

Fig. 44 Activation of hTRPV1 by isothiazolinone derivatives.

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 総合研究報告書

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：家庭用品からの放散が確認されているメタクリル酸エステル類及びアクリル酸エステル類の皮膚感作性を評価した。これらと類似構造を有しアルキル基の異なるフマル酸ジエステル、マレイン酸ジエステル、更に、代替可塑剤として使用されるようになったアジピン酸エステルについても試験した。感作性は、OECD ガイドラインに採用されている LLNA:DA 法を用いて評価した。また、ヒト単球由来 THP-1 細胞の表面抗原 CD54 及び CD86 の発現率の増加を指標とする h-CLAT 法で評価し、LLNA:DA 法との比較を行った。h-CLAT 法では試験したアクリル酸エステル類のうち 2-エチルヘキシルだけが陰性と判定されたが、LLNA:DA 法は全て陽性と判定した。一方、両法での感作性強度の順序に関しては違いが認められた。メタクリル酸エステル類については、いくつかの物質で両法の間での判定に違いが認められた。h-CLAT 法では細胞毒性に依存する試験濃度が感作性強度に関連した。試験したマレイン酸エステル及びフマル酸エステルはいずれも皮膚感作性を示し、アルキル基が長くなるにつれ感作性強度は弱くなった。同じアルキル基であればフマル酸エステルの方がマレイン酸エステルよりも感作性は強く、立体構造の違いが強度に影響することがわかった。LLNA:DA 法においてアジピン酸エステルは 50～100%の濃度で塗布しても SI 値が 3 を超えることはなかったが、アジピン酸ジエチル等は新陽性基準とされる 1.8 以上を示した。アジピン酸エステルは脂溶性が高く培地中では分離するため細胞毒性を示さず、h-CLAT 法で試験ができないものが多かった。皮膚感作性の観点からリスク管理の必要性を順位付けると、フマル酸エステルとマレイン酸エステルの優先順位が高く、以下アクリル酸エステル、メタクリル酸エステルの順であった。これらに比べてアジピン酸エステルの優先順位はかなり低いと思われた。

## 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おり、化学物質過敏症、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等の原因あるいは増悪因子としての関与が疑われている。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。最近の室内空気の実態調査では合成樹脂由来の化学物質が検出されるようになってきている。例えばアクリル酸エステルは塗料、接着剤、建材及び液晶ディスプレイなどの成形樹脂として用いられている。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。

揮発性物質については、吸入または皮膚接触による健康被害を考慮しなければならない。検出される化学物質にはシックハウス症候群やアレルギー性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。特に、家庭用品による健康被害防止のため化学物質の感作性評価は重要と考える。本研究では感作性を指標としたリスク管理を目標に、家庭内環境で検出される化学物質とその類似物質について検討した。

皮膚感作性に関してはマウスを用いるlocal lymph node assay (LLNA) がOECDガイドラインに採用されており、アイソトープを用いない改変法(LLNA:DA)もガイドラインに採用されている。更に、in vitro試験法の開発も行われており、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。本研究では、in vitro試験法のh-CLAT

法の可能性についても明らかにすることとし、各試験物質についてin vivo及びin vitro両方法で評価し結果を比較する。

## B. 研究方法

### 1. 試験物質

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。

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。陽性対照物質として、2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) 及び  $\alpha$ -hexyl cinnamaldehyde (HCA) を用いた。

## 2. LLNA:DA

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。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  $25 \mu\text{l}$  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  $20 \mu\text{l}$  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  $100 \mu\text{l}$  を ATP 抽出液  $100 \mu\text{l}$  と混合し、20 秒後発光試薬  $100 \mu\text{l}$  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。

## 3. h-CLAT

### 3-1. 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 (DMSO) に溶解した後、 $0.22 \mu\text{m}$  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。ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞は 10% FBS 含有 RPMI-1640 培地で培養した。24 穴プレートの各穴に THP-1 細胞浮遊液 ( $2 \times 10^6$  cells/ml)  $500 \mu\text{l}$  を入れ、種々の濃度の試験溶液  $500 \mu\text{l}$  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  $100 \mu\text{l}$  を 96 穴プレートに移し、WST-8 試液を  $10 \mu\text{l}$  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。

### 3-2. 本試験

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  $\mu$ 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、CD54 及び CD86 抗原の相対蛍光強度 (relative fluorescence intensity, RFI) を求めた。CD86 の RFI がコントロールの 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。

### 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類

アクリル酸エステル類は LLNA:DA 法でいずれも感作性物質と判定された。アクリル酸の感作性強度が最も強く、以下 2-ジメチルアミノエチル、2-ヒドロキシエチルであった。h-CLAT 法ではアクリル酸 2-ヒドロキシエチルが陰性となった以外は LLNA:DA の判定結果と一致した。h-CLAT において陽性基準を超える最低試験濃度が低いものほど感作性が強いとした。この基準での h-CLAT 法での感作性強度の順序は LLNA:DA 法での順序とほとんど一致しなかった。

LLNA:DA 法で SI 値が 3 を超え陽性と判定されたメタクリル酸ブチル、2-エチルヘキ

シル、2-ジメチルアミノエチル、2-ヒドロキシエチルエステルのうち、h-CLAT 法では 2-エチルヘキシルと 2-ジメチルアミノエチルのみ陽性であった。逆に h-CLAT 法ではメタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル及びメタクリル酸が陽性と判定された。感作性強度の順序についても LLNA:DA とは大きく異なった (表 1, 2, 3)。

#### 2. フマル酸ジエステル及びマレイン酸ジエステル

フマル酸ジメチルは 1% で SI 値 4.5 を示し濃度依存的に増加した。フマル酸ジエチル、ジブチルとも塗布濃度は高いものの SI 値は 3 を超え、感作性物質と判定した。マレイン酸ジエステル 3 種についても感作性を認めた。同塗布濃度での SI 値を比較したところ、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高い値を示した (図 1)。

#### 3. アジピン酸エステル

LLNA:DA 法において高濃度で塗布しても SI 値が 3 を超えることはなかった。アジピン酸ジエチル、ジブチル、ジイソブチル及びジイソノニルが塗布濃度 50 または 100% で SI 値 1.8 を超えたが、3 を超える SI 値を示すことはなかった (図 2)。アジピン酸エステルは培地と分離するような高濃度でも細胞毒性を示さず CV 値が得られないものがほとんどであった。アジピン酸ジエチル及びジメチルのみ h-CLAT 法で試験したが、陽性基準は超えなかった (図 3)。

### D. 考察

LLNA:DA 法の反応には試験物質の皮膚透過が重要であり、一定の脂溶性を持つ物質が有利である。例えばメタクリル酸エステルの場合、メチルやエチルエステルに比べてブチルエステルの方が強い反応を示すのもア

ルキル鎖の炭素数の増加に伴い脂溶性が高くなり皮膚浸透量が増加したためと思われる。しかし、更に炭素数が増加すると反応は低くなり、皮膚透過に適切な脂溶性があると思われる。また、ヒドロキシ基やアミノ基を有する物質はタンパク質と結合しやすく、感作性の強度と関係する。

アクリル酸エステル類はメタクリル酸エステル類よりメチル基分が少ない物質であるが、全体的にメタクリル酸エステル類より高い反応性を示した。Dearman らはアクリル酸エステルの感作性強度を、SI 値 3 を示す試験濃度で順序づけた。本研究では各物質とも 1 つの濃度で行い SI 値の大きさを強度で順序づけたが、結果は報告とほぼ一致した。

フマル酸ジメチルを原因とする皮膚障害は多数報告されている。本試験でも高い SI 値を示しアクリル酸エステル類よりも強い感作性を有することがわかった。マレイン酸ジエステルはその異性体であり、フマル酸ジエステル同様感作性を有するものの強度は若干弱かった。立体構造の違いが感作性にも影響することが明らかとなった。

フタル酸エステルの内分泌攪乱作用等の懸念から代替可塑剤としてアジピン酸エステル類が使用されている。これらは LLNA:DA 法において SI 値が 3 を超えることはなかったが、OECD ガイドラインでは陽性基準を 1.8 以上（1.8 から 2.5 は陰性の可能性もある）とされており、アジピン酸ジエチルなどいくつかはこれを超えた。しかしアジピン酸エステルについてアレルギーを起こしたという臨床例はなく、本基準での動物実験の評価が正しい感作性を示すのか、詳細な解析が必要である。

h-CLAT の試験濃度は試験物質の水溶性及び細胞毒性強度により決まり、この範囲内

で感作性強度に関連する値が求まる。RFI 値で強度を決める方法も考えられるが、実験ごとにかなり変動する。したがって、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と考えられる。事実、細胞毒性強度の順序と感作性強度の順序は類似していた。一方、*in vitro* 試験系では試験物質の水溶性が試験結果に影響する可能性がある。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、試験が困難となることが多い。一方、LLNA:DA では一定の脂溶性物質の方が反応は出る可能性が高いが、水溶性物質は塗布が困難で皮膚浸透性も悪い。こうした試験法による水溶性あるいは脂溶性物質の試験の得手不得手が、感作性の判定や濃度を基準とした感作性強度の評価の違いに関係するのかもしれない。h-CLAT 法を用いた感作性を指標とした化学物質の抽出と順序づけに関しては、本試験系が試験物質の物性が大きく影響することを良く理解してリスト化する必要がある。

