

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Miura T, Kumagai Y. 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, 2010

2) Miura T, Shinkai Y, Jiang HY, Iwamoto N, Sumi D, Taguchi K, Yamamoto M, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Cho AK, Kumagai Y. Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chem. Res. Toxicol.*, 24, 1836-1844, 2011

3) 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

4) 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

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

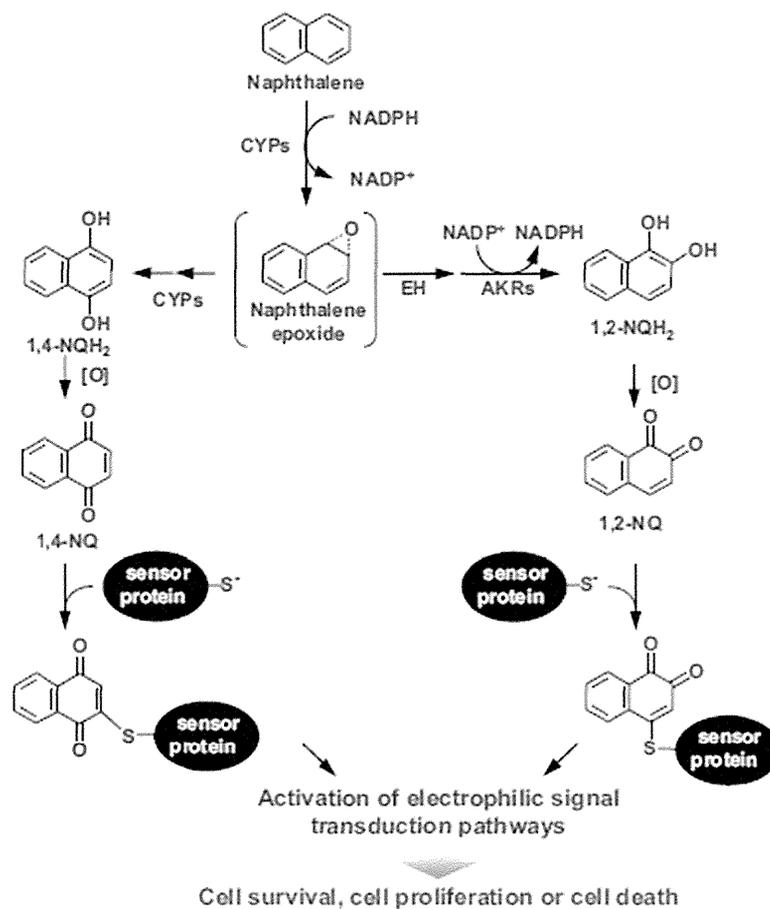
G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし



☒ 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.

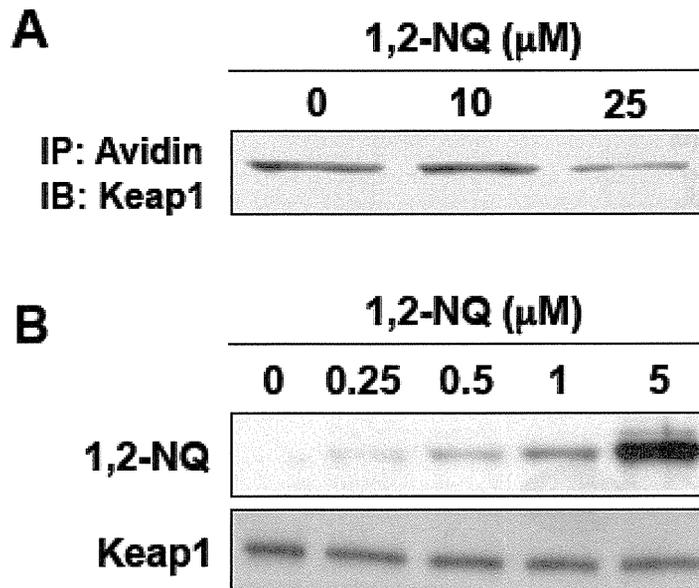


图 2 化学修饰小鼠 Keap1 由 1,2-NQ

(A) 共价附着 1,2-NQ 到细胞 Keap1。小鼠肝细胞暴露于 1,2-NQ (10 或 25 μM) 1 h，并分析细胞裂解液使用 BPM-标记 assay。(B) 浓度依赖性共价附着 1,2-NQ 到重组小鼠 Keap1。重组小鼠 Keap1 (0.5 μg) 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 在 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) 中孵育与 1,2-NQ (0.25–5 μM)。反应混合物然后分析用指示抗体。

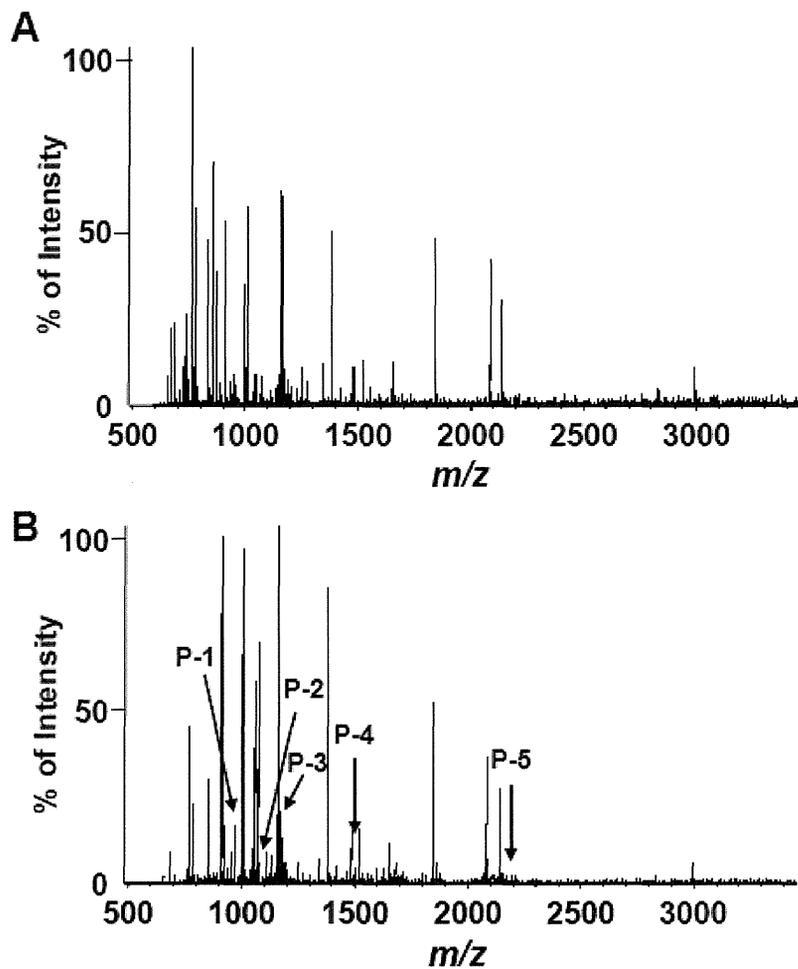


图 3 MALDI-TOF/MS analysis of 1,2-NQ-modified cysteine residues in mouse Keap1
 Recombinant mouse Keap1 (10 μ g) was incubated at 25°C for 30 min in the absence (A) or presence (B) of 1,2-NQ (10 μ M) in a total volume of 20 μ L of 20 mM Tris-HCl (pH 8.5). After reaction, the Keap1 proteins were digested with trypsin and analyzed using MALDI-TOF/MS. Compared with the calculated mass of the unmodified peptides, modified peptides P-1 to P-5, showed an increased mass of 156 Da, corresponding to the addition of a single equivalent of 1,2-NQ.

表 1 Target Sites of 1,2-NQ Modification in Mouse Keap1

Peak	Position	Peptide sequence	Calculated MS	Observed MS
P-1	273–279	CHALTPR+1,2-NQ	953.4	953.5
P-2	255–261	YDCPQRR+1,2-NQ	1093.4	1093.7
P-3	288–296	CEILQADAR+1,2-NQ	1174.5	1174.6
P-4	484–494	LNSAECYYPER+1,2-NQ	1500.6	1500.7
P-5	151–169	CVLHVMNGAVMYQIDSVVR+1,2-NQ	2290.1	2290.3

Amino acid sequences of the tryptic peptides containing 1,2-NQ-modified mouse Keap1. Position corresponds to amino acid sequences of wild-type mouse Keap1. Peak no. corresponds to the number of the peak in Figure 2 (arrows). Mouse Keap1 (0.5 mg/mL) was incubated with 10 μ M 1,2-NQ at 25°C for 30 min in 20 mM Tris-HCl (pH 8.5).

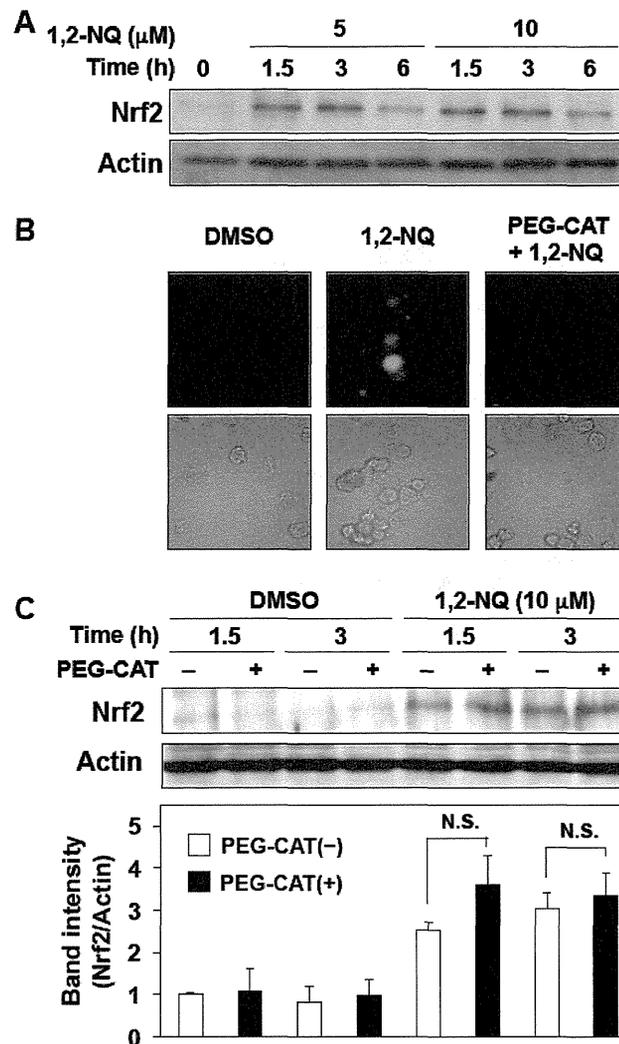


图 4 氢过氧化物的参与在 1,2-NQ 暴露期间小鼠肝细胞 Nrf2 激活中的作用

(A) 1,2-NQ 诱导 Nrf2 的积累。小鼠肝细胞被 1,2-NQ 暴露于指定的浓度 1.5、3 或 6 h，并分析总细胞裂解液 (20 μg) 用指定的抗体。Actin 用作内参。 (B) 1,2-NQ 暴露期间细胞间氧化物的检测。细胞在加入 1,2-NQ 前用 20 μM H₂DCFDA 预处理 1 h。细胞用 DMSO 或 10 μM 1,2-NQ 暴露 20 min。为了清除细胞间氢过氧化物的作用，肝细胞在加入 1,2-NQ 前用 PEG-CAT (1,000 U/mL) 预处理 1 h。顶部面板代表细胞间氧化物的生成，底部面板代表明场。 (C) PEG-CAT 对 1,2-NQ 诱导的 Nrf2 激活的影响。细胞在加入 1,2-NQ 前用 PEG-CAT (1,000 U/mL) 预处理 1 h。细胞用 DMSO 或 10 μM 1,2-NQ 暴露 1.5 或 3 h。总细胞裂解液 (20 μg) 用指定的抗体分析。Actin 用作内参。每个条带的相对强度被量化 (底部)。每个值代表三个独立实验的均值 \pm SD。N.S., 不显著。

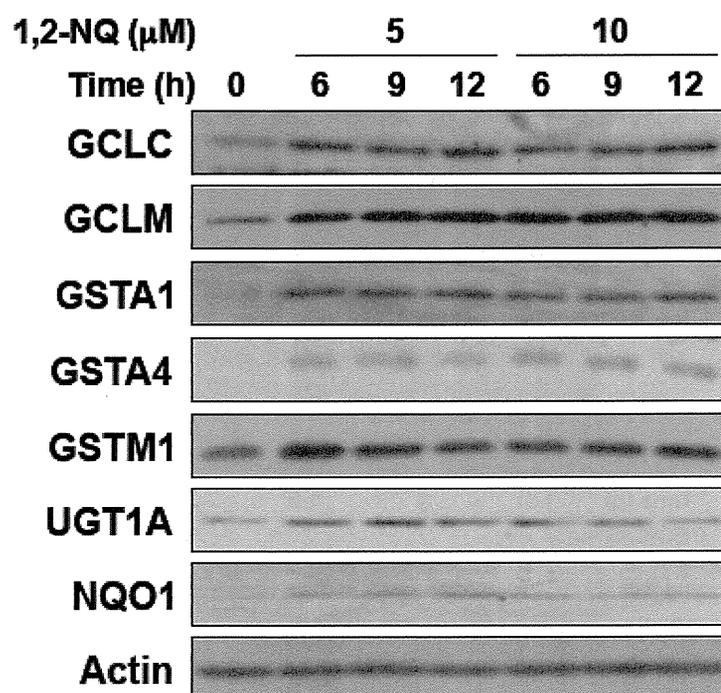


Figure 5 Upregulation of Nrf2 downstream gene-products during exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-NQ

Primary mouse hepatocytes were exposed to 1,2-NQ at the indicated concentrations for 6, 9, or 12 h, and total cell lysates (20 μ g) were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Actin was used as the internal control.

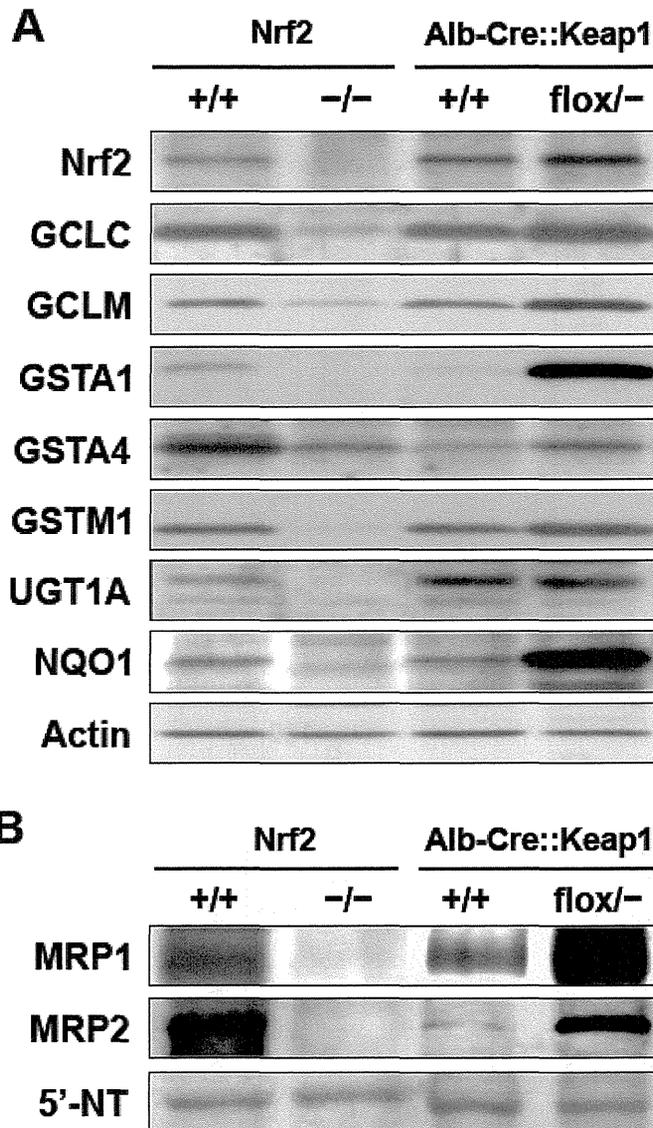


图 6 稳态蛋白表达水平 of Nrf2 及其下游蛋白在初级小鼠肝细胞

(A) 初级肝细胞从 Nrf2^{+/+}, Nrf2^{-/-}, Alb-Cre::Keap1^{+/+}, 或 Alb-Cre::Keap1^{flox/-} 小鼠中分离出来，培养 2 天，总细胞裂解液 (20 μg) 用 Western 印迹分析，用指定的抗体。Actin 用作内参。 (B) 初级肝细胞从 Nrf2^{+/+}, Nrf2^{-/-}, Alb-Cre::Keap1^{+/+}, 或 Alb-Cre::Keap1^{flox/-} 小鼠中分离出来，培养 2 天，粗质膜分数 (30 μg) 制备并分析，用指定的抗体。5'-NT 用作内参。

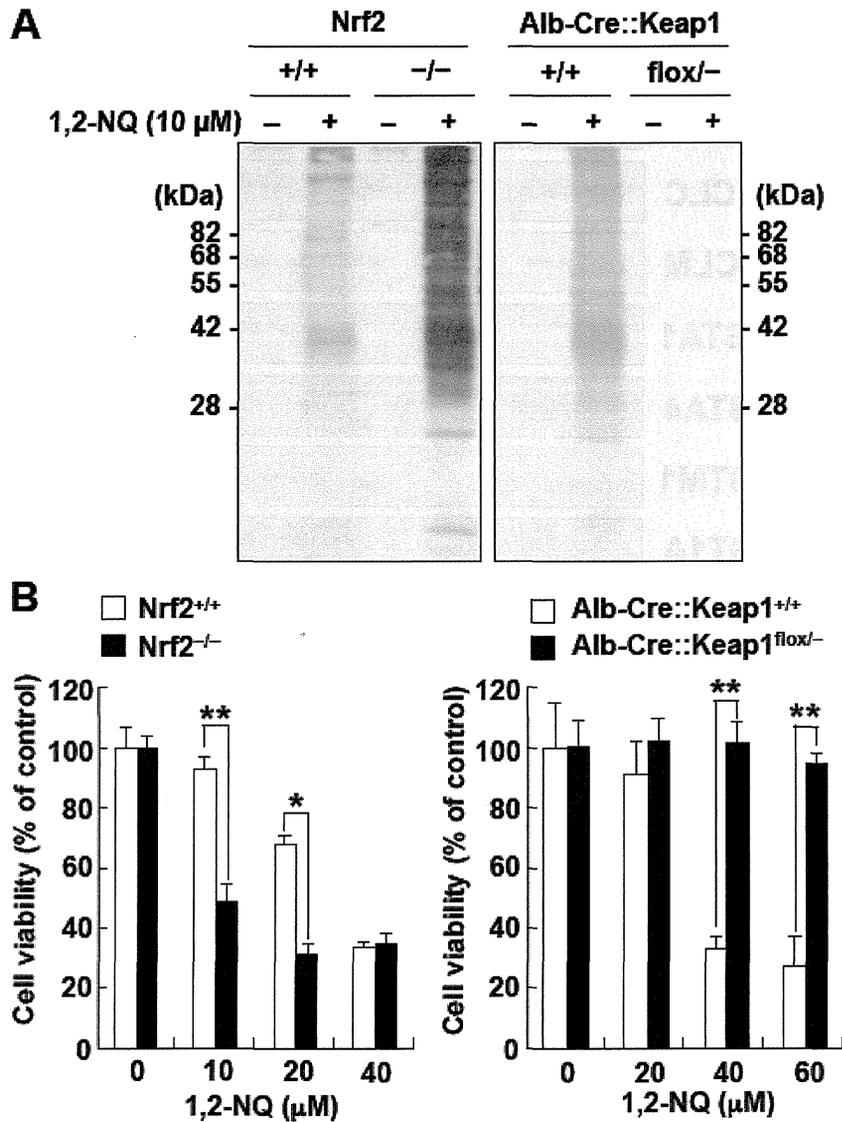


Fig 7 Chemical modification of cellular proteins and cytotoxicity during 1,2-NQ exposure in primary mouse hepatocytes

(A) Primary hepatocytes isolated from Nrf2^{+/+}, Nrf2^{-/-}, Alb-Cre::Keap1^{+/+}, or Alb-Cre::Keap1^{flox/-} mice were exposed to 10 μ M 1,2-NQ for 1 h, and total cell lysates (20 μ g) were analyzed by Western blot with anti-1,2-NQ antibody. (B) Primary hepatocytes isolated from Nrf2^{+/+}, Nrf2^{-/-}, Alb-Cre::Keap1^{+/+}, or Alb-Cre::Keap1^{flox/-} mice were exposed to 1,2-NQ (10–60 μ M) for 24 h, and then an MTT assay was performed. Each value represents the mean \pm SD of four independent experiments. *, $P < 0.05$. **, $P < 0.01$.

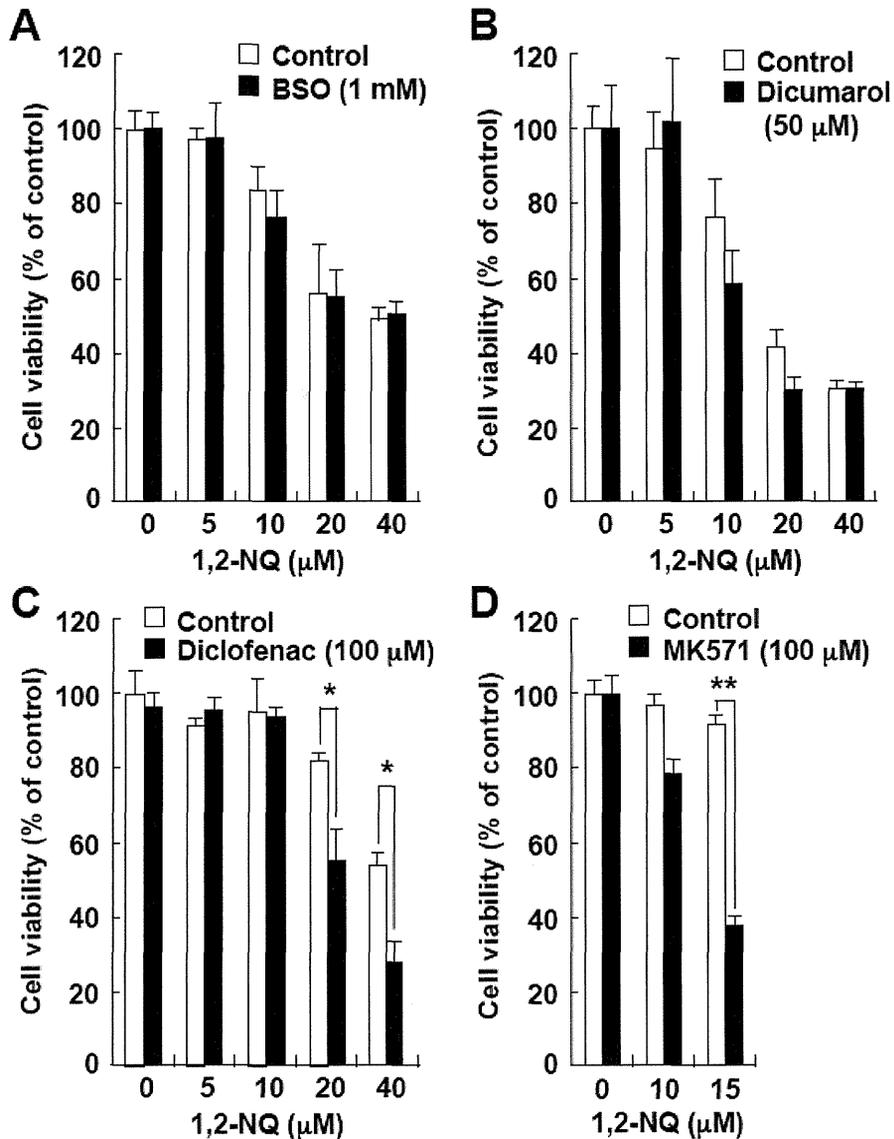


Figure 8 Effects of a variety of inhibitors on cytotoxicity during exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-NQ

(A) Primary mouse hepatocytes wild-type were treated with 1 mM BSO for 6 h prior to exposure to 1,2-NQ (0–40 μM) for 24 h, and an MTT assay was performed. (B) The cells were treated with 50 μM dicumarol for 6 h prior to exposure to 1,2-NQ (0–40 μM) for 24 h, and an MTT assay was performed. (C) The cells were treated with 100 μM diclofenac for 1 h prior to exposure to 1,2-NQ (0–40 μM) for 24 h, and an MTT assay was performed. (D) The cells were treated with 100 μM MK571 for 1 h prior to exposure to 1,2-NQ (0–15 μM) for 24 h, and an MTT assay was performed. Each value represents the mean ± SD of three independent experiments. *, $P < 0.05$. **, $P < 0.01$.

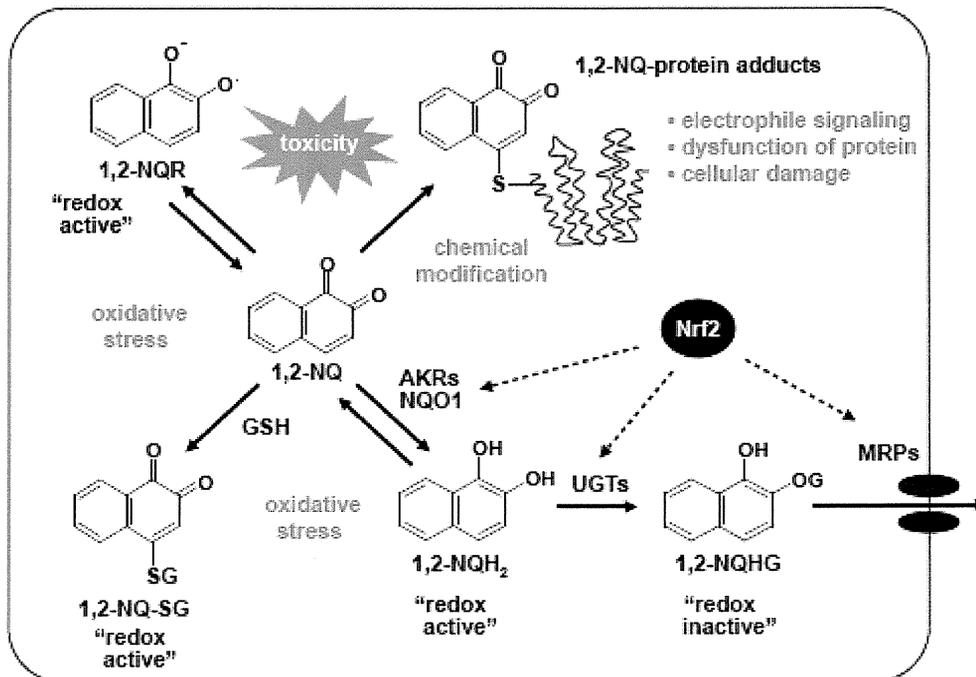


图 9 Role of Nrf2 in the metabolic activation associated with oxidative stress and detoxification of 1,2-NQ
 1,2-NQR, semiquinone radical of 1,2-NQ; 1,2-NQ-SG, GSH adduct of 1,2-NQ; 1,2-NQH₂, 1,2-dihydroxynaphthalene; 1,2-NQHG, monoglucuronide of 1,2-NQH₂.

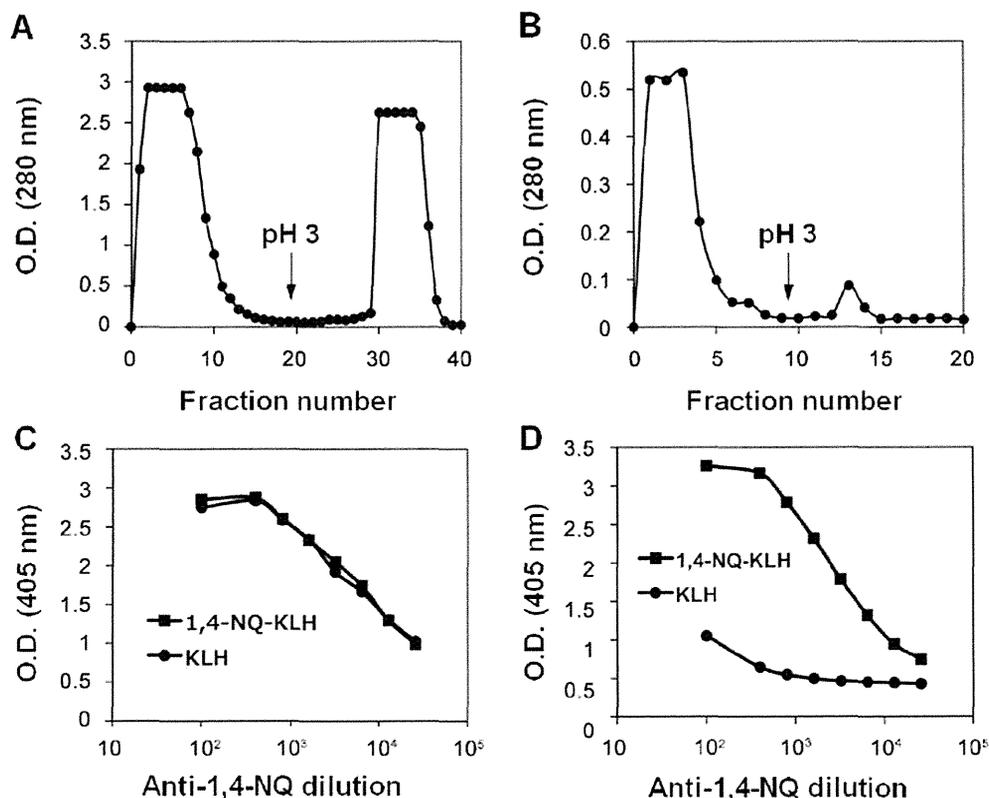
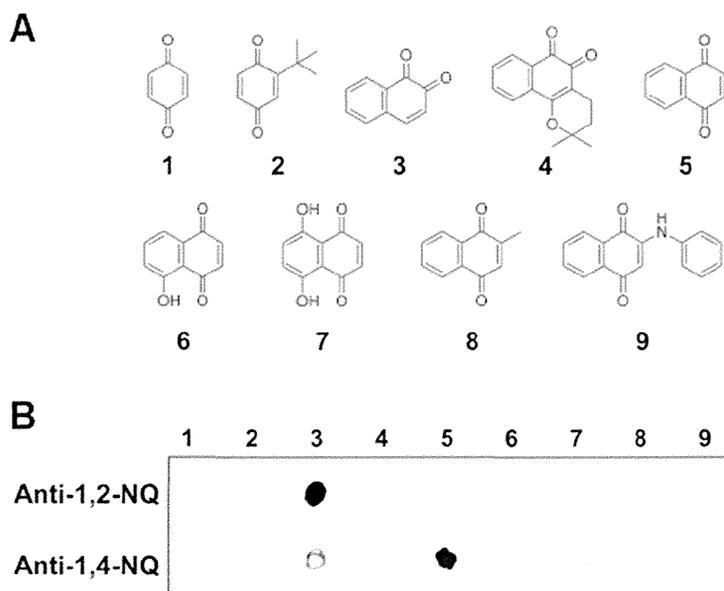


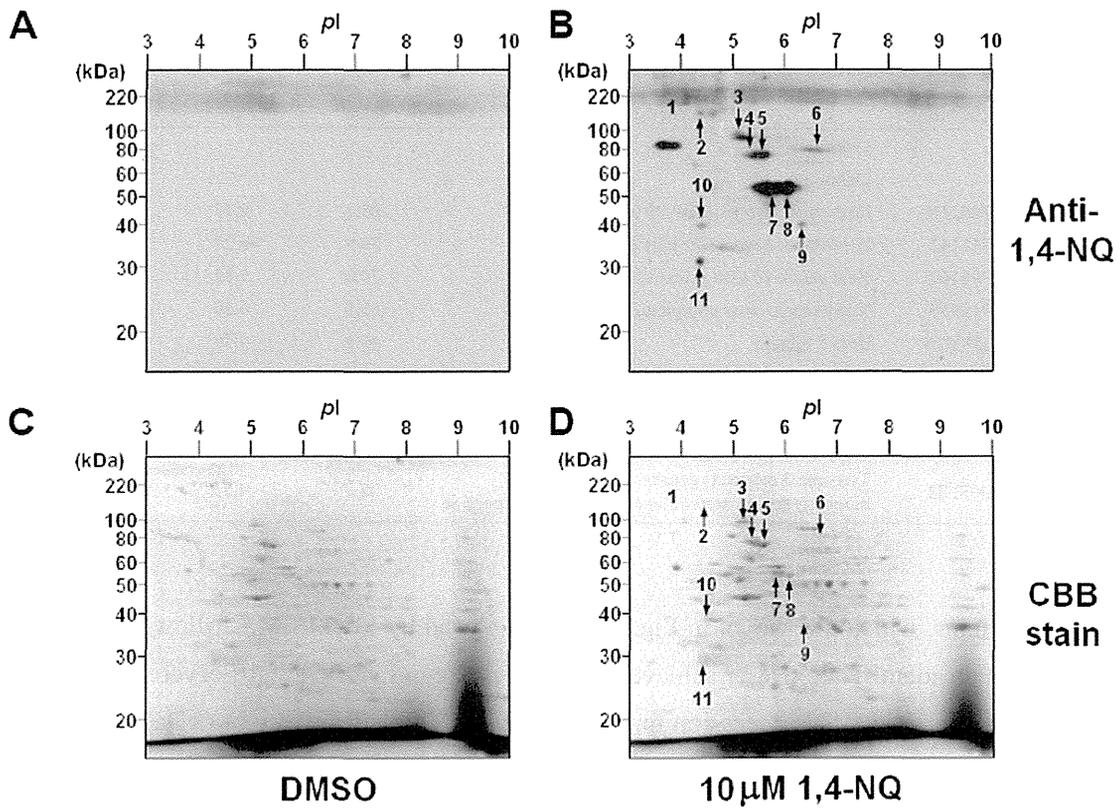
Figure 10 Titration curves of rabbit polyclonal antibodies against 1,4-NQ (C and D) following purification of anti-1,4-NQ by Protein A-Sepharose CL-4B and KLH-Affi-Gel 15 column chromatographies (A and B).

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 (■).



☒ **11** 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-anillino-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).

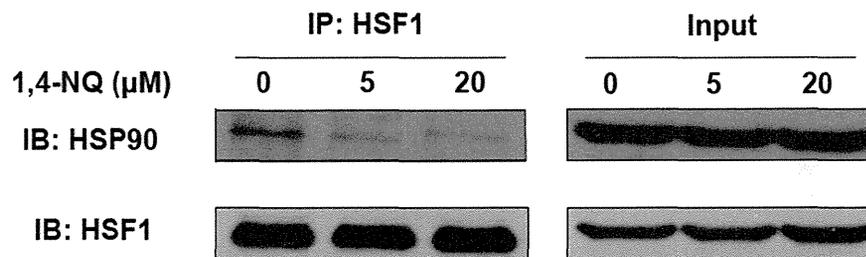


12 Two-dimensional SDS-PAGE of cellular proteins from A431 cells exposed to 1,4-NQ. A431 cells were exposed to DMSO (A and C) or 10 μ M 1,4-NQ (B and D) for 1 hr. Cell lysates (60 μ g) were subjected to isoelectric focusing on Immobiline DryStrip pH 3-10, and then separated by SDS-PAGE. These gels were 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.

表 2. 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.



-  **13** 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.

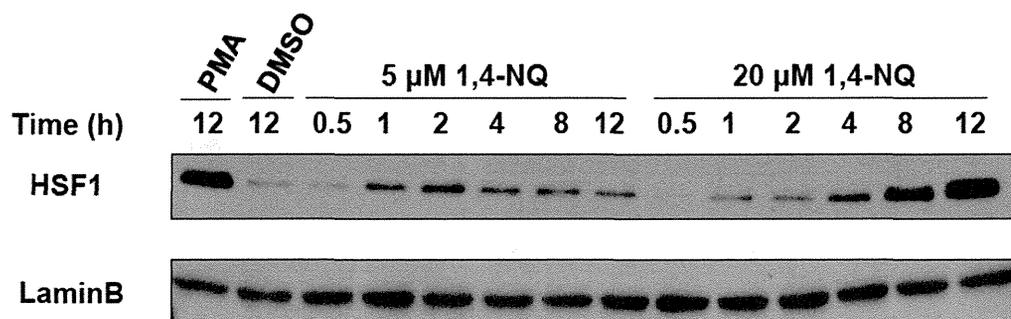
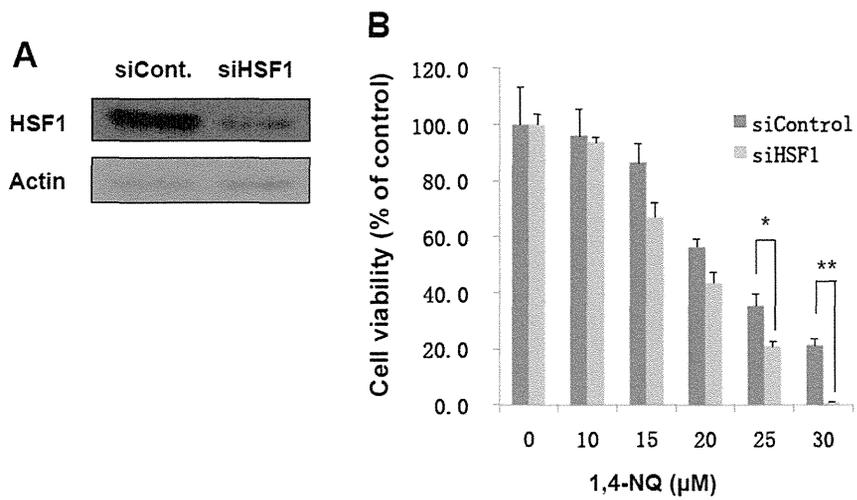


Figure 14 Nuclear translocation of HSF1 induced by 1,4-NQ in A431 cells.
 A431 cells were treated with 1,4-NQ (5 μ M or 10 μ M) for the indicated times, the nuclear was extracted then analyzed by immunoblotting. PMA (1 μ M) was used as a positive control.



☒ **15** 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 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

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
研究分担者	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
研究協力者	古川 容子	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	田中 研次	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	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揮発性有機化合物 (VOC) や 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 (μ -CTE) による放散試験法を確立し、カーテンやカーペットから放散される VOC/SVOC を測定した。その結果、Cyclohexanone や Toluene、2-Ethylhexyl Acrylate、2-Ethyl-hexanol、TXIB など、我々が実施した室内空気の全国調査において検出される様々な化学物質がこれらの家庭用品から放散されることが明らかになった。また、今後、ハウスダスト等を介した暴露が問題となる SVOC についても、Tris(2-chloroisopropyl) Phosphate や Bis(2-ethylhexyl) Phthalate の放散を定量的に評価でき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 VOC/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°C ~240-260°C 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、プロモジフェニルエーテル類など沸点 240-260°C~400°C 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 VOC 及び SVOC はガス状あるいは粒子状として空気

中に存在し、特に SVOC では一部がハウスダストに吸着した状態で存在することが報告されている。ガス状及び粒子状の化学物質は経気道暴露されるのに対し、ハウスダストに吸着した化学物質は“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、室内環境中での様々な VOC 及び SVOC の発生源の同定や放散速度の定量的な解析、主な暴露経路の推定が重要な課題となっている。

そこで、本分担研究では Micro-Chamber/Thermal Extractor (μ -CTE) と呼ばれる加熱脱着機能を備えた小型 4 連チャンバー装置もしくは 6 連チャンバー装置 (図 1) を用いて、防災等の機能カーテンや床用マットから放散される VOC の評価法を確立した (平成 22 年度)。さらに、この μ -CTE 法を VOC と SVOC の同時評価法 (平成 23 年度)、並びに形態別 SVOC 放散量の評価法 (平成 24 年度) へと発展させた。

B. 実験方法

B-1 6 連チャンバー型 μ -CTE による VOC 放散試験 (平成 22 年度)

遮光、防音あるいは遮熱加工等の表記のある機能カーテン 12 製品並びに床用マット 12 製品 (ジョイントマット及びコルクマット各 6 製品) を対象として調査を行った。直径 45 mm の円形に裁断した検体を μ -CTE のチャンバーにセットし、純空気 G2 (太陽日酸) を 20 ± 1 mL/min の流速で通した。後述する放散ガスサンプリング時に実測した流速の誤差は設定値の 10%以内であった。 μ -CTE の制御温

度を 28°C に設定し、室温下で放散試験を実施した。検体を μ -CTE のチャンバーにセットし 1 時間経過後より 120 分間の放散ガスサンプリングを継続的に 4 回、さらに 23 時間後から 120 分間のサンプリングを実施した。放散ガスは Tenax-TA 吸着管 (Spelco 製) に捕集した。

加熱脱離 GC/MS による測定は、50 mL の流速で He ガスを通しながら吸着管を 280°C・6min. 加熱し、脱離した化合物を予め-20°Cに冷却したトラップに再捕集させた。その後 280°Cに急加熱し気化した化合物をスプリット比 20 で HP-1MS カラム (30 m × 0.25 mm 膜厚 0.25 μ m) に導入し、He ガス流速 40 cm/second、40°C (0min.) - (6°C/min.) - 250°C (0min.) の昇温条件で分離した。TOFMS はイオンソース・トランスファアライン共に 250°C、分離された成分は EI 法 70eV でイオン化し、35-500 のイオンを検出した。データ取り込み速度は 10 spectra / second に設定した。なお、TOFMS は 72 時間ごとに校正を行い、そのつど標準品の測定を行って検量線を作成した。定量及びデコンボリューション解析には ChromaTOF Version 4.23 を使用した。デコンボリューション解析で得られた一群のピークの中で Hexane から Hexadecane までの保持時間にあるピークの面積を積分し、Toluene 標準品のピーク面積との比較から定量を行った。

B-2 4 連チャンバー型 μ -CTE 放散試験による

VOC と SVOC の同時評価 (平成 23 年度)
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、VOC を Tenax TA 吸着管に捕集した。ついで、