の定量的な評価を行い、調査した65%の製品については、その使用によって室内空気質総揮発性有機化合物の暫定目標値を超える室内汚染が引き起こされる可能性を示した。また、評価したすべての製品から、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が放散されること、2-Ethyl-1-hexanol以外の脂肪族アルコール類が高頻度に比較的高濃度で放散されることを明らかにした。本研究では、2-Ethyl-1-hexanolがTRPイオンチャネルの活性化を引き起こすことを明らかにしており、家庭用品から放散するこれら化合物が、TRPイオンチャネル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。

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)、熊谷 嘉人(筑波大学大学院人間総合科学研究科教授)

研究協力者: 新開 泰弘(筑波大学大学院人間総合科学研究科助教)、岡元 陽子 (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バ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、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、アクリル酸/メタクリル酸エステル類、グリコールエーテル類や脂肪族アルコール類が家庭用品から放散されることを確認している。アクリル酸/メタクリル酸エステル類は現在急速に普及している液晶テレビをはじめ塗料や粘・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る。アクリル酸エステルと構造類似性を有するフマル酸エステル類の中には、欧州向けの中国製ソファに防かび剤として使用されて皮膚障害を生じた物質も含まれている。また、グリコールエーテル類は可塑剤や染料等の溶剤、化粧品基剤として広く使用されており、その中には生殖および発達への影響から、米国環境保護庁において有害物質規制法による「重要新規利用」規則の適用を提案された物質も含まれる。また、脂肪族アルコール類は溶剤や香料としても多用されており、その中にはシックハウス症候群との因果関係が指摘されている化学物質も含まれる。そこで本年度は、初年度の主要評価物質としたアクリル酸/メタクリル酸エステル類に加えて、グリコールエーテル類及び脂肪族アルコール類も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

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た (Fig. 1)。評価対象化合物として、可塑剤や接着剤、塗料の溶剤や化粧品原料として使用されるグリコール及びグリコールエーテル類、溶剤や香料としても多用される脂肪族アルコール類、家庭用殺虫剤成分として使用されるピレスロイド系薬剤やネオニコチノイド系薬剤及び金属化合物について、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  $Ca^{2+}$  濃度の増加を指標として、活性化の有無と、その活性化様式の濃度依存性を調べた。

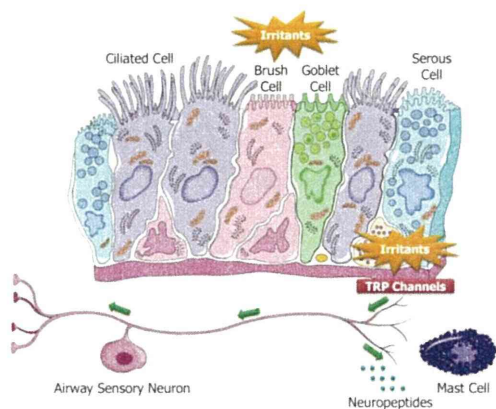


Fig. 1 Schematic presentation of airway hypersensitivity mediated by TRP ion channels.

### 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)と、

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について評価して両結果を比較した。また、フマル酸エステル類及びマレイン酸エステル類の感作性を LLNA:DA で評価した。

### B-3 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ナフトキノン類をモデル化合物として、本年度は 1,4-Naphthoquinone (1,4-NQ) の標的分子を同定することを目的として、抗 1,4-NQ 抗体を新規に作製し、細胞内タンパク質への 1,4-NQ の修飾に関して検討した。

### B-4 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

一般家庭室内における使用頻度や面積・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ペットを評価対象として Micro-Chamber/Thermal Extractor ( $\mu$ -CTE 250i)と呼ばれる加熱脱着機能を備えた小型 4 連チャンバー装置を用いて、放散される VOCs 及び SVOCs の定量的な評価手法について検討を行い、加熱脱離-GC/MS による TVOC の定量、デコンボリューション解析による家庭用品から放散される未同定 VOCs の暫定的な同定を行った。

## 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

家庭用品から放散する可能性のある化合物として、可塑剤や接着剤、塗料の溶剤や化粧品原料として使用されるグリコール及び

グリコールエーテル類 50 化合物、溶剤や香料としても多用される脂肪族アルコール類 19 化合物、家庭用殺虫剤成分として使用されるピレスロイド系薬剤 21 化合物、ネオニコチノイド系薬剤 7 化合物及び金属化合物 8 化合物を評価した。その結果、グリコール及びグリコールエーテル類では 50 化合物中 4 化合物にイオンチャネルの活性化能が見いだされ、中でも Ethyleneglycol mono 2-ethylhexyl ether 及び Diethyleneglycol mono 2-ethylhexyl ether が TRPV1 及び TRPA1 の顕著な活性化を引き起こすことが明らかになった。モノテルペン類を含む炭素数 6~10 の直鎖状若しくは分岐鎖状の飽和又は不飽和の脂肪族アルコール類 19 化合物については、1 化合物を除く 18 化合物が両イオンチャネル或いはいずれかのイオンチャネルの活性化を引き起こすことが明らかになった。特に、香料成分として洗剤等の家庭用品にも多用される 1-Nonanol や Tetrahydrogeraniol が両イオンチャネルを比較的低濃度領域で顕著な活性化を引き起こすことが判明した。また、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 が TRPA1 を顕著に活性化し、その EC<sub>50</sub> 値は約 170 μM であることが判明した (Fig. 2)。金属化合物のなかで、TRPA1 に対する活性化能を有することが報告されている ZnCl<sub>2</sub> 及び CdCl<sub>2</sub> 以外に、HgCl<sub>2</sub> 及び CH<sub>3</sub>HgCl がヒト TRPA1 を異なる機序で活性化することが示された。ピレスロイド系薬剤の中にもヒト TRPV1 またはヒト TRPA1 を活性化する薬剤が認められた。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。

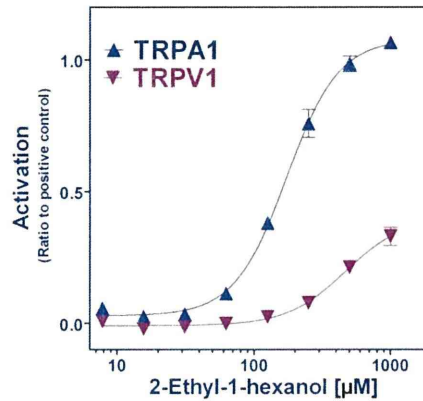


Fig. 2 Activation of hTRPV1 and hTRPA1 by 2-ethyl-1-hexanol.

### C-2 生活環境化学物質の感作性に関する研究

アクリル酸エステル類の感作性の有無に関して、h-CLAT 法と LLNA-DA 法とではほぼ一致した結果が得られ、2-Ethylhexyl acrylate が陰性と判定された以外、Methyl acrylate、Ethyl acrylate、Butyl acrylate、2-(Dimethylamino)ethyl acrylate 及び 2-Hydroxyethyl acrylate はいずれも陽性と判定された。しかし、感作性強度の順位付けに関しては評価法によって大きな違いが認められた。メタクリル酸エステル類に関しては 2-Ethylhexyl methacrylate 及び 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate が両評価法でいずれも感作性陽性と求められた。また、フマル酸ジエステル及びマレイン酸ジエステルについては、評価したマレイン酸ジエステル及びフマル酸ジエステル 6 化合物のいずれもが LLNA:DA 法によって皮膚感作性陽性と判定された。アルキル基の長さや立体構造の違いで感作性強度が変わることがわかった。



### C-3 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

1,4-NQ-KLH 結合体を抗原として抗体を作製しその特異性を検討した結果、得られた抗体は1,4-NQおよび1,2-NQを認識する抗体であることが分かった。1,4-NQをヒト肺上皮由来 A549 細胞に曝露後、本抗体でその結合タンパク質について検討したところ、複数のタンパク質への1,4-NQの修飾が観察された (Fig. 3)。以上より、本抗体は1,4-NQに対する細胞内センサータンパク質の同定に有用であることが示唆された。

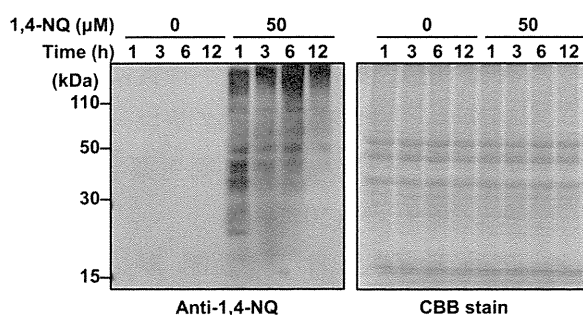


Fig. 3 Immunochemical detection of 1,4-naphthoquinone (1,4-NQ) bound proteins in A549 cells using anti-1,4-NQ antibody.

### C-4 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

調査したカーペット(20 製品)中 65%の製品については、その使用によって室内空気質 TVOC の暫定目標値を超える室内汚染が引き起こされる可能性が示された。個別 VOC については、シックハウス症候群との因果関係が報告されている 2-Ethyl-1-hexanolをはじめとする脂肪族アルコール類が高頻度に比較的高濃度で放散されることが明らかになった。SVOCs に関しては tris(2-Chloroethyl) phosphate や Dibutyl adipate が放散するカーペットが見いだされ、その放散速度から1日

当たりそれぞれ 6.7 mg、42 mg 程度の SVOCs 負荷を生じることが推定された。

### D. 結論

家庭用品から放散される化学物質の定量的解析の結果では、調査したカーペットの 65%の製品については、その使用によって室内空気質総揮発性有機化合物の暫定目標値を超える室内汚染が引き起こされる可能性が示された。また、評価したすべての製品から、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 が放散されることが明らかになった。また、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 イオンチャネル活性化物質のスクリーニングにおいても、2-Ethyl-1-hexanol をはじめとする脂肪族アルコール類がヒト TRP イオンチャネル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化合物が TRP イオンチャ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。

香川らは家庭用品から放散する可能性のある化学物質、及び、室内環境中に存在することが報告されている化学物質として約 200 物質について TRP イオンチャネルの活性化能を検討した。その結果、66 物質が TRPV1 及び TRPA1 のいずれか又は両チャネルの活性化を引き起こすことが明らかになった。これら化合物が複数同時に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得られた結果は、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。

#### D. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### F-1. 論文発表

- 1) Takayama N, Iwamoto N, Sumi D, Shinkai Y, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Kumagai Y. Peroxiredoxin 6 is a molecular target for 1,2-naphthoquinone, an atmospheric electrophile, in human pulmonary epithelial A549 cells. *J. Toxicol. Sci.* 36, 817-821, 2011

##### F-2. 学会発表

- 1) Jinno, H., Ohkawara, S., Furukawa, Y., Nishimura, T., Tanaka-Kagawa, T.: Activation of nociceptive transient receptor potential channels by phosphate ester flame retardants/plasticizers, Indoor Air 2011 (2011.6)
- 2) Tanaka-Kagawa, T., Ohkawara, S., Furukawa, Y., Nishimura, T., and Hideto, J.: Activation of nociceptive transient receptor potential channels by texanol and TXIB, Indoor Air 2011 (2011.6)
- 3) 神野 透人, 古川 容子, 大河原 晋, 西村 哲治, 香川(田中) 聡子: アクリル酸エステル類及びメタクリル酸エステル類によるヒト侵害刺激受容体 TRPA1 及び TRPV1 の活性化, 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7)

- 4) 香川(田中) 聡子, 古川 容子, 大河原 晋, 西村 哲治, 神野 透人: 重金属類によるヒト侵害刺激受容体 TRPA1 及び TRPV1 の活性化, 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7)
- 5) 千葉 弘太郎, 中森 俊輔, 小林 義典, 香川(田中) 聡子, 神野 透人: TRPV1 に対する大黃 anthraquinone 誘導体の活性評価, 日本生薬学会第 58 回年会 (2011.9)
- 6) 神野 透人, 大河原 晋, 西村 哲治, 香川(田中) 聡子: 室内環境化学物質による気道刺激性に関する研究・脂肪族アルコール類, フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー(2011.10)
- 7) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 西村 哲治, 神野 透人: 室内環境化学物質による気道刺激性に関する研究・グリコールエーテル類, フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー(2011.10)
- 8) 広瀬 玲子, 三浦 高, 新開 泰弘, 香川(田中) 聡子, 神野 透人, 熊谷 嘉人: 大気親電子物質 1,4-ナフトキノンによるタンパク質の化学修飾を検出する免疫化学的手法の開発, 衛生薬学・環境トキシコロジー(2011.10)
- 9) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 西村 哲治, 神野 透人: 気道刺激性を有する室内環境化学物質の探索 -TRP イオンチャネルの活性化を指標としたスクリーニング-, 平成 23 年度室内環境学会学術大会 (2011.12)
- 10) 岡元 陽子, 香川(田中) 聡子, 田中 研次, 新井 悦恵, 古川 容子, 神野 透人, 西村 哲治: 家庭用品から放散する準揮発性有機化合物のスクリーニング試験に関する研究 -. 平成 23 年度室内環境学会学術大会, 2011 年 12 月.
- 11) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 西村 哲治,

神野 透人:テルペン類酸化生成物による  
ヒト侵害受容器 TRP イオンチャネルの  
活性化, 日本薬学会第 132 年会 (2012.3).

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  
研究分担者 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評価した。本年度は、家庭用品から放散する可能性のある化合物として、可塑剤や接着剤、塗料の溶剤や化粧品原料として使用されるグリコール及びグリコールエーテル類 50 化合物、溶剤や香料としても多用される脂肪族アルコール類 19 化合物、家庭用殺虫剤成分として使用されるピレスロイド系薬剤 21 化合物、ネオニコチノイド系薬剤 7 化合物及び金属化合物 8 化合物を評価の対象とした。その結果、グリコール及びグリコールエーテル類では 50 化合物中 4 化合物にイオンチャネルの活性化能が見いだされ、中でも Ethyleneglycol mono 2-ethylhexyl ether 及び Diethyleneglycol mono 2-ethylhexyl ether が TRPV1 及び TRPA1 の顕著な活性化を引き起こすことが明らかになった。モノテルペン類を含む炭素数 6~10 の直鎖状若しくは分岐鎖状の飽和又は不飽和の脂肪族アルコール類 19 化合物については、1 化合物を除く 18 化合物が両イオンチャネル或いはいずれかのイオンチャネルの活性化を引き起こすことが明らかになった。特に、香料成分として洗剤等の家庭用品にも多用される 1-Nonanol や Tetrahydrogeraniol が両イオンチャネルを比較的低濃度領域で顕著な活性化を引き起こすことが判明した。また、シックハウス症候群との関連が指摘されている 2-Ethyl-1-hexanol が TRPA1 を顕著に活性化し、その EC<sub>50</sub> 値は約 170 μM であることが明らかになった。金属化合物では、TRPA1 に対する活性化能を有することが報告されている ZnCl<sub>2</sub> 及び CdCl<sub>2</sub> 以外に、HgCl<sub>2</sub> 及び CH<sub>3</sub>HgCl がヒト TRPA1 を異なる機序で活性化することが明らかになった。ピレスロイド系薬剤の中にもヒト TRPV1 またはヒト TRPA1 を活性化する薬剤が認められた。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<sup>1)</sup>、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し、初年度において家庭用品から放散される可能性のあるアクリル酸エステル類や可塑剤難燃剤として使用されるリン酸トリエステル類、また、実際に室内空气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を主な評価対象として97化合物について試験を実施した。

本年度の研究では、家庭用品から放散する可能性のある化合物として、可塑剤や接着剤、塗料の溶剤や化粧品原料として使用されるグリコール及びグリコールエーテル類、溶剤や香料としても多用される脂肪族アルコール類、家庭用殺虫剤成分として使用されるピレスロイド系薬剤やネオニコチノイド系薬剤及び金属化合物を評価の対象としてヒト TRPV1 及び TRPA1 活性化物質のスクリーニングを行い、その活性化様式の濃度依存性を検討した。

## B. 研究方法

### B-1 ヒト TRPV1 及び TRPA1 安定発現細胞株

ヒト後根神経節 Total RNA より RT-PCR によって TRPV1 及び TRPA1 cDNA を pENTR/D-TOPO Vector にクローニングし、Gateway LR 反応により pEF5/ERT/V5-DEST Vector にサブクローニングした。得られた Plasmid を Lipofectamine LTX をもちいて pOG44 Vector とともに Flp-In 293 細胞に Co-transfection し、Hygromycin B を含む選択培地中で培養を行って耐性細胞株を選択してヒト TRPV1 及び TRPA1 安定発現

細胞株を樹立した (TRPV1/HEK293, TRPA1/HEK293)。

### 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  $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ 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  $37^\circ\text{C}$  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 グリコール及びグリコールエーテル類

グリコールエーテル類は溶剤として広く使用されており、実際に家庭用品からの放散化学物質として高頻度に検出される<sup>4)</sup>。特にノート型パーソナルコンピュータから、生殖および発達への影響から、米国環境保護庁 (EPA) において有害物質規制法による「重要新規利用」規則の適用を提案された Diethylene glycol dibutyl ether が検出される可能性がある<sup>4)</sup>。本研究では、Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Hexyl-, 2-Ethylhexyl- の脂肪族並びに Benzyl-の各基を有するエチレングリコール系エーテル、プロピレングリコール系エーテル、及び一部のグリコールエーテルの酢酸エステルを含む 50 化合物 (Table 1) について、ヒト TRPV1 及び TRPA1 イオンチャネルの活性化能を評価した。

その結果、評価した 50 化合物中 4 化合物にイオンチャネルの活性化能が見いだされた。それら 4 化合物の構造式を Fig. 2 に示す。ヒト TRPV1 に対しては Ethylene glycol monohexyl ether、Diethylene glycol monohexyl ether 及び Diethylene glycol mono 2-ethylhexyl ether が活性化作用を有することが明らかになった (Fig. 3)。中でも Diethylene glycol mono 2-ethylhexyl ether が顕著な活性化作用を示し、 $\text{EC}_{50}$  値は約  $60 \mu\text{M}$  であった (Table 2)。一方、ヒト TRPA1 については、Ethylene glycol mono 2-ethylhexyl ether 及び Diethylene glycol mono 2-ethylhexyl ether 処理によって典型的な陽性対照物質である Cinnamic aldehyde と同等もしくはそれ以上の活性



化が引き起こされることが明らかになった (Fig. 3 & Table 2)。尚、いずれの化合物によっても 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。Diethyleneglycol mono 2-ethylhexyl ether は塗料やインキ用溶剤、界面活性剤として使用されていることからこれらを含む消費者製品から放散するグリコールエーテル類が TRP イオンチャネルの活性化を介してシックハウス症候群や喘息の増悪等を引き起こす可能性も考えられる。

### C-2 脂肪族アルコール類

モノテルペン類を含む炭素数 6~10 の直鎖状若しくは分岐鎖状の飽和又は不飽和の脂肪族アルコール類 19 化合物 (Table 3) について、ヒト TRPV1 及び TRPA1 イオンチャネルの活性化能を評価した。それら化合物の構造式を Fig. 4 に示す。

評価した結果、1 位に水酸基を有する炭素数 6 以上の直鎖状アルコール類にヒト TRPV1 活性化能が認められ (Fig. 5)、その  $\text{EC}_{50}$  値は 1-Nonanol, 1-Decanol < 1-Octanol < 1-Heptanol < 1-Hexanol であった (Table 3)。1-Octanol を基本骨格とするモノテルペンアルコール類の中で、これまでに TRPV1 の活性化を引き起こすことが報告されている Geraniol や (-)-b-Citronellol のほかに Tetrahydrogeraniol がこれらテルペン類に比べて低い濃度で TRPV1 を活性化することが判明した (Fig. 6 & Table 4)。それぞれの脂肪族アルコール類について 3 位に水酸基を有する化合物の活性化能を評価したところ、活性化の程度はおしなべて低いものの、3-Octanol、3-Nonanol、

3-Decanol に TRPV1 活性化能が認められた (Fig. 5)。

一方、TRPA1 に関しては、1-, 3-Hexanol、1-, 3-Heptanol、1-Decanol 以外の化合物に顕著な活性化能が認められ (Fig. 5, 6, 7)、3-Octanol を基本骨格とするモノテルペンアルコール類について  $\text{EC}_{50}$  値を比較したところ、Tetrahydrolinalool < Dihydrolinalool < Linalool であった (Table 4)。さらに、これまでに疫学調査でシックハウス症候群との関連が指摘されている 2-Ethyl-1-hexanol が TRPA1 を顕著に活性化し (Fig. 8)、その  $\text{EC}_{50}$  値は約 170  $\mu\text{M}$  であることが明らかになった (Table 4)。尚、いずれの化合物によっても 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。以上の結果から、これら脂肪族アルコール類が TRP イオンチャネルの活性化を介してシックハウス症候群や喘息の増悪等を引き起こす可能性も考えられる。

### C-3 金属化合物

室内環境汚染物質である室内のハウスダストには、花粉やカビ・ダニのようなアレルゲンのほかに、鉛をはじめとする重金属類が含まれていることが報告されている。そこで、昨年度の本研究課題で評価した金属化合物にヒ素化合物を加え、金属化合物として  $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{CdCl}_2$ 、 $\text{HgCl}_2$ 、 $\text{CH}_3\text{HgCl}$ 、 $\text{AsNaO}_2$ 、 $\text{HAsNaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Table 5) についてヒト TRPV1 及び TRPA1 イオンチャネルの活性化能及びその濃度依存性を評価した。

その結果、TRPV1 については  $\text{CdCl}_2$  が弱いながら活性化能を有することが判明

した (Fig. 9)。

一方、TRPA1 については、これまでに活性化することが報告されている ZnCl<sub>2</sub> 及び CdCl<sub>2</sub> 以外に、HgCl<sub>2</sub> 及び CH<sub>3</sub>HgCl がヒト TRPA1 活性化能を有することが明らかになった (Fig. 10)。いずれの水銀化合物によっても濃度依存的な TRPA1 活性化が認められたが、hill 係数の違いから HgCl<sub>2</sub> と CH<sub>3</sub>HgCl では異なる機序で作用している可能性が考えられる (Fig. 10 & Table 6)。

今回の実験条件下では 3 価及び 5 価のヒ素化合物による TRPV1 及び TRPA1 活性化は認められなかった (Fig. 9 & 10)。尚、いずれの化合物によっても 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。

#### C-4 ピレスロイド系薬剤

ピレスロイド系薬剤は衛生害虫や不快害虫の防除の目的で使用される家庭用殺虫剤・防虫剤に有効成分として含まれ、多用されている。本研究では、市販の家庭用殺虫剤に使用されるピレスロイド系薬剤として 21 化合物 (Table 7) を選定し、ヒト TRPV1 及び TRPA1 イオンチャネルの活性化能を評価した。

その結果、活性化の程度は弱いものの、Imiprothrin に TRPV1 の活性化能が認められた。また TRPA1 については Prallethrin、Profluthrin、Pyrethrins Resmethrin が活性化能を示した (Fig. 11)。尚、いずれの化合物によっても 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。

#### C-5.ネオニコチノイド系薬剤

ネオニコチノイド系薬剤は農業用以外にも一般家庭でも、ガーデニング用薬剤、防蟻剤、ペットのシラミ・ノミ取り、ゴキブリ駆除、住宅の化学建材など広範囲に使用されている。本研究では、ネオニコチノイド系薬剤として 7 化合物 (Table 8) を選定しヒト TRPV1 及び TRPA1 イオンチャネルの活性化能を評価した。その結果本研究の実験条件においては、いずれの化合物によっても TRP イオンチャネルの活性化は認められなかった。

#### D. 結論

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 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する可能性のある物質として、可塑剤や接着剤、塗料の溶剤や化粧料原料として使用されるグリコール及びグリコールエーテル類 50 化合物、溶剤や香料としても多用される脂肪族アルコール類 19 化合物、家庭用殺虫剤成分として使用されるピレスロイド系薬剤 21 化合物、ネオニコチノイド系薬剤 7 化合物及び金属化合物 8 化合物を評価の対象とした。

その結果、グリコール及びグリコールエーテル類では 50 化合物中 4 化合物にイオンチャネルの活性化能が見いだされ、中でも Ethyleneglycol mono 2-ethylhexyl ether 及び Diethyleneglycol mono 2-ethylhexyl ether が TRPV1 及び TRPA1 両

イオンチャネルの顕著な活性化を引き起こすことが明らかになった。

モノテルペン類を含む炭素数 6~10 の直鎖状若しくは分岐鎖状の飽和又は不飽和の脂肪族アルコール類 19 化合物については、1 化合物を除く 18 化合物が TRPV1 及び TRPA1 両イオンチャネル或いはいずれかのイオンチャネルの活性化を引き起こすことが明らかになった。特に、香料成分として洗剤等の家庭用品にも多用される 1-Nonanol や Tetrahydrogeraniol が両イオンチャネルを比較的低濃度領域で顕著な活性化を引き起こすことが判明した。

金属化合物では、TRPA1 に対する活性化能を有することが報告されている ZnCl<sub>2</sub> 及び CdCl<sub>2</sub> 以外に、HgCl<sub>2</sub> 及び CH<sub>3</sub>HgCl がヒト TRPA1 を異なる機序で活性化することが明らかになった。

ピレスロイド系薬剤の中にもヒト TRPV1 またはヒト TRPA1 を活性化する薬剤が認められた。

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。

これら多種多様な化合物が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複数の化合物が同時に影響を及ぼし、気道刺激を相加的及び相乗的引き起こす可能性も考えられる。

本研究によって得られた成果は、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ー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. 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご協力頂いた北里大学薬学部中森俊輔氏、池田 香氏に謝意を表します。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 引用文献

- 1) Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.Y., Allan, I., Basbaum, A.I. and Julius, D. : TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell*, **124**, 1269-1282 (2006).
- 2) Bessac, B.F. and Jordt, S.E.: Breathtaking TRP channels:TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology (Bethesda)*, **23**, 360-370 (2008).
- 3) Bessac, B.F., Sivula, M., von Hehn, C.A., Caceres, A.I., Escalera, J. and Jordt, S.E.: Transient receptor potential ankyrin 1 antagonists block the noxious effects of toxic industrial isocyanates and tear gases. *FASEB J*, **23**, 1102-1114 (2009).
- 4) 西村哲治、神野透人、香川（田中）聡子：平成 23 年度化学物質に係る調



査 室内空気環境汚染化学物質調査報告書 (2012).

- 5) 森 美穂子, 原 邦夫, 宮北隆志, 石竹達也: 新築大学校舎の室内空気質と利用者の体調との関連. 日本衛生学雑誌, **66**, 122-128 (2011).
- 6) 上島通浩, 柴田英治, 酒井 潔, 大野浩之, 石原伸哉, 山田哲也, 竹内康浩, 那須民江: 2-エチル-1-ヘキサノールによる室内空気汚染: 室内濃度, 発生源, 自覚症状について. 日本公衆衛生学雑誌, **12**. 1021-1031 (2005).
- 7) Tomoto, T., Akihiro, Moriyoshi, A., Sakai., K., Eiji, Shibata, E. and Kamijima, M.: Identification of emission sources of organic matter that decalcifies cement concrete and generate alcohols and ammonia gases. *Building and Environment*, **44**. 2000-2005 (2009).

