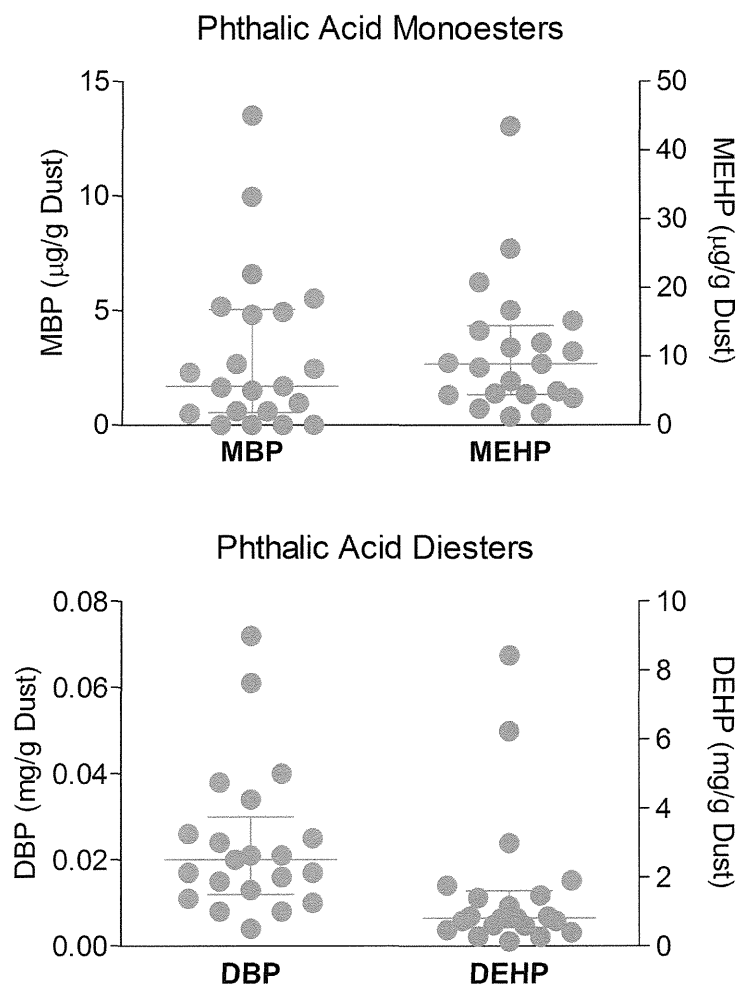


参考資料：厚生労働科学研究費補助金・化学物質リスク研究事業
(研究代表者；神野透人) 平成 21 年度-平成 23 年度総合研究報告書, 平成 24 年 3 月



Phthalate esters in house dust.

参考資料：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（水）医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室）

別紙 事故内容等

製品名：冷却パッド [※]					
No.	消費者庁から情報を入力した日 (括弧内は報告事例を企業が認識した日)	報告事例の概要			
		事故発生日	事故発生場所	被害分類	事故概要
1	平成22年3月18日 (平成21年11月4日)	平成21年7月	兵庫県	負傷又は疾病(治療に要する期間が30日以上)	当該製品を使用した女性が防腐剤によるアレルギー性接触皮膚炎と診断された。

重大製品事故に該当しない軽微な事故

製品名：冷却パッド [※]					
No.	消費者庁から情報を入力した日 (括弧内は報告事例を企業が認識した日)	報告事例の概要			
		事故発生日	事故発生場所	被害分類	事故概要
1	平成22年3月18日 (平成21年10月6日)	平成21年8月	兵庫県	その他軽傷又は疾患	当該製品を使用した女性が防腐剤によるアレルギー性接触皮膚炎と診断され、現在は完治している。

再発防止策

当該製品に使用された防腐剤に含まれるイソチアゾール系化合物である OIT (2-n-オクチル-4-イソチアゾリン-3-オン) は、内側含水ジェルのカビの発生を防ぐために使用されていました。しかし、製品表面生地より OIT が検出され、製品内部から OIT がしみ出している可能性が示唆されました。OIT は皮膚刺激性及び感作性を有する化合物であり、今回の被害の原因物質と考えられています。

製造販売業者においては再発防止のため、以下の対応をいたします。

- ・当該製品の製造・出荷・販売を中止すること
- ・販売済みの製品については、販売店へ注意喚起文を送付し、ホームページに注意喚起文を掲載すること
- ・当該防腐剤の使用を中止し、より安全性の高い防腐剤に変更を行うこと

別紙 事故内容等

本品については、安全に使用いただくため、取扱い説明書にシートまたはカバーを掛けて使用し、こまめに取り替えるよう注意がなされています。当室では、類似の事故の発生等を注視するとともに、今般、本事例を公表し、当該内容を各都道府県・政令市・特別区衛生主管部(局)長あてに通知することにより、広く消費者に周知したいと考えております。

※参考

- ・ 製造業者：株式会社オーシン
 - ・ 販売業者：株式会社オーシン MLP
 - ・ 製品名：冷却ジェルシート朝までクール[®](ジェルでクール[®]A) 枕用シングル
冷却ジェルパッド朝までクール[®](ジェルでクール[®]A) シングル(シート)
 - ・ 製品サイズ：30×45cm、45×45cm、60×90cm、90×90cm、90×140cm、90×150cm、90×180cm、140×180cm、115×80cm、115×140cm
 - ・ 原産国：日本
 - ・ 販売数量：枕用シングル 257,538 枚(2007年～2009年)
シート 377,724 枚(2007年～2009年)
 - ・ 製品の断面構造は、内側から、含水ジェル、不織布(ポリエステル)、ポリエチレン製フィルム、平織りの生地となっており、防腐剤は含水ジェルに使用されていた。
 - ・ ジェルに熱を吸収させて頭や身体を冷やすことを目的として、枕や布団の上に置いて使用する。
 - ・ 製品に添付された説明書において「ベッドまたは敷布団の上に敷いて、シートまたはカバーを掛けてご使用ください」等の注意事項が表示されている。
- 製品に関する問い合わせ先：株式会社 オーシン
TEL:0120-896-996
受付時間：月曜日～金曜日(祝祭日、年末年始、夏期休暇を除く。)午前9時～12時、午後1時～5時

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 部長
研究協力者 小濱とも子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
研究協力者 清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部

研究要旨：LLNA:DA 及び h-CLAT 法を用いて、アジピン酸エステルの感作性の有無と強度を評価した。DEA、DBA、DiBA 及び DiNA が塗布濃度 50 または 100% で SI 値 1.8 を超え塗布濃度 50 または 100% で SI 値 1.8 を超えた。しかし、SI 値が 3 を超えるような試験群は認めなかった。今回は動物ごとに反応性がばらつき、同じ試験群でも陽性と陰性と判断される動物が複数存在することもあった。中程度の感作性強度を有する HCA 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。DEA 及び DMA 以外の物質は培地と分離して試験濃度の設定ができなかった。脂溶性の高いアジピン酸エステルに対し h-CLAT を適用するのは困難であるとし、評価しなかった。DEA 及び DMA については、試験した濃度すべてで陽性基準を超える反応を示すことはなく、LLNA:DA と h-CLAT での判定は一致しなかった。アジピン酸エステルのリスク管理の優先度はかなり低いと思われた。

A. 研究目的

シックハウス症候群や化学物質過敏症は、室内空気中の高濃度の有毒化学物質が原因で発症し、アレルギー性鼻炎、気管支喘息及びアトピー性皮膚炎等の疾病に対するこれらの化学物質の増悪因子としての関与が疑われている。室内空気中化学物質の健康影響への関心の高まりから、1997 年のホルムア

ルデヒドをはじめとして 2002 年まで揮発性・準揮発性有機化合物 13 種の室内濃度指針値が策定されてきた。その後の室内環境汚染実態調査では、これらの化学物質以外にも家庭用品等から多種の化学物質が室内環境中に放散されていることが明らかになっており、家庭内に存在する電気機器、家具あるいは使用する家庭用品など生活様式の変化

によって検出される化学物質にも変化が出ている。一部の化学物質にはシックハウス症候群やアレルギー鼻炎に関連した気道刺激性や感作性についての安全性評価が十分評価されていないものもある。例えば、喘息は即時型アレルギーの症例であるが、このような感作性の観点で、室内空気中の化学物質のリスク管理の必要性を検討した事例は極めて限られている。

昨年度までの研究では、塗料、接着剤及び合成樹脂の原料として使われている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 法及び h-CLAT 法を用いて評価し、それぞれの試験法での結果の比較を行った。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。

近年、塩化ビニルに多用されていたフタル酸系可塑剤は、EU や米国で規制が強化され使用量が減少してきている。それに代わって非フタル酸系の代替可塑剤の使用量が増加しているが、これらについては皮膚感作性データがほとんどないか全くない。非フタル酸系代替可塑剤の一つであるアジピン酸ジエチルヘキシル(DEHA) は家庭用品や玩具等への使用が認められている。DEHA 以外のアジピン酸系可塑剤については一部で家庭用品への使用が確認されており、室内空気中にも検出されているものの、皮膚感作性に関する報告は無い。これらの可塑剤については今後の使用量増加が予測されることから、本年度の対象物質とし、その感作性について評価した。

B. 研究方法

1. 試薬

アジピン酸ジエチル (diethyl adipate, DEA)、アジピン酸ジイソプロピル (diisopropyl adipate, DiPA)、アジピン酸ジブチル (dibutyl adipate, DBA)、アジピン酸ジイソブチル (diisobutyl adipate, DiBA)、アジピン酸ジイソノニル (diisononyl adipate, DiNA) 及びアジピン酸ビス (2-エチルヘキシル) [bis(2-ethylhexyl) adipate, DiNA、または dioctyl adipate, DOA] を試験物質とした。それぞれの化学構造式を図 1 に示した。陽性対照物質として、2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) 及び α -hexyl cinnamaldehyde (HCA)を用いた。

2. 動物

CBA/JCrj 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 100%を最高に、アセトン-オリーブ油 (4:1) (AOO) で希釈して塗布した。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 μl 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 μ 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 μ l を ATP 抽出液 100 μ l と混合し、20 秒後発光試薬 100 μ 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）を求めた。OECD ガイドライン 442A に基づきこの値が 1.8 以上（SI 値 1.8～2.5 は感作性陽性かどうかの境界線）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

試験物質はエタノールまたはジメチルスルホキシドに溶解した後、0.22 μ 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。24 穴プレートの各穴に THP-1 細胞浮遊液（ 2×10^6 cells/ml）500 μ l を入れ、種々の濃度の試験溶液 500 μ l を加えて培養した。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。24 時間後、各穴から細胞懸濁液 100 μ l を 96 穴プレートに移し、WST-8 試液を 10 μ l ずつ加えて 2

時間培養後、マイクロプレートリーダーを用いて測定波長 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（CV75）を求め、高濃度側に 1 濃度、低濃度側に 6 濃度、公比 1.2 で 8 段階を h-CLAT の試験濃度とした。

6. h-CLAT

上記同様、THP-1 細胞浮遊液に各濃度の試験溶液を加えて 24 時間培養した。遠心して細胞を回収した後、0.1% 牛血清アルブミン（BSA）含有 PBS（BSA-PBS）を加え遠心して 2 回洗浄後、0.01% globlins, Cohn fraction II, III（Sigma-Aldrich 社）-PBS 溶液を 600 μ 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 μ l、FITC 標識抗 CD54 抗体（clone 6.5B5, DAKO 社）3 μ l または isotype control として FITC 標識マウス IgG1（clone DAK-G01, Dako 社）3 μ 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 μ l に再懸濁し propidium iodide（PI）25 μ g/ml を 10 μ 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。

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

C. 研究結果

LLNA:DA 法においては、各試験物質とも全身毒性や皮膚刺激性の有無、あるいはおおよその反応性を知るため、予試験として塗布できる最高濃度、今回はいずれも液体であるので原液 100%を適用し、AOO を同様に塗布した時との反応性を比較した。体重の減少あるいは皮膚腐食は認められず、毒性等は認められなかった。いずれの試験物質とも陽性対照物質の 25% HCA 塗布群と比較して、リンパ節重量及び ATP 量増加率は低い値を示した。

次に AOO を用いて試験物質を希釈し、100%、50%、25%の 2~3 段階の濃度で塗布した。各回の試験結果を図 2 に示した。DBA 及び DiBA については 50%でリンパ節 ATP 量は最高となり、SI 値は 2.5~2.7 を示した。DiNA については 100%で SI 値が 2.0 を示した。別機会の実験では、DEA は 100%で最高の SI 値 2.2 を示したが、DiPA 及び DOA の SI 値はいずれの濃度でも 1.8 以下であった。DiPA は予試験で SI 値が 2.0 を超えたが、今回の試験では群内に 2.0 を超える反応性を示す動物もいたが平均値では 1.6 であった。

アジピン酸エステル類の h-CLAT 法での適用濃度を決定するため、WST-8 試薬を判定試薬にして細胞毒性試験を行った。最高濃度 1000 µg/ml で DOP、DiNA、DBA、DiBA 及び DiPA はいずれも 80%以上の細胞生存率を示した。これらの物質をエタノールあるいは DMSO に溶解した試験溶液は、細胞への適用時に培地で希釈すると直ぐに油滴となって二層に分離してしまい、細胞への暴露が十分でなかった。一方 DEA と DMA については培地で希釈しても一定の懸濁状態を保った。それぞれの試験物質の細胞生存率曲

線を図 3 に示した。CV75 値は DEA については 62.5 µg/ml、DMP については 31.3 µg/ml であり、この濃度を基準に h-CLAT を実施した。DEA 及び DMA による CD54 または CD86 の RFI 値は、試験した濃度すべてで 200%または 150%の陽性基準を超えることはなかった (図 4)。アジピン酸エステルのほとんどが h-CLAT での評価は困難であり、h-CLAT と LLNA:DA での判定結果は一致しなかった。

D. 考察

フタル酸エステルは内分泌攪乱作用等の懸念から日米欧でその使用が規制されている。例えば、日本では DEHP、DBP 及び BBP は 6 歳未満対象のおもちゃへの配合が禁止され、食品器具や容器包装に対する規格基準も定められている。DEHP については現行の使用制限を超える制限は不要とのリスク評価結果も提出されているが、代替可塑剤としてアジピン酸エステルなども使用されるようになっている。DEHA は玩具等への使用が認められており、耐寒性可塑剤としてフィルム、レザー等家庭用品にも用いられる。DiNA は耐寒・低揮発性可塑剤として、食品用ラップフィルムに用いられている。このようにいくつかのアジピン酸エステルは家庭用品への使用が確認されており、室内空気中にも検出されている。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、気管支喘息及びアトピー性皮膚炎等の疾病に室内空気中化学物質の関与が疑われているが、アジピン酸エステルについては感作性に関するデータがほとんどない。これらについては今後の使用量増加が予測されることから、その感作性を LLNA:DA 法及び h-CLAT 法により評価した。

試験したアジピン酸エステルは LLNA:DA 法において SI 値が 3 を超えることはなかった。LLNA:DA 法の開発時期に実施されたバリデーション研究では陽性基準を SI 値 3 としていたが、ICCVAM 等の prospective な評価により SI 値 1.8 以上を陽性 (1.8 から 2.5 は陰性の可能性もある) とし、OECD ガイドラインに掲載された。この判定基準を用いると、DEA、DBA、DiBA 及び DiNA が塗布濃度 50 または 100% で SI 値 1.8 を超えた。DiNA については 100% で SI 値が 2.5 を超えなかった。SI 値の標準偏差からも明らかのように試験群内のばらつきも大きく、陽性を示さない動物が複数存在する試験群も存在した。中程度の感作性強度を有する陽性対照物質の HCA と比べても適用濃度は高く反応性も低いことから、OECD ガイドラインの判定基準では感作性陽性となるが、あったとしてもその強度は非常に弱いと思われる。

アジピン酸エステルは化学構造からわかるように脂溶性が非常に高く、水に溶解しない。h-CLAT では非水溶性物質は試験時に一旦 DMSO 等の有機溶媒に溶解した後、培地に希釈するとされている。DOA と DiNA は 500 mg/ml の濃度では DMSO に溶解せずエタノールに溶解させた。これらを細胞に暴露するため培地で希釈し超音波処理したが、直ぐに油滴となって二層に分離してしまった。また、試験物質と細胞との接触が起こらないためか、細胞毒性試験で細胞生存率に変化はなかった。一方 DEA と DMA については培地で希釈しても一定の懸濁状態を保ち、CV75 値が得られたため、これを基準に h-CLAT 法で評価した。DEA 及び DMA は試験した濃度すべてで陽性基準を超えることはなかった。LLNA:DA と h-CLAT 両法で

検査できた DEP について、両方法での判定は一致しなかった。

h-CLAT の試験濃度は物質の水溶性及び細胞毒性強度により決まることを既に報告した。このことは、類似構造を有する感作性物質の強度の順序は細胞毒性試験からおおよそ推定できることを示している。しかしアジピン酸エステルは非水溶性の油状物質で細胞毒性が検出できないもので、h-CLAT 法の適用限界に当たる物質であった。h-CLAT 法は、従来の動物試験では問題の少なかった試験物質の脂溶性が試験の実施及び判定に大きく影響することを念頭に置く必要がある。

E. 結論

LLNA:DA 及び h-CLAT 法を用いて、アジピン酸エステルの感作性の有無と強度を評価した。DEA、DBA、DiBA 及び DiNA が塗布濃度 50 または 100% で SI 値 1.8 を超えたが、3 を超えるような SI 値を示した試験群はなかった。今回同じ試験群でも個体ごとのばらつきが大きかった。中程度の感作性強度を有する HCA と比べて反応性は低く、感作性物質であるとしてもその感作性強度は非常に弱いと考えられた。DEA 及び DMA 以外の物質は培地と分離して試験濃度の設定ができないことから、h-CLAT の適用は困難で評価しなかった。DEA 及び DMA は試験した濃度すべてで陽性基準を超えることはなく、LLNA:DA と h-CLAT での判定は一致しなかった。アジピン酸エステルのリスク管理の優先度はかなり低いと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

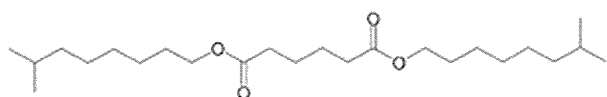
2. 学会発表

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)

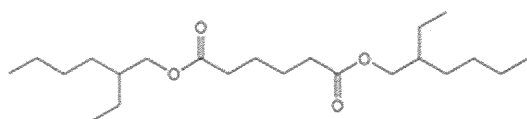
G. 知的所有権の取得状況

なし

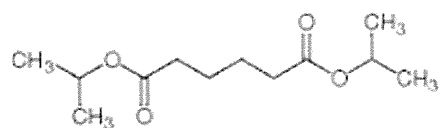
Diisononyl adipate (DiNA)



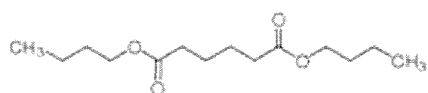
Diethyl adipate (DOA)



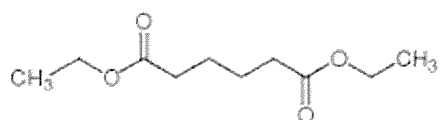
Diisopropyl adipate (DiPA)



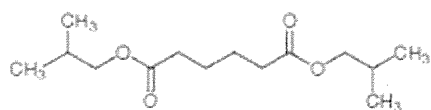
Dibutyl adipate (DBA)



Diethyl adipate (DEA)



Diisobutyl adipate (DiBA)



Dimethyl adipate (DMA)

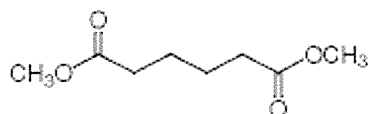
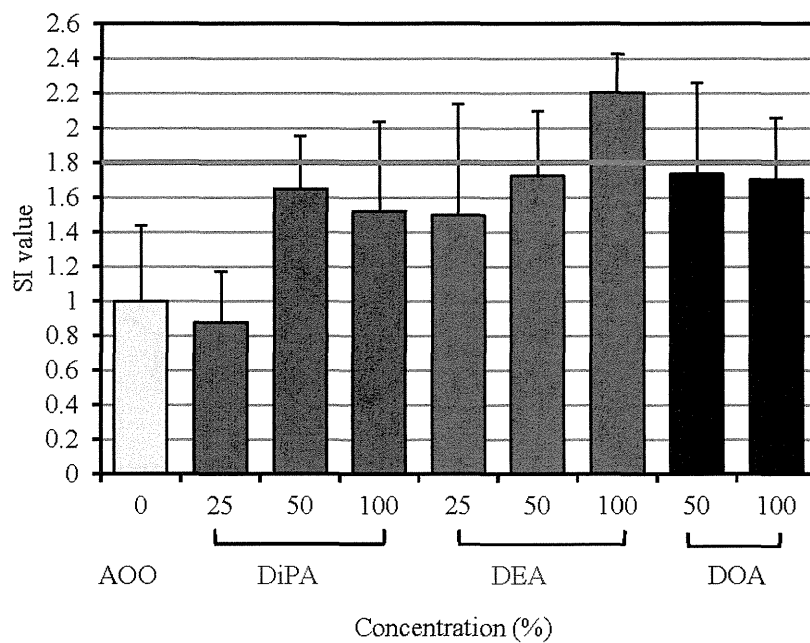


図 1. 試験したアジピン酸エステル構造式

(a) Experiment 1



(b) Experiment 2

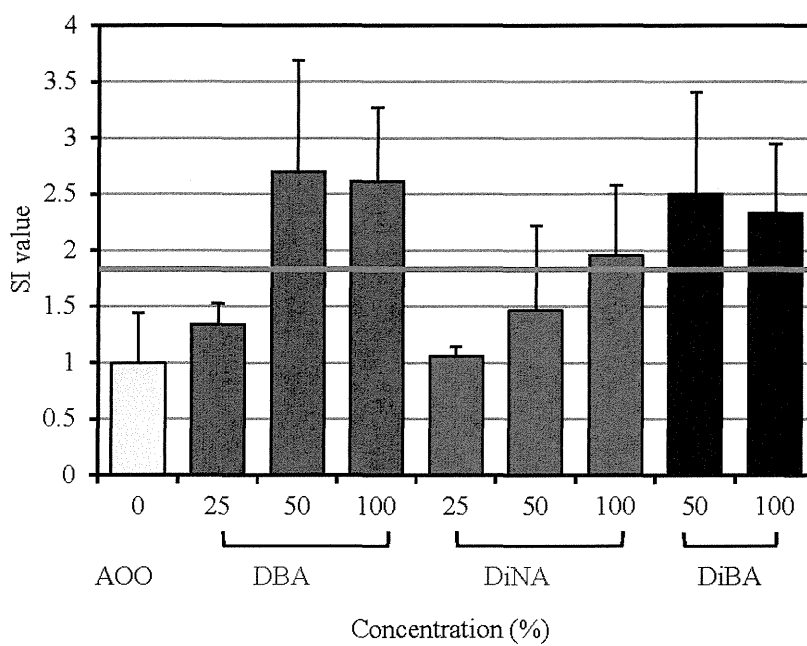


図 2. アジピン酸エステルの LLNA:DA の結果

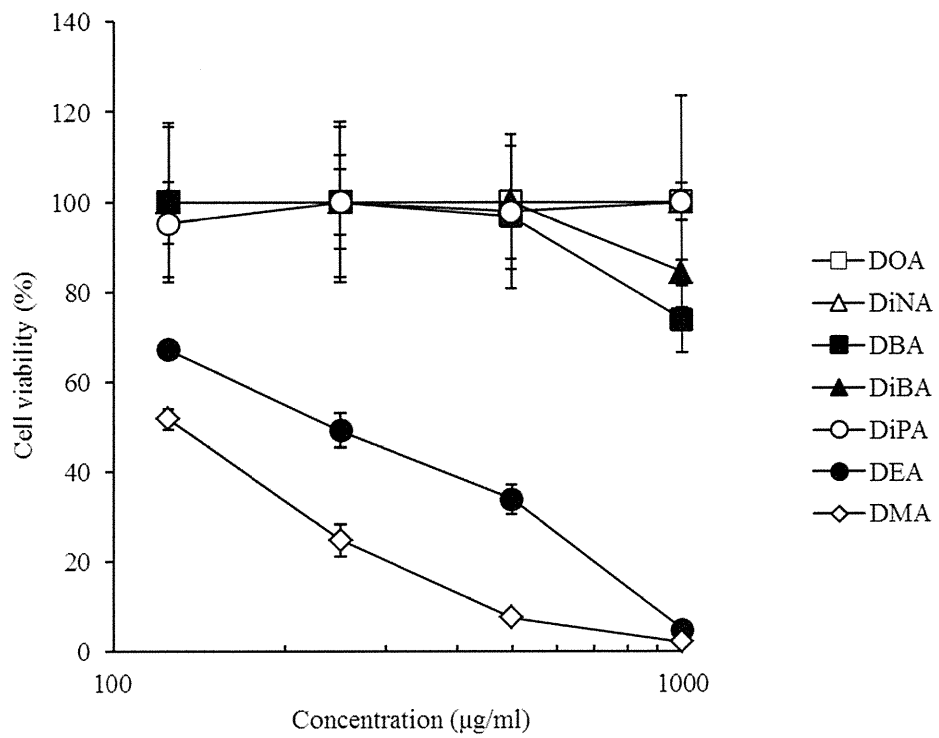
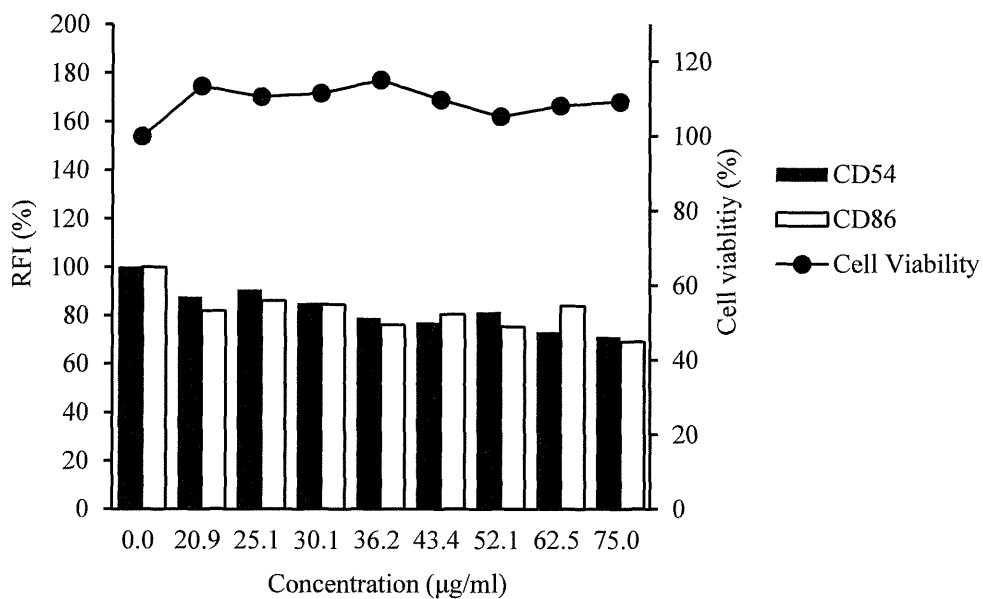


図 3. アジピン酸エステル of 細胞毒性強度

(a) DEA



(b) DMA

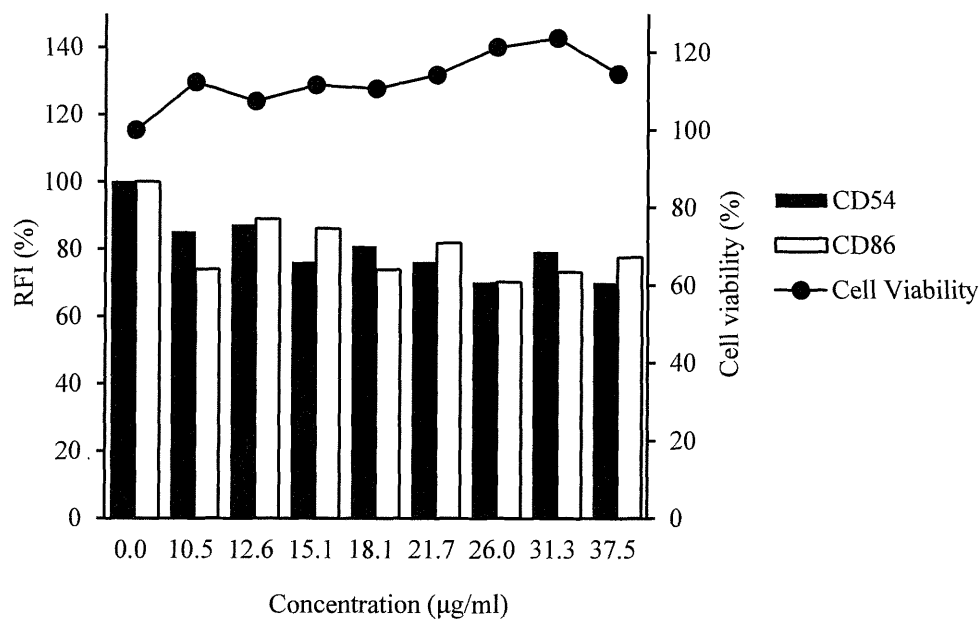


図 4. DEA 及び DMA の h-CLAT の結果

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

研究分担者	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

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、1,4-ナフトキノ
ン（1,4-NQ）を同定した。1,4-NQ は親電子性を有しており、生体内の求核性置換基
を持つタンパク質と容易に共有結合を形成するが、その細胞内分子標的に関する知見
は乏しい。そこで本研究では、1,4-NQ を特異的に認識する抗体を用いて当該物質の
細胞内標的タンパク質を検出・同定すること第一の目的とした。加えて、1,4-NQ に
対して防御的に働くシステムを明らかにすることを第二の目的とした。その結果、ヒ
ト扁平上皮癌由来 A431 細胞における 1,4-NQ の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
功した。また、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。

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 年に

Fraser らが、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）を測定した結果、揮発性成分中にフルオレン（29.8 ng/m³）やフェナンスレン（33.3 ng/m³）と比べて約 200 倍高い濃度でナフトレン（5990 ng/m³）が存在していることを報告している。ナフトレンは、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。また、ナフト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。実際、我々は南カリフォルニア近郊にて採取した大気サンプル中に 1,2-ナフトキノン (1,2-NQ) や 1,4-ナフトキノン (1,4-NQ) 等のキノン化合物が含まれていることを同定した。これらの化学物質はいずれも親電子性を有しており、生体内の求核性置換基を持つタンパク質と容易に共有結合を形成するが、その細胞内分子標的に関する知見は乏しい。

そこで本研究では、特に 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解析するために、1,4-NQ を特異的に認識する抗体を作製し、その抗体を用いて 1,4-NQ が結合する細胞内標的センサータンパク質を検出・同定することを第一の目的とした。更に、当該親電子物質に対してリスク軽減因子として働くことが予想される防御応答システムを明らかにすることを第二の目的とした。

B. 研究方法

抗体の調製

1,4-NQ-KLH 結合体の合成を行った後、合成したハプテンを Freund Incomplete

Adjuvant (初回免疫のみ Freund Complete Adjuvant を使用) と等量混合したものをウサギ (New Zealand White 系) におよそ 80 μg ずつ、4 ヶ月間、計 9 回感作させた。ELISA 法にて抗体価を測定後、全採血を行った。その語、Protein A-Sepharose CL-4B カラムおよび用いて抗体の精製を行った。

タンパク質の定量

標準タンパク質として BSA を用い、ビシンコニン酸 (BCA) 法にて測定した。

ドットブロット法

試料中のタンパク濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように 2 \times 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、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。

ウエスタンブロット法

SDS-PAGE は Leammli らの方法に従って行なった。すなわち、ポリアクリルアミドゲルは 4% 濃縮ゲルおよび 10% または 12% 分離ゲルより成り、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。試料は 3×SDS-PAGE sample buffer 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。ウエスタンブロット法は Kyhse-Andersen らの方法に従って行なった。電気泳動したゲルから 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、TTBS-0.1% BSA で希釈した 1 次抗体に浸し、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。

タンパク質の分離・同定

等電点電気泳動は Immobiline DryStrip (pH 3-10, 7 cm, GE Healthcare) を用い、常法に従った。未知タンパク質は LC-MS を用いて同定した。

培養細胞

ヒト扁平上皮癌由来 A431 細胞は理化学研究所セルバンクより購入した。細胞培養は、5% 二酸化炭素 - 95% 空気および 37°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 (FBS)、100 U/mL ペニシリン-100 μg/mL ストレプトマイシンおよび 2 mM グルタマックス-I を添加した Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM 培地) を用いた。細胞継代は、コンフルエントの状態で行ない、滅菌した D-PBS で FBS 入り培地を洗浄した後、0.25% トリプシン-EDTA 溶液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 : 3 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。

遺伝子導入法

siRNA の導入はリポフェクション法を用いた。すなわち、遺伝子導入試薬は RNAiMAX を使用し、マニュアルに従って siRNA を導入した。

毒性試験法

MTT アッセイを行った。96 well プレートに培養細胞を播種して培養後、無血清培地で更に一晚培養してから 1,2-NQ を 24 時間曝露した。その後、MTT 溶液 (5 mg/ml) を培地量の 20 分の 1 量加えて、37°C で 4 時間反応させた。培地を除去後、DMSO を 100 μ l/well 加えて MTT ホルマザンを溶解させて 540 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。

C. 研究結果

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。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 10 倍以上高かった。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。そこでウサギ抗血清をすべて集め、プロテイン A-Sepharose CL-4B カラム・クロマトグラフィーによって IgG 画分を精製し、1,4-NQ-KLH に対する抗体価のチェックを行った。しかしながら、本抗体画分の 1,4-NQ-KLH に対する抗体価は KLH に対する抗体価とほとんど変わらなかった (図 2A, C)。そこで、KLH を結合させたアフィゲル 15 を用いて KLH に対する抗体を除去した (図 2B)。最終的に得られた IgG 画分を用いて抗体価を測定したところ、KLH でなく 1,4-NQ-KLH

に高い力価を示したことから、抗血清がハプテンに対して高いアフィニティーを持つことが示唆された。

そこで得られた抗 1,4-NQ 抗体の抗原特異性について、抗 1,2-NQ 抗体と比較検討した。先行研究により作製済みの抗 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 3)。

次に、ヒト扁平上皮 A431 細胞に 1,4-NQ を曝露後に、回収したタンパク質を 2 次元電気泳動で分離し 1,4-NQ 抗体で 1,4-NQ の標的タンパク質を検出後 (図 4)、LC-MS にてそのタンパク質を同定した。その結果、合計 9 つのタンパク質を同定することに成功した (表 1)。中でも注目すべきは、3 種類が熱ショックタンパク質 (HSP90, HSC71, HSP70) だったことである。HSP90 や HSP70 は転写因子 heat shock factor-1 (HSF1) を負に制御していることが知られている。通常、HSF1 は不活性化モノマーとして細胞質に存在している。しかし、共有結合が生じるような化学物質の曝露により、HSP90 や HSP70 が修飾を受けると、HSF1 が 3 量体化して核に移行し、heat shock response element (HSRE) の転写活性化を介して、下流の遺伝子発現を誘導することが知られている。そこで次に、HSF-1 の活性化とその防御的役割を検討した。

まず、1,4-NQ の曝露による HSP90 と HSF1 の相互作用の変化について免疫沈降法で検討した。その結果、1,4-NQ の曝

露によって HSP90 と HSF1 の結合は減弱した (図 5)。加えて、1,4-NQ の曝露により HSF1 の曝露時間依存的な核移行が観察された (図 6)。最後に、HSF1 の発現を siRNA の導入によってノックダウンした条件において (図 7A)、1,4-NQ の細胞毒性は増強されたことから (図 7B)、HSP90-HSF1 系は 1,4-NQ に対する防御応答システムとして重要な役割を演じていることが考えられる。

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。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。

A431 細胞における 1,4-NQ の標的タンパク質を解析したところ、HSP70 や HSP90 といった熱ショックタンパク質を同定することに成功した。近年、細胞の親電子シグナル伝達系の 1 つとして HSP90-HSF1 系が報告されている。すなわち、HSP90 や HSP70 が親電子修飾を受けることが引き金となって普段は不活性型である転写因子 HSF1 が活性化され 3 量体化し核に移行した後、下流の熱ショックタンパク質群の転写活性化を亢進し、ストレス応答に働くというものである。実

際、1,4-NQ の曝露によって HSF1 と HSP90 の相互作用は低下し、HSF1 は核に移行した。また、HSF1 によりノックダウン 1,4-NQ の細胞毒性は増強した。したがって、1,4-NQ の細胞内侵入に対して、細胞は HSP90-HSF1 系を活性化させることによって 1,4-NQ のストレスに対して防御・応答していることが示唆された。

一方、我々は最近、1,2-NQ がセンサータンパク質である Keap1 への共有結合を介して転写因子 Nrf2 の活性化を引き起こすことを報告している。これと一致して、1,4-NQ の曝露によっても Nrf2 の活性化が観察されたが (データ未掲載)、本研究において Keap1 を 1,4-NQ 結合タンパク質として同定することはできなかった。この理由としては、HSP90 が細胞内において非常に豊富なタンパク質である一方、Keap1 の細胞内発現量が低いことが挙げられる。細胞内センサータンパク質の検出感度を改善するための更なる研究が必要ではあるが、本研究手法は様々な細胞において親電子シグナル伝達経路を調べることに於いてタンパク質の共有結合に伴う親電子シグナル伝達経路を調べる手法として有用であることが示された。

E. 結論

1) 本研究にて作製した抗 1,4-NQ 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。

2) ヒト扁平上皮由来 A431 細胞において、抗体を用いて 1,4-NQ の標的タンパク質を複数同定することに成功した。

3) 1,4-NQ に対する毒性防御の細胞応答システムとして、HSP90-HSF1 系が重要な役割を果たしている。

F. 研究発表

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. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

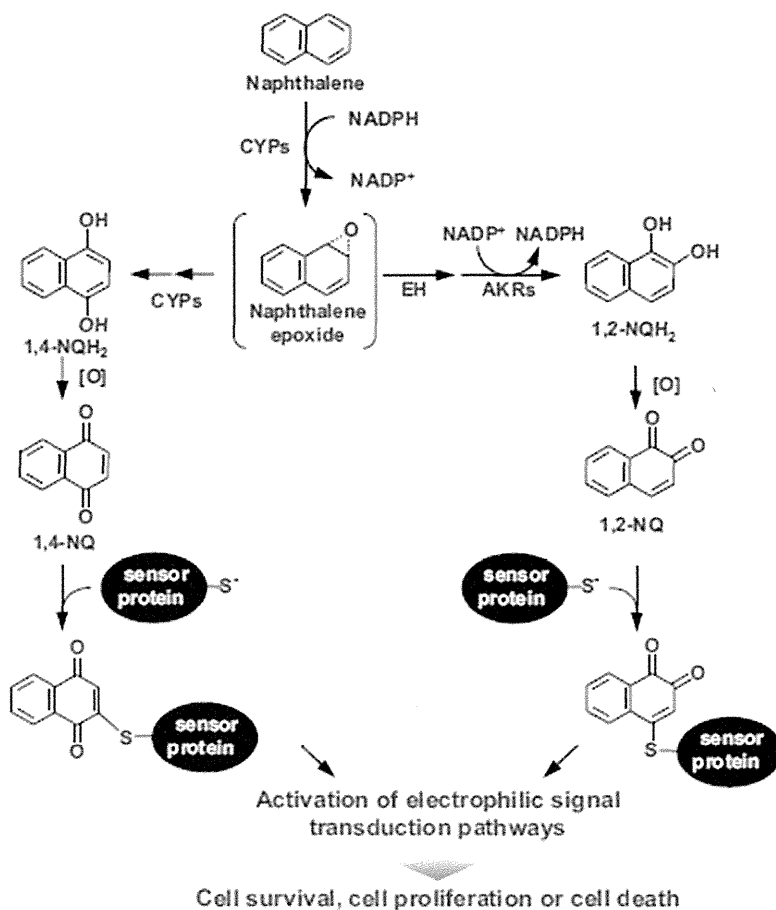
2. 実用新案登録

なし

表 1. Summary of 1,4-NQ modified proteins identified in A431 cells

No.	Accession	Description	kDa	pI	Coverage (%)
1		Unknown			
2		Unknown			
3	P08238	Heat shock protein HSP 90 beta	83.2	4.77	10.9
4	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	70.9	5.20	61.3
5	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A 1B	70.0	5.32	61.9
6	P12956	X ray repair cross complementing protein 6	69.8	6.20	32.5
7	Q5SU16	Beta 5 tubulin	49.6	4.59	37.6
8	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49.2	5.85	49.4
9	Q53SS8	Poly RC binding protein 1	37.5	6.71	31.5
10	P60709	Actin cytoplasmic 1	41.7	5.14	28.5
11	D0PNI1	Tyrosine 3 monooxygenase tryptophan 5 monooxygenase activation protein zeta polypeptide	27.7	4.53	51.4

Numbered proteins, which are shown in Fig. 4, were analyzed by LC-MS/MS following in-gel tryptic digestion. Protein identification was achieved using the ProteinLynx Global Server Browser version 2.3 software (Waters Co.). The accession number, theoretical molecular weight (kDa), and theoretical isoelectric point (pI) indicate the UniProtKB/Swiss-Prot entry. Coverage (%) shows the percentage of the protein sequence covered by identified peptides.



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