

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659326

研究課題名(和文) 環境化学物質の慢性・晩発性中枢神経毒性メカニズムにおける神経新生の役割

研究課題名(英文) Role of neurogenesis in mechanism of chronic or late-onset toxicity of environmental chemicals to the central nervous system

研究代表者

市原 学 (Ichihara, Gaku)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90252238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、オゾン層破壊化学溶剤の代替物質1-ブロモプロパンへの曝露がラット脳歯状回におけるニューロン新生を抑制し、その作用機序としてノルアドレナリン、Glucocorticoid receptor(GR)、brain-derived neurotropic factor (BDNF)の抑制が考えられた。ノルアドレナリンの変化に対し、セロトニン系の変化は小さかった。歯状回における増殖ニューロン数、ノルアドレナリン、GRまたはBDNFレベルが1-ブロモプロパン中枢神経毒性のバイオマーカーとして利用可能かもしれない。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that exposure to 1-bromopropane, an alternative to ozone-depleting solvents, suppressed neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats and noradrenaline, glucocorticoid receptor (GR), brain-derived neurotropic factor (BDNF) are expected to be involved in suppression of the neurogenesis. Change in serotonin level was minimal compared to the decrease in noradrenaline level. Count of proliferative cell in the dentate gyrus, and the level of noradrenaline, GR or BDNF may be used as biomarkers for the toxicity of 1-bromopropane to the central nervous system.

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：バイオマーカー リスク評価

1. 研究開始当初の背景

(最近の慢性、晩発性中枢神経障害症例の報告)我々はオゾン層破壊物質代替物質 2-ブロモプロパンの生殖、骨髄、神経毒性、1-ブロモプロパンの神経、生殖毒性に関する研究を行ってきた。豪州 1 BP 曝露事例では高濃度短期曝露により記憶障害、抑うつが観察されている(市原 2010)。複数の米国症例の脳 MRI では脳室下領域に異常が見られている。

(中枢神経系の形態学的頑健性)動物実験レベルにおいては、ヒト症例に対応した 1-ブロモプロパンの中枢神経障害を直接に証明する形態学的根拠は限定的である(Ichihara 2000, Fueta 2004)。これは、同じくヒトで中枢神経毒性を有することがわかっているトルエンについてもあてはまる。

(成人ヒト、動物におけるニューロン新生の発見)脳の海馬領域、脳室下領域において神経新生が見られることが最近の研究で明らかになってきている。また、放射線曝露により動物でニューロン新生が抑制されることも報告された(Monje 2002)。しかし、環境化学物質によるニューロン新生への影響については十分に研究されていない。ニューロン新生の抑制、幹細胞への障害が、環境化学物質の慢性影響、晩発性影響を説明するとの仮説を我々は立てた。

2. 研究の目的

近年、環境化学物質によるヒトでの慢性あるいは晩発性神経機能障害が報告されている。本研究では、ニューロン新生に環境化学物質が与える影響を解析することにより、慢性・晩発性影響の作用機序を解明する。具体的には

(1)環境化学物質による中枢神経機能毒性を説明する因子としてニューロン新生が果たす役割を調べ、

(2)ニューロン新生作用に対する影響の作用機序を解明する。

最後に、

(3)ニューロン新生と関連した生物学的指標の中枢神経毒性マーカーとして応用可能であるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

48 匹の雄ウィスターラットを 1 週間馴化の後、1 群 12 匹、4 群に分けた。ラットを 0、400、800、1000ppm の 1-ブロモプロパンに名古屋大学医学部動物実験施設に設置された小動物用有機溶剤吸入曝露装置を用いてチャンバー内で 1 日 8 時間、週 7 日、1 週間曝露した。もう一つの 4 群ラットを最初の 2 週間は 0、400、800ppm、引き続き 2 週間は 0、200、400ppm の 1-ブロモプロパンに曝露した。一部のラットは曝露終了時に 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU)を複数回腹腔注射した後、24 時間後に左心室より 4%パラフォルムアルデヒド固定液を用いて灌

流固定を行った。灌流後 1 時間水で冷却し、脳を剖出後、4%パラフォルムアルデヒド固定液で後固定を行った。凍結切片を作成し、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色によって増殖細胞を可視化した。歯状回において増殖する神経数を計測することでニューロン新生に対する 1-ブロモプロパン曝露の影響を調べた。残りのラットは、断頭後すみやかに前頭皮質、線条体、海馬、扁桃体を剖出、急速凍結保存した。凍結脳組織のホモジェネートを作成し、ニューロン新生と関係する因子としてモノアミンレベル、brain-derived neurotropic factor (BDNF)と glucocorticoid receptor (GR)の mRNA レベルを脳の様々な部位で定量リアルタイム PCR 法によって計測した。ラットから取り出した脳の前頭皮質、線条体、海馬、扁桃体におけるニューロトランスミッターであるノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニンおよびそれらの代謝物の変化を高速液体クロマトグラフィーによって調べた。

次に、48 匹の F344 雄ラットを、1 週間の馴化の後、名古屋大学医学部動物実験施設に設置された小動物用有機溶剤曝露装置を用いて、1-ブロモプロパン 0、200、400、800ppm に一日 8 時間、週 7 日、4 週間曝露した。曝露終了時に麻酔下で頭蓋底と第一頸椎の間に注射針を挿入し、脳脊髄液を採取した。すみやかに脳を剖出し、脈絡叢を採取するとともに、大脳皮質、海馬、小脳、中脳に切り分け、急速凍結保存を行った。Transthyretin の免疫染色を行うとともに、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を用いて血漿中、脳脊髄液中の遊離 triiodothyronine, thyroxine を測定した。

4. 研究成果

BrdU 陽性細胞は、4 週間曝露の最高濃度群で有意に減少していた。800ppm と 1000ppm の 1-ブロモプロパンに 1 週間曝露された群ではノルアドレナリンレベルが線条体で有意に減少していた。4 週間曝露の最高濃度群では、海馬、前頭皮質、線条体においてノルアドレナリンレベルが減少していた。1-ブロモプロパンへの曝露は、海馬における BDNF および GR の mRNA レベルを低下させた。1-ブロモプロパンへの 4 週間曝露が歯状回におけるニューロン新生を抑制することが本研究によって明らかとなった。BDNF と GR の mRNA の低下と、海馬における低ノルアドレナリンレベルは、ニューロン新生の減少に少なくとも部分的に貢献していると考えられる。

1-ブロモプロパンへの 1 週間曝露実験において、線条体におけるノルアドレナリンレベルは 400、800ppm で有意に減少したが、セロトニンとその代謝物は変化しなかった。

3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)/dopamine(DA)比は線条体で量依存的に減少した。Homovanillic acid (HVA)/DA 比は、

400、800ppm 暴露群において前頭皮質で有意に減少していた。1-プロモプロパン 4 週間暴露 (0、200、400、800ppm) では、1 週間暴露で見られた変化がさらに顕著であった。HVA、DOPAC/DA、HVA/DA、(DOPAC+HVA)/DA 比は 1-プロモプロパン 800ppm 暴露群で上昇していた。しかし、海馬セロトニンレベルは濃度と暴露期間に関わらず変化しなかった。一方、海馬ドーパミンレベルはすべての暴露濃度において減少していた。1-プロモプロパン 800ppm 暴露では、ノルアドレナリン、5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) レベルを減少させた。前頭皮質では HVA と HVA/DA 比が増加した。線条体ではノルアドレナリンレベルの減少が見られたが、他の神経伝達物質量は変化しなかった。すなわち、ノルアドレナリンが特異的に減少し、これは以前に免疫組織化学的方法で明らかにした 1-プロモプロパン暴露ラット前頭皮質および扁桃体におけるノルアドレナリン神経線維 (ドーパミン ハイドロキラーゼ陽性神経線維) 密度の減少と符合していた。1-プロモプロパンへの 1 週間暴露と 4 週間暴露でコルチコステロンレベルは変化しなかった。ラット体重は 1-プロモプロパン暴露量依存的に減少したものの副腎皮質重量は 1-プロモプロパン暴露によって変化がなかった。

甲状腺ホルモンに着目した実験では、血漿中遊離 triiodothyronine は変化せず、thyroxine が減少した。甲状腺ホルモンはニューロン新生を促進することが知られており、本研究結果は 1-プロモプロパン暴露によるニューロン新生減少に甲状腺ホルモンが関与している可能性を示唆した。また、我々のこれまでの研究で、1-プロモプロパンへの暴露がノルアドレナリン神経線維を減少させることを明らかにしているが、ノルアドレナリン神経線維に甲状腺ホルモンが集積するとの研究報告もあり、1-プロモプロパン暴露によるノルアドレナリン神経線維変性作用において甲状腺ホルモンが重要な役割を果たしている可能性も示唆された。一方、transthyretin は、脳内甲状腺ホルモン輸送に貢献するとともに、甲状腺ホルモン減少が脱髄を促進することがわかっていることから、1-プロモプロパン暴露によるヒト脳 MRI 上での脱髄様所見を説明する可能性が考えられたが、少なくとも免疫組織化学のレベルでは暴露による顕著な変化が見いだせなかった。今後、定量的な方法を用いて同蛋白の動態を調べる予定である。

本研究により、1-プロモプロパン暴露がニューロン新生を抑制し、その作用機序として、ノルアドレナリン、GR、BDNF の抑制が考えられた。セロトニンレベルは変化がほとんどなかったことからノルアドレナリンの変化は特異的であると考えられる。また、ニューロン新生の抑制とそれと関連するノルアドレナリン、GR、BDNF が 1-プロモプロパン中枢

神経毒性のバイオマーカーとして利用可能であることを示した。

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 26 件)

1. Kumagai S, Kurumatani N, Arimoto A, Ichihara G. Time course of blood parameters in printing workers with cholangiocarcinoma. Journal of Occupational Health 2014, in press (査読有)
2. Zhang L, Nagai T, Yamada K, Ibi D, Ichihara S, Subramanian K, Huang Z, Mohideen SS, Naito H, Ichihara G. Effects of sub-acute and sub-chronic inhalation of 1-bromopropane on neurogenesis in adult rats. Toxicology 304: 76-82, 2013 (査読有) 10.1016/j.tox.2012.12.009.
3. Kumagai S, Kurumatani N, Arimoto A, Ichihara G. Cholangiocarcinoma among offset color proof-printing workers exposed to 1,2-dichloropropane and/or dichloromethane. Occup Environ Med 70: 508-510, 2013 (査読有) 10.1136/oemed-2012-101246
4. Mohideen SS, Ichihara S, Subramanian K, Huang Z, Naito H, Kitoh J, Ichihara G. Effects of exposure to 1-bromopropane on astrocytes and oligodendrocytes in rat brain. J Occup Health 55:29-38, 2013 (査読有)
5. 寒川真、塩山実章、鈴木秀和、上田昌美、岡伸幸、市原学、三井良之、楠進 1-Bromopropane 曝露による中毒性神経障害の一例 産業医学ジャーナル 36: 16-21, 2013 (査読無)
6. Samukawa M, Ichihara G, Oka N, Kusunoki S. A case of severe neurotoxicity associated with exposure to 1-bromopropane, an alternative to ozone-depleting or global-warming solvents. Arch Intern Med. 172 (16):1257-1260,2012(査読有) 10.1001/archinternmed.
7. Subramanian K, Mohideen SS, Suzumura A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M, Jin S, Zhang L, Huang Z, Ichihara S, Kitoh J, Ichihara G. Exposure to 1-bromopropane induces microglial changes and oxidative stress in the rat cerebellum. Toxicology. 302 (1):18-24,2012(査読有) 10.1016/j.tox.2012.07.006.
8. Huang Z, Ichihara S, Oikawa S,

- Chang J, Zhang L, Subramanian K, Mohideen SS, Ichihara G. Proteomic identification of carbonylated proteins in F344 rat hippocampus after 1-bromopropane exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 263 (1) : 44-52,2012(査読有)
10.1016/j.taap.2012.05.021.
9. Meyer-Baron M, Kim EA, Nuwayhid I, Ichihara G, Kang SK. Occupational exposure to neurotoxic substances in Asian countries - Challenges and approaches. *Neurotoxicology*. 33 (4) : 853-861,2012(査読有)
10.1016/j.neuro.2011.12.012.
10. Ichihara G, Kitoh J, Li W, Ding X, Ichihara S, Takeuchi Y. Neurotoxicity of 1-bromopropane: Evidence from animal experiments and human studies. *Journal of Advanced Research*. 3 (2) : 91-98,2012(査読有)
10.1016/j.jare.2011.04.005
11. Ichihara G, Wang H, Zhang L, Wakai K, Li W, Ding X, Shibata E, Zhou Z, Wang Q, Li J, Ichihara S, Takeuchi Y. Dose-dependent neurologic abnormalities in workers exposed to 1-bromopropane: authors' response. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 53: 1095-1098,2011(査読有)
10.1097/JOM.0b013e3182300a4f.
12. Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, Misawa N, Yamashita Y, Akatsuka S, Ishihara T, Yamashita K, Yoshikawa Y, Yasui H, Jiang L, Ohara H, Takahashi T, Ichihara G, Kostarelos K, Miyata Y, Shinohara H, Toyokuni S. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*. 108 (49) : E1330-338,2011(査読有)
10.1073/pnas.1110013108.
13. Huang Z, Ichihara S, Oikawa S, Chang J, Zhang L, Takahashi M, Subramanian K, Mohideen SS, Wang Y, Ichihara G. Proteomic analysis of hippocampal proteins of F344 rats exposed to 1-bromopropane. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 257: 93-101,2011(査読有)
10.1016/j.taap.2011.08.023.
14. Mohideen SS, Ichihara G, Ichihara S, Nakamura S. Exposure to 1-bromopropane causes degeneration of noradrenergic axons in the rat brain. *Toxicology*. 285:67-71,2011(査読有)
10.1016/j.tox.2011.04.005.

〔学会発表〕(計 70 件)

1. L. Zhang, C. Zong1, N. Koibuchi, S. Ichihara, H. Fujita, J. Chang, J. Huang, H. Naito, M. Kato, G. Ichihara Effects of Exposure to 1-Bromopropane on the Level of Thyroid Hormone in Cerebrospinal Fluid of Rats. The 53rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2014. 3. 24-27, Phoenix Convention Center, AZ, USA)
2. 張 靈逸, 宗 才, 鯉淵典之, 市原佐保子, 藤田博美, 常 杰, 黄 晋彦, 内藤久雄, 市原 学 ラット脳脊髄液中甲状腺ホルモンレベルの変化への 1BP 曝露の影響 第 13 回分子予防環境医学研究会 (3.31-2.01. 2014、和歌山県民文化会館、和歌山市)
3. L. Zhang, T. Nagai, K. Yamada, D. Ibi, S. Ichihara, K. Subramanian, Z. Huang, S. Sheik Mohideen, H. Naito, G. Ichihara Effects of Short- and Long-Term Exposure to 1-Bromopropane on Neurogenesis in Adult Rats. (2013.3.10-14, SanAntonio, USA)

〔図書〕(計 4 件)

1. 市原学、小木孝 生殖次世代影響 産業安全保健ハンドブック/労働科学研究所、2013 年 総ページ数 1332 (830-831)
2. 市原学、和田攻、森 晃爾 12 化学的健康障害要因とその対策-33. 感作性物質 34. 生殖毒性物質. 産業保健マニュアル/南山堂. 改訂 6 版、2013 年 総ページ数 416 (270-272)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市原 学 (Gaku Ichihara)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 90252238

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山田 清文 (Kiyofumi Yamada)
名古屋大学・医学部附属病院・教授
研究者番号 : 30303639

市原 佐保子 (Sahoko Ichihara)
三重大学・地域イノベーション研究科・准教授
研究者番号 : 20378326