

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：アクリル酸エステル類の皮膚感作性を h-CLAT 法における細胞表面抗原 CD54 及び CD86 の発現率から評価した。それぞれの物質の感作性の有無及び強度の結果は LA:DA 法での結果と比較した。メタクリル酸エステルについても再試験した。LLNA:DA 法でアクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸ブチル、アクリル酸 2-エチルヘキシル、アクリル酸 2-ジメチルアミノエチル、アクリル酸 2-ヒドロキシエチル及びアクリル酸は全て陽性と判定されているが、h-CLAT 法ではアクリル酸 2-エチルヘキシルが陰性と判定された。h-CLAT 法における感作性強度の順序付けでは、アクリル酸 2-ヒドロキシエチルが最も強いと評価された。アクリル酸エステル類の感作性の有無に関しては h-CLAT 法と LLNA-DA 法とではほぼ一致した結果が得られたが、感作性強度の順序に関しては大きな違いが認められた。メタクリル酸エステル類のうちいくつは h-CLAT 法と LLNA:DA 法との間で判定に違いが認められた。h-CLAT 法での試験濃度は細胞毒性強度に依存することが多く、感作性強度の順序付けに関係した。家庭用品の防カビ剤として用いられていたフマル酸ジメチルによる接触皮膚炎が報告されたことから、これと類似構造を有するフマル酸ジエステル及びマレイン酸ジエステル計 6 種の皮膚感作性を LLNA:DA 法によって評価した。試験したマレイン酸ジエステル及びフマル酸ジエステルはいずれも皮膚感作性を有した。マレイン酸ジエステル及びフマル酸ジエステルともアルキル基が長くなるにつれ感作性強度は弱くなる傾向が認められた。フマル酸ジメチル及びマレイン酸ジメチルは、中程度の陽性対照物質として知られる  $\alpha$ -hexyl cinnamaldehyde よりも感作性は強く、フマル酸ジブチル及びマレイン酸ジブチルが同程度あるいはそれ以下と考えられた。同じアルキル基を持つフマル酸ジエステルとマレイン酸ジエステルを比較したところ、フマル酸ジエステルの方がマレイン酸ジエステルよりも感作性は強かった。同じ化学構造式を有する物質であっても cis、trans と幾可異性体の違いで感作性強度が変化することがわかった。

## 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いる。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ないかと疑われている。こうした室内空気中の化学物質に対する関心の高まりから、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気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。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。揮発性物質の気道感作性、例えばぜんそく等は即時型（I型）アレルギーに分類される。しかし家庭用品に使用される化学物質について、感作性の観点からリスク評価した事例は極めて限られている。また、家庭用品の使用状況、あるいは生活様式の変化に応じた化学物質の評価が随時必要となっている。

2006年頃から欧州では、家具、ソファ、靴などに起因すると考えられる接触皮膚炎の報告が頻発し、その原因が防かび剤として

同封したフマル酸ジメチルが昇華し、製品表面に付着、これに接触したためとわかった。フマル酸ジメチルは強い刺激性を持つ中程度の強度の皮膚感作性物質と判定されており、欧州では2009年よりこれを含む製品の流通、販売を禁止している。しかしながら国内で販売されている家庭用品の実態調査の結果、フマル酸ジメチル、その幾可異性体であるマレイン酸ジメチル、及びフマル酸ジブチルが検出された。フマル酸ジブチル及びマレイン酸ジメチルともフマル酸ジメチルとはアルキル鎖や立体構造の違いは少なく、アクリル酸エステル類が2分子結合したような類似構造を有することから、皮膚感作性や交差反応性が疑われる。

現在、化学物質の即時型アレルギー性を評価する試験法は確立されていない。一方、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に収載されている。皮膚感作性に関してはモルモットを用いる試験法に加えてマウスを用いる local lymph node assay (LLNA) が OECD テストガイドラインに採用されている。LLNA は感作性物質による局所のリンパ節活性化反応、すなわちリンパ節細胞の増殖率を  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込み量を指標として判定するが、近年 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の取り込み量あるいは細胞内 ATP 量を測定する 2 つの改変法が新たに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。よって、まずは試験法が確立

している皮膚感作性について評価することが重要と思われる。皮膚感作性物質と気道感作性物質とも感作誘導段階は類似の反応が進むと考えられる。同一の試験法でそれぞれの物質を試験することで、気道感作性の評価に有用な指標を見出すことができるかもしれない。

昨年度は、メタクリル酸エステル類とアクリル酸エステル類の皮膚感作性を LLNA:DA 法を用いて評価した。メタクリル酸エステル類については、h-CLAT 法での検討も行った。本年度は、アクリル酸エステル類について h-CLAT 法による皮膚感作性の評価を行った。メタクリル酸エステル類についても再試験を行い、それぞれ LLNA:DA 法での結果と比較した。

更に、フマル酸ジメチルの皮膚感作性を確認するとともに、アルキル基の長さの異なるフマル酸ジエステル、及びその幾可異性体であるマレイン酸ジエステルについても LLNA:DA 法で評価し、感作性強度を順序づけた。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

アクリル酸メチル (methyl acrylate, MA)、アクリル酸エチル (ethyl acrylate, EA)、アクリル酸ブチル (butyl acrylate, BA)、アクリル酸 2-エチルヘキシル (2-ethylhexyl acrylate, 2EHA)、アクリル酸 2-ジメチルアミノエチル (2-(dimethylamino)ethyl acrylate, 2DMEA)、アクリル酸 2-ヒドロキシエチル (2-hydroxyethyl acrylate, 2HEA)、アクリル酸 (acrylic acid, AA)、メタクリル酸メチル (methyl methacrylate, MM)、メタクリル酸エチル (ethyl methacrylate, EM)、メタクリル酸ブチル (butyl

methacrylate, BM)、メタクリル酸 2-エチルヘキシル (2-ethylhexyl methacrylate, 2EHM)、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (2-hydroxyethyl methacrylate, 2HEM) 及びメタクリル酸 (methacrylic acid, MAA) を試験した。

フマル酸ジメチル (dimethyl fumarate, DMF)、フマル酸ジエチル (diethyl fumarate, DEF)、フマル酸ジブチル (dibutyl fumarate, DBF)、マレイン酸ジメチル (dimethyl maleate, DMM)、マレイン酸ジエチル (diethyl maleate, DEM) 及びマレイン酸ジブチル (dibutyl maleate, DBM) は市販品をそのまま試験物質として用いた。それぞれの化学構造式を図 1 に示した。

### 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。

### 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 10% 牛胎児血清 (FBS)、1% antibiotic-antimycotic 溶液 (Invitrogen 社) 及び 0.055 mmol/ml 2-mercaptoethanol を含有する RPMI-1640 培地 (FBS-RPMI) を用いて培養した。

### 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% を最高に溶解度、刺激性及び毒性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。LNC浮遊液 20  $\mu$ lをPBS 1.98 mlに入れ100倍に希釈後、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、希釈LNC浮遊液 100  $\mu$ lをATP抽出液 100  $\mu$ lと混合し、20秒後発光試薬 100  $\mu$ lを加えて攪拌後、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。ATP量(RLU)について溶媒群に対する試験群の比(stimulation index, SI)を求め、この値が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。

#### 5. 試験濃度の設定

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  $\mu$ mフィルターを通して滅菌し、試験時、培地で指定の濃度に希釈した。THP-1細胞浮遊液( $2 \times 10^6$  cells/ml) 80  $\mu$ lを96穴プレートの各穴に入れ、種々の濃度の試験溶液 80  $\mu$ l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  $\mu$ l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、75%の細胞生存率を示す濃度をCV75( $\mu$ g/ml)として求めた。

#### 6. h-CLAT

THP-1細胞は $0.1 \sim 0.2 \times 10^6$  cell/mlの濃度で48~72時間前培養後、試験に用いた。細胞浮遊液( $2 \times 10^6$  cell/ml)を500  $\mu$ l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  $\mu$ lを加えた。24時間培養後、4 $^{\circ}$ C、280 Gで3分間遠心して細胞を回収した。0.1%牛血清アルブミン(BSA)含有PBS(BSA-PBS) 1 mlを加え、4 $^{\circ}$ C、700 Gで3分間遠心して洗浄する操作を2回行った後、0.01% globlins, Cohn fraction II, III (Sigma-Aldrich社)-PBS溶液を600  $\mu$ l加えて、氷上で10分間処理(FcRブロッキング)した。次にこれを3つに分け、それぞれにFITC標識抗CD86抗体(clone FUN-1, BD Pharmingen社)6  $\mu$ l、FITC標識抗CD54抗体(clone 6.5B5, DAKO社)3  $\mu$ lまたはisotype controlとしてFITC標識マウスIgG1(clone DAK-G01, Dako社)3  $\mu$ lを入れ、暗所、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  $\mu$ lに再懸濁しpropidium iodide (PI) 25  $\mu$ g/mlを10  $\mu$ l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%以上及び/またはCD54のRFIが200%以上を示す時、その物質を感作性物質と判定した。

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

### C. 研究結果

#### 1. アクリル酸エステル類及びメタクリル酸エステルの h-CLAT 法での評価

試験物質で処理した細胞を PI で染色し、フローサイトメーターで生存率を解析した。アクリル酸エステル類の細胞毒性反応曲線を図 2 に示した。2HEA の CV75 値は最も低く 18 µg/ml であった。逆に 2DMEA は最も高い 520 µg/ml であった。これ以外のアクリル酸エステル類については、ほぼ同じ CV 値を示した。

ア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 3 に示した。BA については CD86 発現量のみが陽性基準値を超えた。MA、EA、AA、2HEA 及び 2DMEA は CD54、CD86 いずれも基準値を超えた。2EHA については CD54 及び CD86 発現率とも陽性基準を超えなかった。CD54 の RFI 値が 200% を超えた時の最低試験濃度 (EC200) 及び/または CD86 の RFI 値が 150% を超えた時の最低試験濃度 (EC150) を求めた (表 1)。2HEA の EC200 が 9 µg/ml と最も低く、次に EA が 45 µg/ml の EC150 値を示した。

メタクリル酸エステル類のうち、MM、EM 及び BM についての細胞毒性は弱く、CV75 値は得られなかった (図 4)。メタクリル酸エステル類の h-CLAT 法再試験で得られた結果を表 2 に示した。MM については CD54 及び CD86 両方の発現量が陽性基準値を超えた。EM 及び 2DMEM は CD86 のみ陽性

基を超えた。2EHM 及び MAA については CD54 のみが基準を上回った。BM 及び 2HEM については CD54 及び CD86 とも陽性基準の RFI 値は得られなかった。

h-CLAT 法と LLNA:DA 法との結果の比較を表 3 に示した。昨年度の結果より、アクリル酸エステル類は LLNA:DA 法でいずれも感作性陽性で、AA が最も強く、以下 2DMEA、2HEA としている。h-CLAT 法では 2EHA が陰性となった以外は LLNA:DA の判定結果と一致した。しかし、h-CLAT で EC200 及び EC150 から求めた感作性強度の順序は LLNA:DA での順序とほとんど一致しなかった。

メタクリル酸エステル類について LLNA:DA 法で陽性と判定した BM、2EHM、2DMEM 及び 2HEM のうち、h-CLAT 法再試験では 2EHM 及び 2DMEM を陽性、BM は陰性とした。h-CLAT 法では LLNA:DA 法とは逆に MM、EM 及び MAA を陽性と判定が異なった。LLNA:DA では 2DMEM の感作性強度が最も強く、以下 BM、2HEM となった。一方 h-CLAT では、2HEM の感作性が最も強く、以下 2DMEM、MAA と続き、LLNA:DA とは大きく異なった。

#### 2. フマル酸ジエステル及びマレイン酸ジエステルの LLNA:DA 法での評価

フマル酸ジエステル及びマレイン酸ジエステルはいずれも 3~4 段階の濃度を設定し適用した。DMF の SI 値は 1% で 4.5 を示し、5% まで濃度依存的に増加した (図 5)。DEF は 10%、25% 及び 50% で 3 を超える高い SI 値を示した。DBF は 50% で試験したところ体重増加が若干抑制されるものの、SI 値は 3 を超えた。これらの結果より、フマル酸ジエステル 3 種はいずれも皮膚感作性を有すると判定した。SI 値が 3 を超える最低試

験濃度からこれらの 3 種の感作性強度を順序づけると、DMF が最も強く、以下 DEF、DBF の順であった。

DMM は 1% で SI 値 3 を超えないが、2.5% で 3 を超え、5% で更に高い SI 値が得られた。DEM は 10% で 3 を超えないが、25%、50% と濃度が高くなるにつれ SI 値も 3 を超え高くなった。DBM は 1~10% 濃度で SI 値の上昇が認められなかったため、50% で再試験したところ 3 を超えた。本濃度では耳に若干の炎症を認めたが毒性を示している様子はなかった。今回試験したマレイン酸ジエステル 3 種はいずれも感作性を有すると判定した。前述同様に、感作性強度を順序づけると DMM が最も強く、以下 DEM、DBM の順となった。

同じアルキル基を持つフマル酸ジエステルとマレイン酸ジエステルについて同じ濃度での SI 値を比較したところ、DEF 及び DMF の方が DEM 及び DMM よりも大きな値を示した。

#### D. 考察

アクリル酸エステル類の皮膚感作性を h-CLAT 法で評価した。MA、EA、AA、2DMEA 及び 2HEA による CD54 及び CD86 の発現増加率はいずれも陽性基準を超えた。BA は CD86 の増加率のみが基準を超えた。しかし 2EHA は陽性とならず、LLNA:DA の判定とは異なった。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 リンパ球との接着に関与している。CD54 と CD86 抗原の生体内での働きは異なり、感作性物質によってもこれらの発現率は異なることがわかっている。

メタクリル酸エステル類について再評価した。MAA は CD54 及び CD86 いずれの発現量とも増加させ、昨年度の結果と一致した。2DMEM の感作性の有無については一致したが、CD86 の発現率のみが基準を超え、昨年度 (CD54 だけ) とは異なった。MM、EM 及び 2EHM は陽性となったが、2HEM は今回陰性と判定された。LLNA:DA では MM、EM 及び MAA は陰性、2HEM は陽性となっており、LLNA:DA と h-CLAT との判定は若干違いが認められた。これらの相違の理由はよくわからないが、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い。一方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、高濃度での試験が困難となることが多い。

h-CLAT 法において EC200 及び EC150 で低い値を示す試験物質ほど感作性強度が強いとした。これを基に順序付けすると、アクリル酸エステル類は 2HEA > EA > MA > BA > 2DMEA > AA となり、メタクリル酸エステル類は 2DMEM > MAA > 2EHM > MM > EM となった。h-CLAT 法による感作性強度の順序は、LLNA:DA での順位と一致しなかった。LLNA:DA では各物質とも 1 用量でしか検討しておらず、かつその SI 値の大きさを順序付けをしていることも要因と考えられる。通常の LLNA:DA のように複数の用量で試験し、例えば SI 値が 3 を超える濃度で感作性強度を順序づけると今回の順位とは変化する可能性もある。h-CLAT の試験濃度は CV75 値に依存する。すなわち、試験物質の水溶性及び細胞毒性強度が試験濃度を決定し、この濃度範囲内で EC200 及び EC150 の値が求まる。事実、細胞毒性強

度の順序と感作性強度の順序は似ていた。RFI 値で強度を決める方法も考えられるが、この値は実験ごとに大きく変動する。したがって、類似化学物質を試験した場合の感作性強度の順序は細胞毒性試験の結果でおおよそ推定できると考えられる。

DMF、DEF 及び DBF の SI 値はいずれも 3 を超え、フマル酸ジエステル 3 種はいずれも皮膚感作性を有することが明らかとなった。SI 値が 3 を超える最低試験から感作性強度を順序づけると、DMF が最も強く、以下 DEF、DBF の順であった。フマル酸ジエステルのアルキル基が長くなるにつれ感作性強度は弱くなる傾向が認められた。DMF は使用禁止の措置が取られているが、その強い皮膚感作性が原因と考えられる。モルモットを用いた試験で DMF の皮膚感作性は報告されているが、今回の試験でも DMF の強い感作性を検出した。DBF を扱う職場での接触皮膚炎の症例があるが、おそらく DBF の感作性によると思われる。

マレイン酸ジエステル 3 種も感作性を有することがわかった。SI 値が 3 を示す濃度から感作性強度を順序づけると DMM が最も強く、以下 DEM、DBM の順となった。マレイン酸ジエステルについてもフマル酸ジエステルと同様にアルキル鎖の短い方が感作性は強かった。

同じアルキル基を持つフマル酸ジエステルとマレイン酸ジエステルについて同じ濃度での SI 値を比較したところ、DEF 及び DMF の方が DEM 及び DMM よりも大きな値を示した。DBF は DBM よりも SI 値が低いがこれを DBF の毒性による抑制と考えた。よって、同じ長さのアルキル基を持つ場合、フマル酸ジエステルの方がマレイン酸ジエステルよりも強いと判断した。同じ分子量で

あっても cis、trans と幾可異性体の構造の違いで皮膚感作性の強度が変化することがわかった。

マレイン酸ジエステルとフマル酸ジエステルは  $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニルの化学構造を有する異性体である。SH 基を有するグルタチオンのようなタンパク質はその  $\beta$  位炭素に結合することによって 2 つの幾可異性のタンパク結合物を生成する。これらが抗原認識されるため、マレイン酸ジエステル、フマル酸ジエステルとも感作性を示したものと思われる。2 つのタンパク結合体の生成のしやすさ及び生成比率はマレイン酸ジエステル及びフマル酸ジエステルとは異なり、更にこれらの感作性強度が異なることが感作性強度の差に関連している可能性もある。国内の家庭用品の実態調査では DMF、DMM 及び DBF が検出されていることから、DMF 同様にこれらの物質についても注意が必要と思われる。今後これらの化学物質について h-CLAT 法を用いて評価をし、その有用性を検討する予定である。

## E. 結論

h-CLAT 法ではアクリル酸 2-エチルヘキシルが陰性と判定された以外、メチル、エチル、ブチル、2-ジメチルアミノエチル及び 2-ヒドロキシエチルはいずれも陽性となり、LLNA:DA 法の結果と一致した。しかし、これらの感作性強度の順序に関しては LLNA:DA 法と違いが生じた。h-CLAT 法での試験濃度は細胞毒性強度に依存することが多く、これが感作性強度の順序付けに影響した。メタクリル酸エステル類のうち MM、EM 及び MAA は LLNA:DA では陰性、2HEM は陽性となっており、h-CLAT との判定に若干違いが認められた。

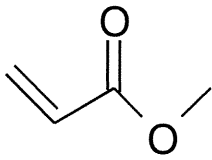
マレイン酸ジエステル及びフマル酸ジエステルの皮膚感作性をLLNA:DA法による評価した。試験した6種はいずれも皮膚感作性を有した。SI値が3を超える最低試験から感作性強度を順序づけると、マレイン酸ジエステル及びフマル酸ジエステルともアルキル基が長くなるにつれ感作性強度は弱くなる傾向が認められた。同じアルキル基を持つフマル酸ジエステルとマレイン酸ジエステルを比較したところ、フマル酸ジエステルの方がマレイン酸ジエステルよりも感作性強度は強いことが明らかになった。

#### F. 引用文献

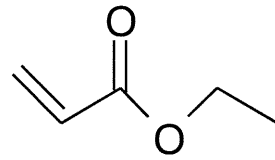
1. Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K., Ito, M. Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10 (2008)
2. Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, 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



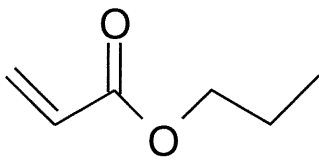
- sensitization potency of acrylates (methyl acrylate, ethyl acrylate, butyl acrylate, and ethylhexyl acrylate) using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis* 57, 242-247 (2007)
9. Rantanen, T.: The cause of the Chinese sofa/chair dermatitis epidemic is likely to be contact allergy to dimethylfumarate, a novel potent contact sensitizer. *Br. J. Dermatol.* 159, 218-221 (2008)
10. de Haan, P., von Blomberg-van der Flier, BM., de Groot, J., Nieboer, C., Bruynzeel, DP.: The risk of sensibilization and contact urticaria upon topical application of fumaric acid derivatives. *Dermatology*, 188, 126-130 (1994)
11. Linker, RA., Lee, DH., Stangel, M., Gold R.: Fumarates for the treatment of multiple sclerosis: potential mechanisms of action and clinical studies. *Expert Rev. Neurother.*, 8, 1683-1690 (2008)
12. Kawakami, T., Isama, K., Matsuoka, A., Nishimura, T.: Determination of dimethyl fumarate and other fumaric and maleic acid diesters in desiccants and consumer products in Japan. *J. Health Sci.*, 57, 236-244 (2011)
13. Sasseville, D., Lafaille, P., Joncas, V.: Allergic contact dermatitis from occupational exposure to dibutyl maleate. *Contact Dermatitis*, 60, 298-300 (2009)
14. Ahlfors, SR., Sterner, O., Hansson, C.: Reactivity of contact allergenic haptens to amino acid residues in a model carrier peptide, and characterization of formed peptide-hapten adducts. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 16, 59-68 (2003)
- G. 研究発表  
なし
- H. 知的所有権の取得状況  
なし



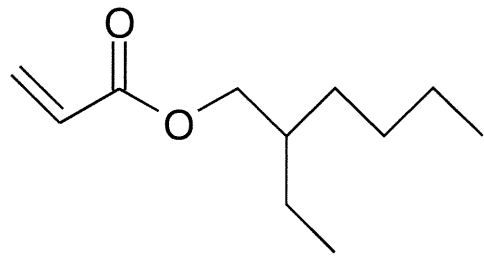
アクリル酸メチル  
(Methyl acrylate, MA)



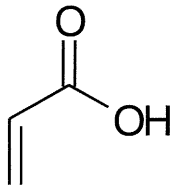
アクリル酸エチル  
(Ethyl acrylate, EA)



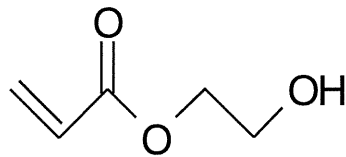
アクリル酸ブチル  
(Butyl acrylate, BA)



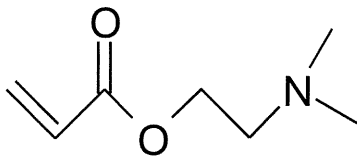
アクリル酸 2-エチルヘキシル  
(2-Ethylhexyl acrylate, 2EHA)



アクリル酸  
(Acrylic acid, AA)



アクリル酸 2-ヒドロキシエチル  
(2-Hydroxyethyl acrylate, 2HEA)



アクリル酸 2-ジメチルアミノエチル  
(2-(Dimethylamino)ethyl acrylate, 2DMEA)

図 1. アクリル酸エステル類の構造式

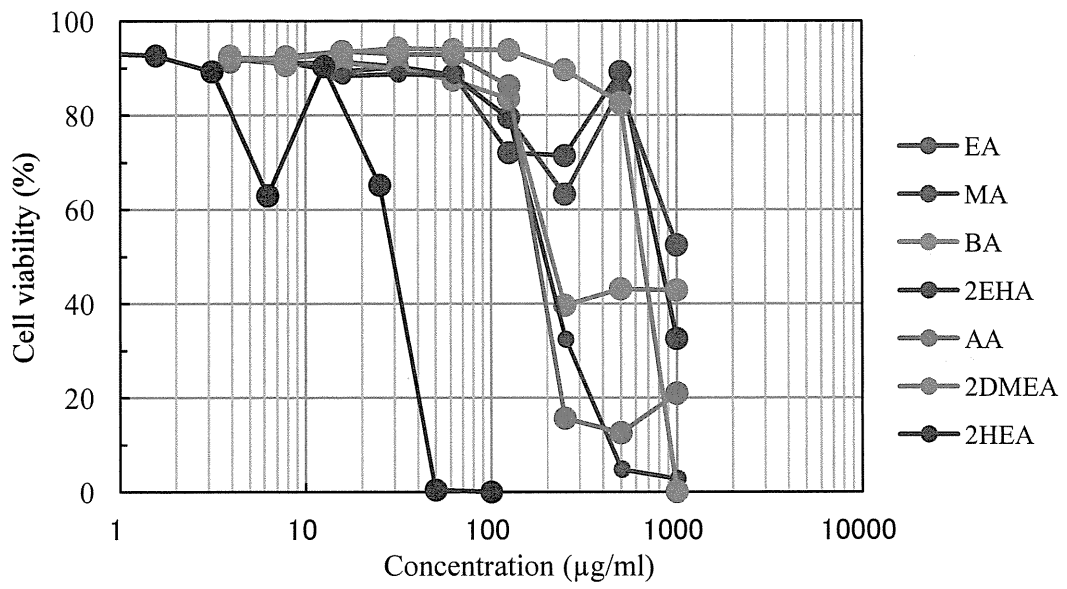


図 2. アクリル酸エステル類の細胞毒性反応曲線

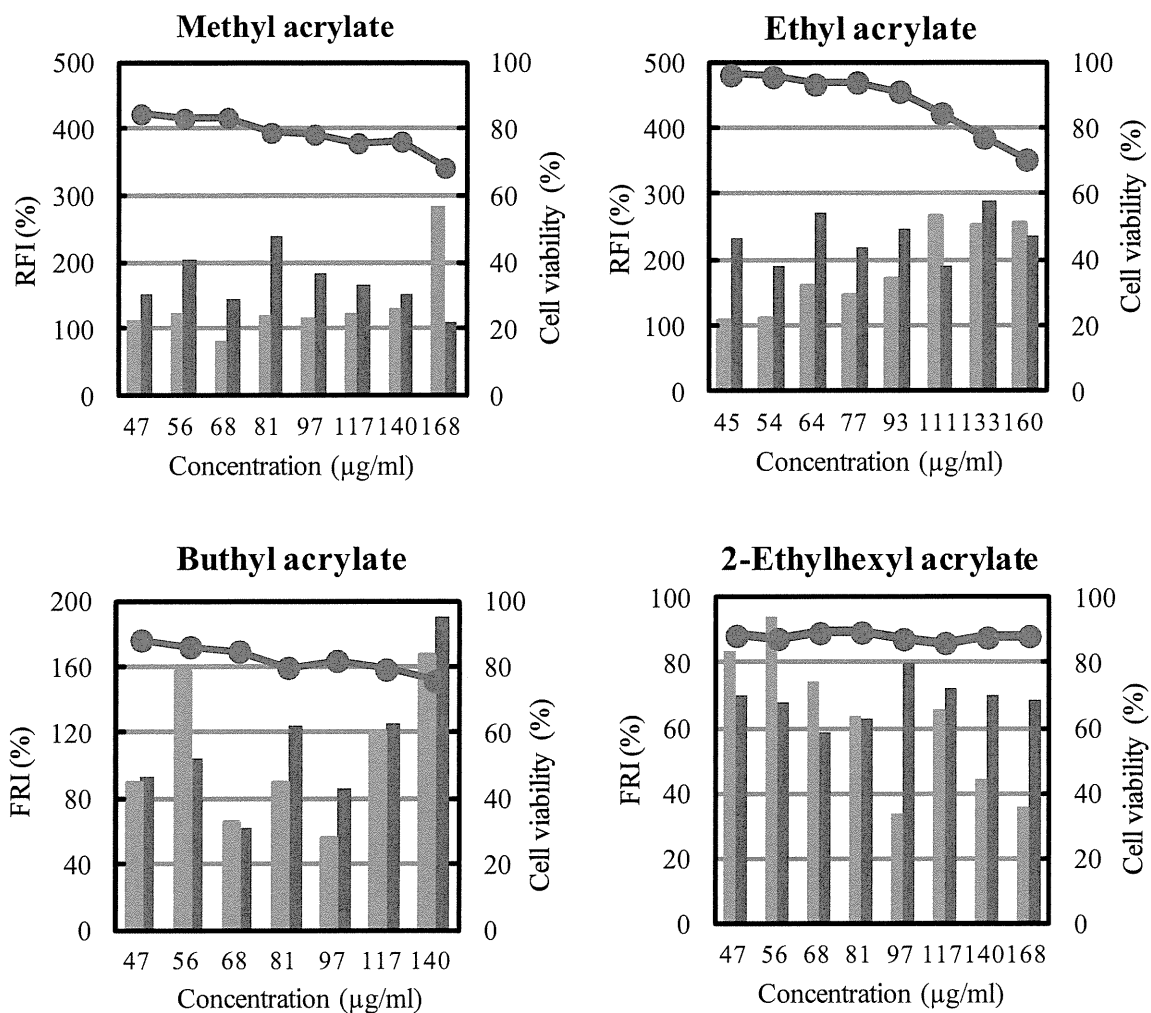


図 3. アクリル酸エステル類による CD54 及び CD86 発現率の変化

■ CD54, ■ CD86, ● 細胞生存率

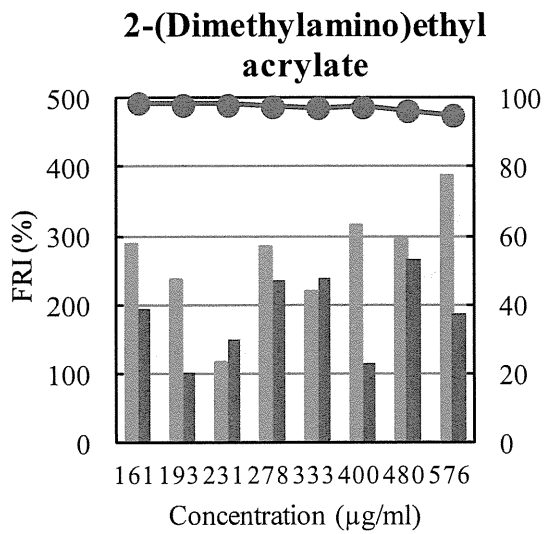
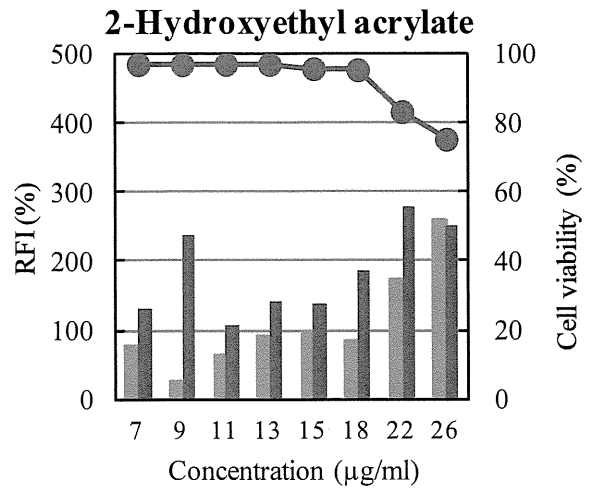
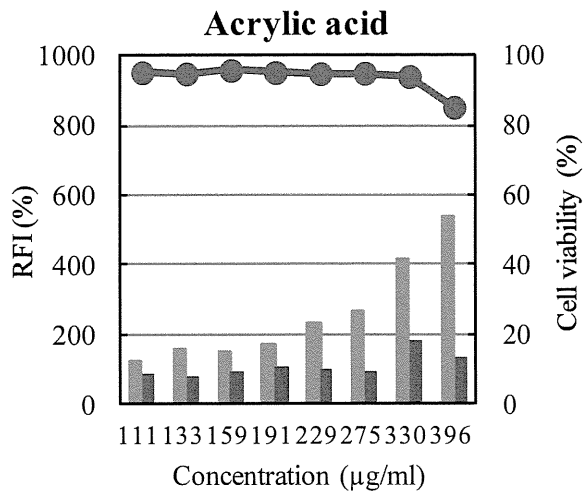


図3. アクリル酸エステル類による CD54 及び CD86 発現率の変化 (続き)

■ CD54, ■ CD86, ● 細胞生存率

表 1. アクリル酸エステル類の h-CLAT 法の結果

Chemical	Abbreviation	Sensitivity	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	
			EC200 (CD54)	EC150 (CD86)
Methyl acrylate	MA	+	168	47
Ethyl acrylate	EA	+	111	45
Butyl acrylate	BA	+	not determined	140
2-Ethylhexyl acrylate	2EHA	-	not determined	not determined
Acrylic acid	AA	+	229	330
2-Hydroxyethyl acrylate	2HEA	+	22	9
2-(Dimethylamino)ethyl acrylate	2DMEA	+	161	161

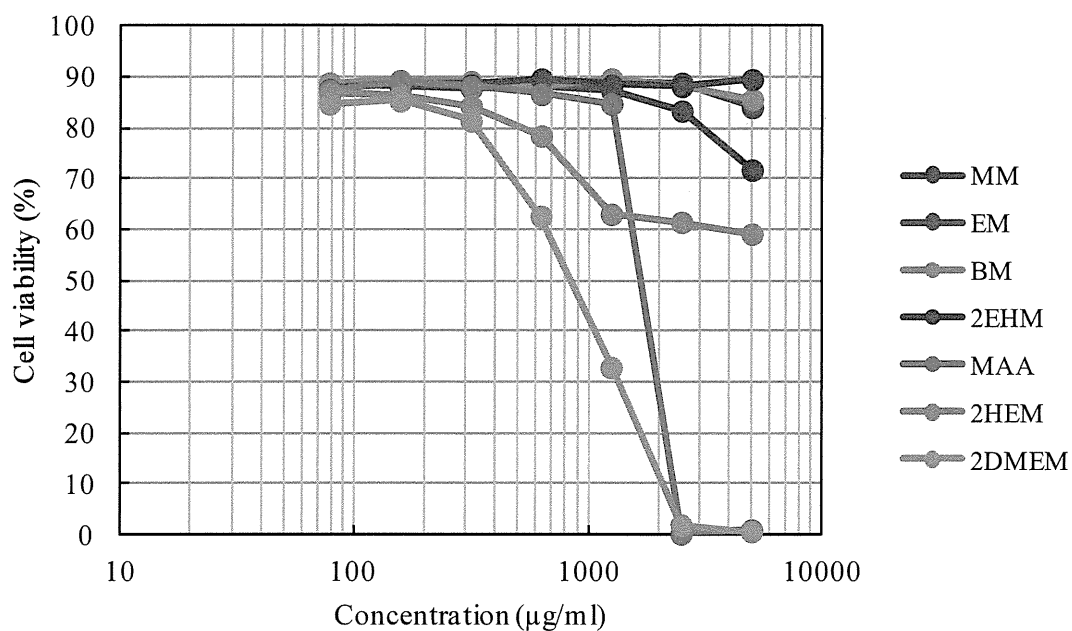


図 4. メタクリル酸エステル類の細胞毒性反応曲線

表 2. メタクリル酸エステル類の h-CLAT 法の結果

Chemical	Abbreviation	Sensitivity	Concentration (µg/ml)	
			EC200 (CD54)	EC150 (CD86)
Methyl methacrylate	MM	+	1206	1206
Ethyl methacrylate	EM	+	1447	1447
Butyl methacrylate	BM	+	not determined	not determined
2-Ethylhexyl methacrylate	2EHM	-	837	not determined
Methacrylic acid	MAA	+	695	695
2-Hydroxyethyl methacrylate	2HEM	+	not determined	not determined
2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate	2DMEM	+	not determined	282

表 3. LLNA-DA 法と h-CLAT 法の結果の比較

Chemical	LLNA:DA		h-CLAT		Cytotoxicity rank
	Sensitivity	Rank	Sensitivity	Rank	
MA	+	7	+	3	6
EA	+	6	+	2	2
BA	+	4	+	4	5
2EHA	+	5	-	-	3
AA	+	1	+	6	4
2HEA	+	3	+	1	1
2DMEA	+	2	+	5	7

Chemical	LLNA:DA		h-CLAT		Cytotoxicity rank
	Sensitivity	Rank	Sensitivity	Rank	
MM	-	-	+	4	-
EM	-	-	+	5	-
BM	+	2	-	-	-
2EHM	+	4	+	3	4
MAA	-	-	+	2	3
2HEM	+	3	-	-	1
2DMEM	+	1	+	1	2

