

(FBS, Gibco 社)、100 U/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシン (和光純薬工業社) および 2 mM グルタマックス-I (Gibco 社) を添加した。FBS の非働化は、56°C で 30 分間熱処理後、氷上で 1 時間冷やした。非働化した FBS は分注後、使用するまで -20°C で保存した。

A549 細胞 (#RCB0098) は理化学研究所セルバンクより購入した。培地は、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM 培地) を用いた。細胞継代は、80% コンフルエントの状態で行ない、滅菌したカルシウムおよびマグネシウム不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) で FBS 入り培地を洗浄した後、0.25% トリプシン-EDTA 溶液 (和光純薬工業社) により細胞を剥離した。剥離した細胞は、細胞継代用 DMEM 培地に 1 : 5 の比率で懸濁して、継代した。化学物質の曝露は、全て FBS を含まない細胞継代用 DMEM 培地を用いた。

タンパク質の定量

Bradford の方法 (Bradford, 1976) に従い、プロテインアッセイ Bradford 法 (Bio-Rad 社) を用いて行なった。すなわち、0.4 mL のプロテインアッセイ試薬に 0.01 N 水酸化ナトリウムで希釈した試料 (2 mL) を混合し、室温で 15 分間静置した。その後、波長 595 nm における吸光度を U-1500 spectrophotometer (日立社) で測定した。標準タンパク質として BSA (0-10 µg/mL) を用いた。また、試料中にドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などの界面活性剤が含まれている場合は、ビスンコ

ニン酸 (BCA) 法を用いた。Smith らの方法 (Smith *et al.*, 1985) に従い、プロテインアッセイ ビシンコニン酸キット (ナカライテスク社) を用いて行なった。すなわち、A 液 (炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、BCA 検出試薬および酒石酸ナトリウムを含む 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液) と B 液 (4% 硫酸銅五水和物溶液) を 50 : 1 の割合で混合した。96 穴平底プレートを用いて、この混合液 100 µL と適当に希釈した試料 5 µL を加えて、37°C で 30 分間静置した。その後、波長 540 nm における吸光度を iMark microplate reader で測定した。標準タンパク質として BSA (0-2.5 mg/mL) を用いた。

マウス肝酵素溶液の調製

2 時間絶食させた雄性 C57BL/6J マウスにペントバルビタール麻酔薬を腹腔内投与 (1 µL/g 体重) することで、全身麻酔した。開腹後、心臓より冷えた生理食塩水を注入し、腹腔大静脈から放血することにより、灌流脱血した肝臓を得た。以降の操作は全て 4°C 条件下で行なった。肝臓は、使用直前に 1% protease inhibitor cocktail (Sigma 社) を添加したホモジナイズ緩衝液 (0.25 M スクロース、5 mM Tris-HCl (pH 7.4) および 0.1 mM EDTA) 中で、ハサミを用いて細切した。その後、テフロンホモジナイザーを用いて 4 倍量のホモジナイズ緩衝液中でホモジナイズした。ホモジナイズ液を遠心分離 (600 × g、10 分間、4°C) して得られた上清を、さらに遠心分離 (9,000 × g、10 分間、4°C) して 9,000 × g 上清を得た。その後、9,000

× g 上清 (3 mL) を 50 mM KPi 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したエコノカラム 10DG に付し、3 mL の 50 mM KPi 緩衝液 (pH 7.5) で溶出した。得られた溶液を肝臓酵素溶液 (S9) とし、使用するまで -80°C で保存した。

ウサギポリクローナル抗 1,4-NQ 抗体の作成

1) 1,4-NQ 抗原の作成

Sigma 社から購入した keyhole limpet hemocyanin (KLH, 21 mg) に 4 M 塩化グアニジニウムおよびジチオスレイトール (DTT, 5 mg) を加えて、全量を 3.5 mL とし、25°C、遮光、アルゴンガス下で 2 時間攪拌した。還元した KLH (3 mL) を 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) で平衡化したエコノカラム 10DG (Bio-Rad 社) に付し、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) (3 mL) で溶出した。得られた還元 KLH (15 mg) と DMSO に溶解した 1,4-NQ (5 mM) を全量 3 mL の 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) 中で 25°C、遮光、アルゴンガス下で 1 時間反応させた。1,4-NQ と反応した KLH (3 mL) を 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) で平衡化したエコノカラム 10DG (Bio-Rad 社) に付し、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) (3 mL) で溶出した。得られた 1,4-NQ-KLH 結合体を 1,4-NQ 抗原とした。

2) 1,4-NQ 抗原の免疫感作

ウサギ (2 羽) の背部を剃毛し 70% エタノールで消毒した。1,4-NQ 抗原 (1 mg/mL) と Freund's adjuvant complete (Gibco 社) を 2.4 mL ずつ試料瓶に取り、2.5 mL 容量のディスポシリンジ (テルモ

社) で十分粘性のある懸濁液を得るまで 1,4-NQ 抗原混合液を乳化した。得られた 1,4-NQ 抗原混合液 (2 mL) を少量ずつ 10 箇所程度に分けてウサギ背部に皮下注射した。さらに、Freund's adjuvant complete の代わりに Freund's adjuvant incomplete (Sigma 社) を用いた 1,4-NQ 抗原混合液を上記の方法で作成し、2 週間おきに計 9 回感作させた。全ての感作は、生理食塩水に溶解したフェノバルビタール (30 mg/kg 体重) の耳静脈投与による全身麻酔下で行なった。

3) 抗体価の測定

2 週間おきにウサギ耳静脈から採血を行なった。得られた血液 (約 5 mL) は室温で 1 時間静置後、さらに氷上で 12 時間静置した。この血液を 1,200 × g で 20 分間遠心分離して得られた上清を、抗血清とした。抗血清抗体価の測定は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により行なった。1,4-NQ 抗原、KLH、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) または 1,4-NQ-GAPDH 結合体を終濃度 1 µg/mL となるようにコーティング液 (2.9 g/L 炭酸水素ナトリウム-1.6 g/L 炭酸ナトリウム, pH 9.6) で調整した。調整したコーティング液を 50 µL/well ずつ 96-well Maxi Sorp plate (Nunc 社) に滴下し、室温で 30 分間振盪後、コーティング液を取り除いた。D-PBS に溶解した 1% (w/v) BSA を 100 µL ずつコーティングしたウェルに滴下し、室温で 30 分間振盪した。ウェルを D-PBS で希釈した 0.05% (v/v) Tween-20 (洗浄液) 200 µL で 3 回濯いだ。D-PBS を用いて抗血清希釈液

(100、400、800、1600、3200、6400、12800 および 25600 倍希釈) を作成し、50 μ L ずつウェルに滴下後、室温で 30 分間振盪した。抗血清希釈液を取り除き、ウェルを洗浄液 (200 μ L) で 3 回濯いだ後、D-PBS で 5,000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Dako 社) を 50 μ L ずつ滴下し、室温で 30 分間振盪した。溶液を取り除き、洗浄液 (200 μ L) で 3 回濯いだ後、PNPP 発色液 (1 mg/mL パラニトロフェニルリン酸、97 g/L ジエタノールアミン、0.1 g/L 塩化マグネシウム・六水和物、pH 9.8) を 100 μ L ずつ滴下し、室温で 30 分間振盪した。反応生成物パラニトロフェノールの吸収波長 405 nm における吸光度は、iMark microplate reader で測定した。

4) 抗 1,4-NQ ポリクローナル IgG の精製
十分な抗体価が得られたウサギは、フェノバルビタール全身麻酔下で開胸し、心臓から全採血を行なった。得られた血液は室温で 1 時間静置後、さらに氷上で 12 時間静置した。この血液を 1,200 \times g で 20 分間遠心分離して得られた上清を、56°C、30 分間非働化処理した後、氷上で 30 分間急冷したものを抗血清とした。得られた抗血清 (55 mL) に等量の 10 mM KPi 緩衝液 (pH 7.5)–0.15 M 塩化ナトリウムを加え、硫酸アンモニウムを 50% 飽和濃度となるように添加、室温で 30 分間攪拌した後、遠心分離 (27,000 \times g、15 分間、4°C) した。10 mM KPi 緩衝液 (pH 7.5)–0.02% アジ化ナトリウム (10 mL) に溶解した沈殿物を透析チューブに移し、同様の緩衝液 (2 L) で 4°C、一晩透析した。

透析した試料を再度遠心分離 (27,000 \times g、4°C、15 分間) し、得られた上清 (15.2 mg/mL、25 mL) は、カラムに付すまで -20°C で保存した。

IgG の精製操作は、低温室 (4°C) で行なった。平衡化緩衝液 (20 mM グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.7)–1 M 塩化ナトリウム) で平衡化した Protein A-Sepharose CL-4B カラム (66 mm \times 24 mm i.d.) に、40 mM グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.7)–1 M 塩化ナトリウムを等量混合した上記試料 (152 mg) を流速 1 mL/min で付した。波長 280 nm の吸光度が 0.15 以下になるまで平衡化緩衝液でカラムを洗浄した後、0.1 M グリシン-HCl (pH 3) により IgG を溶出し、直ちに 1 M Tris-HCl (pH 8) を用いて pH を中性にした。得られた IgG を透析チューブに移し、20 mM KPi 緩衝液 (pH 7.2)–0.15 M 塩化ナトリウム–0.02% アジ化ナトリウム (2 L) で 4°C、一晩透析した後、Ultracell-10K (Millipore 社) を用いた限外濾過により濃縮した。得られた濃縮液を 20 mM KPi 緩衝液 (pH 7.2)–0.15 M 塩化ナトリウム–0.02% アジ化ナトリウムで 5 mg/mL に調整したものを抗 1,4-NQ 抗体として、-20°C で保存した。

5) 抗 1,4-NQ 抗体の抗原特異性

0.1 mM 多環芳香族炭化水素類 (何れも DMSO に溶解) を含む全量 250 μ L の反応液 (50 mM KPi 緩衝液 (pH 7.4) および 2 mg S9) は、37°C、1 時間反応させた。反応後、速やかに氷上で 5 分間冷却した後、ドットブロット法により解析を行なった。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli らの方法 (Laemmli, 1970) に従って行なった。ポリアクリルアミドゲルは 4% 濃縮ゲル (4% アクリルアミド、0.1% *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド (BIS)、125 mM Tris-HCl (pH 6.5)、0.1% SDS、0.4 mg/mL ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS) および 0.2% *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)) および 7.5% または 12% 分離ゲル (7.5% または 12% アクリルアミド、0.2 または 0.32% BIS、375 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1% SDS、0.4 mg/mL APS および 0.2% TEMED) より成り、目的タンパク質の分子量に応じて適当な分離ゲル濃度を選択した。試料 (2 倍量) は、上記の 3 × SDS-PAGE sample 液 (1 倍量) と混合し、95°C で 5 分間熱変性させた。泳動バッファーには、25 mM Tris、192 mM グリシン および 0.1% SDS 溶液を用いた。クロスパワー500 (アトー社) を用いて、ゲル 1 枚につき濃縮ゲル中は 10 mA および分離ゲル中は 25 mA の定電流条件で電気泳動した。

タンパク質の検出

1) クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色

電気泳動したゲルを CBB 染色液 (0.01% CBB、50% メタノールおよび 7.5% 酢酸) に浸し、室温で 1 時間振盪した。その後、脱色液 (5% メタノールおよび 7.5% 酢酸) に浸し、室温で紙と共に振盪

することで、適当な濃さになるまで脱色した。脱色したゲルは DDW でよく洗浄した後、RAPIDRY-MINI (アトー社) を用いて、ろ紙上で 60°C、45 分間減圧乾燥した。

2) ドットブロット法

試料中のタンパク濃度が 0.1 μg/μL となるように 2 × dot blot sample 液 (125 mM Tris-HCl (pH 6.8) および 4% SDS) を用いて希釈した後、95°C で 5 分間加熱した。この希釈試料を 2 μL ずつニトロセルロース (NC) 膜上へ滴下し、30 分間風乾させた後、ブロッキング液 (TTBS-5% スキムミルク) に浸し、室温で 1 時間振盪することでブロッキングを行なった。ブロッキングした NC 膜を TTBS で 5 回洗浄した後、抗 1,4-NQ 抗体 (5 mg/mL) を TTBS-0.1% BSA で 10,000 倍に希釈し、室温で 1 時間振盪した。再度、NC 膜を TTBS で洗浄した後、TTBS-0.1% BSA で 5,000 倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体を室温で 1 時間振盪させた。再度、TTBS で洗浄後、化学発光検出試薬 (Chemi-Lumi One, ナカライテスク社) を用いて検出した。

3) イムノブロット法

イムノブロット法は Kyhse-Andersen らの方法 (Kyhse-Andersen, 1984) に従って行なった。電気泳動したゲルからポリビニリデンフルオライド (PVDF) 膜へ転写を行なった。すなわち、クロスパワー500 を用い、2 mA/cm² 条件下で 1 時間転写を行なった。PVDF 膜はメタノールで 30 秒間処理した。転写は、1 液 (0.3 M Tris お

