

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2007 ～ 2009
 課題番号： 19390160
 研究課題名（和文） フロン代替物質神経毒性の分子・細胞標的解析と中枢神経障害バイオマーカーの確立
 研究課題名（英文） Analysis of molecular and cellular targets in neurotoxicity of alternatives to ozone-depleting substances and establishment of biomarkers for the central nervous toxicity
 研究代表者
 市原 学 (Ichihara Gaku)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号： 90252238

研究成果の概要（和文）：脳の一部位中では海馬と大脳皮質において 1-ブロモプロパン曝露による神経伝達物質遺伝子発現への影響が大きいことがわかった。3 系統のマウスおよび Nrf2 ノックアウトマウスを用いた実験により、曝露に対する感受性には、CYPIIE1、グルタチオン系が寄与し、酸化ストレスが毒性作用と関係していることが明らかにされた。また、蛋白中システインが分子標的の一つであることが付加物解析により明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The present study revealed that the cerebrum and hippocampus are the most susceptible brain regions to 1-bromopropane exposure, regarding suppression of gene expression of neurotransmitter receptors. Experiments using three inbred mice and Nrf2-null mice showed that CYP1IE1 and glutathione pathway contribute to the susceptibility and oxidative stress is involved in the toxicity of 1-bromopropane. Moreover, study on protein adducts revealed that cysteine in the protein is one of the molecular targets of 1-bromopropane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ブロモプロパン、神経毒性、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景
 1996年の先進国でのフロン生産禁止に引き続

き、2010年までには代替フロンHCFCの使用が終了する。これに伴い、フロン代替溶剤1-ブ

ロモプロパン(1BP)が日本、米国、韓国、イタリア、フランスに導入されている。私たちは1BPの神経毒性を、ヒト症例が発生する以前に動物実験によって発見した(Yu1998, Ichihara2000b)。一方、米国において1BP中毒症例が発見された。市原はNorthCarolinaのクッション工場で働く3人の労働者の神経障害を記述した(Ichihara2002)。さらに最近、Utah州において新しい1BPの重症例6例が報告された(Majersik 2004)。この症例ではSpasticな麻痺に加えて認知機能の障害が著しく、高次中枢神経系の障害が疑われた。認知機能の低下は、中国1BP製造工場労働者においても観察されており(Ichihara2004)、1BPの高次中枢神経系に対する障害作用を明確に示している。

初期動物実験は毒性解明の糸口になったものの、そこには大きな限界があった。中枢神経系はその修復機能、組織構築上の頑健性のために病理組織学的な評価がきわめて困難な組織である。初期の動物実験では800ppmで「大脳」の重量が低下し(Ichihara2000b)、引き続き研究で神経特異蛋白の「大脳」における低下(Wang2002, 3003)を観察している。これらの研究で用いられた伝統的なサンプリング法での「大脳」とは、神経解剖学的は大脳皮質、扁桃核、梨状葉、海馬、Caudate-Putamen(線条体)を含んでいた。これらの指標は確かに中枢神経影響を定量化したという点での前進はあったが、必ずしもヒト症候や毒性機序を説明するものではなく、意味付けが困難であった。

2. 研究の目的

最新のヒト症例と動物実験から得られた知見を参考にし、中枢神経障害機序と障害局在の特定を行うために、1BP曝露に対する感受性要因を動物において明らかにする。同時に、1BPにより形成される蛋白付加物を明らかにする。以上より1BPによる中枢神経影響と、曝露のバイ

オマーカーを探索する。

3. 研究の方法

(実験1) 1BPによる神経伝達物質受容体発現への影響を調べることにより、中枢神経影響マーカ探索、マイクロアレイ解析に適した高感受性部位を調べた。36匹のF344ラットを9匹ずつの4群に分け、0、400、800、1000ppmの1BPに一日8時間、週7日、4週間吸入曝露を行った。曝露終了時に、ラットを断頭し、脳を剖出、分割し、急速凍結した。脳各部位の神経伝達物質受容体mRNA発現量を定量リアルタイムPCR法にて定量するとともに、ウェスタンブロット法にて蛋白レベルでの発現も確認した。

(実験2) 1BP曝露に対する3つの近交系マウスC57BL/6J, DBA/2J, BALB/cAの感受性を比較した。各系統マウスを6匹ずつ4群に分け、0、50、110、250ppmの1BPに一日8時間週7日4週間吸入曝露をおこなった。