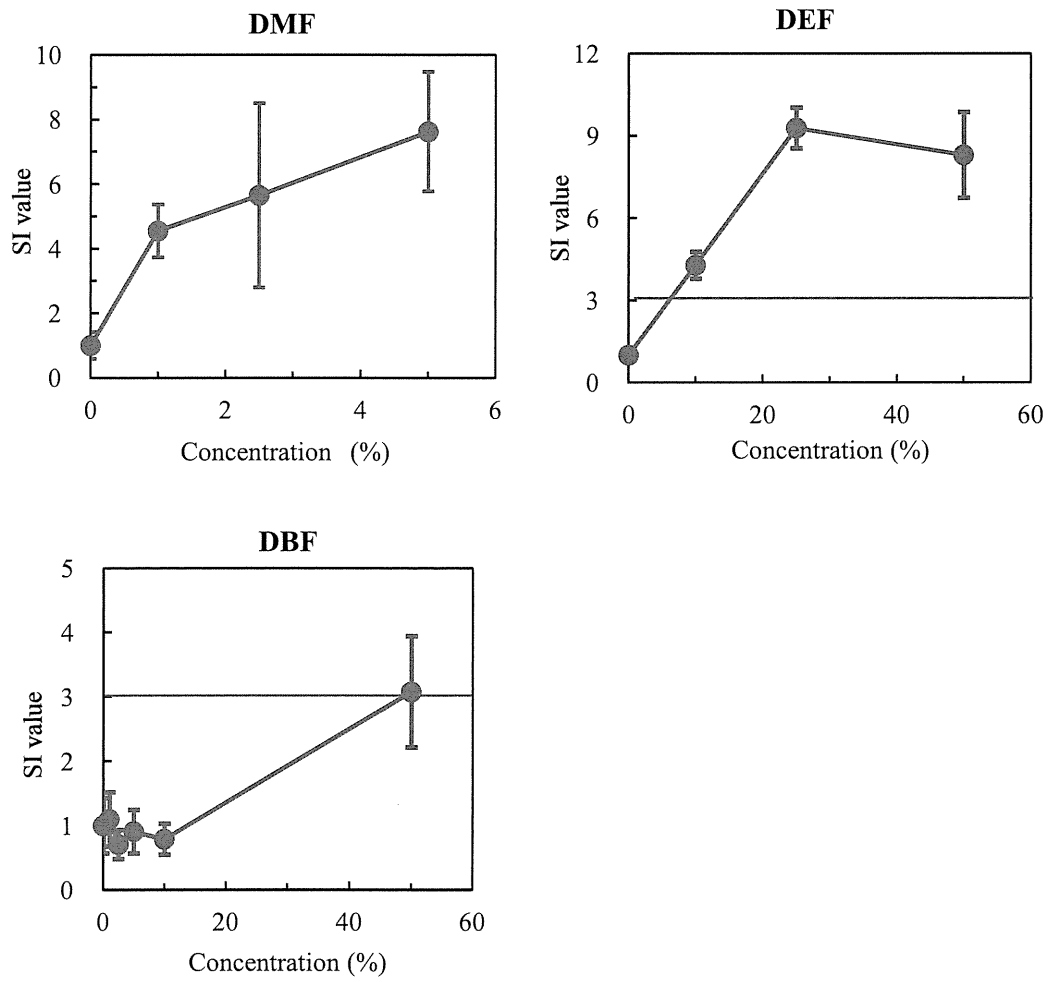


図5. フマル酸ジエステルの LLNA:DA 法による結果



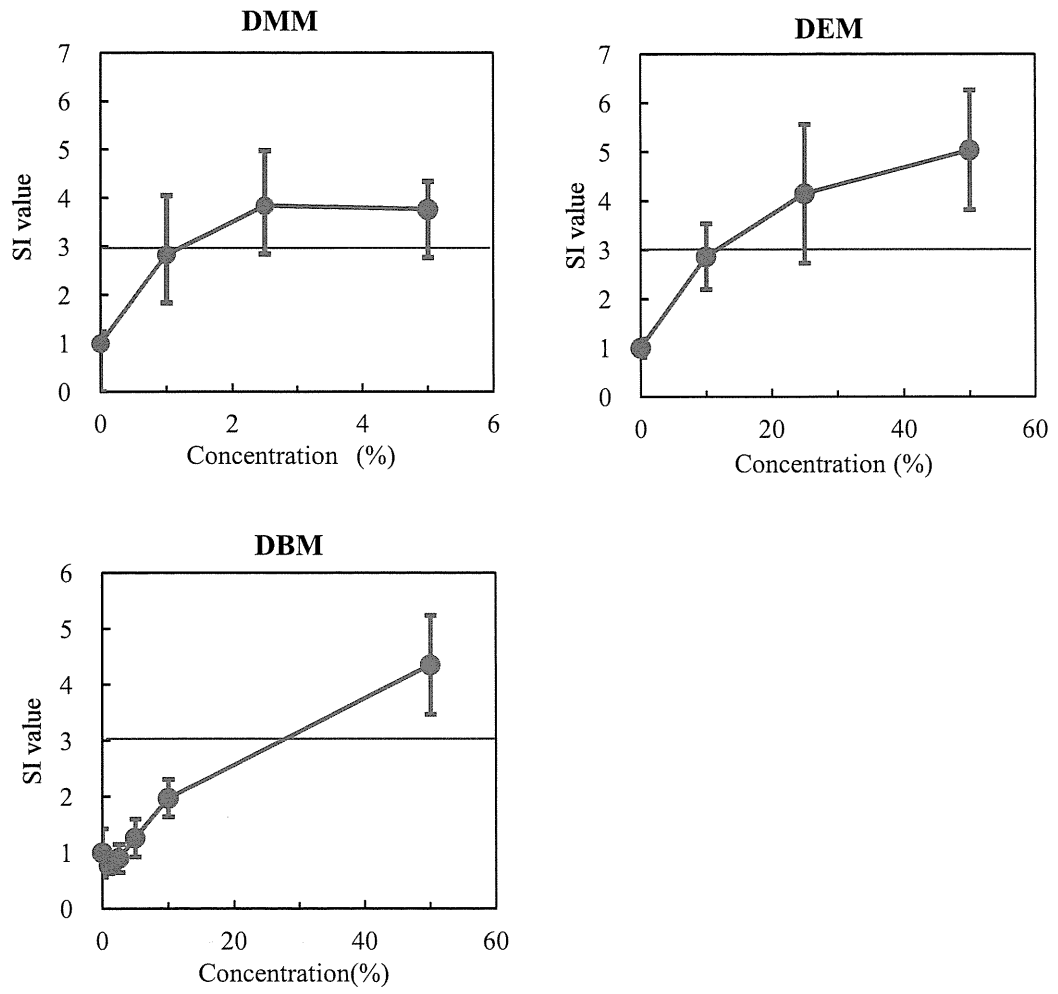


図 6. マレイン酸ジエステルの LLNA:DA 法による結果

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

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

研究分担者 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

研究要旨：我々は大気中に存在する揮発性有機化合物の1つとして、1,2-ナフトキノン（1,2-NQ）を同定し、その骨格を特異的に認識する抗体を作製することで当該物質の細胞内分子標的を解析してきた。一方、同じく大気中揮発性有機化合物として我々は1,4-ナフトキノン（1,4-NQ）を同定しているが、その分子標的に関する知見は乏しい。そこで本研究では、抗 1,4-NQ 抗体を新たに作製し、その抗体を用いて 1,4-NQ が結合する細胞内タンパク質を検出することを目的とした。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。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。

A. 研究目的

産業の発達は人間社会に豊かな生活を与えている反面、年々増加する自動車から排出される揮発性ガス状成分や浮遊粒子状物質は、ヒトの健康に様々な影響を与えていることが知られている。特に、アメリカのカリフォルニア州ロサンゼルス地域は他地区からの人口移動やそれに伴う自動車数の急激な増加により、大気

汚染問題が深刻化している。1998年 Fraser ら (Fraser *et al.*, 1998) は、アメリカのロサンゼルス大気中に含まれる多環芳香族炭化水素類 (PAHs) を測定した。その結果、揮発性成分中にフルオレン (29.8 ng/m<sup>3</sup>) やフェナンスレン (33.3 ng/m<sup>3</sup>) と比べて約 200 倍高い濃度でナフタレン (5990 ng/m<sup>3</sup>) が存在していることを報告した。Preuss らによれば、大気中からのナフタレン 1 日平均曝露量は成人で 78.9

μg/70 kg、子供で 45 μg/10 kg である (Preuss *et al.*, 2003)。さらに、Daisy らの報告によると、市販タバコ 1 本当たりの煙中ナフタレン量は主流煙で < 4 μg、副流煙で < 46 μg 含まれている (Daisy *et al.*, 2002)。ナフタレンは、光酸化反応によって 1,2-ナフトキノン (1,2-NQ) および 1,4-ナフトキノン (1,4-NQ) に変換されることが知られている (Chen *et al.*, 2006)。また、ナフタレンは生体内でチトクロム P450 (CYPs) とエポキシド加水分解酵素 (EH) により *trans*-ジヒドロジオール体を経て、アルド-ケト還元酵素 (AKRs) のような二電子還元酵素により最終的に 1,2-NQ および 1,4-NQ へ代謝される (図 1)。このことから、大気中に揮発性成分として存在しているナフタレンから光酸化反応および生体内代謝活性化により生成した NQ 類がもたらす生体への影響が懸念される。これまでに我々は、南カリフォルニア近郊にて採取した大気中微小粒子成分中に 4 種類のキノン化合物が含まれていることを初めて同定した (Cho *et al.*, 2004)。当研究室はこれまで、同定した 4 種類のキノン化合物の中でも 1,2-NQ に着目し、1,2-NQ に対する特異的な抗体を作製することで (Miura and Kumagai, 2010)、当該物質の分子標的とそれに対する細胞の応答機構について研究を進展させてきた (Kikuno *et al.*, 2006; Endo *et al.*, 2007)。例えば、1,2-NQ は上皮成長因子レセプター (EGFR) を負に制御しているプロテインチロシンフォスファターゼ 1B を化学修飾することで本酵素活性を阻害して、その結果、EGFR の自己リン酸化を亢進するシグナル伝達が生じることを見出した

(Iwamoto *et al.*, 2007)。また、1,2-NQ の毒性に対する生体防御システムとして Keap1/Nrf2 系が重要な役割を果たしていることを明らかにした (Miura *et al.*, 2011)。一方、同じく大気中微小粒子成分中に含まれる 1,4-NQ の分子標的やそれに対する細胞応答システムについての知見は乏しい。

そこで本年度の研究では、1,4-NQ が細胞内でどのようなタンパク質に共有結合するのかを 1,2-NQ と比較・検討するため、1,4-NQ に対する抗体を作製してその反応特異性を調べ、細胞内タンパク質への 1,4-NQ の修飾を検出することを目的とした。本研究により、大気汚染物質の生体影響とその分子メカニズムの解明に繋がることが期待される。

## B. 研究方法

### 実施概要

大気中微小粒子成分の 1 つである 1,4-NQ を特異的に認識する抗体を作製するため、まず 1,4-NQ - ヘモシアニン結合体の合成を行なった。得られた当該物質をウサギに感作し、ELISA 法にて抗体価を測定後、全採血を行い血清中より抗体を精製した。得られた 1,4-NQ に対するポリクローナル抗体の抗原特異性を検討するため、種々の多環芳香族炭化水素とマウス肝臓の酵素溶液とを反応させ、ドットブロット及びイムノブロット法で解析した。更に、1,4-NQ をヒト肺胞上皮由来 A549 細胞に曝露して、1,4-NQ 結合タンパク質の検出を行なった。

## 試薬

主な試薬は、下記の会社より購入した。特に記載のない試薬については特級試薬を用いた。実験に使用する水は、特に記載のない限り超純水装置ナノピュアダイアモンド D12441 (Barnstead International 社、Dubuque, IA, USA) から得た比抵抗 18.2 M $\Omega$ -cm 以上の超純水を用いた。

### コニカミノルタヘルスケア社 (東京)

- ・メディカルフィルム

### 東京化学工業社 (東京)

- ・1,2-ナフトキノン (1,2-NQ)
- ・1,4-ナフトキノン (1,4-NQ)

### ナカライテスク社 (京都)

- ・アジ化ナトリウム
- ・ウシ血清アルブミン (BSA)
- ・エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物 (EDTA)
- ・クマシーブリリアントブルー G-250 (CBB)

- ・グリシン
- ・グリセロール
- ・ジチオスレイトール (DTT)
- ・ブロモフェノールブルー (BPB)
- ・メタノール

### 富士フィルム社 (東京)

- ・インドール現像液
- ・レンフィックス定着液

### 和光純薬工業社 (大阪)

- ・アクリルアミド
- ・2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Tris)
- ・塩化ナトリウム

- ・水酸化ナトリウム
- ・スキムミルク
- ・スクロース
- ・ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
- ・トリエチルアミン
- ・ブチオニンスルフォキシミン (BSO)
- ・2-プロパノール

### Cell Signaling Technology 社 (Danvers, MA, USA)

- ・西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG 二次抗体

### Dako 社 (Glostrup, Denmark)

- ・アルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体

### Sigma 社 (San Diego, CA, USA)

- ・ジメチルスルフォキシド (DMSO)

## 実験動物

実験動物は、室温 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、湿度 55 $\pm$ 5%、明期 14 時間および暗期 10 時間に管理された室内で飼育し、固形飼料と 5  $\mu$ m のフィルターを通した無菌水を自由に摂取させた。全ての動物実験は、筑波大学が定める動物実験取扱規定および遺伝子組換え実験安全管理規定に基づいて行なった。雄性 C57BL/6J マウス (6 週齢) は、日本クレア社から購入した。雌性 New Zealand White ウサギ (1.5–2.0 kg, 8–9 週齢) は、日本クレア社から購入した。

## 培養細胞

細胞培養は、5% 二酸化炭素 – 95% 空気および 37 $^{\circ}$ C 環境下で行なった。細胞継代用培地には、10% 非働化ウシ胎児血清