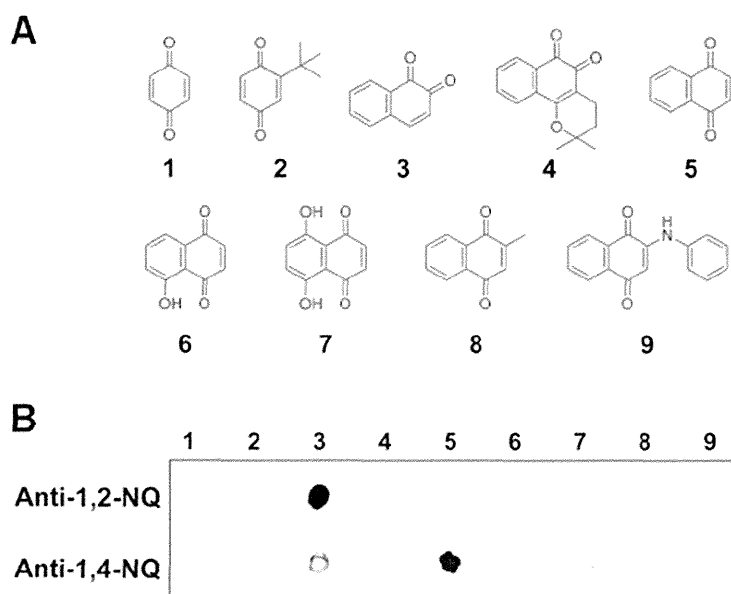


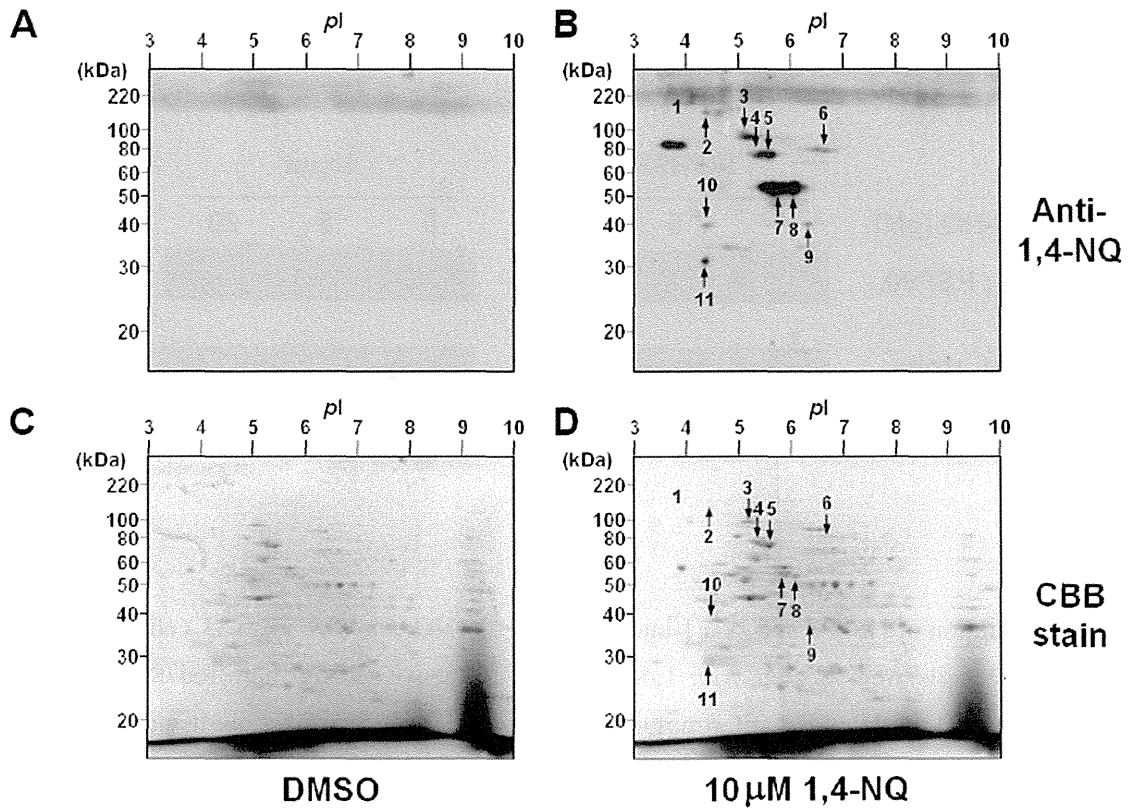
Figure 2 Titration curves of rabbit polyclonal antibodies against 1,4-NQ (C and D) following purification of anti-1,4-NQ by Protein A-Sepharose CL-4B and KLH-Affi-Gel 15 column chromatographies (A and B).

A. The antiserum (0.6 g) was loaded on a Protein A-Sepharose CL-4B column (6.6 cm × 1.2 cm i.d.) and washed with 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2)-1.5 M NaCl and then 0.1 M glycine-HCl (pH 3). Up to 5 ml per fraction of IgG fractions 30-37 were collected. The IgG fractions were neutralized immediately by 0.5 ml of 1 M Tris-HCl (pH 8). **B.** The IgG fraction (1 mg) was loaded on a KLH-Affi-Gel 15 column (4 cm × 0.7 cm i.d.) and circulated at 4°C for 12 hr. Then, the column was washed with TTBS (anti-1,4-NQ fraction, No. 1-3) and 0.1 M glycine-HCl (pH 3) (anti-KLH fraction, No. 13-14). Up to 1.5 ml per fraction were collected. **C.** The titer of the IgG fraction (5 mg/ml) was determined by measuring the binding of serial dilutions of IgG (1/100 to 1/25600) to plates coated with native KLH (●) or 1,4-NQ-KLH (■). **D.** The titer of the anti-1,4-NQ fraction (1 mg/ml) was determined by measuring the binding of serial dilutions of anti-1,4-NQ antibody (1/100 to 1/25600) to plates coated with native KLH (●) or 1,4-NQ-KLH (■).



☒ 3 Cross-reactivity of the polyclonal antibody against 1,4-NQ with aromatic hydrocarbon quinones.

A. Structures of aromatic hydrocarbon quinones: 1, 1,4-benzoquinone; 2, TBQ; 3, 1,2-NQ; 4, β -lapachone; 5, 1,4-NQ; 6, 5-hydroxy-1,4-NQ; 7, 5,8-dihydroxy-1,4-NQ; 8, 2-methyl-1,4-NQ; 9, 2-anilino-1,4-NQ. **B.** Dot blot analysis. The S9 (0.1 mg/ml) was incubated with each aromatic hydrocarbon quinone (10 μ M) for 30 min at 25°C in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5. Anti-1,2-NQ antibody was prepared as reported previously (Miura and Kumagai, 2010).



4 Two-dimensional SDS-PAGE of cellular proteins from A431 cells exposed to 1,4-NQ. A431 cells were exposed to DMSO (A and C) or 10 μM 1,4-NQ (B and D) for 1 hr. Cell lysates (60 μg) were subjected to isoelectric focusing on Immobiline DryStrip pH 3-10, and then separated by SDS-PAGE. These gels were immunoblotted with anti-1,4-NQ (upper) and stained with CBB stain (lower). Numbered arrows indicate proteins that were subjected to tryptic digestion followed by nanoUPLC-MS/MS analysis, as shown in Table 1.

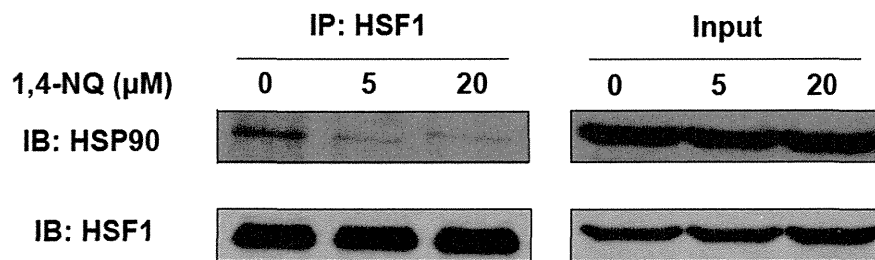
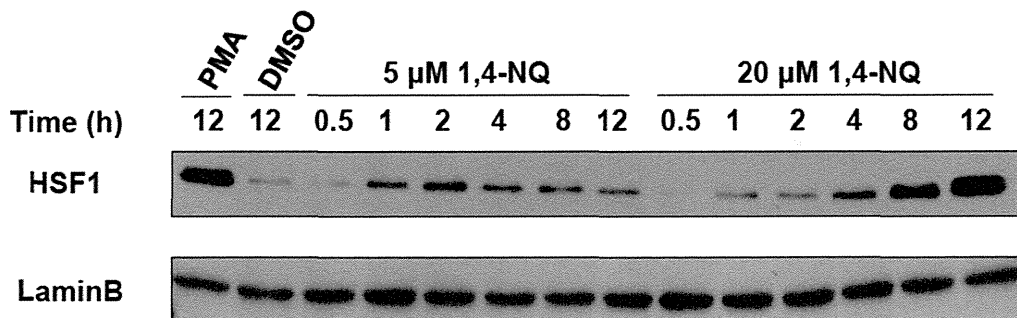
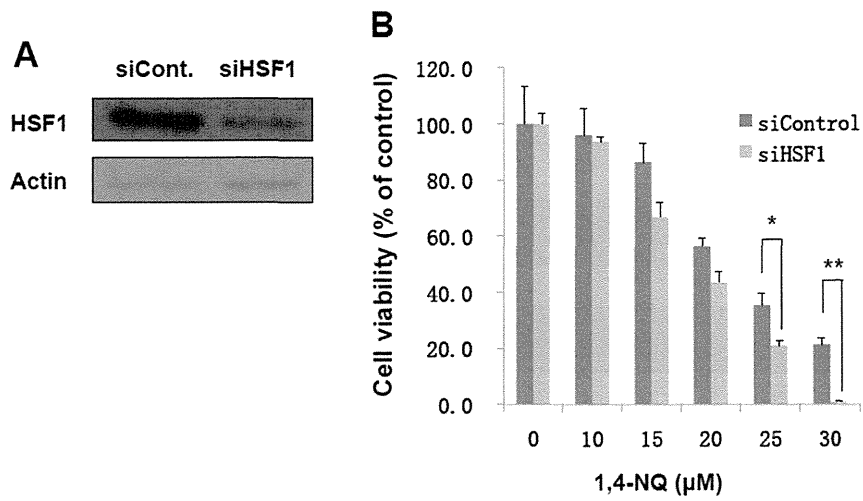


Fig 5 Disruption of HSP90 and HSF1 interaction by 1,4-NQ exposure in A431 cells. A431 cells were treated with 1,4-NQ for 1 h, then lysed by modified RIPA buffer with protease inhibitor cocktail. Immunoprecipitation was performed by using HSF1 specific antibody with Dynabeads.



☒ 6 Nuclear translocation of HSF1 induced by 1,4-NQ in A431 cells.
 A431 cells were treated with 1,4-NQ (5 μ M or 10 μ M) for the indicated times, the nuclear was extracted then analyzed by immunoblotting. PMA (1 μ M) was used as a positive control.



☒ 7 HSF1 knockdown increased 1,4-NQ toxicity in A431 cells.

A. A431 cells were transfected with control or HSF1 siRNA for 72 h. B. Control or HSF1 siRNA-transfected cells (72 h) were exposed to 1,4-NQ (10, 15, 20, 25, 30 μM) for 24 h, after that cell viability was measured by MTT assay.

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

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

研究要旨: 家庭用品から室内環境中へガス態及び付着態として放散される SVOC の定量的評価手法として Micro-Chamber/Thermal Extractor (μ -CTE) による放散試験法を確立し、カーペット 12 製品について SVOC 25 物質の放散速度を測定した。その結果、TXIB、Tributyl Phosphate、Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate 及び Bis(2-ethylhexyl) Phthalate の 4 化合物についてカーペットからの放散が認められ、これらの中で TXIB と Tributyl Phosphate は主にガス態として、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 μ -CTE による SVOC の放散試験法では、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 Fraction 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、並びに直接的な接触による経皮暴露の可能性が高い fraction を分別して推計することが可能である。今後は、それぞれの経路による暴露シナリオを精緻化することによって、 μ -CTE 放散試験の結果をもとに様々な家庭用品から放散される SVOC の多経路暴露スクリーニングが可能となることが期待される。

A. 研究目的

家庭用品から室内環境中へ放出される化学物質として、沸点が 50-100℃ ~240-260℃の揮発性有機化合物 (VOC) に加えて、可塑剤や難燃剤として使用されるフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類、ブロモジフェニルエーテル類など沸点 240-260℃~400℃の準揮発性有機化合物 (SVOC) に対する関心が高まっている。これらの SVOC はごく

僅かな部分がガス状あるいは粒子状として空気中に存在するものの、大部分はハウスダストに吸着した状態で存在しており、“Hand-to-Mouth” 行動などにより経口暴露されることが知られている。SVOC の暴露に関しては、このような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 SVOC

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。

SVOC 放散速度の定量的な評価方法として、建築材料については既にマイクロチャンバー法 (JIS A 1904:2008) が策定されている。この方法は、試験片から放散されて表面処理ガラス製マイクロチャンバー (内径 82 mm、容積 630 mL) の内壁に吸着した SVOC を 200-220℃で加熱脱着し、Tenax TA 等の吸着管に捕集して加熱脱離-GC/MS で定量するものである。一方、家庭用品から放散される SVOC については JIS A 1904:2008 法のように十分に検証された方法は現在のところ存在しないものの、我々は Micro-Chamber/Thermal Extractor (μ -CTE) と呼ばれる加熱脱着機能を備えた小型 4 連チャンバー装置により家庭用品から放散される SVOC を定量的に評価できることを既に明らかにしている。そこで、本研究では室内における使用頻度や面積・容積から判断して室内環境への負荷が大きいと考えられるカーペット製品を対象として μ -CTE による放散試験を実施した。カーペットからガス状で放散される SVOC とチャンバー内の蓋部分に付着した状態で存在する SVOC を分別して定量し、ガス状・粒子状成分の経気道暴露量及び付着成分の "Hand-to-Mouth" 行動による経口暴露量を推計した。

B. 実験方法

B-1 対象化合物

フタル酸エステル類 5 化合物 (Dibutyl Phthalate, Benzyl Butyl Phthalate, Bis(2-ethylhexyl) Phthalate, Di-*n*-octyl Phthalate, Dinonyl Phthalate)、リン酸トリエステル類 14 化合物 (Triethyl Phosphate, Tripropyl Phosphate, Tributyl Phosphate,

Tris(2-chloroethyl) Phosphate, Tris(1,3-dichloroisopropyl) Phosphate, Tri(butoxyethyl) Phosphate, Triphenyl Phosphate, Isodecyl Diphenyl Phosphate, Di-*n*-octyl Phenyl Phosphate, Tris(2-ethylhexyl) Phosphate, Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate, Cresyl Diphenyl Phosphate, Bis(4-methylphenyl) Phenyl Phosphate, Tricresyl Phosphate)、アジピン酸エステル類 3 化合物 (Dibutyl Adipate, Bis(2-ethylhexyl) Adipate, Dinonyl Adipate)、及びその他の可塑剤として 3 化合物 (TXIB, Bis(2-ethylhexyl) Terephthalate, Hexamol DINCH) の計 25 化合物を測定対象とした。各 SVOC の μ -CTE からの回収率を図 1 に示した。

B-2 μ -CTE による放散試験

直径 64 mm の円形に裁断した検体 (表 1) を μ -CTE250i の不活性処理ステンレス製チャンバーに入れ、室温で 4 時間、高純度 He ガスを一定圧力 (流速約 50 ml/min) で通気した。この間、通気開始 10 分後から 3 時間 50 分にわたってガス状の放散化合物を不活性処理ステンレス製吸着管 (Tenax TA/Carbograph 1TD/Carboxen 1000) で捕集した。

ついで、検体を除いて清浄なチャンバーに交換した後に、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℃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 SVOC を脱離させて吸着管に捕集した。

B-3 加熱脱離-GC/MS による SVOC の定量
吸着管に捕集した SVOC は、加熱脱離-GC/MS (Shimadzu TDTS-2010 及び GCMS-2010) で定量した。主要な測定条件を以下に記した。

[TDTS-2010]

DESORPTION: 300℃, 10 min, 50 mL He/min

COLD TRAP: -10°C
TRAP DESORPTION: 300°C, 10 min
LINE and VALV 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
MONITOR IONS:
Triethyl Phosphate 155 (99, 127)
Tripropyl Phosphate 183 (99, 141)
TXIB 71 (43, 56, 83)
Tributyl Phosphate 211 (99, 155)
Tris(2-chloroethyl) Phosphate
249 (63, 251)
Dibutyl Adipate 129 (111, 185)
Dibutyl Phthalate 149 (150, 223)
Tris(1,3-dichloroisopropyl) Phosphate
209 (99, 211, 381)
Benzyl Butyl Phthalate 149 (91, 206)
Tri(butoxyethyl) Phosphate
299 (125, 199)
Bis(2-ethylhexyl) Adipate 129 (57, 147)
Triphenyl Phosphate 326 (77, 325)
Isodecyl Diphenyl Phosphate
251 (94, 250)
Di-*n*-octyl Phenyl Phosphate
175 (94, 287)
Tris(2-ethylhexyl) Phosphate
211 (99, 113)
Bis(2-ethylhexyl) Phthalate
149 (167, 279)
Di-*n*-octyl Phthalate 149 (150, 279)
Bis(2-ethylhexyl) Terephthalate
261 (112, 279)
Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate
277 (125, 279)
Cresyl Diphenyl Phosphate
340 (77, 339)
Bis(4-methylphenyl) Phenyl Phosphate
354 (165, 353)
Dinonyl Adipate 255 (57, 129)
Tricresyl Phosphat 368 (107, 367)
DINCH 155 (127, 299)
Dinonyl Phthalate 293 (127, 149)
DBP-d4 153 (227)
BBP-d4 153 (210)
DEHP-d4 153 (283)

確認イオンを括弧内に示した。

SVOC 25 物質の GC/MS Chromatogram、並びに Dinonyl Adipate、DINCH 及び Dinonyl Phthalate の各 Cluster の Ion Chromatograms をそれぞれ図 2、図 3 に示した。

C. 結果と考察

測定対象とした 25 種類の SVOC の中で、1 µg/m²/h 以上の放散が認められる製品が存在したものは、Tributyl Phosphate (3 製品)、TXIB (4 製品)、Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate (3 製品)及び Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (4 製品) の 4 物質であった。図 4~7 にそれぞれの SVOC の放散速度を示した。TXIB は Wool 製 2 製品と Polyester 製 3 製品及び Rush 製 1 製品で 1.9~24 µg/m²/h の放散が認められ、Rush 製品で全体の 15%が付着態として検出された以外は何れの製品でも全てガス態として放散された。Tributyl Phosphate は Acryl 製 2 製品と Polypropylene 製 1 製品で 40~47 µg/m²/h の放散が認められ、何れの製品でも 18~33%が付着態として検出された。Bis(2-ethylhexyl) Phthalate は Wool 製 1 製品、Acryl 製 1 製品、Nylon 製 2 製品から 1.1~4.2µg/m²/h の放散が認められ、何れの製品からも全て付着態として放散された。Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate は Acryl 製 1 製品と Nylon 製 1 製品、Polypropylene 製 1 製品から 10~11 µg/m²/h の放散が認められ、Polypropylene 製では全てが付着態として放散されるのに対し、Acryl 製と Nylon 製ではそれぞれ 10%、23%がガス態で検出された。各製品からガス態として放散される SVOC の放散速度をもとに、試験を行ったカーペッ

ト製品を床面積 8 m²、容積 20 m³、換気回数 0.5 回/h の部屋の床に敷き詰めた場合を想定し、製品の使用に伴う室内空气中濃度の増加量 (気中濃度増分予測値) を推計した。その結果を表 2 に示した。Rush 製のカーペットを敷き詰めた場合、TXIB の空气中濃度は 16 µg/m³ に達することが予想される。TXIB は我々が 101 軒の家屋を対象に実施した室内空気全国実態調査においても約 40%の頻度で検出されており、カーペットが放散源の一つとなり得ることが明らかになった。また、Tributyl Phosphate についても、放散が認められた 3 製品による気中濃度増分予測値は 25 ~26 µg/m³ となり、TXIB の場合と同様にカーペットが室内での継続的な放散源となる可能性があることを示していると考えられる。

成人について、

成人の体重: 50 kg

成人の 1 日あたりの呼吸量: 20 m³/day

1 日あたりの滞在時間: 16 時間

また、子供について、

子供の体重: 15 kg

子供の 1 日あたりの呼吸量: 8 m³/day

1 日あたりの滞在時間: 16 時間

と仮定して TXIB の経気道暴露量を推計すると、成人では最大で 4.4 µg/kg/day、子供では最大で 5.9 µg/kg/day となる。同様に、Tributyl Phosphate では成人と子供の経気道暴露量は最大でそれぞれ 7.0 µg/kg/day、9.4 µg/kg/day と推計される。

一方、µ-CTE による放散試験において付着態で検出される SVOC は、実際の室内環境中ではカーペットの表面、あるいは表面に堆積したハウスダストに吸着して存在すること

が想定される。そこで、大部分が付着態として存在する Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate について、Polypropylene 製のカーペットで得られた 1 日あたりの室内環境への負荷量の最大値 268 µg/m²を用いて、以下の仮定のもとに Hand-to-Mouth 行動による経口暴露量の推計を行った。

幼児の体重: 10 kg

幼児の手の表面積: 10 cm²

Hand-to-Mouse 行動の頻度: 5 回/h

1 日あたりの滞在時間: 8 時間

カーペット表面から手への移行率: 100%

手へ体内 (口腔内) への移行率: 100%

その結果、幼児の Hand-to-Mouth 行動による Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate 経口暴露量の推計値として 1.1 µg/kg/day (268 µg/m² x 0.001 m² x 5 回/h x 8 h/day / 10 kg) が得られた。この値は Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate の ADI 4 µg/kg/day の 1/4 を占めることになるが、今後は、移行率の初期値の設定も含めて Hand-to-Mouth 行動による適切な暴露シナリオの構築が必要であると考えられる。

D. 結論

本研究では、家庭用品から室内環境中へガス態及び付着態として放散される SVOC の定量的評価手法として µ-CTE 法を確立し、カーペット 12 製品について SVOC 25 物質の放散速度を測定した。その結果、TXIB、Tributyl Phosphate、Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate 及び Bis(2-ethylhexyl) Phthalate の 4 化合物についてカーペットからの放散が認められ、これらの中で TXIB と Tributyl Phosphate は主にガス態として、

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 μ -CTE による SVOC の放散試験法では、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 Fraction 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、並びに直接的な接触による経皮暴露の可能性が高い fraction を分別して推計することが可能である。今後は、それぞれの経路による暴露シナリオを精緻化することによって、 μ -CTE 放散試験の結果をもとに様々な家庭用品から放散される SVOC の多経路暴露スクリーニングが可能となることが期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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

表 1 放散試験を行ったカーペットの製品情報

ID	素材	製品情報
1	ウール	品名：ウィルトンカーペット BE 中国製 ウール 100%
3	ウール	品名：ウールツイードラグ 日本製 ウール 100%、防炎・防ダニ
5	ポリエステル	品名：アラベスク ポリエステル 98% ナイロン 2%
6	ポリエステル	品名：消臭マシュマロラグ 日本製 ポリエステル 100% 裏：不織布貼り、消臭機能
7	アクリル	品名：ノーブルファー 日本製 アクリル系 100%、防炎・防ダニ
8	アクリル	品名：レルス アクリル 65% アクリル系 35% 裏：高発泡ウレタン樹脂コーティング、防炎・防ダニ・防音
2	ナイロン	品名：マッコードラバー パイル：BCF ナイロン 100% バックিং：クッションバック（発泡ウレタン）
10	ナイロン	品名：東リ7機能 ラグ 日本製 表：BCF ナイロン 100% 裏：ポリプロピレン・ジュート、防炎
11	ナイロン	品名：東リ6機能 ラグ 日本製 表：BCF ナイロン 100% 裏：ポリプロピレン・ジュート、防炎・防ダニ
14	ポリプロピレン	品名：サンメロディ MY-51 日本製 ポリプロピレン 100% 裏：発泡ポリウレタン、防炎・防音
15	ポリプロピレン	品名：サウンドプラン 日本製 ポリプロピレン 100% 防炎・防ダニ・床衝撃音低減商品
18	い草	品名：紋織りカラーい草上敷き 日本製 天然国産い草 100%

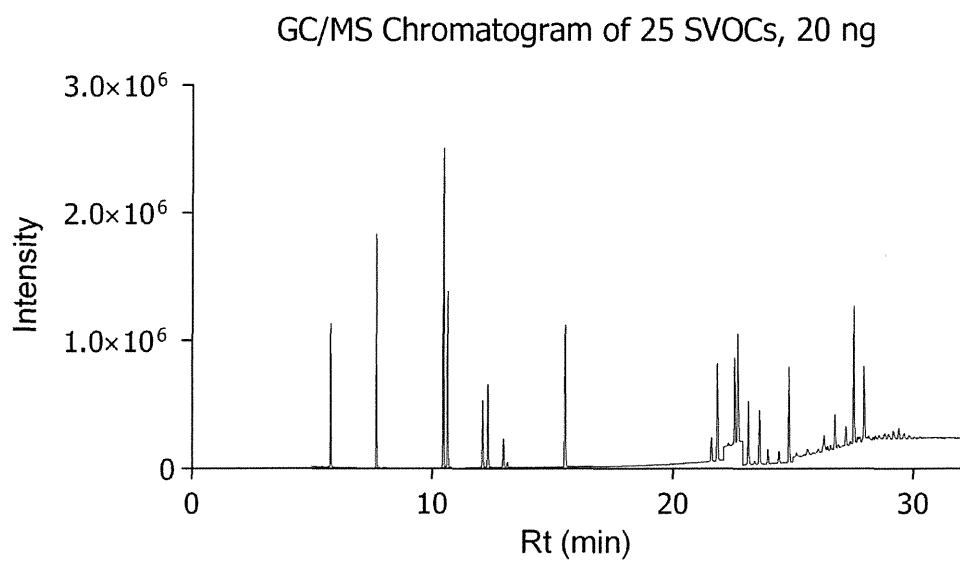


図2 SVOC 25 化合物の GC/MS SIM Chromatogram

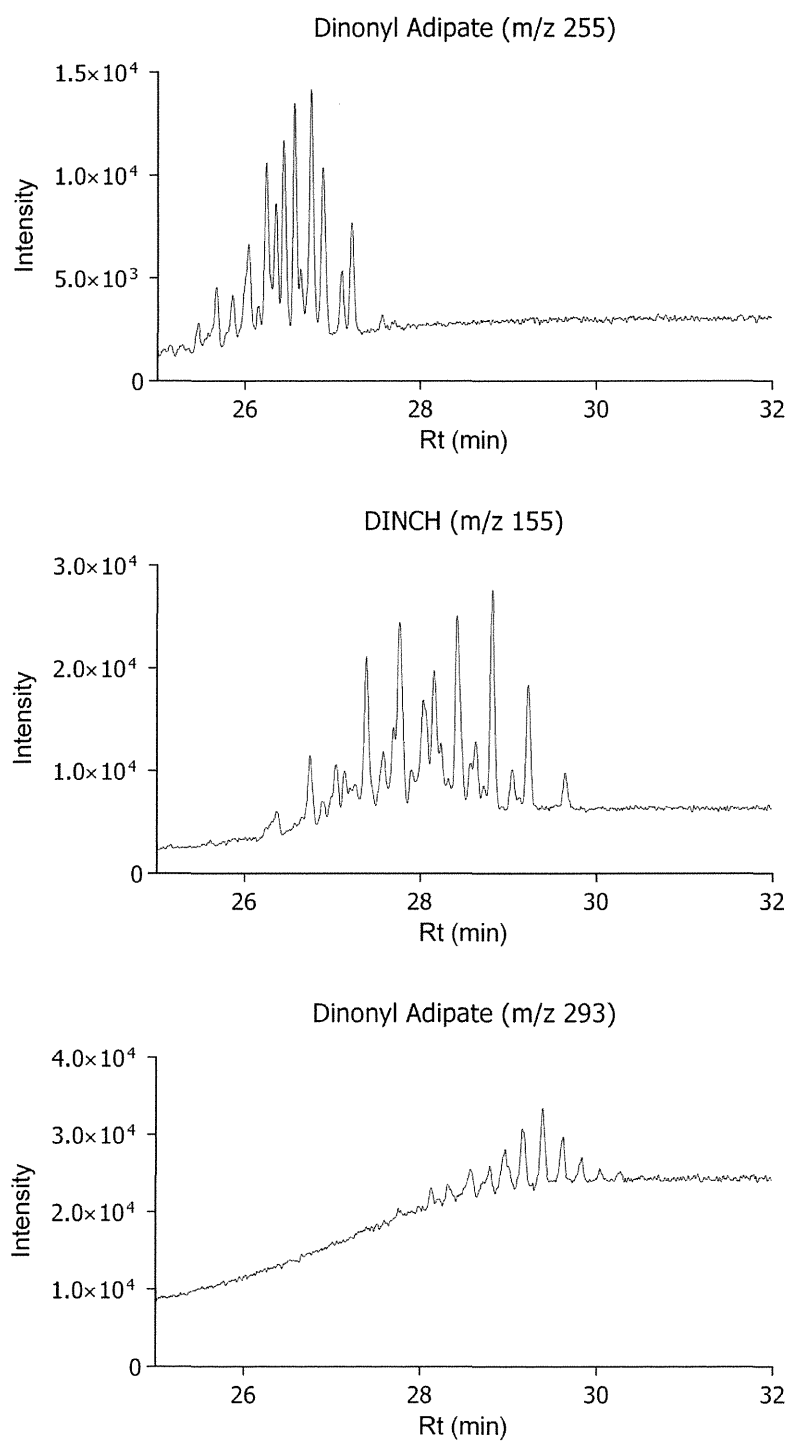


図 3 Dinonyl Adipate、DINCH 及び Dinonyl Phthalate Clusters の Ion Chromatogram

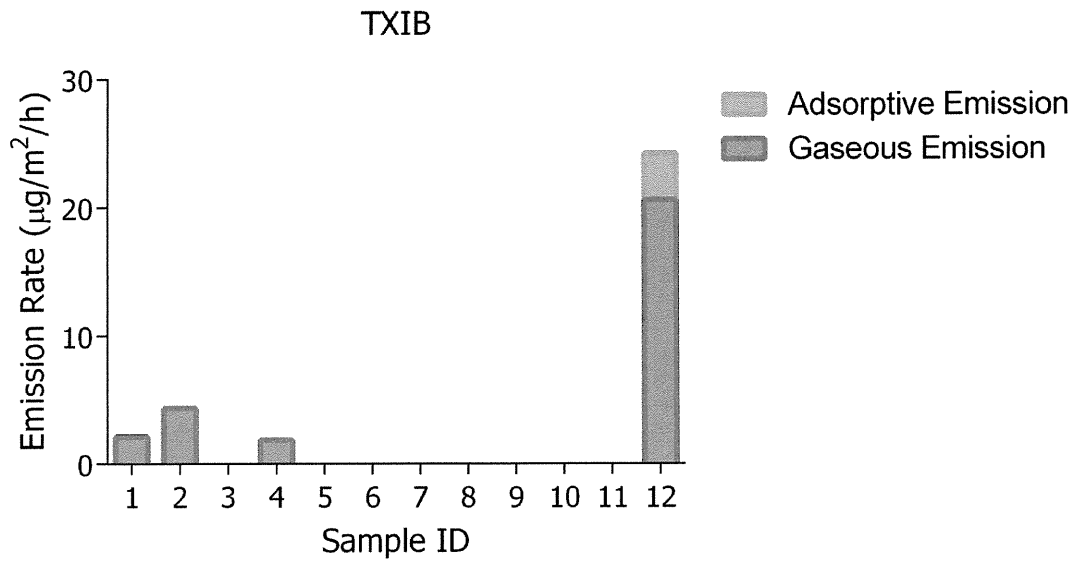


図4 カーペットからのTXIBの放散速度

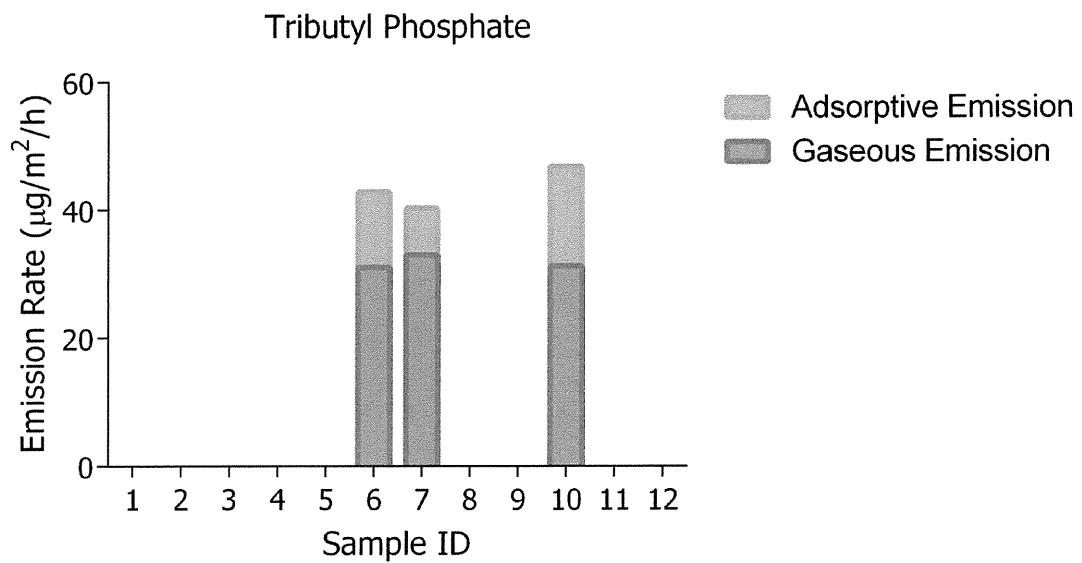


図5 カーペットからのTributyl Phosphateの放散速度

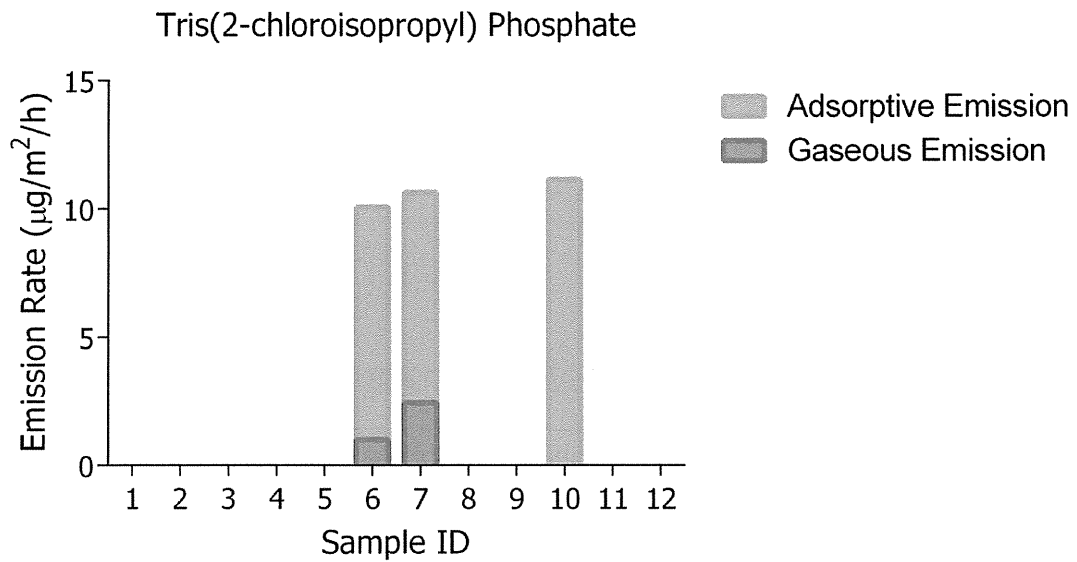


図6 カーペットからの Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate の放散速度

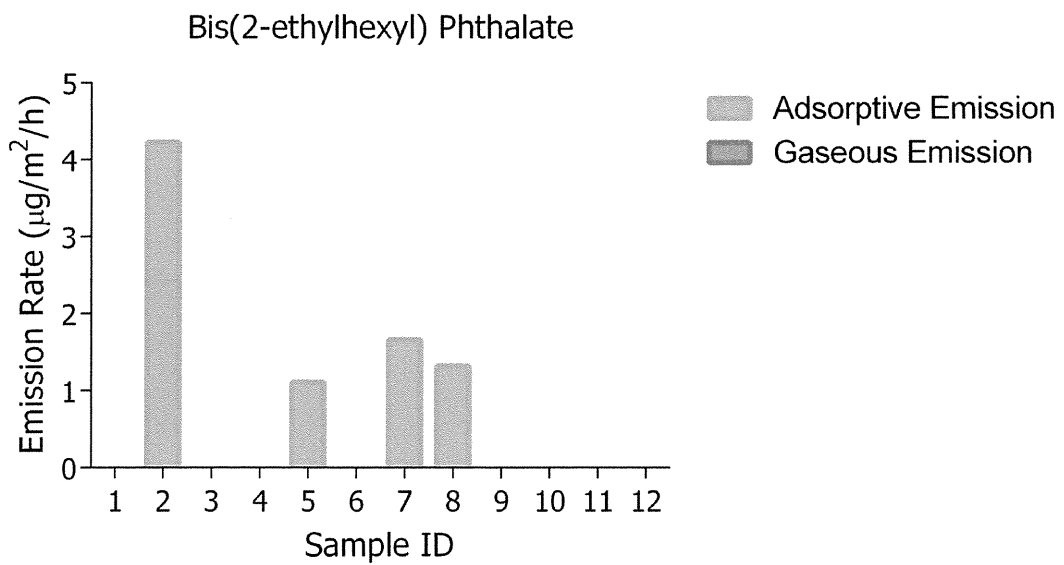


図7 カーペットからの Bis(2-ethylhexyl) Phthalate の放散速度

表2 カーペットから放散するSVOCの気中濃度増分予測値 (μg/m³)

ID	TXIB	Tributyl Phosphate	Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate
1	1.71	-	-
2	3.49	-	-
3	-	-	-
4	1.48	-	-
5	-	-	-
6	-	24.82	0.81
7	-	26.40	1.95
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	25.00	-
11	-	-	-
12	16.47	-	-

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Hirose, R., Miura, T., Sha, R., Shinkai, Y., Tanaka-Kagawa, T. and 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