

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月10日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659123

研究課題名（和文）トリクロロエチレンによる重症皮膚－肝障害は活性代謝物の蛋白質付加体が抗原となる

研究課題名（英文）Trichloroethylene-induced hypersensitivity may be caused by its active metabolite-protein adducts

研究代表者

那須 民江 (Tamie Nasu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10020794

研究成果の概要（和文）：雌雄のモルモットを用いて、トリクロロエチレン、トリクロロエタノールおよびトリクロロ酢酸のマキシミゼーションテストを行った。トリクロロエチレンの皮膚の感作率は雄70%、雌90%、トリクロロエタノールは雄20%、雌50%であった。しかし、トリクロロ酢酸は雄10%、雌0%で、殆ど感作性を示さなかった。トリクロロエチレンに感作した皮膚には好酸球浸潤が、肝臓には巣状壊死とその周囲にリンパ球浸潤が見られた。これらの所見はトリクロロエタノール曝露群でも観察されたが、程度はトリクロロエチレンより低かった。トリクロロエチレン曝露は血漿 γ GTPとインターフェロン γ 値を上昇させたが、その他の曝露による上昇は観察されなかった。

研究成果の概要（英文）：We investigated skin and liver damages associated with trichloroethylene-, trichloroethanol- and trichloroacetic acid-induced hypersensitive skin reactions in the hartley guinea pig maximization test. The sensitization rates of trichloroethylene-induced dermal allergy were 70% in male guinea pigs, and 90% in female ones. Those of trichloroethanol were 20% in male guinea and 50% in female ones, while only a minor sensitization was seen after trichloroacetic acid treatment. In relation to the sensitization, eosinocytes were seen in the skin, and infiltration of lymphocytes was seen around focal necrosis in the liver. These changes were seen most prominent in trichloroethylene-exposed animals, followed by trichloroethanol. Trichloroethylene exposure also increased plasma γ GTP and interferon γ levels, while trichloroethanol and trichloroacetic acid did not.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	360,000	3,060,000

研究分野：社会医学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：インターフェロン γ 、肝臓、 γ GTP、好酸球、CYP2E1、トリクロロエチレン、トリクロロエタノール、トリクロロ酢酸、皮膚

1. 研究開始当初の背景

アジアの途上国を中心に TRI による新しい職業病（全身性の皮膚—肝障害）の発生が注目(Nakajima et al., J Occup Health 2003)されてから約 10 年が経過し、申請者らの調査によってその病態が明らかにされてきた。即ち、この疾患は、TRI 曝露から 1 ヶ月前後で発症、皮膚の病型は剥脱性皮膚炎、多形紅斑、Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死融解症に分類される (Huang et al., J Occup Health 2006; Kamijima et al., 同雑誌 2007)。肝障害は必発であり、85%の患者においてはヒトヘルペスウイルス 6 型の再活性化が見られる等遅発性アレルギーの病態を示し、臨床的には重症薬疹に類似している。患者の多くに TNF α 、IL-10 の上昇が認められる。一方で、申請者らはマキシミゼーション法を用い、この疾病のモデル動物作製に成功した(Tang et al., J Occup Health 2008)。この方法では 66%に皮膚炎が見られ、ALT、AST 値は皮膚炎が見られなかった動物に比べ有意に高かった。しかし、このメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

経済協力開発機構 OECD 毒性試験ガイドライン (No.406) に沿って、雄と雌のモルモット 10 匹及び対照群 5 匹に、トリクロロエチレンと代謝物のトリクロロエタノールおよびトリクロロ酢酸を塗布して、モルモットマキシミゼーションテストを行い、感受性の性差および原因物質（トリクロロエチレンかその代謝物か）を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

経済協力開発機構 OECD 毒性試験ガイドライン (No.406) に沿って、雄と雌のモルモット 10 匹及び対照群 5 匹に、トリクロロエチレンと代謝物のトリクロロエタノールおよびトリクロロ酢酸のマキシミゼーションテストをおこなった。投与量を比較するため、最初の皮下投与後に採尿し、代謝物濃度を GC-MS で測定した。皮膚と肝臓はホルマリン固定後 HE 染色を行い、顕微鏡下で病理的变化を観察した。

4. 研究成果

4-1. 皮膚感作率

皮膚の感作率はトリクロロエチレンの場合、雄 70%、雌 90%、TCE の場合、雄 20%、雌 50%であった。TCA は雄が 1 匹のみ感作した。

表 1 皮膚感作率

	Male	Female
TRI	70%	90%
TCA	10%	0%
TCE	20%	50%

4-2. 皮膚・肝臓病理

皮膚の病理像は、好酸球・リンパ球浸潤、浮腫、微小水泡についてスコアリングを行った。トリクロロエチレン群の場合真皮層に好酸球が多く見られ、これはパッチテストで 2 と判定された動物に多かった。トリクロロエタノール及びトリクロロ酢酸群の場合、好酸球は軽度観察されたが、その程度はトリクロロエチレン群の場合より軽度であった。一方、肝臓の病理所見は、脂肪滴、炎症細胞浸潤、壊死について評価したが、すべての群で大部分正常組織像であった。しかし、トリクロロエチレンの場合、肝臓辺縁部と中心部に局所的な層状壊死とその周辺のリンパ球浸潤および空胞化が限局的に観察された。トリクロロエタノール群では肝臓辺縁部にごく軽度の壊死が、トリクロロ酢酸群では肝臓辺縁部に

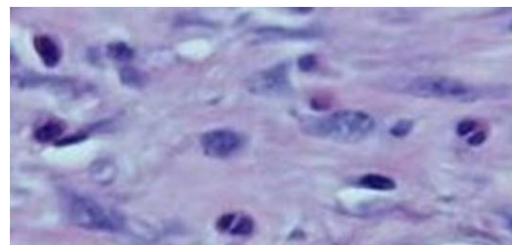


図 1 トリクロロエチレン曝露後の皮膚の病理 (好酸球が観察された)

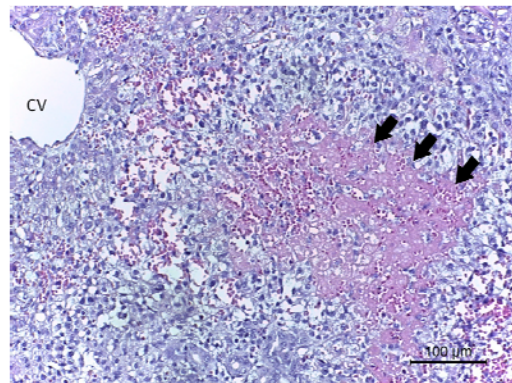


図 2 多数のリンパ球浸潤及び巣状壊死像を認めた。矢印は巣状壊死像 (トリクロロエチレン曝露雄モルモット)

局所的な層状壊死とその周辺のリンパ球浸潤がわずかに見られた。

以上の様に、皮膚や肝臓に大きな病理的变化をもたらすのはトリクロロエチレンであることが明らかとなった。しかし、トリクロロエタノールの関与も否定できなかった。ついで、トリクロロエチレン代謝に関わるCYP2E1の蛋白発現を検討した。トリクロロエチレン群の肝臓ではCYP2E1が明らかに誘導されていた。一方、トリクロロエタノール群では雌のみ対照群に比べ有意に蛋白発現が増加しており、逆にトリクロロ酢酸群では雄で有意に蛋白発現が増加していた。また、肝機能マーカーである血清ALT及びASTをWakoのキットを用い測定したが、各群に有意差は認められなかった。

4-3. プロテオミクス解析

抗体を作成する前段階として、電気泳動で70kD付近にトリクロロエチレン曝露による特徴的な強いバンドが発現していたので、このバンドをカットして、プロテオミクス解析を行った。HSP70、HSP70の一種である小胞体ストレスマーカーのGRP78とunknown proteinが抽出された。HSP70とGRP78をWestern Blot分析をしたが、いずれもトリクロロエチレン曝露による増強は認められなかった。トリクロロエチレン曝露によるUnknown proteinのペプチド解析結果を参考に抗体を作成しようとしたが、うまくいかなかった。

4-4. 肝機能および免疫反応

視点を変えて、肝機能や免疫反応に関わるメカニズム解析を行った。肝機能検査では、トリクロロエチレン曝露によってALTやASTのトランスアミナーゼよりも γ GTP値の上昇が、特に雌モルモットで強く観察された。遅延性の4型アレルギーを想定して、CD4、CD8、TNF α の免疫染色を試みたが、うまく染色出来なかった。また、血漿を用いた免疫応答の解析をした。IgEの上昇は観察されなかったが、インターフェロン γ (IFN γ)が、トリクロロエチレン曝露によって上昇した。

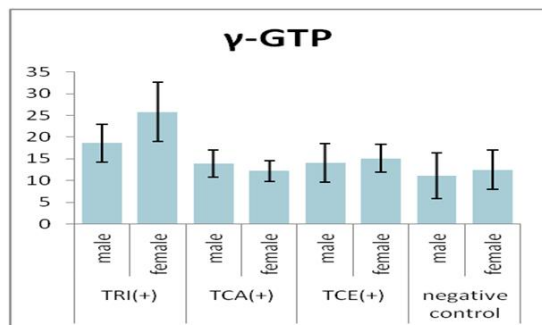


図3 トリクロロエチレン曝露による γ GTP上昇(TRI(*))とControlの間に有意差あり

4-5. CYP2E1の誘導

トリクロロエチレンの主代謝酵素CYP2E1のWestern blot分析と免疫染色を行った。肝臓のCYP2E1発現は明らかに増大し、誘導されていることが確認できたが、皮膚には発現していなかった。即ちCYP2E1による免疫複合体の形成は確認できなかった。以上の結果より、トリクロロエチレンにより引き起こされた皮膚・肝障害はTh1優位の4型アレルギーであることが推察されたが、CYP2E1との関連性はさらに検討が必要である。トリクロロエタノールによってもアレルギー反応が誘導されるが、その関与はトリクロロエチレンに比べると弱いと推察された。

4-6. 尿中代謝物

トリクロロエチレン曝露動物の尿中にはトリクロロエタノールとトリクロロ酢酸が検出された。トリクロロエタノール曝露動物からはトリクロロエタノールとトリクロロ酢酸が検出され、モルモットにおいてもトリクロロエタノールからトリクロロ酢酸の代謝経路があることが確認された。トリクロロ酢酸曝露動物からはトリクロロ酢酸のみが検出された。

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 1 件)

1. Ramdhan DH, Kamijima M, Wang D, Ito Y, Naito H, Yanagiba Y, Hayashi Y, Tanaka N, Aoyama T, Gonzalez FJ, Nakajima T. Differential Response to Trichloroethylene-Induced Hepatosteatosis in Wild-Type and PPAR α -Humanized Mice. Environ Health Perspect.118: 1557-1563, 2010.(査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

1. 内藤久雄、日比野優衣、斉藤優、王棟、趙娜、宋向榮、王海蘭、上島通浩、那須民江. モルモットを用いたトリクロロエチレンによる皮膚・肝障害のメカニズム解析 第85回日本産業衛生学会総会 2012. 5. 31 名古屋 名古屋国際会議場
2. 日比野優衣、内藤久雄、斉藤優、王棟、趙娜、宋向榮、王海蘭、上島通浩、那須民江. トリクロロエチレン曝露による免疫性肝障害に関する研究第82回日本衛生

3. Ramdhan DH, Kamijima M, Wang D, Ito Y, Yanagiba Y, Hayashi Y, Naito H, Gonzalez FJ, Nakajima T.
DIFFERENTIAL RESPONSE TO TRICHLOROETHYLENE-INDUCED HEPATOSTEATOSIS IN WILD-TYPE AND PPARA-HUMANIZED MICE.
XII International Congress of Toxicology 2010.7.19-23
Barcelona-Spain Palau de Congressos de Barcelona

4. Ramdhan DH, 上島通浩, 王棟, 伊藤由起, 柳場由絵, 林由美, 内藤久雄, Gonzalez FJ, 那須民江. トリクロロエチレン誘発性肝障害におけるPPAR α 活性の種差による影響について. 第83回日本産業衛生学会総会 2010.5.28 福井、福井国際交流会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須民江 (中島) (Tamie Nasu)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 10020794

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし