

201236007A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 香川（田中） 聡子

平成 25（2013）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、岡元 陽子、真弓 加織、田原 麻衣子	・・・ 9
2. 生活環境化学物質の感作性に関する研究 五十嵐 良明、小濱 とも子、清水 久美子	・・・ 39
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-ナフトキノンの細胞内標的タンパク質 及びそれに対する防御応答システムの解析- 熊谷 嘉人、新開 泰弘	・・・ 49
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、真弓 加織	・・・ 63
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 75
IV. 研究成果の刊行物・別刷	・・・ 76

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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

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24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、家庭用品から放散して室内を汚染する可能性のある化合物として、可塑剤・フタル酸ジエステル類18化合物及びその加水分解物であるフタル酸モノエステル類9化合物とその構造類似化合物2化合物、また、殺菌・防腐剤イソチアゾリン誘導体5化合物、計34化合物を評価した。その結果、可塑剤として汎用される Bis(2-ethylhexyl) phthalate の加水分解生成物で実際にハウスダスト中からも検出される Monoethylhexyl phthalate が TRPA1 の強力な活性化物質 (EC50値; 0.4  $\mu$ M) であることが明らかになった。イソチアゾリン誘導体については今回評価した5化合物すべてが TRPA1 活性化能を有すること、また、「布団冷却パッド」の使用に伴うアレルギー性皮膚炎発症の原因物質である可能性が指摘された 2-*n*-Octyl-4-isothiazolin-3-one は TRPV1 に対しても活性化を引き起こすことを明らかにした。また、皮膚感作性に関する研究では、フタル酸エステル類の代替可塑剤として使用される アジピン酸エステル類7化合物の皮膚感作性を LLNA:DA 及び h-CLAT 法で評価した結果、いずれの化合物についても感作性強度が非常に弱いことが示唆された。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、大気汚染物質である 1,4-ナフトキノン (1,4-NQ) に対する抗体を作製し、細胞内標的タンパク質として、heat shock protein 90 (HSP90) および HSP70 を含む複数のタンパク質を同定することに成功し、1,4-NQ に対する毒性防御の細胞応答システムとして、HSP90-heat shock factor 1 (HSF1) 系が重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、化学物質の放散に関する研究では、家庭用品からの室内環境中へガス態及び付着態として放散される準揮発性有機化合物 (SVOC) の定量的評価手法として

Micro-Chamber/Thermal Extractor ( $\mu$ -CTE) による放散試験法を確立してカーペット12製品を評価した結果、TXIBとTributyl phosphateが主にガス態として、Tris(2-chloroisopropyl) phosphateとBis(2-ethylhexyl) phthalateについては大部分が付着態として製品から放散されることが明らかになった。本研究で確立した $\mu$ -CTEによるSVOCの放散試験法によって、ガス態として室内環境中に放散されてそのままの状態、あるいは浮遊粒子状物質に吸着した状態で経気道暴露される可能性の高いFactorと、製品表面や近傍へ移行した後にHand-to-Mouth行動やハウスダストの摂食による経口暴露、並びに直接的な摂食による経皮暴露の可能性が高いFactorを分別推計し、それぞれの経路別暴露シナリオを精緻化することが可能となる。また、カーペットから放散することが明らかになったTXIB、Tributyl phosphate、Tris(2-chloroisopropyl) phosphateは、本研究初年度にTRPイオンチャネルの活性化を引き起こすことが判明しており、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部長)、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 (筑波大学医学医療系教授)

研究協力者: 新開 泰弘 (筑波大学医学医療系助教)、岡元 陽子 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部)、真弓 加織 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部)、田原 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部)、小濱 とも子 (国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部)、清水 久美子 (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10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气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に重要な情報を提供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おり、前年度までにこれら化合物を対象として評価を実施した。本年度は、フタル酸エステル等の可塑剤、及び平成21年に冷却パッドの使用に伴う製品事故の原因物質である可能性が指摘された殺菌・防腐剤イソチアゾリン誘導体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、本年度は、可塑剤として使用されるフタル酸エステル類とその加水分解生成物、また、家庭用品の使用による製品事故を引き起こした殺菌・防腐剤イソチアゾリン誘導体について、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。

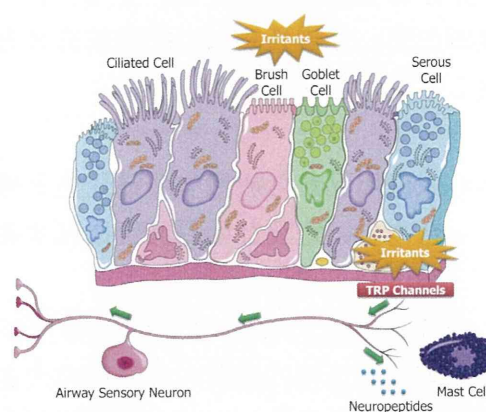


Fig. 1 Schematic presentation of airway hypersensitivity mediated by TRP ion channels.

### 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) によってフタル酸エステル類の代替可塑剤として使用されるアジピン酸エステル類 7 化合物の皮膚感作性を評価した。



one) を評価した結果、評価したすべての化合物が TRPA1 を活性化すること、また、OIT は TRPV1 に対しても活性化を引き起こすことが明らかになった。これまでに、塗料中に含まれるこれら抗菌剤が室内空気を介して皮膚炎を発症させる事例や、鼻炎や微熱等のシックハウス様症状を示す事例も報告されていることから、これらの化合物が、TRPV1 及び 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。

### C-2 生活環境化学物質の感作性に関する研究

フタル酸エステル類の代替可塑剤として使用されるアジピン酸エステル類7化合物の皮膚感作性をフタル酸エステル類の代替可塑剤として使用されるアジピン酸エステル類7化合物 (Dimethyl adipate, Diethyl adipate, Diisopropyl adipate, Dibutyl adipate, Diisobutyl adipate, Diisononyl adipate及びBis(2-ethylhexyl) adipate) の皮膚感作性の有無と強度をh-CLAT法とLLNA-DA法で評価した。評価可能であったLLNA-DA法による結果では、中程度の感作性強度を有する陽性対照物質 $\alpha$ -Hexyl cinnamaldehyde と比べて、いずれのアジピン酸エステルも反応性は低く、感作性物質であったとしてもその感作性強度は非常に弱いことが示唆された。

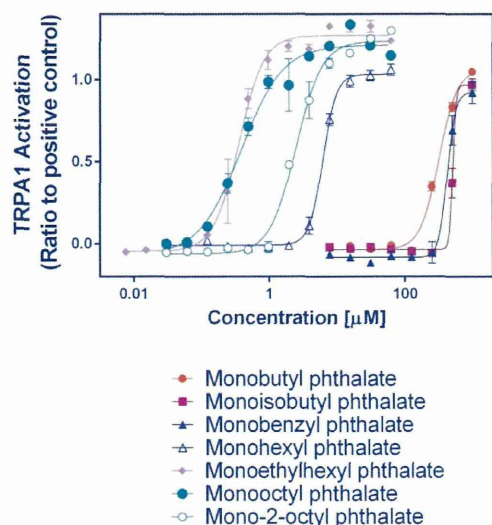


Fig. 2 Activation of TRPA1 by phthalate monoesters.

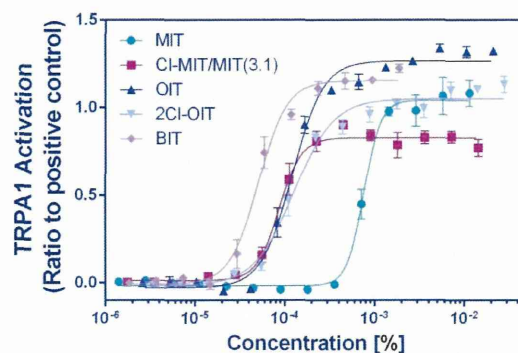


Fig. 3 Activation of TRPA1 by isothiazolinone derivatives.

### 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 を特異的に認識する抗体を作製して、ヒト扁平上皮癌由来 A431 細胞における細胞内標的タンパク質を探索した結果、同定された9つのタンパク質のうち3種類が熱ショックタンパク質 (HSP90, HSC71, HSP70) であることを明らかにした。さらに、HSP90 や HSP70 の発現制御にかかわる転写因子 heat shock factor-1



(HSF1) を siRNA の導入によってノックダウンすることにより、1,4-NQ の細胞毒性が増強されることが判明した。以上の結果より、HSP90-HSF1 系が 1,4-NQ に対する防御応答システムとして重要な役割を果たしていると考えられる。

#### 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

カーペット 12 製品を評価した結果、TXIB と Tributyl phosphate が主にガス態として、Tris(2-chloroisopropyl) phosphate と Bis(2-ethylhexyl) phthalate については大部分が付着態として製品から放散されることが明らかになった。本研究で確立した  $\mu$ -CTE による SVOC の放散試験法によって、ガス態として室内環境中に放散されてそのままの状態、あるいは浮遊粒子状物質に吸着した状態で経気道暴露される可能性の高い Factor と、製品表面や近傍へ移行した後に Hand-to-Mouth 行動やハウスダストの摂食による経口暴露、並びに直接的な摂食による経皮暴露の可能性が高い Factor を分別推計し、それぞれの経路別暴露シナリオを精緻化することが可能となる。

#### D. 結論

気道刺激性の *in vitro* 評価法として TRP イオンチャネルの活性化に関して検討した結果では、フタル酸ジエステル類 18 化合物中 8 化合物が、また、フタル酸モノエステル類 9 化合物中 7 化合物が TRPA1 活性化能を有することが明らかになった。

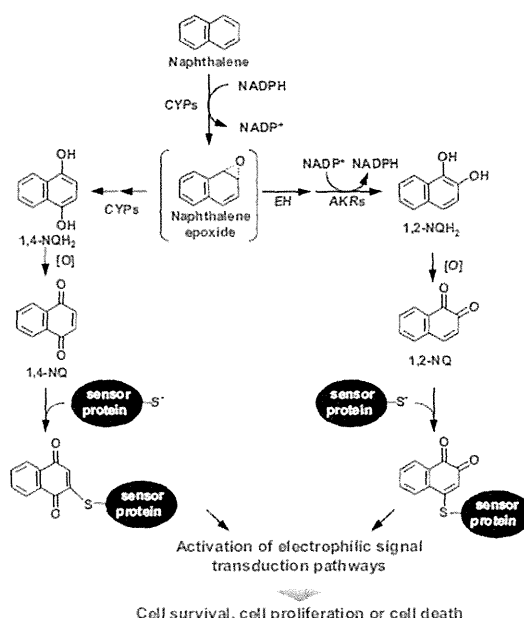


Fig. 3 Postulated cellular responses through covalent modification of sensor proteins during metabolic activation of naphthalene to produce 1,2-naphthoquinone and 1,4-naphthoquinone.

可塑剤として汎用される Bis(2-ethylhexyl) phthalate に TRPA1 の活性化能は認められなかったが、その加水分解生成物で実際にハウスダスト中からも検出される Monoethylhexyl phthalate が TRPA1 の強力な活性化物質であることが判明した。また、殺菌・防腐剤として塗料、接着剤、及びトイレタリー製品など多種多様な目的に使用されるイソシアゾリン誘導体 5 化合物を評価した結果、評価したすべての化合物が TRPA1 活性化を引き起こすことが明らかになった。

フタル酸エステル類の代替可塑剤として使用されるアジピン酸エステル類 7 化合物の皮膚感作性を LLNA-DA 法で評価した結果では、いずれのアジピン酸エス

テルも反応性は低く、感作性物質であったとしてもその感作性強度は非常に弱いことが示唆された。

環境応答・生体防御のメカニズムに関する研究では、化学物質に対する特異的抗体を利用した標的分子の探索手法が防御応答のメカニズム解明において極めて有用であることが示唆された。

家庭用品からの放散化学物質に関する研究では、マイクロチャンバーを用いる High Through-put な評価手法を確立し、カーペット製品からの揮発性有機化合物及び準揮発性有機化合物の放散速度を測定した。この評価手法では、家庭用品の使用に伴う室内空気中濃度の増加量を推計するのみならず、ガス態としてあるいは粒子状物質に吸着した状態での経気道暴露量、製品表面や近傍から Hand-to-Mouth 行動やハウスダストの摂食による経口暴露量、並びに直接的な接触による経皮暴露量を分別して推計することが可能である。また、評価した製品から TXIB、Tributyl phosphate、Tris(2-chloroisopropyl) phosphate が放散することが明らかになった。これら化合物は、本研究初年度に TRP イオンチャネルの活性化を引き起こすことが判明しており、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。

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上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) Hirose, R., Miura, T., Sha, R., Shinkai, Y., Tanaka-Kagawa, T., Kumagai, Y. A method for detecting covalent modification of sensor proteins associated with 1,4-naphthoquinone-induced activation of electrophilic signal transduction pathways. *J. Toxicol. Sci.*, **37**, 891-898, (2012)
- 2) Ohkawara, S., Tanaka-Kagawa, T., Furukawa, Y. and Jinno, H.: Methylglyoxal activates the human transient receptor potential ankyrin 1 channel. *J. Toxicol. Sci.*, **37**, 831-835, 2012.

F-2 学会発表

- 1) 池田 香, 香川 (田中) 聡子, 神野透人, 小林義典: 紫根による侵害受容体 TRPA1 の活性化に関する研究. 第 37 回日本化粧品学会 (2012.6)
- 2) 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 神野透人: フタル酸エステル類及びその加水分解生成物による TRPV1 及び TRPA1 の活性化. 第 39 回日本毒性学会学術

年会 (2012.7)

- 3) Jinno, H., Ohkawara, H., Tanaka-Kagawa, T.: Activation of nociceptive transient receptor potential channels by phthalates. 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-VI) (2012.7)
- 4) 五十嵐良明, 内野 正, 西村哲治. 家庭用品から放散するアクリル酸エステル類及びメタクリル酸エステル類の感作性評価. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (2012.10)
- 5) 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 岡元陽子, 五十嵐良明, 神野透人: フタル酸エステル類の気道刺激性に関する研究. 平成 24 年度室内環境学会学術大会 (2012.12)
- 6) 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 岡元陽子, 五十嵐良明, 神野透人: イソチアゾリン系抗菌剤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 133 年会 (2013.3)

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

—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—

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  
研究協力者 真弓 加織 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 田原 麻衣子 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：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、可塑剤として使用されるフタル酸ジエステル類 18 化合物及びその加水分解物であるフタル酸モノエステル類 9 化合物とその構造類似化合物 2 化合物、また、平成 21 年に冷却パッドの使用に伴う製品事故の原因物質である可能性が指摘された 2-*n*-Octyl-4-isothiazolin-3-one を含む殺菌・防腐剤イソチアゾリン誘導体 5 化合物、計 34 化合物を評価の対象とした。フタル酸エステル類に関しては、フタル酸ジエステル類 9 化合物、フタル酸モノエステル類 7 化合物がヒト TRPA1 を活性化することを明らかにした。可塑剤等の用途で汎用される Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) には TRP イオンチャネルの活性化能は認められなかったが、その加水分解生成物である Monoethylhexyl phthalate は TRPA1 の強力な活性化物質 (EC<sub>50</sub> 値; 0.4 μM) であることが明らかになった。これまでの研究で生活環境中の化学物質の暴露媒体であるハウスダスト中に DEHP が高濃度に存在することが報告されており、著者らは加水分解によって生じる Monoethylhexyl phthalate もハウスダスト中に存在することを明らかにしている。また、シックハウス症候群との因果関係が指摘されており、DEHP の加水分解物によって生成するほか溶剤としても広く使用されている 2-Ethyl-1-hexanol も前年度の研究によって TRPA1 を活性化することを明らかにしている。また、今回評価の対象としたイソチアゾリン系誘導体 5 化合物 (2-Methyl-4-isothiazolin-3-one、5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one、2-*n*-Octyl-4-isothiazolin-3-one、4,5-Dichloro-2-*n*-octyl-4-isothiazolin-3-one 及び

1,2-Benzisothiazolin-3-one) が TRPA1 を活性化すること、また、2-*n*-Octyl-4-isothiazolin-3-one は TRPV1 に対しても活性化を引き起こすことが明らかになった。イソチアゾリン系抗菌剤は塗料や化粧品・衛生用品等様々な製品に使用されており、諸外国においてはこれら抗菌剤を含む製品の使用により接触皮膚炎等の臨床事例が数多く報告されている。我が国でも、冷感効果を謳った製品の使用による接触皮膚炎が報告され、その原因としてイソチアゾリン系抗菌剤の可能性が指摘された。これまでに、塗料中に含まれるこれら抗菌剤が室内空気を介して皮膚炎を発症させる事例や、鼻炎や微熱等のシックハウス様症状を示す事例も報告されていることから、これらの物質が、TRPV1 及び 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。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、前年度までに溶剤や可塑剤・難燃剤、殺虫剤成分など家庭用品から放散される可能性のある、あるいは実際に室内環境中で検出される化学物質を中心に約200化合物について試験を実施した。

本年度の研究では、ハウスダストから高濃度で検出される可塑剤 Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) をはじめとするフタル酸エステル類、及びその加水分解生成物 29 化合物、また、平成 21 年に冷却パッドの使用に伴う製品事故の原因物質である可能性が指摘された殺菌・防腐剤イソチアゾリン誘導体 5 化合物、計 34 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  $Ca^{2+}$ 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 可塑剤フタル酸エステル類及びその加水分解生成物

フタル酸エステル類は塩化ビニル樹脂用の可塑剤としてのみならず塗料や接着剤等の用途に幅広く用いられており、空気中への揮散及びハウスダストへの吸着等によって室内環境を汚染していると考えられる。本研究では、可塑剤等の用途で汎用されるフタル酸エステル類 Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) をはじめとするフタル酸ジエステル類 18 化合物及びその加水分解物であるフタル酸モノ

エステル類 9 化合物とその構造類似化合物 2 化合物、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。評価した化合物の一覧を Table 1 (フタル酸ジエステル類) 及び Table 2 (フタル酸モノエステル類) に、その構造式を Fig. 2 (フタル酸ジエステル類) 及び Fig. 3 (フタル酸モノエステル類) に示す。また、2-ethylhexyl 基を有するモノエステル体の構造類似化合物として 2-Ethylhexyl 4-hydroxybenzoate 及び 2-Ethylhexyl salicylate についても評価した。構造式を Fig. 4 に示す。

フタル酸ジエステル類に関しては、評価した 18 化合物中 8 化合物が TRPA1 イオンチャネル活性化能を有することが明らかになった (Fig. 5)。フタル酸モノエステル類に関しては評価した 9 化合物中 monomethyl phthalate 及び monoethyl phthalate を除く 7 化合物が TRPA1 イオンチャネル活性化能を有することが明らかになった (Fig. 5)。ヒト TRPV1 に対しては今回の検討条件においては顕著な活性化能を示す化合物は見いだされなかった (Fig. 6)。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ことから、これらフタル酸エステル類によるイオンチャネルの活性化は TRPA1 に特異的な反応であると考えられる。

TRPA1 活性化能の濃度依存性について検討した結果を Fig. 7 (フタル酸ジエステル類) 及び Fig. 8 (フタル酸モノエステル類) に示す。TRPA1 活性化能が認められたフタル酸ジエステル類 9 化合物の  $\text{EC}_{50}$

値は Diisohexyl phthalate (27  $\mu\text{M}$ )、Di-*n*-propyl phthalate (39  $\mu\text{M}$ )、Diallyl phthalate (39  $\mu\text{M}$ )、Diisopropyl phthalate (48  $\mu\text{M}$ ) < Diethyl phthalate (142  $\mu\text{M}$ ) < Di-*n*-hexyl phthalate (487  $\mu\text{M}$ )、Dimethyl phthalate (505  $\mu\text{M}$ ) であった (Table 3)。また、フタル酸モノエステル類に関しては Monoethylhexyl phthalate、Monooctyl phthalate Mono-2-octyl phthalate 及び Monohexyl phthalate が極めて強い TRPA1 活性化能を有することが本研究によって明らかになり、その  $\text{EC}_{50}$  値はそれぞれ 0.4  $\mu\text{M}$  (Monoethylhexyl phthalate)、0.4  $\mu\text{M}$  (Monooctyl phthalate)、2.5  $\mu\text{M}$  (Mono-2-octyl phthalate)、6.2  $\mu\text{M}$  (Monohexyl phthalate) であった (Table 4)。Monobutyl phthalate 及び Monobenzyl phthalate も TRPA1 活性化能を有しそれぞれの  $\text{EC}_{50}$  値は 315  $\mu\text{M}$  (Monobutyl phthalate)、419  $\mu\text{M}$  (Monoisobutyl phthalate) であった (Table 4)。

フタル酸モノエステル類のなかで、TRPA1 活性化能が最も高かった Monoethylhexyl phthalate と構造の類似した 2-Ethylhexyl 4-hydroxybenzoate、2-Ethylhexyl salicylate のいずれにも TRPA1 活性化能は認められなかった。

DEHP の加水分解物として Monoethylhexyl phthalate と共に生成する 2-Ethyl-1-hexanol (Fig. 9) も、TRPA1 の活性化能を有することを前年度までの本研究で明らかにしている (Fig. 10)。これまでの研究によって生活環境中の化学物質の暴露媒体であるハウスダスト中に DEHP が高濃度に存在することが報告さ



れており、著者らは加水分解によって生じる Monoethylhexyl phthalate もハウスダスト中に存在することを明らかにしている (参考データ;厚生労働科学研究費補助金、化学物質リスク研究事業 平成 21 年度-平成 23 年度 総合研究報告書<sup>4)</sup>)。また、DEHP の加水分解物である 2-Ethyl-1-hexanol は、溶剤としても広く使用されており、シックハウス症候群との因果関係も指摘されている<sup>5,6,7)</sup>。従って、これらの物質が、TRPV1 及び 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。

## C-2 イソチアゾリン誘導体

節電による暑さ対策商品として、冷却シート等冷感商品の市場が拡大しているが<sup>8)</sup>、平成 21 年に「布団冷却パッド」の使用が原因とみられる重大製品事故として、アレルギー性接触皮膚炎の報告があった。その原因物質として、含水ジェル中に防腐剤として使用された 2-*n*-Octyl-4-isothiazolin-3-one (OIT) の可能性が指摘された<sup>9)</sup>。また、平成 23 年には「冷感タオル」の使用が原因と考えられるアレルギー性接触皮膚炎が報告され、製品から OIT、5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one (CI-MIT)、2-Methyl-4-isothiazolin-3-one (MIT) が検出された<sup>10)</sup>。本研究では、殺菌・防腐剤として使用されるイソチアゾリン誘導体 5 化合物を評価した。評価した化合物の一覧を Table 5 に、その構造式を Fig. 11 に示す。

尚、CI-MIT については、MIT との混合物 (AK Scientific Inc. 混合比 CI-MIT/MIT=3.1, active ingredient 14.4%)

以外に入手出来なかったため、MIT との混合物として評価した。

本研究で評価したすべてのイソチアゾリン誘導体、即ち MIT、CI-MIT、OIT、4,5-Dichloro-2-*n*-octyl-4-isothiazolin-3-one (2CI-OIT) 及び 1,2-Benzisothiazolin-3-one (BIT) が TRPA1 を顕著に活性化することが判明した (Fig. 12)。また、OIT は TRPV1 に対しても活性化を引き起こすことが明らかになった (Fig. 13)。Table 6 に TRP イオンチャネルに対するこれらイソチアゾリン系誘導体の EC<sub>50</sub> 値をモル濃度、及び w/v % で示した。アレルギー性皮膚炎を引き起こした布団冷却パッド及び危害情報がある「冷感タオル」に抗菌剤として使用されていた OIT の TRPV1 に対する EC<sub>50</sub> 値は 49 μM (1.0E-03 w/v%)、TRPA1 に対する EC<sub>50</sub> 値は 5.7 μM (1.2E-04 w/v%) であり、OIT が極めて低い濃度で TRPV1 及び TRPA1 の活性化を引き起こすことが明らかになった。また、化粧品基準で配合の制限が規定されている MIT についても、EC<sub>50</sub> 値 66 μM (7.6E-04 w/v%) で TRPA1 の活性化を引き起こすことが明らかになった。

CI-MIT については単独で評価することは出来なかったが、MIT との混合物として EC<sub>50</sub> 値 8.7E-05 w/v%) で TRPA1 の活性化を引き起こすことが明らかになった。この値は MIT の EC<sub>50</sub> 値に比べて約 9 倍低く、CI-MIT の作用が MIT に比べて高い可能性が考えられる。MIT と CI-MIT の混合剤は化粧品をはじめとして塗料、接着剤、シャンプーなどのトイレタリー製品など多種多様な製品に用いられ、多くの職業性及び非職業性の接触皮膚炎の原因物質

として報告されていることから、この化合物が TRPA1 の活性化を介して皮膚炎等の健康被害を引き起こしている可能性がある。これまでに、塗料中に含まれるこれら抗菌剤が室内空気を介して皮膚炎を発症させる事例や、鼻炎や微熱等のシックハウス様症状を示す事例も報告されていることから、以上の結果は室内環境化学物質による健康障害のメカニズムを解明する上で重要な知見である。

#### 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評価した。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、可塑剤として使用されるフタル酸ジエステル類 18 化合物及びその加水分解物であるフタル酸モノエステル類 9 化合物とその構造類似化合物 2 化合物、また、平成 21 年に冷却パッドの使用に伴う製品事故の原因物質である可能性が指摘された 2-*n*-Octyl-4-isothiazolin-3-one を含む殺菌・防腐剤イソチアゾリン誘導体 5 化合物、計 34 化合物を評価の対象とした。フタル酸エステル類に関しては、フタル酸ジエステル類 9 化合物、フタル酸モノエステル類 7 化合物がヒト TRPA1 を活性化することを明らかにした。可塑剤等の用途で汎用される DEHP には TRP イオンチャネルの活性化能は認められなかったが、その加水分解生成物である

Monoethylhexyl phthalate は TRPA1 の強力な活性化物質 (EC<sub>50</sub> 値; 0.4 μM) であることが明らかになった。これまでの研究で生活環境中の化学物質の暴露媒体であるハウスダスト中に DEHP が高濃度に存在することが報告されており、著者らは加水分解によって生じる Monoethylhexyl phthalate もハウスダスト中に存在することを明らかにしている。また、DEHP の加水分解物によって生成するほか溶剤としても広く使用されている 2-Ethyl-1-hexanol はシックハウス症候群との因果関係が指摘されており、前年度の研究によって TRPA1 を活性化することを明らかにしている。また、今回評価の対象としたイソチアゾリン系誘導体 5 化合物が TRPA1 を活性化すること、また、2-*n*-Octyl-4-isothiazolin-3-one は TRPV1 に対しても活性化を引き起こすことが明らかになった。イソチアゾリン系抗菌剤は塗料や化粧品・衛生用品等様々な製品に使用されており、諸外国においてはこれら抗菌剤を含む製品の使用により接触皮膚炎等の臨床事例が数多く報告されている。我が国でも、冷感効果を謳った製品の使用による接触皮膚炎が報告され、その原因としてイソチアゾリン系抗菌剤の可能性が指摘された。これまでに、塗料中に含まれるこれら抗菌剤が室内空気を介して皮膚炎を発症させる事例や、鼻炎や微熱等のシックハウス様症状を示す事例<sup>11, 12, 13)</sup>も報告されていることから、これらの物質が、TRPV1 及び 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。

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に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リストを作成する上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、佐藤千明氏、八木千恵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) 厚生労働科学研究費補助金・化学物質リスク研究事業（研究代表者；神野透人）平成 21 年度-平成 23 年度総合研究報告書, 平成 24 年 3 月
- 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., Moriyoshi, A., Sakai, K., 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).
- 8) 暑さ対策商品、オーラルケア商品などトイレタリー用品の国内市場を調査—トイレタリー用品国内市場調査(2)—富士経済 (2012). <https://www.fuji-keizai.co.jp/market/12073.html>
- 9) 厚生労働省報道発表資料：冷却パッ

ドの使用に伴う重大製品事故について (平成22年3月24日 医薬食品局 審査管理課化学物質安全対策室)

- 10) 独立行政法人国民生活センター報道 発表資料:「水でぬらすだけで冷感が得られることをうたったタオル」ー 湿疹・かぶれの原因となることもー (平成24年1月19日独立行政法人国民生活センター)
- 11) Lundov, M.D., Zachariae, C., Menné, T., Johansen, J.D.: Airborne exposure to preservative methylisothiazolinone causes severe allergic reactions. *BMJ*, 345:e8221. doi: (2012)
- 12) Lundov, M.D., Mosbech, H., Thyssen, J.P., Menné, T., Zachariae, C.: Two cases of airborne allergic contact dermatitis caused by methylisothiazolinone in paint. *Contact Dermatitis*, **65**, 176-179 (2011)
- 13) Bohn, S., Niederer, M., Brehm, K., Bircher, A.J.H.: Airborne contact dermatitis from methylchloroisothiazolinone in wall paint. Abolition of symptoms by chemical allergen inactivation. *Contact Dermatitis*, **42**, 196-201(2000).

## H. 研究発表

### H-1 論文発表

- 1) Ohkawara, S., Tanaka-Kagawa, T., Furukawa, Y. and Jinno, H.: Methylglyoxal activates the human transient receptor potential ankyrin 1 channel. *J. Toxicol. Sci.*, **37**, 831-835,

2012.

### H-2 学会発表

- 1) 池田 香, 香川(田中) 聡子, 神野透人, 小林義典: 紫根による侵害受容体 TRPA1 の活性化に関する研究. 第37回日本化粧品学会 (2012.6)
- 2) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 神野透人: フタル酸エステル類及びその加水分解生成物による TRPV1 及び TRPA1 の活性化. 第39回日本毒性学会学術年会 (2012.7)
- 3) Jinno, H., Ohkawara, H., Tanaka-Kagawa, T: Activation of nociceptive transient receptor potential channels by phthalates. 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-VI) (2012.7)
- 4) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 岡元陽子, 五十嵐良明, 神野透人: フタル酸エステル類の気道刺激性に関する研究. 平成24年度室内環境学会学術大会 (2012.12)
- 5) 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 岡元陽子, 五十嵐良明, 神野透人: イソチアゾリン系抗菌剤によるヒト侵害受容体 TRP イオンチャネルの活性化. 日本薬学会第133年会 (2013.3)

### 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