## E. 結論

LLNA:DA 及び h-CLAT 法を用いて、メタクリル酸エステル類、アクリル酸エステル類、フマル酸ジエステル、マレイン酸ジエステル及びアジピン酸エステルの感作性の有無と強度を評価した。アクリル酸エステル類については LLNA:DA 法と h-CLAT 法でほぼ一致した判定が得られたが、感作性強度に関しては違いが認められた。メタクリル酸エステル類やアジピン酸エステルについては両法の間で判定に違いが認められた。h-CLAT 法を脂溶性物質に適用できない場合も多く、家庭用品に使用される物質のリスク評価に用いるには困難が多いと思われた。試験したマ

レイン酸エステル及びフマル酸エステルはいずれも皮膚感作性を示し、アルキル基が長くなるにつれ強度は弱くなった。同じアルキル基であればフマル酸エステルの方がマレイン酸エステルよりも感作性は強く、幾可異性体の違いで感作性強度は変化することがわかった。アジピン酸エステルについてはLLNA:DA の判定基準値の違いにより陽性となる物質があり、更に詳細な検討が必要であった。皮膚感作性を指標とするリスク管理の必要性は、フマル酸エステルとマレイン酸エステルの優先度が高く、以下アクリル酸エステル、メタクリル酸エステルの順であった。これらに比べてアジピン酸エステル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

表 1. メタクリル酸エステル類及びアクリル酸エステル類の LLNA:DA 法の結果

| Experiment 1                                |                  |                |
|---|------------------|----------------|
| Chemical                                    | Concentration(%) | ATP content SI |
| Acetone-olive oil (4:1) (AOO)               |                  | 1.0 ± 0.4      |
| α-Hexyl cinnamaldehyde (α-HCA)              | 25               | 5.0 ± 0.9      |
| Methyl methacrylate (MM)                    | 50               | 1.1 ± 0.3      |
| Ethyl methacrylate (ME)                     | 50               | 2.3 ± 0.7      |
| Butyl methacrylate (MB)                     | 50               | 4.6 ± 0.7      |
| 2-Ethylhexyl methacrylate (M2-EH)           | 50               | 3.0 ± 0.7      |
| Experiment 2                                |                  |                |
| Chemical                                    | Concentration(%) | ATP content SI |
| Acetone-olive oil (4:1) (AOO)               |                  | 1.0 ± 0.1      |
| α-Hexyl cinnamaldehyde (α-HCA)              | 25               | 7.7 ± 1.7      |
| 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate (M2-DE) | 50               | 7.7 ± 1.7      |
| 2-Hydroxyethyl methacrylate (M2-HE)         | 50               | 3.2 ± 1.0      |
| Methacrylic acid (MA)                       | 50               | 1.9 ± 0.4      |
| Experiment 3                                |                  |                |
| Chemical                                    | Concentration(%) | ATP content SI |
| Acetone-olive oil (4:1) (AOO)               |                  | 1.0 ± 0.3      |
| α-Hexyl cinnamaldehyde (α-HCA)              | 25               | 4.9 ± 1.2      |
| Methyl acrylate (AM)                        | 50               | 2.9 ± 0.4      |
| Ethyl acrylate (AE)                         | 50               | 3.7 ± 0.3      |
| Butyl acrylate (AB)                         | 50               | 4.8 ± 1.5      |
| 2-Ethylhexyl acrylate (A2-EH)               | 50               | 4.2 ± 0.9      |
| Acrylic acid (AA)                           | 50               | 1.9 ± 0.6      |
| Experiment 4                                |                  |                |
| Chemical                                    | Concentration(%) | ATP content SI |
| Acetone-olive oil (4:1) (AOO)               |                  | 1.0 ± 0.4      |
| α-Hexyl cinnamaldehyde (α-HCA)              | 25               | 4.3 ± 1.2      |
| 2-Hydroxyethyl acrylate (A2-HE)             | 10               | 4.9 ± 0.6      |
| Acrylic acid (AA)                           | 5                | 4.5 ± 1.2      |
| Dimethyl fumarate (FD)                      | 5                | 7.7 ± 1.9      |
| Experiment 5                                |                  |                |
| Chemical                                    | Concentration(%) | ATP content SI |
| Acetone-olive oil (4:1) (AOO)               |                  | 1.0 ± 0.4      |
| α-Hexyl cinnamaldehyde (α-HCA)              | 25               | 5.4 ± 1.2      |
| 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)             | 0.1              | 4.4 ± 0.9      |
| 2-(Dimethylamino)ethyl acrylate (A2DE)      | 10               | 11.1 ± 1.7     |
| Methyl acrylate (AM)                        | 50               | 4.1 ± 1.2      |
| Acrylonitrile                               | 5                | 2.1 ± 0.4      |
| Methacrylic acid (MA)                       | 5                | 1.5 ± 0.4      |
| Ethyl methacrylate (ME)                     | 50               | 2.2 ± 0.3      |



表 2. メタクリル酸エステル類及びアクリル酸エステル類の h-CLAT 法の結果

(a) アクリル酸エステル類

| Chemical                        | Abbreviation | Sensitivity evaluation |
|---------------------------------|--------------|------------------------|
| Methyl acrylate                 | MA           | +                      |
| Ethyl acrylate                  | EA           | +                      |
| Butyl acrylate                  | BA           | +                      |
| 2-Ethylhexyl acrylate           | 2EHA         | -                      |
| Acrylic acid                    | AA           | +                      |
| 2-Hydroxyethyl acrylate         | 2HEA         | +                      |
| 2-(Dimethylamino)ethyl acrylate | 2DMEA        | +                      |

(b) メタクリル酸エステル類

| Chemical                            | Abbreviation | Sensitivity evaluation |
|-------------------------------------|--------------|------------------------|
| Methyl methacrylate                 | MM           | +                      |
| Ethyl methacrylate                  | EM           | +                      |
| Butyl methacrylate                  | BM           | +                      |
| 2-Ethylhexyl methacrylate           | 2EHM         | -                      |
| Methacrylic acid                    | MAA          | +                      |
| 2-Hydroxyethyl methacrylate         | 2HEM         | +                      |
| 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate | 2DMEM        | +                      |

表 3. LLNA:DA 法と h-CLAT 法の評価結果の比較

(a) アクリル酸エステル類

| Chemical | LLNA:DA     |      | h-CLAT      |      | Cytotoxicity<br>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                    |

(b) メタクリル酸エステル類

| Chemical | LLNA:DA     |      | h-CLAT      |      | Cytotoxicity<br>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                    |

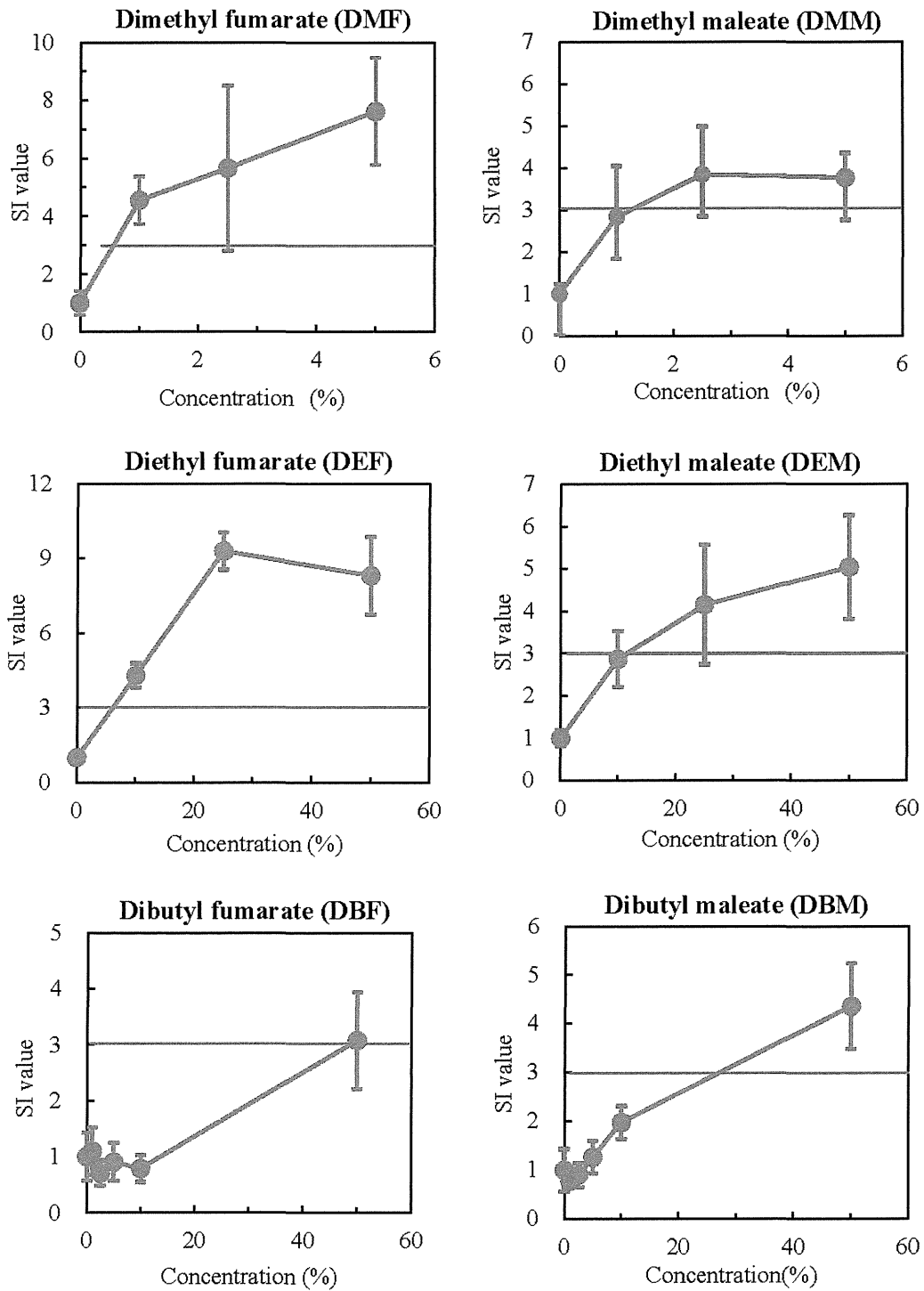
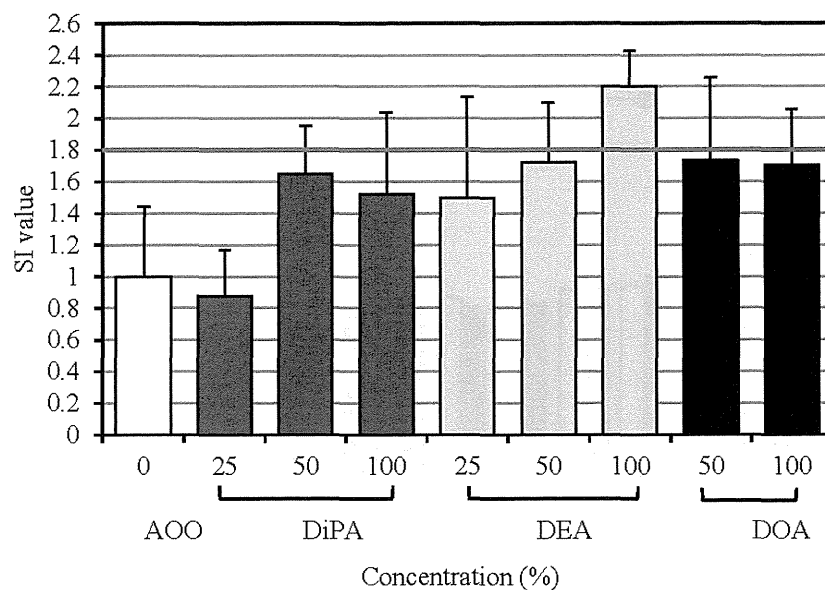


図1. フマル酸エステル及びマレイン酸エステルの LLNA:DA 法による結果

(a) Experiment 1



(b) Experiment 2

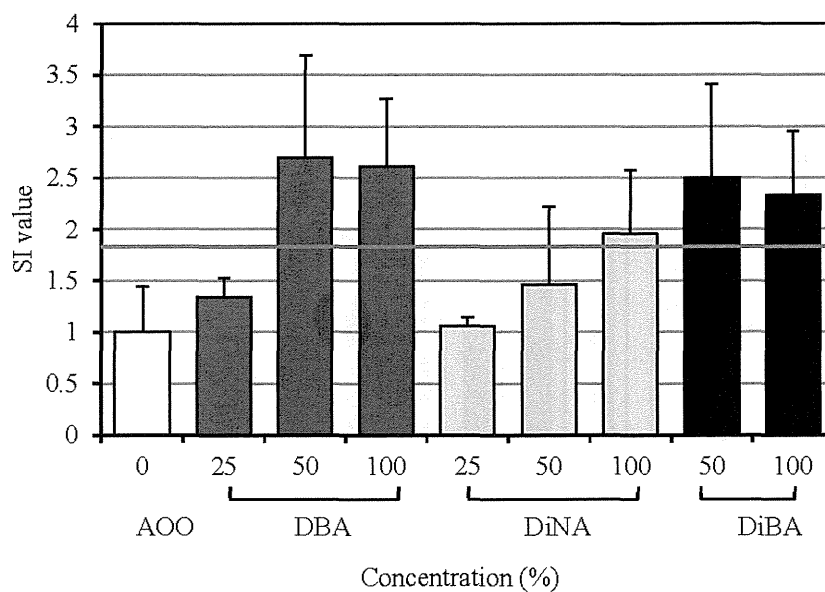
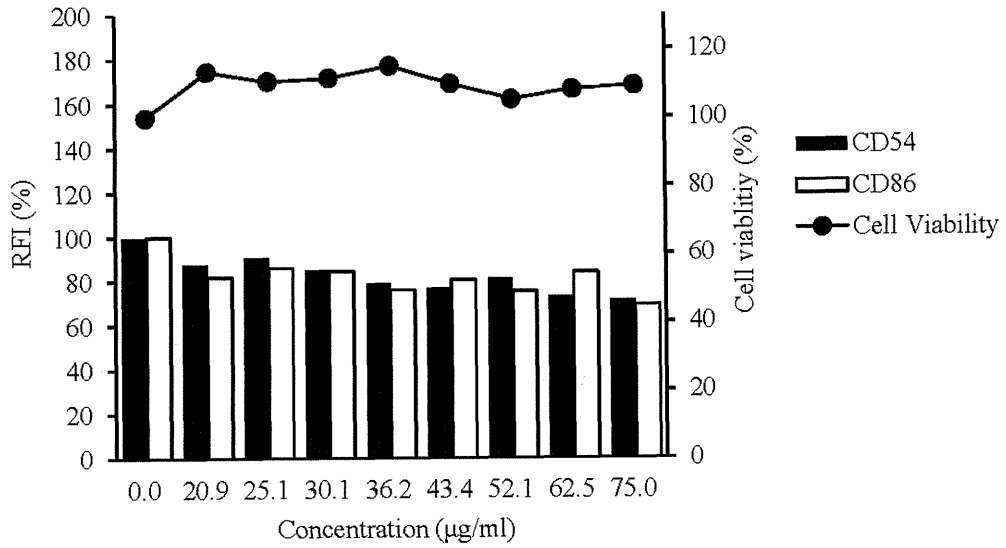


図 2. アジピン酸エステルの LLNA:DA 法による結果

(a) DEA



(b) DMA

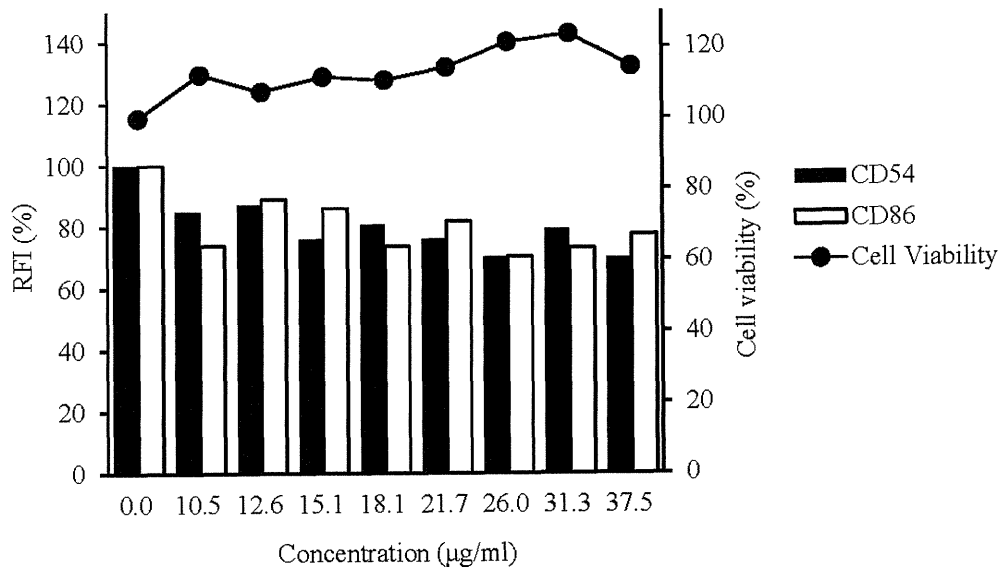


図3. アジピン酸エステル of h-CLAT の結果

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 総合研究報告書

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受性を指標とする  
リスク評価

大気中揮発性成分 1,2-ナフトキノンおよび 1,4-ナフトキノンに対する  
細胞の防御応答システムに関する研究

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として、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）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、これらの親電子物質を特異的に認識する抗体を用いて 1,2-NQ や 1,4-NQ が結合する細胞内タンパク質を解析し、更に、これらの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細胞の親電子シグナル伝達経路とその防御的役割を明らかにすることを目的とした。その結果、これらの親電子物質に対する毒性防御の細胞応答システムとして、1,2-NQ においては Keap1-Nrf2 系が、1,4-NQ においては HSP90-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、工場や自動車などから排出される揮発性ガス状成分や浮遊粒子状物質は、ヒトの健康に悪影響を与えることが懸念されている。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/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ている。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。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サンプル中に 1,2-ナフトキノンや 1,4-ナフトキノン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、1,2-NQ や 1,4-NQ が細胞内でどのようなタンパク質に共有結合し、細胞がどのような親電子シグナル伝達経路を活性化させて応答・防御しているのかを、それぞれを特異的に認識する抗体を用いて解析することを目的とした。

## B. 研究方法

### 抗体の調製

1,2-NQ-KLH 結合体および 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  $\mu\text{g}$  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

の後、Protein A-Sepharose CL-4B カラムを用いて抗体の精製を行った。

### 培養細胞

マウス初代肝細胞の単離は、コラゲナーゼを用いた 2 段階灌流法にて肝細胞を単離した。また、肝非実質細胞を除去するために Percoll 緩衝液を用いて遠心分離を行った。最終的に得られた肝実質細胞をコラーゲンコート (タイプ 1) されたディッシュもしくはプレートに  $8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、Willam's medium E (10%FBS、2 mM L-アラニル-L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシン含有) にて培養した。

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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。化学物質の曝露は、全て FBS を含まない培地を用いた。

### MALDI-TOF/MS

20 mM Tris-HCl (pH8.5) 緩衝液中において、マウスの野生型 Keap1 (10  $\mu\text{g}$ ) を 1,2-NQ と 25°C で 30 分間反応させた。Econo-Pac 10 DG カラムにて未反応の 1,2-NQ を除去した後、Keap1 をトリプシンで消化した。ペプチドフラグメントに

dithiothreitol と trifluoroacetic acid を加えた後、更に 50%アセトニトリルと 0.1% trifluoroacetic acid に溶解させた  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (2.5 mg/mL) を混ぜて室温で乾燥させた。分析は窒素レーザーを備えた Shimadzu AXIMA-TOF<sup>2</sup> mass spectrometer を用いて行った。

#### 細胞内オキシダントの測定

H<sub>2</sub>DCFDA 法を用いた。すなわち、肝細胞に H<sub>2</sub>DCFDA (20  $\mu$ M) を 37°C で 1 時間前処理し、1,2-NQ (10  $\mu$ M) を 37°C で 20 分間曝露した後、その蛍光度を蛍光顕微鏡 DMIRE-2 にて測定した。

#### 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  $\mu$ 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。

#### 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。

#### タンパク質の検出・同定

SDS-PAGE は Leammli らの方法に従い、イムノブロット法は Kyhse-Andersen らの方法に準じて行なった。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。

#### 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。

### C. 研究結果

#### I. 1,2-NQ に関する検討

1,2-NQ に対する Keap1-Nrf2 システムを介した細胞応答について検討した。はじめに、マウスの初代肝細胞において、ビオチンマレイミド沈降法で細胞内への Keap1 に対する 1,2-NQ の結合を検討したところ、25  $\mu$ M の 1,2-NQ を 1 時間曝露した条件において Keap1 の化学修飾が検出された (図 2A)。また、リコンビナントのマウス Keap1 に対する 1,2-NQ の結合を 1,2-NQ の抗体で検出したところ、濃度依存的な共有結合の増加が観察された (図 2B)。

Keap1 タンパク質には反応性の高いシステイン残基が多く含まれているが、1,2-NQ が Keap1 のどの部位を修飾するかは不明である。そこで、MALDI-TOF/MS 方法にて 1,2-NQ を用いて Keap1 の修飾部位の同定を行った。その結果、1,2-NQ は



リコンビナントマウス Keap1 の Cys151, Cys257, Cys273, Cys288 および Cys489 に共有結合することが示唆された (図 3, 表 1)。

Keap1 の化学修飾により転写因子 Nrf2 が活性化されることが報告されている。マウス初代肝細胞に 1,2-NQ を曝露すると、Nrf2 の活性化が生じた (図 4)。同条件下において、細胞内オキシダントの生成が観察された。しかし、PEG-CAT の前処理によって細胞内過酸化水素を消去しても 1,2-NQ による Nrf2 の活性化は抑制されなかった。このことから、1,2-NQ による Nrf2 の活性化は、活性酸素種 (ROS) の産生というよりむしろ、Keap1 への共有結合に起因することが示唆された。また Nrf2 の活性化に伴って、下流タンパク質である、GCLC、GCLM、GSTA1、GSTA4、GSTM1、UGT1A、NQO1 の発現上昇が見られた (図 5)。

次に、遺伝子改変マウスより単離した培養細胞を用いて、1,2-NQ の毒性防御機構における Keap1-Nrf2 系の役割について検討した。まず、肝臓特異的 Keap1 欠損マウスおよび Nrf2 欠損マウスより単離した初代肝細胞における異物解毒酵素群の発現量についてウエスタンブロット法で比較・検討した。その結果、GCLC、GCLM、GSTA1、GSTA4、GSTM1、UGT1A、NQO1、MRP1 および MRP2 の発現量は、野生型と比較して Nrf2 の欠損により低下し、Keap1 の欠損により増加していた (図 6)。これらの細胞に 1,2-NQ を曝露してその細胞内タンパク質への共有結合の度合いをウエスタンブロット法で比較したところ、野生型と比較して、Nrf2 の欠損によって

1,2-NQ の共有結合量は顕著に増加した。一方、Keap1 の欠損によってタンパク質への 1,2-NQ の共有結合量は顕著に低下した (図 7A)。更にこれらの細胞を用いて、1,2-NQ の毒性を MTT 法で比較した。その結果、Nrf2 の欠損によって 1,2-NQ の毒性は顕著に増加した。一方、Keap1 の欠損によってタンパク質への 1,2-NQ の共有結合量は顕著に低下した (図 7B)。これらのことから、1,2-NQ に対する毒性防御の細胞応答系として、Nrf2-Keap1 システムが重要な役割を果たしていることが示唆された。

最後に、各種阻害剤を用いて 1,2-NQ の毒性防御に関わる酵素群について調べた。その結果、グルタチオン (GSH) 合成の律速酵素であるグルタミルシステインリガーゼの阻害剤である BSO や NQO1 の阻害剤である Dicumarol の前処理によって 1,2-NQ の細胞毒性は殆ど変化しなかったが、UGT の阻害剤である Diclofenac や、MRP の阻害剤である MK-571 の前処理によって 1,2-NQ の細胞毒性は有意に増強した (図 8)。これらのことから、Nrf2 下流の酵素群のうち、グルクロン酸転移酵素やその抱合体の排泄に関わる MRP トランスポーターの働きが重要であることが示唆された (図 9)。

## II. 1,4-NQ に関する検討

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 10A, 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 10B)。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 (図 10D)、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 11)。

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 12)、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 2)。その中でも

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 13)。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 14)。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 15A)、1,4-NQ の細胞毒性は増強されたことから (図 15B)、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

### I. 1,2-NQ に関する検討

本研究により、1,2-NQ は他の親電子物質と同じく Keap1 の反応性の高いチオール基と共有結合を形成することが明らかとなった。このような修飾はマウス初代

肝細胞においても観察された。更に、初代肝細胞に 1,2-NQ を曝露すると転写因子 Nrf2 が活性化されその下流の遺伝子産物の発現が誘導された。また、Nrf2 は 1,2-NQ の細胞内タンパク質への共有結合の減少および 1,2-NQ の毒性軽減に働く因子であることも示された。

1,2-NQ はリコンビナントマウス Keap1 の Cys151, Cys257, Cys273, Cys288 および Cys489 に共有結合することが明らかとなった。Keap1 の Cys151, Cys257, Cys273 は特に反応性の高いシステイン残基であることが知られているが、Cys288 や Cys489 に関しても種々の親電子物質によって共有結合を受けて Nrf2 の活性化に繋がることが示されている。一方、初代肝細胞において、PEG-CAT の前処理により 1,2-NQ による Nrf2 の活性化は抑制されなかった。このことから 1,2-NQ のレドックスサイクルで生じた ROS に起因する過酸化水素の産生は Nrf2 の活性化の主要な因子ではないことが示唆された。

図 15 に 1,2-NQ の生体内変換反応とそれに関連する細胞毒性についてまとめた。我々は以前、A431 細胞において 1,2-NQ が PTP1B を Cys121 への共有結合を介して不活性化し、EGFR を活性化させることを報告している。1,2-NQ による細胞内タンパク質への共有結合は、親電子シグナルだけでなくタンパク質の機能かく乱や毒性の発現に繋がることが予想される。実際、初代肝細胞において 1,2-NQ の細胞内タンパク質への共有結合はその毒性発現と相関性が見られた（データ未掲載）。このことは、1,2-NQ の細胞内タンパク質への共有結合の減少はその毒性の軽減に

繋がることを示唆している。これと一致して、Nrf2 が常に活性化している Keap1 欠損の初代肝細胞においては野生型と比較して 1,2-NQ の細胞内タンパク質への共有結合が減少し、その毒性が低下した。

キノン化合物は、チトクロム P450 還元酵素によって一電子還元反応を受けてセミキノンラジカルへと変換され、それが分子状酸素と反応して活性酸素を産生する。この活性酸素は不均化反応により、過酸化水素と酸素を産生する。また、過酸化水素は銅や鉄といった遷移金属の存在下でヒドロキシルラジカルに変換される。キノン化合物による細胞内での酸化ストレスの惹起は、少なくとも ROS の産生が一部関与している。オルトキノンの 2 電子還元反応によるヒドロキノンへの変換は必ずしも解毒反応ではない事が示唆される。なぜなら、キノンとヒドロキノンの不均化反応によりセミキノンラジカルが生じ、ROS を産生してしまうからである。この考えに一致して、Dicumarol 前処理によって NQO1 活性を低下させた条件下でも 1,2-NQ の毒性に変化は見られなかった。1,2-NQ の GSH による抱合反応は、細胞内での当該親電子物質の量を減少させる重要な経路であるが、BSO によって GSH の産生を低下させても 1,2-NQ の細胞毒性には変化がなかった。キノン化合物の GSH 抱合は一般的に解毒経路ではあるが、GSH 抱合体となったキノン化合物はレドックスサイクルによる ROS 産生能を有している。まとめると、1,2-NQ の GSH 抱合よりもむしろ、1,2-NQH<sub>2</sub> の産生を介したグルクロン酸抱合が初代肝細胞においては最終的な解毒経路であるこ

とが示唆された。実際、UGT の阻害剤である Diclofenac や MRP の阻害剤である MK571 の前処理によって 1,2-NQ の毒性は増強された。

## II. 1,4-NQ に関する検討

本研究で作成したウサギ抗 1,4-NQ 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 1,2-NQ 抗体は、非常に特異性の高い抗体である。一方、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) 1,2-NQ に対する毒性防御の細胞応答システムとして、Keap1-Nrf2 系が重要な役割を果たしている。

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。