## H. 研究発表

### H-1. 論文発表

なし

### H-2. 学会発表

- 1) Jinno, H., Ohkawara, S., Furukawa, Y., Nishimura, T., Tanaka-Kagawa, T.: Activation of nociceptive transient receptor potential channels by phosphate ester flame retardants/plasticizers, *Indoor Air* 2011 (2011.6)
- 2) Tanaka-Kagawa, T., Ohkawara, S., Furukawa, Y., Nishimura, T., and Hideto, J.: Activation of nociceptive transient receptor potential channels by texanol and TXIB, *Indoor Air* 2011 (2011.6)
- 3) 神野 透人, 古川 容子, 大河原 晋, 西村 哲治, 香川 (田中) 聡子: アクリル酸エステル類及びメタクリル酸エステル類によるヒト侵害刺激受容体 TRPA1 及び TRPV1 の活性化, 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7)
- 4) 香川 (田中) 聡子, 古川 容子, 大河原 晋, 西村 哲治, 神野 透人: 重金属類によるヒト侵害刺激受容体 TRPA1 及び TRPV1 の活性化, 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7)
- 5) 千葉 弘太郎, 中森 俊輔, 小林 義典, 香川 (田中) 聡子, 神野 透人: TRPV1 に対する大黄 anthraquinone 誘導体の活性評価, 日本生薬学会第 58 回年会 (2011.9)
- 6) 神野 透人, 大河原 晋, 西村 哲治, 香川 (田中) 聡子: 室内環境化学物質による気道刺激性に関する研究・脂肪族アルコール類, フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011.10)
- 7) 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 西村 哲治, 神野 透人: 室内環境化学物質による気道刺激性に関する研究・グリコールエーテル類, フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011.10)
- 8) 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 西村 哲治, 神野 透人: 気道刺激性を有する室内環境化学物質の探索 -TRP イオンチャネルの活性化を指標

としたスクリーニング-, 平成 23 年度  
室内環境学会学術大会 (2011.12)

- 9) 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 西村  
哲治, 神野 透人: テルペン類酸化生成  
物によるヒト侵害受容器 TRP イオン  
チャンネルの活性化, 日本薬学会第 132  
年会 (2012.3) .

I. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を  
含む)

I-1. 特許取得  
なし

I-2. 実用新案登録  
なし

**Table 1 The list of compounds assayed in this study  
-Glycols/Glycol ethers-**

<b>Compounds</b>		<b>Cas No</b>
<b>Glycols/Glycol ethers</b>		
1	Propylene glycol	57-55-6
2	2-Methoxyethanol	109-86-4
3	2-(2-Methoxyethoxy)ethanol	111-77-3
4	2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethanol	112-35-6
5	Polyethylene glycol monomethyl ether	9004-74-4
6	2-Isopropoxyethanol	109-59-1
7	2-Methoxyethyl acetate	110-49-6
8	2-Butoxyethanol	111-76-2
9	2-(2-Butoxyethoxy)ethanol	112-34-5
10	Triethylene glycol monobutyl ether	143-22-6
11	2-Isobutoxyethanol	4439-24-1
12	2-(2-isobutoxyethoxy)ethanol	18912-80-6
13	Ethylene glycol monohexyl ether	112-25-4
14	Diethylene glycol monohexyl ether	112-59-4
15	Ethyleneglycol mono 2-ethylhexylether	1559-35-9
16	Diethyleneglycol mono 2-ethylhexylether	1559-36-0
17	Allyloxyethanol	111-45-5
18	2-Ethoxyethyl acetate	111-15-9
19	2-Phenoxyethanol	122-99-6
20	2-(Benzyloxy)ethanol	622-08-2
21	2-[2-(Benzyloxy)ethoxy]ethanol	2050-25-1
22	1-Methoxy-2-propanol	107-98-2
23	Dipropylene glycol monomethyl ether	34590-94-8
24	Tripropylene glycol monomethyl ether	20324-33-8
25	1-propoxy-2-propanol	1569-01-3
26	Dipropylene glycol propyl ether	29911-27-1
27	1-Butoxy-2-propanol	5131-66-8
28	Dipropylene glycol monobutyl ether	29911-28-2
29	Tripropylene Glycol monobutyl ether	55934-93-5
30	1-Phenoxy-2-propanol	770-35-4