よび 10% メタノール) に浸けた濾紙 2 枚の上に 2 液 (25 mM Tris および 10% メタノール) に浸けた濾紙を 1 枚重ね、さらに PVDF 膜、電気泳動したゲル、3 液 (25 mM Tris、10% メタノールおよび 40 mM 6-アミノカプロイン酸) に浸けた濾紙 3 枚を順に重ねた。転写後、PVDF 膜をブロッキング液に浸し、室温で 1 時間振盪することでブロッキングを行なった。ブロッキングした PVDF 膜を TTBS で 5 回洗浄した後、抗 1,4-NQ 抗体 (5 mg/mL) を TTBS-0.1% BSA で 10,000 倍に希釈し、室温で 1 時間振盪した。再度、PVDF 膜を TTBS で洗浄した後、TTBS-0.1% BSA で 5,000 倍に希釈した HRP 標識した種々の抗 IgG 抗体を室温で 1 時間振盪させた。再度、TTBS で洗浄後、化学発光検出試薬を用いて検出した。

チオール基の測定

チオール基の定量は、Ellman らの方法 (Ellman, 1958) に従って行なった。試験管内で 300 μ L の 200 mM Tris-HCl - 20 mM EDTA (pH 8.2) と 100 μ L の 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) または KLH (0.4 mg) を混合した。次に、メタノールに溶解した 10 mM DTNB (20 μ L) を添加し、直ちに 5% SDS (150 μ L) と DDW (930 μ L) を加え反応させた。DTNB を添加してから 2 分間経過した反応液を混合し、波長 412 nm の吸光度を分光光度計 UV-1800 により測定した。チオール基の算出には、モル吸光係数 $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いた。

C. 研究結果

1) 1,4-NQ による KLH 中チオール基の消費

1,4-NQ 未反応の KLH および 1,4-NQ-KLH 結合体に含まれるチオール基量の定量を行なったところ、未反応 KLH 1 g 中にチオール基は約 31 μ mol 含まれていた。一方、1,4-NQ-KLH 結合体 1 g 中では 0.08 μ mol 含まれており、1,4-NQ 処理によって未反応 KLH で検出されたチオール基のほとんど全てが消費された (表 1)。

2) 抗 1,4-NQ 抗体の 1,4-NQ 抗原に対する抗体価

2 羽のウサギに 1,4-NQ 抗原 (1 mg/rabbit) を 4 か月間、9 回感作した (図 2A)。抗原感作期間中のウサギの体重変化は $\pm 0.4 \text{ kg}$ であり、抗原感作によるウサギの体重減少などの悪影響は観察されなかった (図 2B)。1,4-NQ 抗原を 9 回感作して得られたウサギ抗血清を 100-25600 倍に段階希釈し、ELISA 法を用いて検討したところ、1600 倍希釈抗血清では GAPDH と比較して 1,4-NQ-GAPDH に対する抗体価が 11 倍高かった (図 2C)。すなわち、この抗血清には 1,4-NQ を認識する抗体が含まれていることが示された。そこで、抗 1,4-NQ 抗体を含む抗血清をプロテイン A セファロースカラムに付した後、0.1 M グリシン-HCl (pH 3) による溶出を行なったところ、フラクション番号 26-36 に IgG を含む画分を得た (図 2D)。得られた IgG 画分は終濃度 5 mg/mL となるよう調整した。

3) IgG 画分の 1,4-NQ に対する抗体価と抗原特異性

得られた IgG 画分を 100-25600 倍に段階希釈し、ELISA 法を用いて検討したところ、1600 倍希釈抗体では GAPDH と比較して 1,4-NQ-GAPDH に対する抗体価が 15 倍高かった (図 3A)。次に得られた抗 1,4-NQ 抗体の抗原特異性について、平成 19 年度大気環境の改善と健康影響に関する調査研究「ディーゼル排気曝露ラットの生体内タンパク質と芳香族炭化水素キノン体との共有結合に関する研究」で用いた抗 1,2-NQ 抗体と比較検討した。抗 1,2-NQ 抗体は検討した 9 種類の多環芳香族炭化水素類のうち、1,2-NQ のみを認識した。一方、抗 1,4-NQ 抗体は 1,4-NQ を強く認識したのに対し、1,4-NQ を母骨格とした各種誘導体は全く認識しなかった。また、1,2-NQ は僅かに認識した (図 3B)。

4) 1,2-NQ および 1,4-NQ によるタンパク質の親電子修飾

マウス肝臓 9,000 × g 上清と 1,2-NQ または 1,4-NQ を濃度依存的に反応させたところ、1,2-NQ では 18、30、48、75 および 120 kDa にバンドが検出された。一方、1,4-NQ は 48 および 75 kDa にバンドが検出された (図 4)。次に、A549 細胞に 1,4-NQ (50 μM) を曝露し、時間依存的な 1,4-NQ 修飾タンパク質の変化を調べた。曝露 1 時間後では、複数の細胞内タンパク質が 1,4-NQ による親電子修飾を受けていることが明らかとなった。この 1,4-NQ 修飾タンパク質のバンドは、経時的に減少していき、曝露 12 時間後では 30 kDa 以下のタンパク質への修飾はほとんど検出され

なかった (図 5)。

D. 考察

本研究で作成したウサギポリクローナル抗体は、1,4-NQ だけでなく 1,2-NQ も認識したが、1,4-ベンゾキノンは全く認識しなかった。一方、2-メチル-1,4-NQ、5-ヒドロキシ-1,4-NQ や 2-アリニノ-1,4-NQ のように 1,4-NQ に側鎖がある場合には、本抗体は抗原として認識しなかった (図 3B)。したがって、今回得られたポリクローナル抗体は、1,4-NQ だけでなく、1,2-NQ により修飾されるタンパク質の検出・同定にも有用であることが示唆された。1,4-NQ とマウス肝臓 9,000 × g 上清とを反応すると、1,4-NQ と共有結合する複数のタンパク質が検出された。その修飾タンパク質を 1,2-NQ によって修飾を受けるタンパク質と比較すると、2.5 μM 曝露条件下では 1,4-NQ によって 48 kDa のタンパク質が修飾を受けるのに対し、1,2-NQ では 30 kDa のタンパク質への修飾が検出された (図 4)。このことは、低濃度曝露時に 1,4-NQ と 1,2-NQ とでは標的となるタンパク質が異なることを示唆している。また、A549 細胞を用いた 1,4-NQ 曝露実験では、複数の細胞内タンパク質への修飾が検出されたことから (図 5)、既に報告した 1,2-NQ と同様に 1,4-NQ の標的となるセンサータンパク質が複数存在することを示唆している。今後、本研究で得られた抗 1,4-NQ 抗体を用いてプロテオミクス解析することで、これらの標的タンパク質を同定することが可能であり、1,4-NQ の生体影響および生体応答を知る