(実験3) 1BPの肝臓毒性における作用機序を明らかにするために、転写因子Nrf2ノックアウトマウス(KOマウス)を用いて実験を行い、酸化ストレスの関与を明らかにした。Nrf2-KOマウスおよび野生型C57BL/6Jマウスを1BPに0、100、300ppm、一日8時間週7日4週間吸入曝露を行った後、断頭採血し肝臓を剖出、凍結保存を行った。

(実験4) ラット尿中N-アセチルプロピルシステイン(AcPrCys)とグロビン、ニューロフィラメント蛋白のS-プロピルシステイン(PrCys)付加物の定量法を確立し、1BP曝露レベルと曝露期間依存性を明らかにした。AcPrCysはLC/MS/MSおよびGC/MSにて測定し、PrCys付加物はLC/MS/MSにて測定した。

(実験5) 1BP毒性の可逆性をラットで調べた。ラットを24匹ずつ3群に分け、0、400、1000ppmの1BPに一日8時間、週7日、6週間曝露し、8

匹ずつ、曝露終了時、曝露終了4週間後、14週間後に断頭した。

4. 研究成果

(実験1) 海馬では 5HTr2a、D2R、GABAA1 の mRNA 発現量は量依存的に減少し、大脳皮質では 5HTr1a、5HTr2a、D1R および GABAA1 の mRNA 発現量が 800ppm で有意に減少していた。海馬の D2R 受容体、橋/延髄の 5HTr1a、5HTr3a 受容体 mRNA 遺伝子発現が最も敏感な指標であった。

(実験2) 肝臓の壊死領域は BALB/cA > C57BL/6J > DBA/2J の順に大きかった。BALB/cA は DBA/2J に比して CYP 2E1 蛋白量が高く、総グルタチオンおよびグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) レベルは低かった。3系統中、BALB/cA が 1BP 肝臓毒性に関し最も感受性が高く、CYP 2E1、グルタチオンおよび GST 量が感受性に寄与していることが示唆された。50ppm の 1BP によって精巣上体精子数、運動率が減少し、頭部形態異常精子率が、どの系統でも有意に増加しており、以前のラット実験と比べると、マウスがラットよりも雄性生殖毒性、肝臓毒性に関し感受性が高いことも明らかとなった。

(実験3) KO マウスは、野生型マウスに比べ、同じ曝露濃度で、有意に肝臓壊死領域が大きかった。また、KO マウスでは脂質過酸化の指標であるマロンジアルデヒド、GSSG/GSH 比が高く、総グルタチオン量が低かった。GST の元々のレベルそして、増加率が、KO マウスで野生型に比べて低かった。KO マウスで酸化酵素の発現が低く、MDA が高かったことから、1BP 肝臓毒性への酸化ストレスの関与が明らかになった。

(実験4) ラットにおいて PrCys 付加物と尿中 AcPrCys は、曝露レベルに対して直線的な量依存的関係にあった。1BP 曝露労働者では、

非曝露労働者に比べてグロビン PrCys 付加物が有意に増加し、尿中 AcPrCys は曝露量に依存して増加していた。本研究は、1BP が In vivo で蛋白を共有結合によって修飾することを示し、尿中 AcPrCys およびグロビン PrCys がヒトにおける 1BP 曝露のバイオマーカーとして有用であることを示した。

(実験5) 6週間曝露後、1000ppm 曝露群では、精巣、精巣上体、前立腺、精囊の重量、精子数、精子運動率は低下し、形態異常精子は増加し、精巣で精子形成細胞のびまん性変性を起こしていた。対照群レベルに回復した前立腺および精囊重量を除くと、上記変化は、曝露終了後14週においても回復しなかった。400ppm で増加していた遅延精子細胞は曝露終了後4週で正常化した。これまで、1BP の精巣における作用は、精祖細胞を標的とする2-ブロモプロパン (2BP) とは違うと考えられてきた。しかし本研究により、1BP の精子形成に対する影響は量依存的であり、低濃度では精子放出障害、ホルモン依存性臓器重量を減少させるものの、これらの変化は一過性であること、高濃度 1000ppm では 1BP は精子形成細胞を枯渇させ、2BP の作用と似てくることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Liu F, Ichihara S, Valentine WM, Itoh K, Yamamoto M, Mohideen SS, Kitoh J, Ichihara G. Increased susceptibility of Nrf2 null mice to 1-bromopropane-induced hepatotoxicity. Toxicological Sciences 2010, in press (査読有)
2. Liu F, Ichihara S, Mohideen SS, Sai U, Kitoh J, Ichihara G. (査読有)
Comparative study on susceptibility to 1-bromopropane in three mice strains. Toxicological Sciences 112:100-10, 2009
3. Mohideen SS, Ichihara S, Banu S, Liu F, Kitoh J, Ichihara G. Changes in

- neurotransmitter receptor expression levels in rat brain after 4-week exposure to 1-bromopropane. *Neurotoxicology* 30: 1078-83, 2009 (査読有)
4. Ichihara S, Yamada Y, Gonzalez FJ, Nakajima T, Murohara T, Ichihara G. Inhibition of ischemia-induced angiogenesis by benzo[a]pyrene in a manner dependent on the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 381 : 44-49 ,2009 (査読有)
 5. Huang F, Ning H, Xin QQ, Huang Y, Wang H, Zhang ZH, Xu DX, Ichihara G, Ye DQ. Melatonin pretreatment attenuates 2-bromopropane-induced testicular toxicity in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 75- 82 , 2009 (査読有)
 6. Donaldson K, Oberdorster G, Ichihara G, Maynard A, Stone V, Borm P, Aitken R. Nanoparticles: one word: a multiplicity of different hazards. *Biochem Biophys Res Commun* 3: 263 - 264 , 2009 (査読有)
 7. 市原学.有機溶剤中毒と尿検査.総合臨床 58 : 1269-1271 ,2009 (査読無)
 8. Endo M, Tsuruoka S, Ichihara G. Carbon Nanotubes in historical and future perspective: summary of an extended session at Carbon 2008 in Nagano (JP). *Part Fibre Toxicol* 2008; 5:21. (査読有)
 9. Liu Y, Song W, Li W, Ichihara G. In vitro cytotoxicity and oxidative damage effects of multi-wall carbon nanotube on RAW246.7 macrophages. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2008; 37: 281-4. (in Chinese). (査読有)
 10. Ichihara G, Castranova V, Tanioka A, Miyazawa K. Re: Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci* 2008; 33:381-2. (査読有)
 11. Furuhashi K, Ogawa M, Suzuki Y, Endo Y, Kim Y, Ichihara G. Methylation of dimethyltin in mice and rats. *Chemical Research in Toxicology* 2008; 21:467-71. (査読有)
 12. Ramdhan DH, Kamijima M, Yamada N, Ito Y, Yanagiba Y, Nakamura D, Okamura A, Ichihara G, Aoyama T, Gonzalez FJ, Nakajima T. Molecular mechanism of trichloroethylene-induced hepatotoxicity mediated by CYP2E1. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 231: 300-7. (査読有)
 13. Yamanoshita O, Ichihara S, Hama H, Ichihara G, Chiba M, Kamijima M, Takeda I, Nakajima T. Chemopreventive Effect of Selenium-Enriched Japanese Radish Sprout against Breast Cancer Induced by 12-Dimethylbenz[a]anthracene in Rats. *Tohoku J Exp Med*. 212: 191-8, 2007 (査読有)
 14. Ito Y, Yamanoshita O, Asaeda N, Tagawa Y, Lee C, Aoyama T, Ichihara G, Furuhashi K, Kamijima M, Gonzalez FJ, Nakajima T. Di(2-ethylhexyl)phthalate induces hepatic tumorigenesis through a peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent pathway. *J Occup Health*. 49: 172-82. 2007 (査読有)
 15. Ichihara S, Yamada Y, Ichihara G, Nakajima T, Kondo T, Gonzalez FJ, Murohara T. A role for the aryl hydrocarbon receptor in regulation of ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1297-1304, 2007 (査読有)
 16. Ichihara S, Yamada Y, Kawai Y, Osawa T, Furuhashi K, Duan Z, Ichihara G. Roles of oxidative stress and Akt signaling in doxorubicin cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 359: 27-33, 2007 (査読有)
 17. Matsushita A, Iwase M, Kato Y, Ichihara S, Ichihara G, Kimata H, Hayashi K, Hashimoto K, Yokoi T, Noda A, Koike Y, Yokota M, Nagata K. Differential cardiovascular effects of endotoxin derived from *Escherichia coli* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp Anim* 56: 339-48, 2007 (査読有)
 18. Valentine H, Amarnath K, Amarnath V, Li W, Ding X, Valentine WM, Ichihara G. Globin S-propyl cysteine and urinary N-acetyl-S-propylcysteine as internal biomarkers of 1-bromopropane exposure. *Toxicological Sciences* 98: 427-35, 2007 (査読有)
 19. Banu S, Ichihara S, Huang F, Ito H, Inaguma Y, Furuhashi K, Fukunaga Y, Wang Q, Kitoh J, Ando H, Kikkawa F, Ichihara G. Reversibility of the adverse effects of 1-bromopropane exposure in rats. *Toxicological Sciences* 100: 504-12, 2007 (査読有)

〔学会発表〕 (計 35 件)

1. Fang Liu, Sahoko Ichihara, William M. Valentine, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto, Sahabudeen Sheik Mohideen, Junzoh Kitoh, Gaku Ichihara. Nrf2 null mice are more susceptible to 1-bromopropane-induced hepatotoxicity. The 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2010.3.7-11, Salt lake city, USA)
2. Yuka Suzuki, Sahoko Ichihara, Ai Kato, Takanori Yamaguchi, Yoshiji Yamada, Gaku Ichihara. N-acetyl-L-cysteine prevents the toxic effects of hyperphosphatemia and hypozincemia on the testicular function in WKY, but not in SHR/NDmcr-cp, a model of metabolic syndrome. The 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2010.3.7-11, Salt lake city, USA)
3. Gaku Ichihara, Weihua Li, Yuji Fujitani, Sahoko Ichihara, Xuncheng Ding, Ying Liu, Qiangyi Wang, Uka Sai, Natsumi Hata, Takahiro Kobayashi. Exposure assessment and evaluation of health status in workers handling titanium dioxide. The 4th International Conference on Nanotechnology (2009.8.29-29, Helsinki, Finland)
4. Ichihara G. Epidemiological Study on workers handling titanium dioxide (招待講演) . Symposium on the social acceptance of nanomaterials, NIMS WEEK 2009 (2009.7.24, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan)
5. Ichihara G., Li W, Shibata E, Zhou Z, Ichihara S., Wang Q, Li J, Ding X, Takeuchi Y. Dose-dependent neurological and hematological effects of 1-bromopropane exposure on workers. The 29th International Congress on Occupational Health (2009. 3. 22-27, Cape Town, South Africa)
6. Ichihara S., Li W, Kobayashi T, Ding X, Fujitani Y, Liu Y, Wang Q, Cui U, Hata N, Ichihara G. Occupational Health Survey on workers handling titanium dioxide. The 29th International Congress on Occupational Health (2009. 3. 22-27, Cape Town, South Africa)
7. Ichihara G., Li W, Kobayashi T, Ding X, Fujitani Y, Liu Y, Sai U, Hata N, Wang Q, Ichihara S. Exposure assessment and health examination of workers handling titanium dioxide. The 48th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2009. 3. 15-19, Baltimore, USA)
8. Ichihara S., Yamada Y, Ichihara G., Nakajima T, Gonzalez E.J, Murohara T. Inhibition of ischemia-induced angiogenesis by benzo[a]pyrene in a manner dependent on aryl hydrocarbon receptor. The 48th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2009. 3. 15-19, Baltimore, USA)
9. Ichihara G. Animal experiments and human studies in risk assessment of manufactured nanomaterials. International Workshop at Nagoya University “Recent Progress in EHS Research on Manufactured Nanomaterials.” (2008. 12.12, Nagoya, Japan)
10. Ichihara G., Li W, Kobayashi T, Ding X, Fujitani Y, Liu Y, Wang Q, Cui U, Hata N, Ichihara S. Assessment of exposure and health status in workers handling titanium dioxide. Internatoinal Conference on safe production and use of nanomaterials, NANOSAFE 2008 (2008. 11.03-07, Minatec, Grenoble, France)
11. Ichihara G., Li W, Kobayashi T, Ding X, Fujitani Y, Liu Y, Wang Q, Cui U, Hata N, Ichihara S. Occupational Health Survey on workers handling titanium dioxide. The 45th Congress of the European Societies of Toxicology (2008. 10. 5-8, Rhodes, Greece)
12. Ichihara G. Recent studies of bromopropane toxicity-animal studies and newly found human cases in United States. China-Japan Collaboration Workshop “Environmental Health and Safety Research on new manufactured materials”.(2008. 7. 30-31, Shanghai, China)
13. Ichihara G. Microarray study on bromopropane toxicity. China-Japan Collaboration Workshop “Environmental Health and Safety Research on new manufactured materials”.(2008. 7. 30-31, Shanghai, China)
14. Ichihara G. International collaboration and coordination of nanotoxicology research. China-Japan Collaboration Workshop

- “Environmental Health and Safety Research on new manufactured materials”.(2008. 7. 30-31, Shanghai, China)
15. Furuhashi K, Ogawa M, Suzuki Y, Endo Y, Ichihara G. Methylation of dimethyltin in mice and rats. The 47th Annual Meeting of Society of Toxicology (2008.3.16-20 Seattle, Washington, USA)
 16. Sheik Mohideen S, Ichihara S, Liu F, Furuhashi K, Li W, Ichihara G. Effect of 1-bromopropane exposure on gene expression of neurotransmitter receptors in rat. The 47th Annual Meeting of Society of Toxicology (2008.3.16-20 Seattle, Washington, USA)
 17. Ichihara G. Neurotoxicity and reproductive toxicity of 1-bromopropane, an alternative to ozone-depleting solvents. International Conference on “Toxic Exposure Related Biomarker : Genomes and Health Effects” (2008.1.10-11, National Environmental Engineering Research Institute, Nagpur, India)
 18. Sahabudeen S, Ichihara G. Effect of 1-bromopropane exposure on gene expression of neurotransmitter receptors and exploration of biomarkers for the central nervous system toxicity. The 24th International Neurotoxicology Conference (2007.11-14, San Antonio, TX, US)
 19. Ichihara G. Environment, Health and Safety Research on Manufactured Nanomaterials. The 13th International Symposium on Toxicity Assessment (2007.8.19-24, Toyama, Japan)
 20. Huang F, Ichihara S, Kitagawa E, Mizugami S, Iwahashi H, Kito J, Furuhashi K, Banu S, Iida M, Ichihara G. DNA microarray study with two dimensional analysis on susceptibility to 1-bromopropane exposure. The 11th International Congress of Toxicology (2007.7.15-19, Montreal, Canada)
 21. Li W, Wang Q, Ding X, Shibata E, Takeuchi Y, Valentine W, Ichihara G. Dose-dependent effects of 1-bromopropane exposure on workers. The 18th Korea Japan China Joint Conference on Occupational Health (2007.5.20-22, Nagoya, Japan)

22. Ichihara G. Occupational Health Survey on workers handling nano-titanium dioxide. Roundtable on Nanotechnology and engineered nanoparticles: Research perspectives in Occupational Health and Safety (2007.2.12, Canadian Embassy, Tokyo, Japan)

(ほか 13 件学会発表)

〔図書〕 (計 1 件)

1. 工業業ナノ素材の環境、健康、安全性研究戦略と労働現場におけるナノ粒子測定、健康調査、市原 学、ナノ材料のリスク評価と安全性対策、印刷中、フロンティア出版、東京、2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市原 学 (ICHIHARA GAKU)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90252238

(2) 研究分担者

市原 佐保子 (ICHIHARA SAHOKO)
三重大学・生命科学研究支援センター・准教授
研究者番号：20378326

(3) 連携研究者

田中 輝幸 (TANAKA TERUYUKI)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10246647
伊東 秀記 (ITO HIDENORI)
愛知県コロニー発達障害研究所・神経制御・研究員
研究者番号：40311443
束村 博子 (TSUKAMURA HIROKO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：00212051
岩橋 均 (IWAHASHI HITOSHI)
産業技術総合研究所・主任研究員
研究者番号：60356540
尾崎 紀之 (OZAKI NORIYUKI)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：40244371
杉浦 康夫 (SUGIURA YASUO)
名古屋大学・医学系研究科・理事
研究者番号：50093042
山本 敏充 (YAMAMOTO TOSHIMICHI)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50260592