

(4)10µm

図 15 気道内の微粒子沈着量分布解析結果 (Model (A))

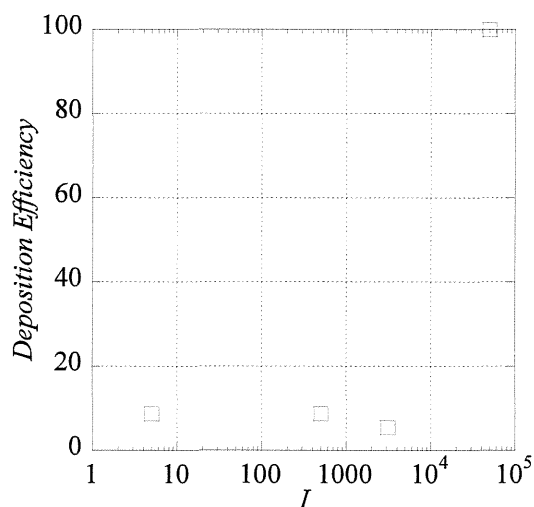


図 16 *Inertial Parameter*(呼吸量に比例)と気道内沈着確率の関係

表 7 気道内の部位別沈着量 (Model (A))

	0.1µm(%)	1µm (%)	2.5µm (%)	10µm (%)
鼻腔	1.46	1.62	1.14	95.2
口腔	0	0	0	0
咽頭	0.980	0.980	0.77	2.15
喉頭	1.09	0.910	0.690	0.860
下気道	4.80	4.87	2.53	0.73

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

気道障害性を指標とする室内環境化学物質のリスク評価手法の開発に関する研究

気道障害性の *in vitro* 評価

研究分担者	香川(田中) 聡子	横浜薬科大学薬学部 教授
研究協力者	大河原 晋	九州保健福祉大学薬学部 准教授
研究協力者	神野 透人	名城大学薬学部 教授
研究協力者	浅井 理香	名城大学薬学部薬学科
研究協力者	野中 志保	名城大学薬学部薬学科

研究要旨：TRP (Transient Receptor Potential) チャネルは気道における侵害刺激に関与する重要な一群の生体高分子である。本研究では、既に著者らが評価系を確立した hTRPV1 および hTRPA1 に加え、気道での侵害刺激への関与が最近明らかにされたヒト TRPM8 (hTRPM8) について安定発現細胞株を用いるアッセイ系の確立を行った。さらに、生活環境化学物質による侵害刺激の種差を明らかにする目的で、mTRPA1 アッセイ系についてもあわせて開発を行った。本年度の研究班共通検討対象物質に選定した TXIB、Texanol および 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol の 3 物質についてヒト TRPM8 に対する Agonist 作用を検討した結果、これらの化合物にはいずれも活性化能は認められなかった。一方、タバコ煙中のアルカロイドである Nicotine および Nornicotine について TRPA1 活性化能ならびにその種差を検討した結果、これらの化合物はいずれもヒトおよびマウスの TRPA1 を活性化すること、ヒト TRPA1 よりもマウス TRPA1 の方がこれらのタバコアルカロイドに対する感受性が高いことが明らかになった。このように、本研究および先行研究で確立した hTRPV1、hTRPA1、mTRPA1 および hTRPM8 のハイスループットアッセイ系は、侵害刺激を惹起する可能性のある生活環境化学物質を同定する上できわめて有効な評価系である。

A. 研究目的

TRP (Transient Receptor Potential) チャネルは 6 回膜貫通型の非選択的 Cation チャネルである。TRPV, TRPA, TRPM, TRPC, TRPP および TRPML の 6 つの Subfamily で構成され、ヒトでは 28 種類の遺伝子が同定されている。

気道において、幾種類かの TRP チャネルが末梢の知覚神経をはじめ、鼻腔や気管支、肺などの上皮系の細胞にも発現しており、咳などの侵害応答や炎症に関与

することが明らかにされている。筆者らは、既に後根神経節 Total RNA からクローニングしたヒト TRPV1 (hTRPV1) およびヒト TRPA1 (hTRPA1) を安定的に発現する Flp-In 293 細胞株を樹立し、多種多様な生活環境化学物質がこれらの TRP チャネルを活性化することを明らかにしてきた。

本研究では、hTRPV1 および hTRPA1 に加えて、気道での侵害刺激への関与が最近明らかにされたヒト TRPM8 (hTRPM8)

について安定発現細胞株を用いるアッセイ系の確立を行った。さらに、TRPA1 活性化について比較的大きな種差の存在が報告されていることから、生活環境化学物質による侵害刺激の種差を明らかにする目的で、mTRPA1 アッセイ系の開発についてもあわせて行った。

B. 実験方法

B-1. マウス TRPA1 (mTRPA1) 安定発現細胞株の樹立

mTRPA1 cDNA (NM_207608) を挿入した Plasmid (OriGene MR227099) を鋳型として、Cloning 用 Forward Primer 5'-CACCATGAAGCGCGGCTTG-3'、Reverse Primer 5'-AAAGTCCGGGTGGCTAATAG-3' を用いて PCR を行い、3379 bp の Fragment を増幅した。得られた Amplicon を pENTR/D-TOPO ベクター (Thermo Fisher Scientific Inc./Invitrogen) にクローニングした。ついで、Fluorescent Dye Terminator 法による Sequencing を行い、Insert の Forward および Reverse 両鎖の DNA 配列を確認したのちに、pEF5/FRT/V5-DEST ベクターにサブクローニングした。得られた mTRPA1 哺乳動物細胞発現ベクターと Flp-Recombinase 発現ベクター (pOG44) を LipofectAmine 3000 (Invitrogen) を用いて Flp-In 293 細胞にコトランスフェクションし、100 µg/mL Hygromycin を添加した選択培地で培養して安定発現細胞株 (Flp-In-

293/mTRPA1 細胞) を樹立した。

B-2. ヒト TRPM8 (hTRPM8) 安定発現細胞株

ヒト前立腺 mRNA (Clontech) から cDNA を合成し、Forward Primer として 5'-CACCATGTCCTTTCGGGCAGCCA -3'、Reverse Primer として 5'-TTTGATTTTATTAGCAATCTCTTTCAG-3' を用いて PCR を行い、hTRPM8 cDNA (3325 bp) を増幅した。mTRPA1 安定発現細胞株の場合と同様に、得られた Amplicon を pENTR/D-TOPO ベクター、ついで pEF5/FRT/V5-DEST ベクターにクローニングした。得られた hTRPM8 哺乳動物細胞発現ベクターと Flp-Recombinase 発現ベクター (pOG44) を LipofectAmine 2000 (Invitrogen) を用いて Flp-In 293 細胞にコトランスフェクションし、100 µg/mL Hygromycin を添加した選択培地で培養して安定発現細胞株 (Flp-In-293/hTRPM8 細胞) を樹立した。

B-3. Calcium Mobilization Assay

Assay 前日に Flp-In-293/mTRPA1 細胞あるいは Flp-In-293/mTRPM8 細胞を Poly-D-Lysine-coated 96-well Dish に 3.5×10^5 cells/mL の細胞濃度で播種した。翌日に培地を除去して FLIPR Calcium 6 試薬溶液に置換し、37°C で 2 時間培養したのちに、分注機能付きマイクロプレートリーダー FlexStation3 を用いて下記の測定条件で被

検物質曝露による Flp-In-293/mTRPA1 細胞内 Calcium 濃度の変動を記録した。

FlexStation3 測定条件

[Temperature]

37°C

[Read Mode]

Fluorescence/Bottom Read

[Wave Length]

Excitation: 485 nm

Emission: 525 nm

Cut off: 515 nm

[Sensitivity]

Readings: 3

PMT: Medium

C. 結果と考察

著者らは、先行する厚生労働科学研究において、気道刺激性が疑われる多種多様な生活環境化学物質が TRPV1 および TRPA1 を活性化することを明らかにした。一方、最近の研究で、TRPM8 も気道および肺での侵害受容に関与する可能性が示唆されていることから、本年度の研究ではヒト TRPM8 を活性化する室内環境化学物質のハイスループットスクリーニング系の確立を行った。さらに、TRP Superfamily の中で、TRPA1 はヒトとげっ歯類の間のホモロジーが比較的 low (80%程度)、Menthol のように Agonist 作用に種差が認められる化合物が報告されていることから、従来 Assay に用いていたヒト TRPA1 と比較可能なマウス TRPA1

安定発現細胞の樹立についても検討を行った。

本年度の共通検討対象物質である TXIB、Texanol および 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol についてヒト TRPM8 に対する Agonist 作用を検討した結果、これらの化合物にはいずれも活性化能は認められなかった (Data Not Shown)。

次に、室内環境化学物質による TRPA1 活性化の種差を明らかにするために、典型的な TRPA1 Agonist である Cinnamic Aldehyde、ならびにヒト TRPM8 の Agonist であり、かつヒト TRPA1 を活性化することが知られている Menthol を Positive Control として、両化合物による hTRPA1 と mTRPA1 の活性化を比較、検証した。その結果、図 1A に示したように、Cinnamic Aldehyde では、hTRPA1 と mTRPA1 でほぼ同一の濃度-反応曲線が得られ、EC₅₀ 値にもほとんど差異は認められなかった (それぞれ 23 μM、17 μM)。一方、Menthol による TRPA1 の活性化についても、EC₅₀ 値にはヒトとマウスの間で著しい差異は認められなかった (それぞれ 71 μM、88 μM) のに対し、細胞内カルシウム濃度の最高値で比較すると、mTRPA1 は hTRPA1 の 1/2 ないし 1/3 程度の活性化しか観察されなかった。

さらに、タバコ煙中に含まれるアルカロイドである Nicotine、ならびにその脱メチル化体である Normicotine について hTRPA1 および mTRPA1 に対する活性化

能を比較した。その結果、Nicotine および Noronicotine はいずれもマウスおよびヒトの TRPA1 を活性化した (図 2)。ただし、mTRPA1 の方が hTRPA1 よりも EC₅₀ 値が小さく (Nicotine ではそれぞれ 10 mM、19 mM、Nornicotine ではそれぞれ 20 mM、> 40 mM)、mTRPA1 の方が hTRPA1 よりも Nicotine および Nornicotine に対する感受性が高いことが明らかになった。

これらの結果は、TRPA1 を介する侵害刺激に関して、毒性実験に繁用されるマウスとヒトの間には種差が存在することを示しており、げっ歯類で得られた結果をヒトに外挿する際の妥当性を化合物ごとに検証する必要があるものと考えられる。

D. 結論

本研究では、侵害刺激を惹起する可能性のある生活環境化学物質のスクリーニング法を開発する目的で、著者らが既に樹立したヒト TRPA1 に加えて、ヒト TRPM8 およびマウス TRPA1 の安定発現細胞株を新たに樹立し、細胞内カルシウム濃度を指標とするアッセイ系を確立した。このスクリーニング法を用いて、TXIB、Texanol および 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol による侵害刺激を評価したところ、いずれの化合物にも TRPM8 の活性化は観察されなかった。一方、重要な室内環境汚染源の一つであるタバコ煙中の Nicotine および Nornicotine による侵害刺

激について検討した結果、これらの化合物はいずれも TRPA1 を活性化し、動物種の比較ではマウスに対する感受性が高いことが明らかになった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表

1. Takeuchi S., Tanaka-Kagawa T., Saito I., Kojima H., Jin K., Satoh M., Kobayashi S., Jinno H.: Differential determination of plasticizers and organophosphorus flame retardants in residential indoor air in Japan. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, Jun 24. doi:10.1007/s11356-015-4858-z
2. Hanioka N, Isobe T, Kinashi Y, Tanaka-Kagawa T, Jinno H.: Hepatic and intestinal glucuronidation of mono(2-ethylhexyl) phthalate, an active metabolite of di(2-ethylhexyl) phthalate, in humans, dogs, rats, and mice: an in vitro analysis using microsomal fractions. *Arch Toxicol*. 2015, in press.

学会発表

1. 河上 強志, 伊佐間 和郎, 香川(田中) 聡子, 神野 透人: 家庭用水性スプレー製品中のグリコール類及びグリコールエーテル類等の分析, 24 回環境化学討論会 (2015.6)

- | | |
|--|---|
| <p>2. Jinno H, Tanaka-Kagawa T : Revision of the Indoor Air Quality Guidelines in Japan: Consumer Products as Sources of Air Pollution in Indoor Environment. AsiaTox 2015 (2015.6)</p> <p>3. 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 神野透人:生活環境化学物質による TRP イオンチャンネルの活性化, 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015,6)</p> <p>4. 田原 麻衣子, 真弓 加織, 五十嵐 良明, 埴岡 伸光, 香川 (田中) 聡子, 神野透人: COSMO-RS 法による空気-鼻粘液分配係数の予測, 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015,6)</p> <p>5. 香川 (田中) 聡子, 大河原 晋, 神野透人: 金属化合物によるヒト侵害刺激受容 TRP イオンチャンネルの活性化, メタルバイオサイエンス研究会 2015 (2015,8)</p> <p>6. 香川 (田中) 聡子, 田原 麻衣子, 上村 仁, 斎藤 育江, 武内 伸治, 神野透人: 室内環境中の粒子状物質の日内変動とその組成に関する研究, フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー (2015.9)</p> <p>7. 河上 強志, 伊佐間 和郎, 香川(田中) 聡子, 神野 透人: 家庭用芳香剤などのスプレー製品に含まれるグリコールエーテル等の実態調査, 第 52 回全国衛生化学技術協議会年会 (2015.12)</p> | <p>G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)</p> <p>特許取得</p> <p>なし</p> <p>実用新案登録</p> <p>なし</p> |
|--|---|

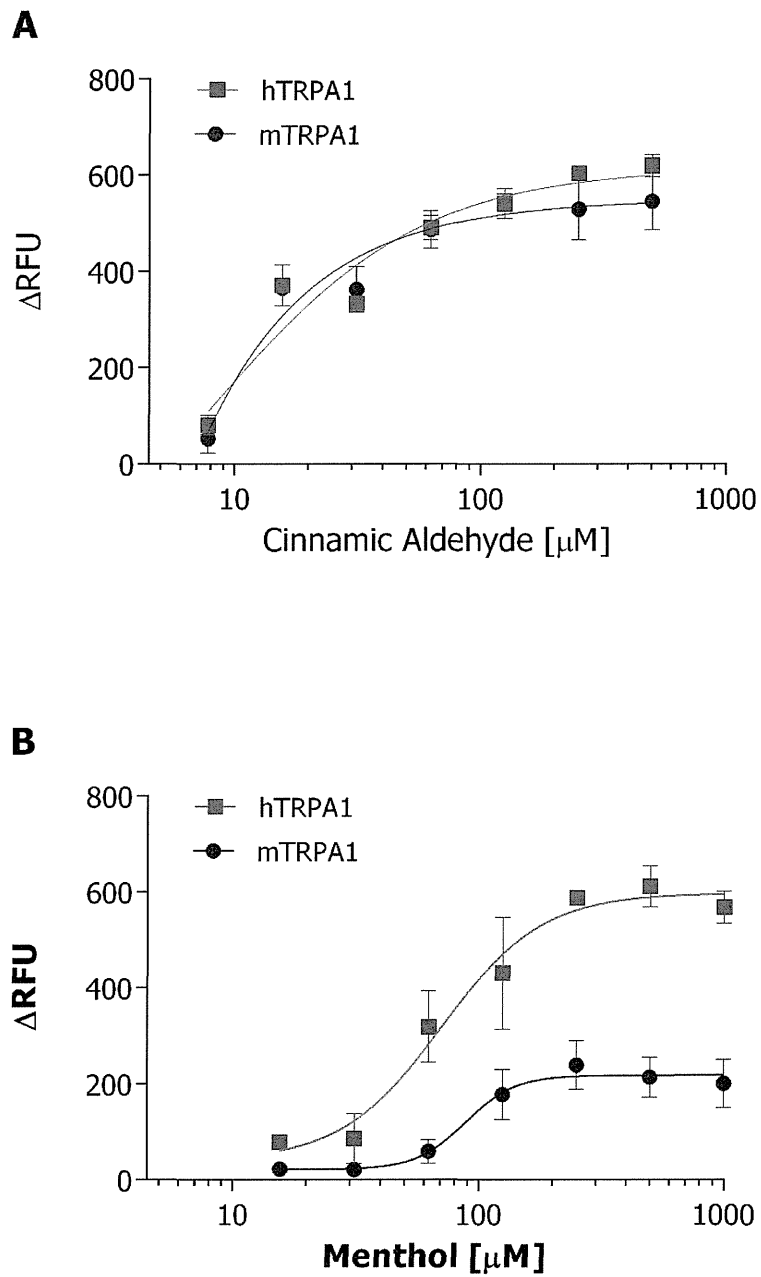


図 1 Cinnamic Aldehyde および Menthol による hTRPA1 および mTRPA1 の活性化

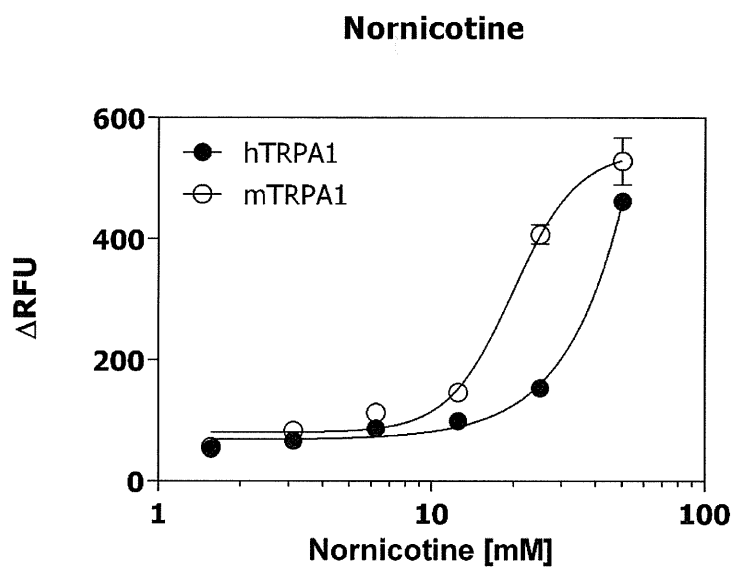
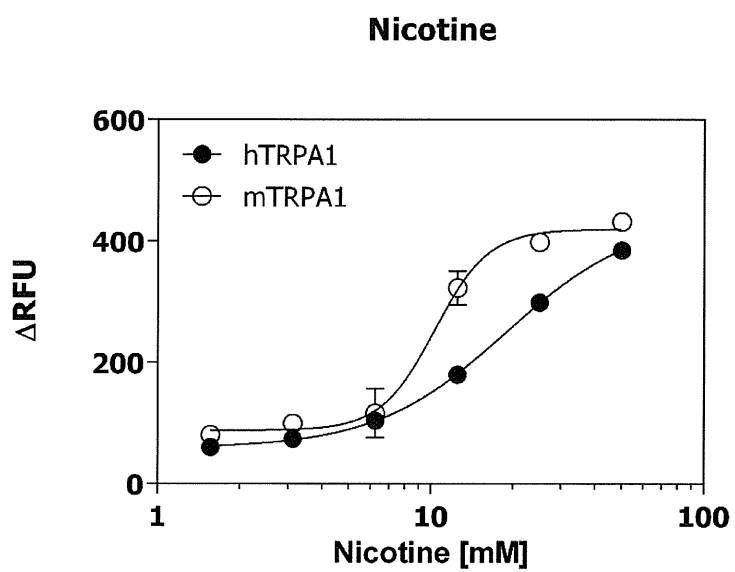


図2 Nicotine および Nornicotine による TRPA1 活性化の種差

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

気道障害性を指標とする室内環境化学物質のリスク評価手法の開発に関する研究

気道障害性の *in vitro* 評価

研究分担者 河上 強志 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 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

本研究では、室内空気全国調査等にて高頻度・高濃度で検出が報告されているグリコール類等を中心に、23 化合物を被験物質として Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) を用いた感作性評価を実施した。さらに、陽性と分類された化合物について、Cys-peptide 及び Lys-peptide との結合性を比較し、その気道感作性を評価した。試験に先立ち、OECD TG 442C で規定されている proficiency test を実施したところ、対象 10 物質中、Cys-peptide 及び Lys-peptide 共に 9 物質で要求されているペプチド減少率を示し、技能レベルが規定水準以上であることを確認した。試験した 23 化合物のうち、陽性と判断されたのは、ジメチル、ジエチル及びジブチルのフマル酸及びマレイン酸ジエステル類 6 化合物であった。一方、化粧品及び繊維製品で接触皮膚炎が報告されている 1,3-butandiol 及び diethylhexyl maleate は陰性と分類された。これは、DPRA では感作性の弱い化合物は偽陰性を示すことや、疎水性化合物は水溶解度が低く正しく試験できないことなどが影響していると考えられた。気道感作性については、本研究で陽性と判断された 6 化合物のうち、シックハウス様症状が報告されている dimethyl fumarate で Lys/Cys が既報と同様の傾向を示し、DPRA による気道感作性評価はある程度有効であるものと示唆された。今後、より多くの室内環境化学物質について試験し、その気道感作性について評価する予定である。

A. 研究目的

人間は一日の大半を室内環境で過ごすことから、室内空気は人間の健康上、重要な環境媒体である。我が国では室内空気の安全性について、室内濃度指針値が 13 種類の化学物質対して策定¹⁾され、建築基

準法では 2 種類の化学物質が規制対象²⁾とされている。

しかしながら、室内濃度指針値が策定されてから 10 年程度過ぎ、代替溶剤等の使用や準揮発性有機化合物による室内環境汚染が懸念されるようになってきている。

このような背景から、2012 年からシックハウス (室内空気汚染) 問題に関する検討会(シックハウス検討会) が開催され、室内濃度指針値の見直しや、対象物質の追加に関する議論が進められている³⁾。この検討会では、現在の室内空気汚染実態の把握のために、全国調査を実施するとともにその結果を公表している。この実態調査結果から室内空気中で注目すべき化合物を選定し、既存のハザード情報に基づく初期リスク評価、さらには優先化合物リスト作成、詳細リスク評価を経て最終的に室内濃度指針値の見直しが行われることになっている。しかしながら、このような化合物の初期リスク評価に資するハザード情報は比較的限られている。そのため、この段階が室内濃度指針値の改定において律速となることが懸念されている。そこで、本研究ではハザード情報の網羅的な収集、並びに不足情報の補完方法の確立を目的としている。具体的には、気道内挙動の *in vitro/in silico* 予測、気道障害性の *in vitro* 評価及び気道障害性にかかる情報収集及び優先順位判定をサブテーマとして設定して検討を進め、気道障害性が疑われる室内環境化学物質についての優先取組リスト等、室内環境衛生にかかる厚生労働行政を推進する上で必要不可欠な情報の提供を目指している。本分担研究課題では、気道障害性の *in vitro* 評価として、室内環境化学物質の気道感作性評価を目的としている。

化学物質の感作性については、皮膚感作性と気道感作性とがある。前者はIV型アレルギー (遅延型アレルギー) であり、*in vitro* 及び *in vivo* のどちらでも多くの試験

法が確立している⁴⁾。そして、これまでに数多くの化学物質が評価され、その皮膚感作性の有無が報告されている。一方、後者は主にI型アレルギー (瞬時型アレルギー) である。産業衛生学会では、気道感作性物質はアレルギー性呼吸器疾患 (鼻炎, 喘息, 過敏性肺臓炎, 好酸球性肺炎等, アレルギーの関与が考えられる疾患) を誘発する物質と定義付けており、人間に対して明らかに感作性がある物質 (第1群)、人間に対しておそらく感作性があると考えられる物質 (第2群)、動物試験などにより人間に対して感作性が懸念される物質 (第3群) と分類し、それぞれに判断基準を示している⁵⁾。ただし、気道感作性については、*in vivo* 及び *in vitro* どちらの試験系においても確立された試験方法はこれまで報告されていない^{4,6)}。そのため、気道感作性物質として確認されている化学物質数は皮膚感作性物質に比べると非常に少ないのが現状である⁵⁾。

化学物質の感作性試験について、近年は動物愛護の観点から代替法が開発されている。そして、その際には *adverse outcome pass way* (AOP) を考慮した試験法の開発が行われている。皮膚感作法試験については、Fig. 1 に示したように、①化学物質とタンパク質との結合、②ケラチノサイトにおける炎症性応答及び遺伝子発現、③樹状細胞の活性化、④リンパ節における T 細胞の活性化、といった各ステージに対応した試験法が開発されている⁷⁾。このうち、①の化学物質とタンパク質との結合について評価している *Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA) は、Fig. 2 に示したシステイン含有ペプチド (Cys-

peptide) またはリジン含有ペプチド (Lys-peptide) と被験物質とを混合し 24 時間反応させた後、未反応のペプチド量を測定し、そこから被験物質の反応性を分類する方法である。この方法は、Gerberick ら⁸⁾によって開発され、現在は OECD のテストガイドライン⁹⁾に採用されている (OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG 442C (In Chemico Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay))。この DPRA について、被験物質に対する Cys-peptide 及び Lys-peptide の結合性の差から、その気道感作性を評価できる可能性が報告されている¹⁰⁾。

そこで本分担研究では、室内空気汚染実態全国調査等にて高頻度・高濃度で検出が報告されている化学物質を中心に、DPRA を用いた皮膚感作性及び気道感作性評価を実施した。

B. 研究方法

B1. 試薬類

評価対象とした被験物質及び proficiency test に使用した化合物の購入先を表 1 に示した。なお、dipropylene glycol (DPG) に関しては異性体混合物であり、具体的な異性体の種類およびそれらの含有率については不明である。リン酸緩衝液の作製に使用した、リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素二ナトリウムは関東化学製の特級試薬を用いた。酢酸アンモニウム緩衝液の作製に用いた酢酸アンモニウム及びアンモニウム水はナカライテスク製及び和光純薬工業製をそれぞれ用いた。アセトニトリル及びトリフルオロ酢酸 (TFA) はシグマアルドリッチ製及

び和光純薬工業製の HPLC 用をそれぞれ用いた。Cys-peptide 及び Lys-peptide は株式会社スクラムより購入した。試験に用いた水は全てミリポア製超純水製造装置 Milli-Q AdvantageA10 で製造した水を用いた。

リン酸緩衝液は各 100 mmol/L に調製したリン酸二水素ナトリウム水溶液及びリン酸水素二ナトリウム水溶液を 18/82 の割合で混合し、pH を 7.5 ± 0.05 に調製したものを用いた。酢酸アンモニウム緩衝液は酢酸アンモニウム 1.542 g を 200 mL の水に溶解した後、アンモニア水を用いて pH を 10.2 に調製したものを用いた。

ペプチド溶液は Cys-peptide (Cys 溶液) 及び Lys-peptide (Lys 溶液) が 0.667 mmol/L となるように、それぞれリン酸緩衝液及び酢酸アンモニウム緩衝液に溶解させた。

陽性対照に使用した Cinnamic aldehyde 及び各被験物質は 100 mmol/L となるようにアセトニトリルに溶解させた。

B2. 試験方法

OECD TG 442C に従い試験した。Cys-peptide と各被験物質との反応では、Cys 溶液 750 μ L に 200 μ L のアセトニトリル及び被験対象物質溶液 50 μ L を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、暗所にて 25°C で 24 ± 2 時間静置した。24 時間後に高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器 (HPLC/PDA) にて Cys-peptide を測定した。Lys-peptide では、Lys 溶液 750 μ L に 250 μ L の被験物質溶液を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、Cys-peptide と同様に操作後に測定した。また、各ペプチドとの反応において、

ペプチド溶液を対応する各緩衝液に置き換えた試料を Co-elution control、被験物質溶液をアセトニトリルに置き換えたものを Reference control としてそれぞれ調製し用いた。ここで、Co-elution control は各ペプチドと被験物質の保持時間が重なるの有無の確認用、Reference control は各ペプチドの安定性評価に用いている。また、試験の成立確認のために、各ペプチドについて検量線を作製し測定した。

これらの試験は、最初に混合された試料から 22~26 時間以内に HPLC による測定を開始し、HPLC 分析は測定開始から 30 時間以内終了した。

各被験物質によるペプチド減少量は次式から算出した。

$$\text{Peptide Depletion (\%)} = \left[1 - \frac{\text{Peptide peak area in replicate injection}}{\text{Mean peptide peak area in reference controls}} \right] \times 100$$

OECD TG 442C では DPRA 法の実施にあたり試験者の技術レベルを確認するため、感作性強度が extreme から non-sensitizer まで幅広い 10 物質を用いた技能試験 (proficiency test) の実施が求められており、Cys-peptide 及び Lys-peptide のそれぞれについて、10 物質中 8 物質以上で所定のペプチド減少率の範囲に収まることが要求されている。本研究では、DPRA 法による感作性評価試験に先立ち、proficiency test を実施した。

B3. HPLC/PDA 条件

島津製作所製の NexeraX2 システムを用いた。カラムにはアジレントテクノロジー社製の Zorbax SB-C18 (内径 2.1 mm × 長さ 100 mm × 粒子径 3.5 μm) を用い

た。カラムオープン温度及びオートサンプラーラック温度は 30℃ 及び 25℃ とした。流速は 0.35 mL/min、注入量は 10 μL とした。移動相は、A 液が 0.1% (w/w) TFA 水、B 液が 0.085% (w/w) TFA アセトニトリルとした。グラジエント条件は B 液を初期濃度 10% から 10 分間に 25% とし、その後 1 分間で 90% とした。その後、2 分間 B 液 90% で保持した後、0.5 分で 10% とし、その後 7.5 分間保持した。測定波長は 220 nm 及び 258 nm とし、ペプチド減少率は 220 nm で測定した。

C. 結果および考察

C1. Proficiency test

OECD TG 442C では proficiency test として、Cys-peptide 及び Lys-peptide のそれぞれについて、指定された被験物質 10 物質中 8 物質以上で Table 2 に示した所定のペプチド減少率の範囲に収まることが要求されている。

本研究で実施した proficiency test の結果を Table 2 に示した。Cys-peptide では、Farnesal で減少率が 10% と OECD TG 442C で要求している減少率 (15~55%) を下回った。また、Lys-peptide では、benzylideneacetone で減少率が 63% と OECD TG 442C で要求している減少率 (0~7%) から外れていた。一方、その他の被験物質は、Cys-peptide 及び Lys-peptide のどちらについても、そのペプチド減少率は全て OECD TG 442C の要求範囲に収まっていた。そのため、本研究では DPRA 法の実施にあたり、技能レベルが規定水準以上であることが確認できた。

C2. DPRA 法による各被験対象化合物の感作性評価

DPRA では被験物質のペプチドとの反応性の評価は、ペプチド減少率の平均値を算出し、Table 3 に示したモデルにて分類することになっている⁹⁾。この際、各ペプチドと被験物質の溶出時間が重なった場合にはペプチド減少率の算出が不可能となる。ただし、その現象が Lys-peptide のみの場合には、Cys-peptide 1:10 model に従い分類することになっている。本研究では、各ペプチドと被験物質とで溶出時間の重なりは認められなかったため、Cys-peptide 1:10/Lys-peptide 1:50 model にて評価した。

本研究では、室内空気汚染全国実態調査³⁾で高頻度、高濃度での検出が報告されているグリコール類、グリコールエーテル類とその類縁化合物や、欧州で接触皮膚炎発症時にシックハウス様症状を併発したとの報告¹¹⁾のある dimethyl fumarate とその類縁化合物など 23 化合物について DPRA により評価した (Fig. 3)。その結果、ジメチル、ジエチル及びジブチルのフマル酸及びマレイン酸ジエステル類 6 化合物が陽性と分類され、それ以外の化合物は全て陰性と分類された (Table 4)。

今回評価した被験物質について、グリコール類は全て陰性と評価された。一方で、化粧品類に使用された 1,3-butandiol による接触皮膚炎が多数報告されている^{12,13)}。DPRA は感作性試験として広く実施されてきたマウス局所リンパ節試験 (LLNA) と 80%以上の一致を示すとされているが感作力の弱い化合物では偽陰性を示すことが多く、さらに代謝活性化が

必要な化合物は評価できないとされている¹⁴⁾。そのため、本研究では 1,3-butandiol やその異性体及び類縁化合物に関しては、DPRA では陰性と評価されたが、感作性についてはそのほかの試験法も合わせた複合的な評価が必要であると考えられた。

また、dimethyl fumarate は強い感作性を示すことが知られており、その類縁化合物であるフマル酸ジエステル類及びマレイン酸ジエステル類も dimethyl fumarate に交叉反応性を示すとともに、それら自体も感作性を有していることが知られている¹¹⁾。本研究でも、これらのジメチル、ジエチル及びジブチルエステル類については、陽性と分類された。しかしながら、皮膚感作性が報告¹⁵⁾されている diethylhexyl maleate 及びその異性体である diethylhexyl fumarate については陰性と分類された。DPRA では、ペプチドと被験物質との反応が水系で行うため、水への溶解性の低い疎水性化合物についても正確に評価することが難しいとされている¹⁴⁾。そして、diethylhexyl maleate 及び diethylhexyl fumarate はオクタノール・水分分配係数が他の化合物に比べて大きい (Table 1)。そのため、これら二つの化合物では DPRA による正しい評価が難しいと考えられた。

Lalko et al. は既知の気道感作性物質と、皮膚感作性を有するが気道感作性を有さない化合物とを DPRA により評価し、それらの Cys-peptide 及び Lys-peptide におけるペプチド減少率の比 (Lys/Cys) を求め比較した¹⁰⁾。その結果、気道感作性を有する化合物の方が、皮膚感作性のみ有する化合物に比べて Lys/Cys が大きくなる

ことを報告しており、気道感作性物質の Lys/Cys は 0.2 以上を示していた。本研究で陽性と判断された 6 化合物について Lys/Cys を見ると、0.11~0.83 を示していた。これらの化合物のうち、欧州で接触皮膚炎が多数報告されている dimethyl fumarate は皮膚症状のみならずシックハウス症状も報告¹¹⁾されており、Lys/Cys は 0.46 と 0.2 以上を示していた。そのため、今後より多くの化合物について評価し、そのデータの蓄積が必要と考えられるが、Lys/Cys による気道感作性評価はある程度有効であるものと示唆された。

D. まとめ

本研究では、室内空気全国調査等にて高頻度で検出が報告されている化学物質を中心に、23 化合物を被験物質として DPRA を用いた感作性評価を実施した。さらに、陽性と分類された化合物について、Cys-peptide 及び Lys-peptide との結合性を比較し、その気道感作性を評価した。試験に先立ち、OECD TG 442C で規定されている proficiency test を実施し、技能レベルが規定水準以上であることを確認した。試験した 23 化合物のうち、陽性と判断されたのは、ジメチル、ジエチル及びジブチルのフマル酸及びマレイン酸ジエステル類 6 化合物であった。一方、化粧品及び繊維製品で接触皮膚炎が報告されている 1,3-butandiol 及び diethylhexyl maleate は陰性と分類された。これは、DPRA では感作性の弱い化合物は偽陰性を示すことや、疎水性化合物は水溶解度が低く正しく試験できないことなどが影響していると考えられた。気道感作性については、本研究

で陽性と判断された 6 化合物のうち、シックハウス様症状が報告されている dimethyl fumarate では Lys/Cys が既報と同様の傾向を示し、DPRA による気道感作性評価はある程度有効であるものと示唆された。今後、より多くの室内環境化学物質について試験し、その気道感作性について評価する予定である

E. 研究発表

E1. 論文発表

- 1) Kawakami T., Isama K., Ikarashi Y.: Survey of isothiazolinones and other preservatives in household wet tissue products in Japan, J. Environ. Chem., 25, 207-214, 2015.

E.2 学会発表

- 1) 河上強志, 伊佐間和郎, 五十嵐良明: ウェットティッシュ製品に含まれる防腐剤調査, 第 45 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会・学術大会 (2015.11)

F. 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
3. その他
なし

G. 引用文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室: 室内濃度指針値一覧, <http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/situnai/hyou.html>

- 2) 国土交通省: 改正建築基準法に基づくシックハウス対策の概要,
<http://www.mlit.go.jp/jutakukentiku/build/sickhouse.files/gaiyou.pdf>
- 3) 厚生労働省: シックハウス (室内空気汚染) 問題に関する検討会,
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/other-iyaku.html?tid=128714>
- 4) 青山公治: 動物による皮膚および呼吸器感作性試験の最近の動向, 日衛誌, 65, 14-19, 2010.
- 5) 産業衛生学会: 許容濃度等の勧告 (2014年度), 産衛誌, 56, 162-188, 2014.
- 6) Mekenyan O., Patlewicz G., Kuseva C., Popova I., Mehmed A., Kotov S., Zhechev T., Pavlov T., Temelkov S., Roberts W.D.: A mechanistic approach to modeling respiratory sensitization, *Chem. Res. Toxicol.*, 27, 219-239, 2014.
- 7) 辻田恭子・足利太可雄: 皮膚感作試験代替法開発への取り組み, *Fragrance Journal*, 2014-9, 27-31, 2014.
- 8) Gerberick G.F., Vassallo J.D., Bailey R.E., Chaney J.G., Morrall S.W., Lepoittevin J.P.: Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens, *Toxicol. Sci.*, 81, 332-343, 2004.
- 9) OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG 442C (In Chemico Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay).
- 10) Lalko J.F., Kimber I., Gerberick G.F., Foertsch L.M., Api A.M., Dearman R.J.: The direct peptide reactivity assay: Selectivity of chemical respiratory allergens, *Toxicol. Sci.*, 129, 421-431, 2012.
- 11) 河上強志・伊佐間和郎・松岡厚子・西村哲治: 防カビ剤として用いられたフマル酸ジメチルによる接触皮膚炎, *J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.*, 6, 339-350, 2012.
- 12) Aizawa A., Ito A., Masui Y., Ito M.: Case of allergic contact dermatitis due to 1,3-butylene glycol, *J. Dermatol.*, 41, 815-816, 2014.
- 13) Sugiura M., Hayakawa R., Kato Y., Sugiura K., Hashimoto R., Shamoto M.: Results of patch testing with 1, 3-butylene glycol from 1994 to 1999, *Environ. Dermatol.*, 8, 1-5, 2001.
- 14) JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会: 皮膚感作性試験評価報告書 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA): ペプチド結合性試験 平成 27 年 2 月 6 日, http://www.jacvam.jp/files/news/20150303_1.pdf
- 15) 今村真也・足立厚子・白井成鎬・井上友介・前山泰彦・島田恭子・森あゆみ・佐々木和実: 購入 3 日目天日干し後に着用したブラジャー紐に一致して出現した, di (2-ethylhexyl) maleate による接触皮膚炎, *J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.*, 9, 436, 2015.

Table 1. CAS No, logKow, boiling point, and supplier of chemicals studied.

Chemicals	CAS No.	logKow	Boiling point (°C)	Supplier ^a	
Cinnamic aldehyde	14371-10-9			T	Positive control
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7			W	
Oxazolone	15646-46-5			T	
Formaldehyde	50-00-0			W	
Benzylideneacetone	122-57-6			T	
Farnesal	19317-11-4			W	Proficiency substances
2,3-Butanedione	431-03-8			T	
1-Butanol	71-36-3			W	
6-Methylcoumarin	92-48-8			T	
DL-Lactic Acid	50-21-5			T	
4-Methoxyacetophenone	100-06-1			T	
Ethylene glycol	107-21-1	-1.36	196	T	
Propylene glycol	57-55-6	-0.92	188	K	
1,2-Butanediol	584-03-2	-0.34	194	T	
1,3-Butanediol	107-88-0	-0.29	207	T	
1,4-Butanediol	110-63-4	-0.83	228	T	
2,3-Butanediol	513-85-9	-0.92	182	T	
Hexylene glycol	107-41-5	0.58	197	T	
Diethylene glycol	111-46-6	-1.98	245	T	
Dipropylene glycol	110-98-5 ^b	-0.7~-1.5	232	T	
Diethylene glycol monoethylether	111-90-0	-0.15	196	T	
3-Methoxy-3-methylbutanol	56539-66-3	0.18	174	T	
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	6846-50-0	4.91	280	T	Test substances
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate	25265-77-4	3.00	244~247	A	
2-Ethyl-1-hexanol	104-76-7	2.28	187	T	
Butyl acetate	123-86-4	1.82	126	T	
Dimethyl maleate	624-48-6	0.22	205	T	
Diethyl maleate	141-05-9	1.48	225	T	
Dibutyl maleate	105-76-0	3.38	161	T	
Diethylhexyl maleate	142-16-5	7.88	173	T	
Dimethyl fumarate	624-49-7	0.74	104	T	
Diethyl fumarate	623-91-6	2.20	219	W	
Dibutyl fumarate	105-75-9	3.49	285	T	
Diethylhexyl fumarate	141-02-6	7.25	197	T	

^a K: Kanto Chemical Co., Inc., T: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., W: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., A: Alfa Aesar

^b Mixture of three isomers. CAS number were described on the product label.

Table 2. Predicted skin sensitisation hazards and peptide depletion (%) of proficiency substances.

Proficiency substances	Predicted skin sensitisation hazards		Peptide depletion (%)			
			This study		OECD requirement	
	LLNA	DPRA	Cysteine	Lysine	Cysteine	Lysine
2,4-Dinitrochlorobenzene	Sensitiser (extreme)	Positive	100	30	90-100	15-45
Oxazolone	Sensitiser (extreme)	Positive	68	53	60-80	10-55
Formaldehyde	Sensitiser (strong)	Positive	54	4.1	30-60	0-24
Benzylideneacetone	Sensitiser (moderate)	Positive	93	63	80-100	0-7
Farnesal	Sensitiser (weak)	Positive	10	5.8	15-55	0-25
2,3-Butanedione	Sensitiser (weak)	Positive	78	27	60-100	10-45
1-Butanol	Non-sensitiser	Negative	1.1	0.68	0-7	0-5.5
6-Methylcoumarin	Non-sensitiser	Negative	0.86	0.89	0-7	0-5.5
DL-Lactic Acid	Non-sensitiser	Negative	0.51	0.88	0-7	0-5.5
4-Methoxyacetophenone	Non-sensitiser	Negative	1.6	0.47	0-7	0-5.5

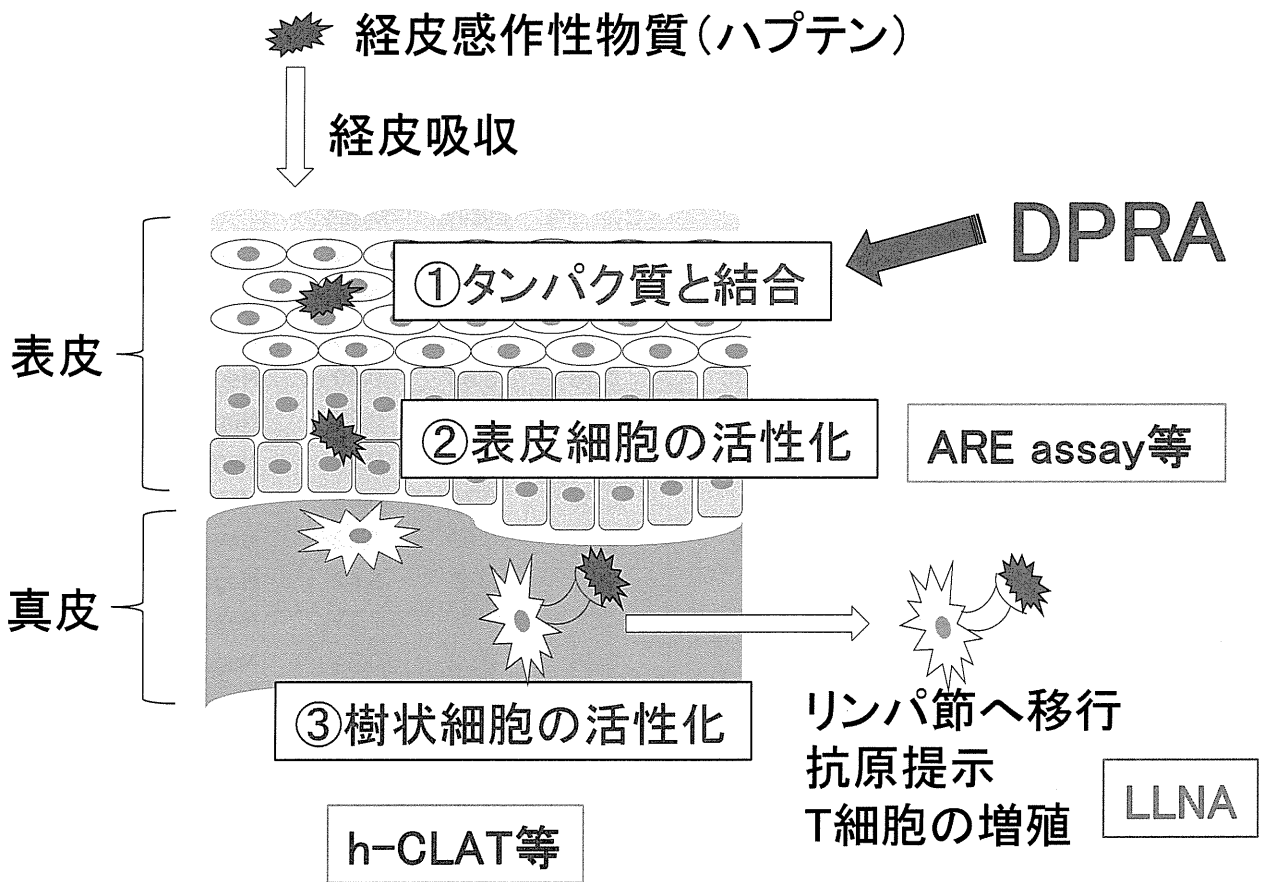
Table 3. Prediction models of DPRA.

Prediction model	Prediction	Mean of cysteine and lysine % depletion	Reactivity Class
Cys-peptide 1:10 Lys-peptide 1:50 Prediction model	Negative	$0\% \leq \text{mean \% depletion} \leq 6.38\%$	No or minimal reactivity
		$6.38\% < \text{mean \% depletion} \leq 22.62\%$	Low reactivity
	Positive	$22.62\% < \text{mean \% depletion} \leq 42.47\%$	Moderate reactivity
		$42.27\% < \text{mean \% depletion} \leq 100\%$	High reactivity
Cys-peptide 1:10 Prediction model	Negative	$0\% \leq \text{mean \% depletion} \leq 11.89\%$	No or minimal reactivity
		$11.89\% < \text{mean \% depletion} \leq 23.09\%$	Low reactivity
	Positive	$23.09\% < \text{mean \% depletion} \leq 98.24\%$	Moderate reactivity
		$98.24\% < \text{mean \% depletion} \leq 100\%$	High reactivity

Table 4. Results of DPRA for chemicals.

Chemicals	Depletion (%)			Prediction	Lys/Cys
	Cysteine	Lysine	Mean		
Ethylene glycol	0.65	0.82	0.74	Negative	- ^a
Propylene glycol	0.35	0.62	0.48	Negative	-
1,2-Butanediol	0.27	0.94	0.60	Negative	-
1,3-Butanediol	0.16	0.63	0.40	Negative	-
1,4-Butanediol	0.019	0.55	0.28	Negative	-
2,3-Butanediol	0.21	0.81	0.51	Negative	-
Hexylene glycol	0.37	0.75	0.56	Negative	-
Diethylene glycol	0.64	0.99	0.82	Negative	-
Dipropylene glycol	0.63	1.2	0.92	Negative	-
Diethylene glycol monoethylether	3.2	1.0	2.13	Negative	-
3-Methoxy-3-methylbutanol	0.45	0.22	0.34	Negative	-
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	1.0	0.38	0.69	Negative	-
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate	1.9	0.51	1.21	Negative	-
2-Ethyl-1-hexanol	1.3	0.36	0.82	Negative	-
Butyl acetate	1.3	0.36	0.81	Negative	-
Dimethyl maleate	100	83	91.6	Positive (high)	0.83
Diethyl maleate	100	81	90.3	Positive (high)	0.81
Dibutyl maleate	100	36	68.2	Positive (high)	0.36
Diethylhexyl maleate	5.45	-0.32	2.56	Negative	-
Dimethyl fumarate	100	46.1	73.1	Positive (high)	0.46
Diethyl fumarate	100	46.2	73.1	Positive (high)	0.46
Dibutyl fumarate	100	10.7	55.3	Positive (high)	0.11
Diethylhexyl fumarate	8.6	0.5	4.6	Negative	-

^a Not evaluated.



- Adverse Outcome Pathway (AOP)**
- ①化学物質とタンパク質との結合
 - ②ケラチノサイトにおける炎症性応答および遺伝子発現
 - ③樹状細胞の活性化
 - ④リンパ節におけるT細胞の増殖

Fig. 1 皮膚感作性のメカニズムとそれに対応した代替試験法
(引用文献7より改変)