上で有益な情報を提供できるといえる。

これまでの研究から我々は、抗 1,2-NQ 抗体および抗 1,4-NQ 抗体を得た。前年度の調査研究では、マウス肝臓 9,000 × g 上清と反応させたナフタレンの約 4 割が 1,2-NQ としてタンパク質と結合することを明らかとしたが、1,4-NQ についても定量化が可能である。そして、大気中揮発成分中にはナフタレンが多く含まれていることから、ナフタレンの代謝活性化により生成され、タンパク質と共有結合した NQs の検出し、その標的タンパク質の同定が期待できる。低濃度の曝露条件下において、1,2-NQ や 1,4-NQ の標的タンパク質を同定することで、ナフタレン、1,2-NQ および 1,4-NQ の生体へ及ぼす影響を解明する有益な情報が得られることが期待できる。

D. 結論

1) 本研究にて抗 1,4-NQ 抗体を作製し、その抗体は 1,4-NQ だけでなく 1,2-NQ も認識する反応特異性を有することが明らかとなった。

2) 1,4-NQ をヒト肺上皮由来 A549 細胞に曝露したところ、細胞内の複数のタンパク質への 1,4-NQ の修飾が観察された。

<参考文献>

- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Chen J., Ehrenhauser F.S., Valsaraj K.T., and Wornat M.J. (2006). Uptake and UV-photooxidation of gas-phase PAHs on the surface of atmospheric water films. 1. Naphthalene. *J Phys Chem A*, **110**, 9161-9168.
- Cho A.K., Di Stefano E., You Y., Rodriguez C.E., Schmitz D.A., Kumagai Y., Miguel A.H., Eiguren-Fernandez A., Kobayashi T., Avol E., and Froines J.R. (2004). Determination of four quinones in diesel exhaust particles, SRM 1649a, and atmospheric PM_{2.5}. *Aerosol Sci Technol*, **38**, 68-81.
- Daisy B.H., Strobel G.A., Castillo U., Ezra D., Sears J., Weaver D.K., and Runyon J.B. (2002). Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodora vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, **148**, 3737-3741.
- Ellman G.L. (1958). A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys*, **74**, 443-450.
- Endo A., Sumi D., and Kumagai Y. (2007). 1,2-Naphthoquinone disrupts the function of cAMP response element-binding protein through covalent modification. *Biochem Biophys Res Commun*, **361**, 243-248.
- Fraser M.P., Cass G.R., Simoneit B.R.T., and Rasmussen R.A. (1998). Air Quality Model Evaluation Data for Organics. 5. C₅-C₂₂ Nonpolar and Semipolar

- Aromatic Compounds. *Environ Sci Technol*, **32**, 1760-1770.
- Iwamoto N., Sumi D., Ishii T., Uchida K., Cho A.K., Froines J.R., and Kumagai Y. (2007). Chemical knockdown of protein-tyrosine phosphatase 1B by 1,2-naphthoquinone through covalent modification causes persistent transactivation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, **282**, 33396-33404.
- Kikuno S., Taguchi K., Iwamoto N., Yamano S., Cho A.K., Froines J.R., and Kumagai Y. (2006). 1,2-Naphthoquinone activates vanilloid receptor 1 through increased protein tyrosine phosphorylation, leading to contraction of guinea pig trachea. *Toxicol Appl Pharmacol*, **210**, 47-54.
- Kyhse-Andersen J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-209.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Miura T., and Kumagai Y. (2010). 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.
- Miura T., Shinkai Y., Jiang H.Y., Iwamoto N., Sumi D., Taguchi K., Yamamoto M., Jinno H., Tanaka-Kagawa T., Cho A.K., and Kumagai Y. (2011). Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during the exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chem Res Toxicol*, **24**, 559-567.
- Preuss R., Angerer J., and Drexler H. (2003). Naphthalene--an environmental and occupational toxicant. *Int Arch Occup Environ Health*, **76**, 556-576.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., and Klenk D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- E. 研究発表
1. 論文発表
- 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
2. 学会発表
- 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

G.知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

表 1. 1,4-NQ による KLH 中のチオール基の消費

Protein	Thiol content
KLH	30.9 ± 3.3 μmol of thiol/g of protein
1,4-NQ modified KLH	0.08 ± 0.1 μmol of thiol/g of protein

KLH (15 mg) と DMSO に溶解した 1,4-NQ (5 mM) を全量 3 mL の 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) 中で 25°C、遮光、アルゴンガス下で 1 時間反応させた。1,4-NQ と反応した KLH (3 mL) を 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) で平衡化したエコノカラム 10DG (Bio-Rad 社) に付し、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) (3 mL) で 1,4-NQ-KLH 結合体を溶出した。KLH および 1,4-NQ-KLH 結合体のチオール基量を方法 5.9 に記した Ellman 法により定量した。

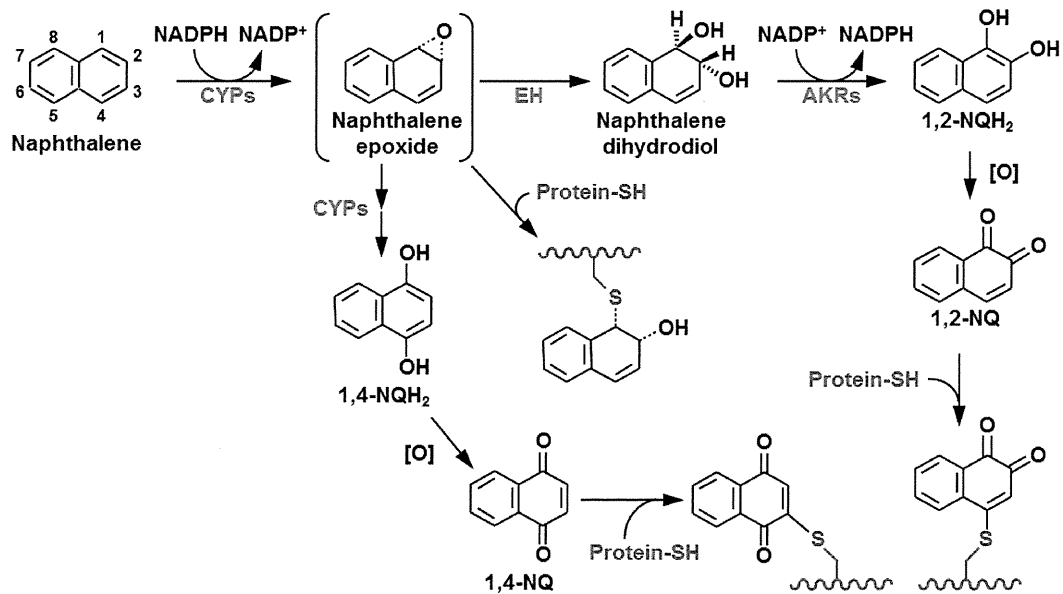


図 1. ナフタレンの代謝活性化経路とその親電子代謝物

NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form; NADP⁺, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form; CYPs, cytochrome P450 isozymes; EH, epoxide hydrolase; AKRs, aldo-keto reductase isozymes; 1,2-NQH₂, 1,2-dihydroxynaphthalene; 1,2-NQ, 1,2-naphthoquinone; 1,4-NQH₂, 1,4-dihydroxynaphthalene; 1,4-NQ, 1,4-naphthoquinone.

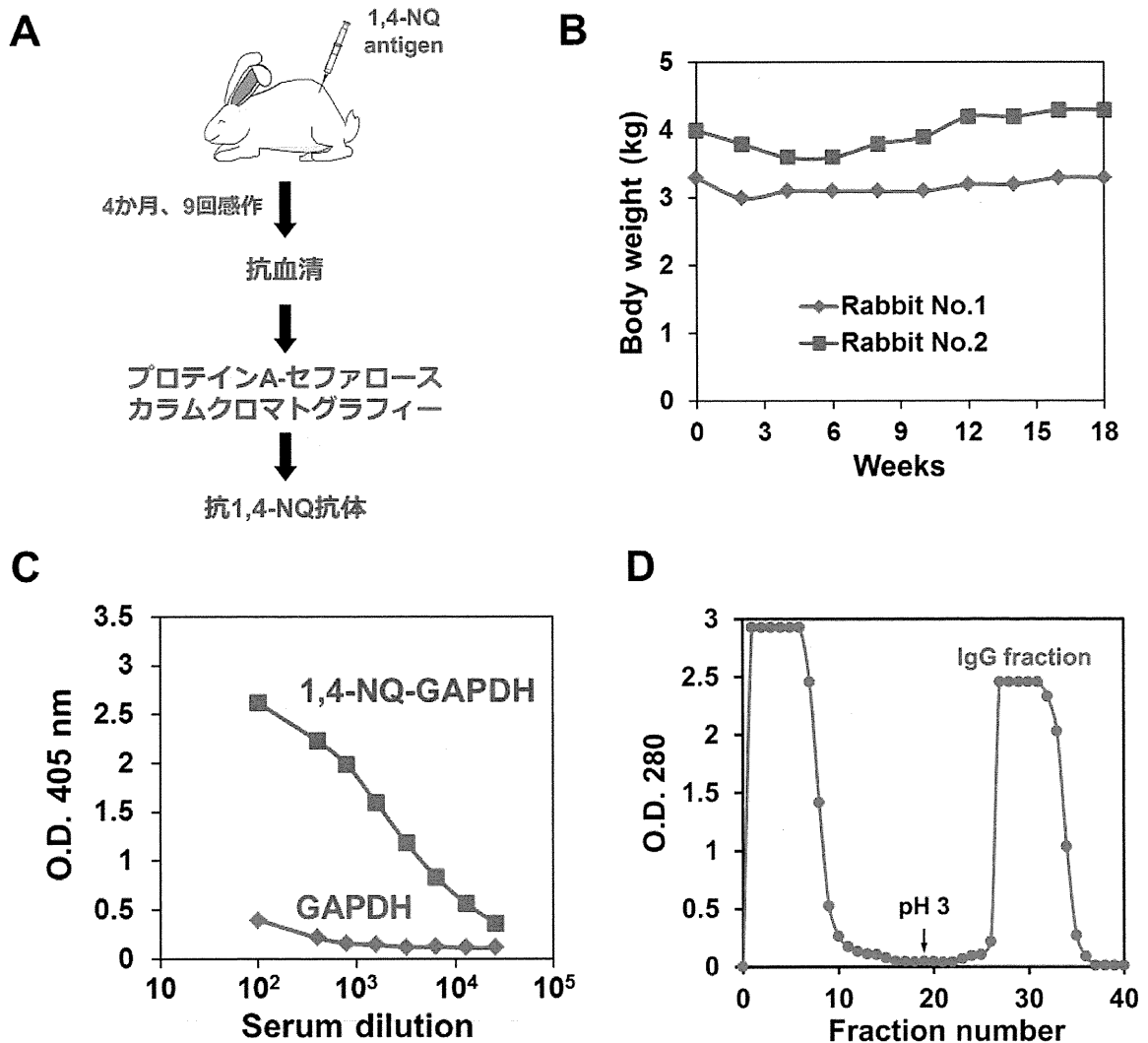


図 2. プロテイン A セファロースカラムによるウサギ抗血清のアフィニティー精製

A. 1,4-NQ 抗原感作および抗 1,4-NQ 抗体精製の工程図。B. 1,4-NQ 抗原感作ウサギの体重変化。C. 抗血清の 1,4-NQ 修飾タンパク質に対する抗体価。1,4-NQ 抗原を 9 回感作したウサギから得た抗血清を 100-25600 倍希釈し、GAPDH および 1,4-NQ-GAPDH に対する抗体価を ELISA 法により測定した。D. 抗 1,4-NQ 抗体の精製。抗血清 (152 mg) をプロテイン A セファロースカラムに流速 1 mL/min で付した後、0.1 M グリシン-HCl (pH 3) により IgG を溶出し、直ちに 1 M Tris-HCl (pH 8) を用いて pH を中性に調整した。得られた画分の波長 280 nm における吸光度は、分光光度計により測定した。

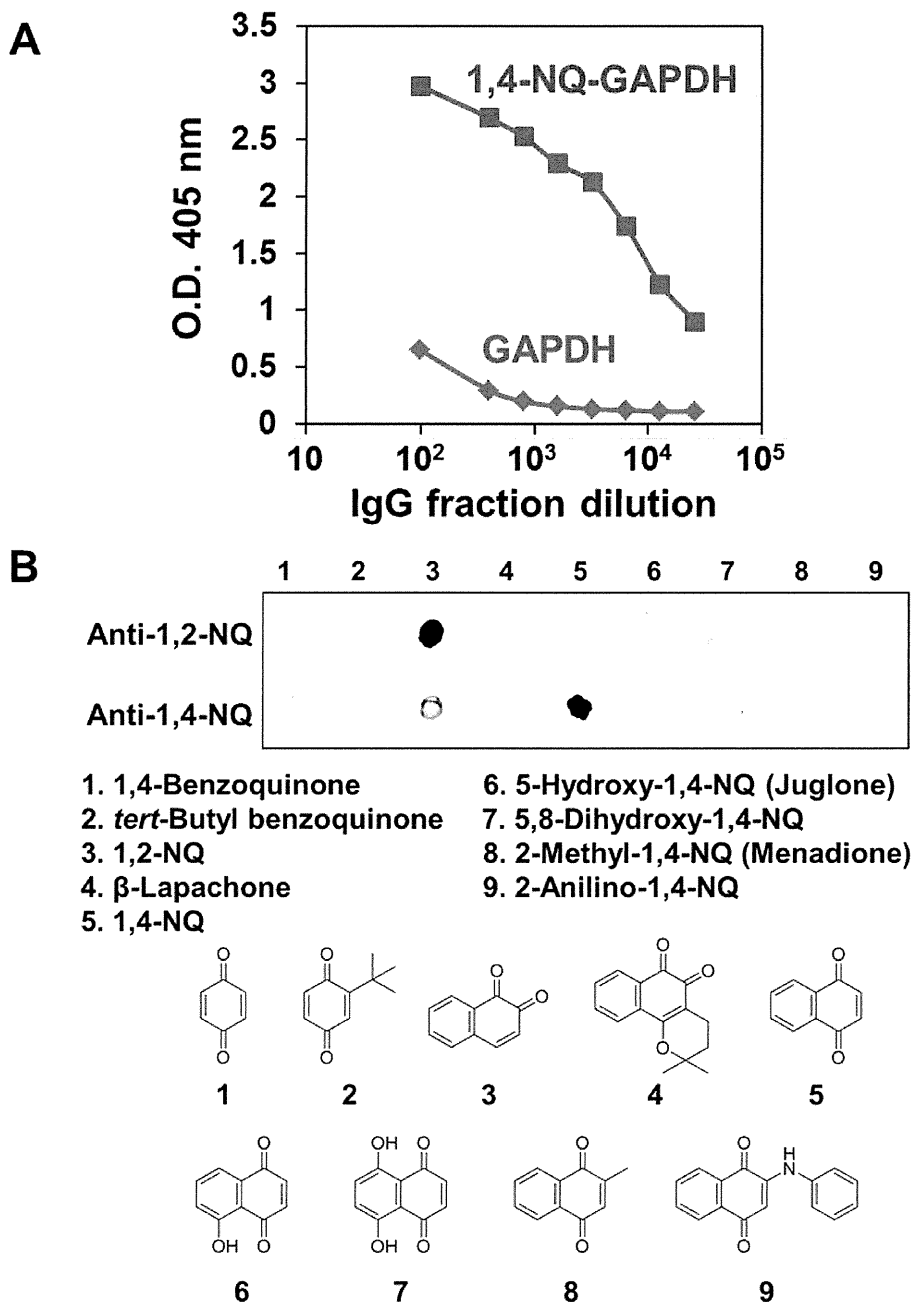


図 3. IgG 画分の 1,4-NQ に対する抗体価 (A) と抗原特異性 (B)

A. 得られた IgG 画分濃度を 5 mg/mL に調整したものを原液とし、それを 100-25600 倍希釈した IgG 画分を用いて GAPDH および 1,4-NQ-GAPDH に対する抗体価を ELISA 法により測定した。B. 0.1 mM 多環芳香族炭化水素類を含む全量 250 μ L の反応液 (50 mM KPi 緩衝液 (pH 7.4) および 2 mg S9) は、37°C、1 時間反応させ、抗 1,2-NQ 抗体または抗 1,4-NQ 抗体を用いたドットブロット法により解析を行なった。最上段の数字は、それぞれの多環芳香族炭化水素類の名称 (中段) と構造 (下段) に対応している。

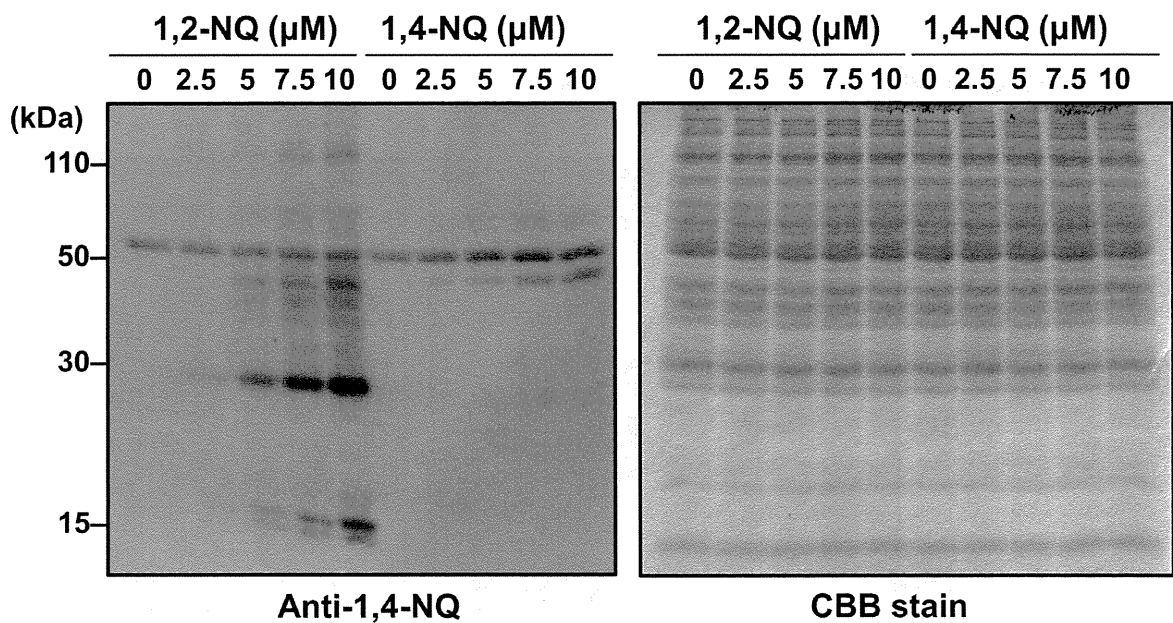


図 4. マウス肝臓 $9,000 \times g$ 上清中タンパク質と 1,2-NQ および 1,4-NQ の共有結合

全量 $250 \mu\text{L}$ の反応液 (50 mM KPi 緩衝液 (pH 7.4) および 2 mg S9) は、0-10 μM の 1,2-NQ または 1,4-NQ と 37°C , 1 時間反応した。反応後、速やかに氷上で 5 分間冷却した後、SDS-PAGE および抗 1,4-NQ 抗体を用いたイムノブロット法により解析を行なった。

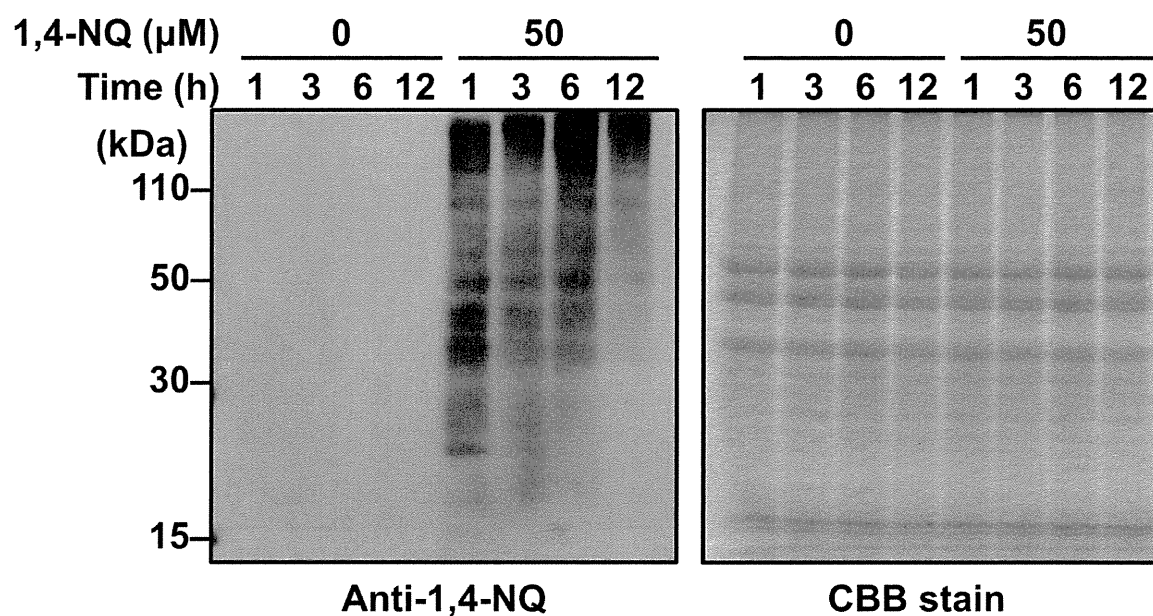


図 5. A549 細胞における 1,4-NQ 修飾タンパク質の経時的変化

無血清培地で前培養した A549 細胞に 1,4-NQ (50 μM) を曝露し、1-12 時間後の細胞内タンパク質への 1,4-NQ 修飾を SDS-PAGE および抗 1,4-NQ 抗体を用いたイムノブロット法により解析した。

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

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

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

研究協力者 岡元 陽子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室

研究要旨: 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 (μ -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、家庭用品から放散される揮発性有機化合物 (VOCs) 及び準揮発性有機化合物 (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による総揮発性有機化合物 (TVOC) の定量、デコンボリューション解析により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。その結果、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。VOCs に関し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比較的高濃度で放散されることが明らかになった。本年度の気道刺激性に関する *in vitro* 評価研究において 2-Ethyl-1-hexanol やある種の脂肪族アルコール類が末梢神経の侵害受容器 TRP イオンチャネルの活性化を介して鼻粘膜・気道刺激を引き起こす可能性を示唆しており、カーペットをはじめとする家庭用品から放散される VOCs とアレルギー様症状の関連について更に検討を進める必要があると考えられる。

A. 研究目的

建材等からの揮発性有機化合物 (VOCs) の放散量の評価法として「小形チャンバーを使用する放散試験法」(JIS A 1901:2009) が定められている。多くの家庭用品、特に平面状

の家庭用品についてはこの JIS A 1901 法を準用して VOCs 放散速度を測定することが可能であるが、液状の製品を含む多種、多様な家庭用品に小形チャンバー法のみで対応するのは困難であり、放散試験に要するコスト

の面からも代替法あるいは補完法の開発が必須であると考えられる。著者らはこれまでに、VOCsを測定対象としてMicro-Chamber/Thermal Extractor (μ -CTE)による放散試験のHigh Throughput化について検討を行い、家庭用品から放散するVOCsを定量的に評価する上で μ -CTE法が有用な方法であることを明らかにしている。

一方、家庭用品から室内環境中へ放出される化学物質として、フタル酸エステル類やリン酸トリエステル類など沸点240-260°C ~ 400°Cの準揮発性有機化合物(SVOCs)に対する関心が高まっている。SVOCsの暴露に関しては、室内環境中でのハウスダストを介した経口暴露の寄与が従来想定されたよりも遙かに大きいことが明らかにされつつあり、室内環境中での主要なSVOCs発生源の同定や放散速度の定量的な解析が重要な課題となっている。

そこで本研究では、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 (μ -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、家庭用品から放散される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り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。

B. 実験方法

B-1 検体

撥水、抗菌、防ダニ加工等の表記のあるカーペット20製品を対象として調査を行った。カーペットの選定は、パイル素材別にウール、ナイロン、ポリエステル、アクリル、ポリプロピレンの各4製品、計20製品を大手通販サイトより購入した。検体としたカーペットの製品情報を表1に示した。

B-2 μ -CTE 放散試験

Micro-Chamber/Thermal Extractor (μ -CTE 250i)の外観及び構造を図1に示す。著者らは平成22年度厚生労働科学研究補助金事業において、家庭用品から室内環境中へ放散されるSVOCsの定量的評価法として μ -CTE法の諸条件を確立しており¹⁾、その方法を用いて以下のように放散試験を実施した。

直径64 mmの円形に裁断した検体を μ -CTE250iの不活性処理ステンレス製チャンバーに入れ、高純度Heガスを定圧(流速約50 ml/min)で流しながら室温で1時間、VOCsをTenax TA吸着管に捕集した。ついで、検体を除いた後に超高純度Heガスを約50 ml/minの流速で流しながらチャンバーを室温から200°Cまで1時間にわたって加熱し、チャンバー内の蓋部分に吸着したSVOCsを脱着してTenax TA吸着管に捕集した。

B-3 加熱脱離-GC/MSによるVOCsの定量

Tenax TA吸着管に捕集したVOCsは、加熱脱離-GC/MS (Shimadzu TD-20 及び

GCMS-2010Ultra) で定量した。室内空気分析用 50VOCS 標準液 (Supelco 社製) を段階希釈して検量線を作成した。加熱脱離-GC/MS 分析の主要な測定条件を以下に記した。

[Thermal Desorption]

Desorption: 280°C, 10 min, 50 mL He/min

Cold Trap: -15°C

Trap Desorption: 280°C, 10 min

Line and Valve Temp.: 250°C

[GC]

Column: Rtx-1 (0.32 mm x 60 m, 1µm)

Carrier Gas: He, 40cm/min

Split Ratio: 1:20

Oven Temp: 40°C - 5°C /min - 250°C (3 min)

[MS]

Interface Temp.: 250°C

Ion Source Temp.: 200°C

Scan range: *m/z* 35-400

各試料の測定によって得られたクロマトグラムファイルを AIA (ANDI)フォーマットに変換し、AnalyzerPro (Sectralworks 社)によるデコンボリューション解析を行った。また、シミラリティー検索のためのマススペクトルライブラリーとして、NIST 05 及び FFNSC GC/MS 香料ライブラリー (島津製作所)を用いて解析し、試料から放散される成分に関して暫定的同定を行い Toluene 換算値を算出した。また、*n*-Hexane から *n*-Hexadecane までの範囲で検出した VOCS のピーク面積の総和を Toluene に換算して総揮発性有機化合物 (TVOC)濃度を算出した。

B-4 加熱脱離-GC/MS による SVOCs の定量

Tenax TA 吸着管に捕集した SVOCs は、加熱脱離-GC/MS (Shimadzu TDTS-2010 及び GCMS-2010) を用い、FASST(Fast Automated Scan/SIM Type) モードで測定した。測定対象物質としてフタル酸エステル 4 化合物 (Diethyl Phthalate (DEP)、Dibutyl Phthalate (DBP) 、 Benzyl Butyl (BBP) 及び bis(2-Ethylhexyl) Phthalates (DEHP)、アジピン酸エステル類 3 化合物 (Diisobutyl Adipate (DiBA)、Dibutyl Adipate (DBA)及び Dioctyl Adipate (DOA))、リン酸トリエステル類 5 化合物 (Triethyl Phosphate (TEP)、Tributyl Phosphate (TBP) 、 tris(2-Chloroethyl) Phosphate (TCEP)、Triphenyl Phosphate (TPhP) 及び tris(2-Eethylhexyl) Phosphates (TEHP)) を選定し、1 ng から 400 ng の範囲で定量した。尚、試薬は和光純薬工業あるいは東京化成工業から入手した。

加熱脱離-GC/MS 分析の主要な測定条件を以下に記す。

[Thermal Desorption]

Desorption: 300°C, 10 min, 50 mL He/min

Cold Trap: -10°C

Trap Desorption: 300°C, 10 min

Line and Valve Temp.: 300°C

[GC]

Column: Rtx-1 (0.32 mm x 60 m, 1µm)

Carrier Gas: He, 30cm/min

Split Ratio: 1:20

Oven Temp: 80°C - 40°C /min - 200°C - 5°C /min - 320°C (5 min)

[MS]

Interface Temp.: 250°C

Ion Source Temp.: 230°C

Scan range: m/z 50-500

Monitor Ions: TEP (99, 155), DEP (149, 177), TBP (99, 155), DiBA (129, 185), TCEP (249, 251), DBA (129, 185), DBP (149, 223), BBP (149, 206), DOA (129, 147), TPhP (326, 325), TEHP (99, 113), DEHP (149, 279)

上記条件で分析した標準物質のクロマトグラムを図2に示す。

C. 結果と考察

C-1 揮発性有機化合物

VOCsの分析条件で測定した各カーペットサンプルのトータルイオンクロマトグラムを図3-7に示す。各製品からのTVOC放散速度は40 ~ 7,269 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ 、中央値は921 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ であった(表2、図8)。

容積20 m^3 、床面積8 m^2 、換気回数0.5回/hの室内の床一面にカーペットが敷き詰められている状態を想定して室内空气中濃度増分予測値を算出した。20製品中の13製品に関しては、その製品を使用することによって暫定目標値400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超える室内空気汚染を引き起こす可能性が明らかになった(表2、図9)。これらは製品購入後、開梱して初期の放散速度で評価した結果であり、かつ μ -CTE法では蒸散支配型の放散が過剰に見積もられる可能性はあるものの、少なくともカーペットの使用開始時には十分な換気を行う必要があることを示す結果であると

言える。

カーペットから放散されるVOCsをNIST08 Mass Spectral Libraryで暫定的に同定し、トルエン換算値として放散速度を算出した(表3)。その結果、大部分の製品から2-Ethyl-1-hexanolをはじめとする脂肪族アルコール類が比較的高濃度で放散されることが明らかとなった。

C-2 準揮発性有機化合物

カーペットからの放散速度を検討した結果、No.15の製品からTCEPが35 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ 、No.19の製品からDBAが218 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ の放散速度で放出されることが明らかとなった(表4)。床面積8 m^2 の室内を想定した場合、これらのカーペットが存在することによって1日当たりそれぞれ6.7 mg、42 mg程度のSVOCs負荷を生じるものと推定される。

D. 結論

本研究では、 μ -CTE250i法による放散試験によりカーペットから放散するVOCs及びSVOCsの定性及び定量的評価を行った。その結果、VOCsに関しては2-Ethyl-1-hexanolをはじめとする脂肪族アルコール類が比較的高濃度で放散されることが明らかとなった。ある種の脂肪族アルコール類が末梢神経のTRPV1やTRPA1の活性化を介して鼻粘膜・気道刺激を引き起こすことを本年度の当該研究において明らかにしており(香川(田中) 聡子ら²⁾)、カーペットをはじめとする家庭用品から放散されるVOCsとアレルギー様症状の関連について更に検討を進める必

要があると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 引用文献

- 1) 神野透人ら：家庭用品から放散する化学物質の定量的・速度論的評価手法の開発に関する研究，厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業平成 22 年度研究報告書，課題名「家庭用品に由来する化学物質の多経路暴露評価手法の開発に関する研究」，研究代表者神野透人
- 2) 香川(田中) 聡子ら：生活環境化学物質の気道刺激性に関する研究－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－，厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業平成 23 年度研究報告書，課題名「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」，研究代表者香川聡子

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし