

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24406018

研究課題名(和文) プロモプロパンの神経変性作用に関する新しいバイオマーカーを用いた調査研究

研究課題名(英文) Investigation on neurodegenerative effect of 1-bromopropane using new biomarkers

研究代表者

市原 学 (Ichihara, Gaku)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：90252238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：1-プロモプロパン工場労働者25人の赤血球グロビンに1-プロモプロパンが形成する蛋白付加物を計測した。グロビン中S-propyl cysteineと白血球数との間に有意な負の相関があることが明らかとなった。S-propyl cysteineはヒトにおける1-プロモプロパンの曝露マーカーとして有効である可能性を本研究は示した。

研究成果の概要(英文)：Protein adduct in globin formed by exposure to 1-bromopropane was quantified in 25 workers in a factory. The level of S-propyl cysteine in globin showed significant and negative association with the number of leucocyte. S-propyl cysteine might be useful as a biomarker for 1-bromopropane exposure.

研究分野：産業衛生学

キーワード：バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

1-プロモプロパン(1BP)はオゾン層破壊・地球温暖化作用をもつクロロフルオロカーボン(フロン)の代替溶剤として、日本、米国、欧州で広く用いられている。

一方、1-プロモプロパンが有する神経毒性に大きな懸念が発生している。2010年末、大阪の大手企業で働く労働者が1-プロモプロパンによる金属部品の蒸気洗浄を数ヶ月行なった後、歩行障害に陥った。近畿大学医学部附属病院神経内科で精査、鑑別診断を行なったところ、中毒性神経障害との診断がなされた。下肢末梢神経生検(生体組織診断)では、卵円状のミエリン変性が観察され、軸索障害が疑われた。これらの病理所見は、驚くべきことに我々がかつて行なった1-プロモプロパン吸入曝露実験によって見られたラット末梢神経の病理像と極めて類似していた(Ichihara 2000)。

この大阪症例は、1-プロモプロパン神経中毒を病理組織学的レベルで解明したはじめての症例である(寒川、市原、末梢神経研究会 2011)。一方、米国ミズーリー州 Kansas City では、多発性硬化症様の脳室周囲白質の異常がMRIで確認されている(近藤、市原、有機溶剤中毒研究会 2009)。上記症例は、1-プロモプロパンが末梢、中枢の両方で神経変性(Neurodegeneration)を引き起こすことを示している。

【1-プロモプロパンのリスク評価およびリスク管理の国際的状況】特定フロン等オゾン層破壊物質は、1996年より先進工業国では生産禁止となり、代替フロン HCFC、HFC 等も間もなく使用が制限される。1-プロモプロパンは新しい代替溶剤として労働現場に導入され、米国と日本を中心にその使用が広がり、特に米国では洗浄剤、接着剤中に使用される塩素系溶剤の10-30%に匹敵するレベルまで生産量は増加している。1-プロモプロパンは洗浄剤としてだけでなく噴射剤としても

使用されているが、最近ではドライクリーニングの溶剤として使用されつつあり(Blando 2010)、労働者のみならず、妊婦、小児を含む一般市民への曝露が懸念され、衛生基準の設定は緊急の課題となっている。現在、日本においては日本産業衛生学会許容濃度委員会において1-プロモプロパンの許容濃度設定に向けて議論が始まっている。米国では複数の許容濃度提案に相互に大きな隔たりがあり、一致の方向性を見出していない。これは、疫学データの不十分さのために、動物からヒトへの外挿以外に数値を設定する方法がなく、提案者の理論的前提等によって結論が大きく左右されるためである。

【量-反応関係における不確定性】我々は、これまで、中国にける1-プロモプロパン曝露労働者の調査研究を行ってきた(Ichihara 2004, Li, Ichihara 2010)。これらの疫学研究において、曝露群と性、年齢をマッチングさせた対照群との比較では、1-プロモプロパン曝露群の下肢神経伝導速度低下、遠位潜時延長、振動覚低下が観察された。これに対し、我々は Author's response(Ichihara 2011)を提出した。その中で、曝露濃度の変動性を考慮した時に、曝露濃度帯で分類することに合理性があることを述べた。他方、曝露濃度評価の一定の不確定性については同意した。本研究では労働者尿および血清を用いた曝露バイオマーカー検索を行う。

## 2. 研究の目的

1-プロモプロパン曝露によるヒトにおける神経障害の病態を明らかにするとともに、1-プロモプロパンの曝露のバイオマーカーとしてのグロビン蛋白付加物の妥当性を検討した。

## 3. 研究の方法

中国江蘇省 Yixing 市にあるプロモプロパン

工場を訪問し、プロモプロパン生産状況を調査した。さらに過去の調査において健康診断を行った労働者のフォローアップを行った。同時に日本で発生した新しい 1-プロモプロパン中毒症例の解析を行い、中国における疫学研究の健康診断項目の再検討を行った。曝露バイオマーカーとして尿中代謝物分析法の検討を行った。3-Bromopropionic acid を添加した水溶液から酢酸エチルを用いて液-液抽出を行った。小試験管内に検体を入れ、等量の酢酸エチルを加えた後、小型スターラーを用いて 15 分間攪拌した。酢酸エチルにはあらかじめ 3-chloropropionic acid を内部標準として添加した。攪拌後静置し、上清を回収した。抽出を 2 回繰り返して集めた上清に無水硫酸マグネシウムを加えて脱水後、遠心濃縮器を用いて濃縮した後、少量の酢酸エチルに溶解、N-methyl-N-[tert-butyl dimethylsilyl] trifluoroacetamide (MTBSTFA) with 1% tert-butyl dimethylchlorosilane (TDMCS) を加え、70 °C で 90 分加熱した。反応液を名古屋大学に既設の GC - MS に導入し、3-Bromopropionic acid を定量した。1-プロモプロパンが酸化された後にグルタチオン抱合を受けてメルカプツール酸となった N-acetyl-2-hydroxypropyl cysteine の定量も検討した。

1 - プロモプロパン工場労働者 25 人の赤血球グロビン蛋白に 1 - プロモプロパンが形成する蛋白付加物を計測した。EDTA 採血した血液の一部から血漿、Buffy Coat を取り除き、赤血球分画を高張緩衝液を用いて洗浄した。溶血液にアスコルビン酸を加えた後、オキサロ酢酸 アセトン混合液に緩徐に流し込み、沈査を得た。沈査をアセトンにて洗浄後、窒素ガスにて乾固し、重量を計測した。得られたグロビン蛋白を PicoTag を用いて窒素ガス下で酸加水分解し、得られた S-propyl cysteine を LC-MS/MS を用いて定量した。一

方、血液の残りの部分を用いて血球数を計測した

#### 4 . 研究成果

症例の神経学的所見として生来の発達障害はあるものの意思疎通は十分に可能、意識清明で、高次脳機能障害は認めず、脳神経領域でも明らかな異常は認めなかった。運動系では両上下肢で遠位優位に徒手筋力テスト 4 程度の筋力低下を認め、腱反射は下肢で亢進していた。Babinski 徴候は両側陰性であった。四肢の運動失調、開脚歩行を認めた。指鼻試験が両側とも拙劣であった。感覚系では表在覚障害として下肢温痛覚低下を認めた。深部覚では、振動覚は両上肢で低下(6 秒 16 秒)、両下肢で消失を認めたが、位置覚の障害は認めなかった。四肢の異常感覚(しびれ感)および疼痛を認めた。Romberg 徴候が陽性であった。自律神経系は異常所見を認めなかった。運動神経・感覚神経ともに下肢優位に遠位潜時延長、振幅低下、伝導速度低下を認めた。ときほぐし線維法で約 30%に軸索障害を示唆する myelin ovoid を認めた。エボン包埋標本(トルイジンブルー染色)では大径有髄線維の減少と大径線維の 10 ~ 20%に軸索腫大や軸索消失、myelin ovoid といった軸索障害を示唆する所見を認めた。脱髄や炎症細胞浸潤、血管炎の所見は認めなかった。

グロビン中 S-propyl cysteine と白血球数との間に有意な負の相関があることが明らかとなった。S-propyl cysteine はヒトにおける 1 - プロモプロパンの曝露マーカーとして有効である可能性を本研究は示した。

#### 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 10 件)

1. Zn(II) released from zinc oxide nano/micro particles suppresses vasculogenesis in human endothelial colony-forming cells. Saeko Tada-Oikawa, Gaku Ichihara, Yuka

- Suzuki, Kiyora Izuoka, Wenting Wu. Toxicology Reports. 査読有. 印刷中. 2015
2. Copper oxide nanoparticles reduce vasculogenesis in transgenic zebrafish through down-regulation of VEGF expression and induction of apoptosis. Chang J, Ichihara G, Shimada Y, Tada-Oikawa S, Kuroyanagi J, Zhang B, Suzuki Y, Sehseh R, Kato M, Tanaka T, Ichihara S. J Nanosci Nanotech. 査読有. 印刷中. 2015
  3. Effects of Nanomaterials on Cardiovascular System -Analysis of in Vitro and Animal Experiments. Ichihara S, Tada-Oikawa S, Suzuki Y, Wu W, Ichihara G. Trans Mater Res Soc Jpn. . 査読有. 印刷中. 2014
  4. Hippocampal phosphoproteomics of F344 rats exposed to 1-bromopropane. Huang Z, Ichihara S, Oikawa S, Chang J, Zhang L, Hu S, Huang H, Ichihara G. Toxicol Appl Pharmacol. DOI: 10.1016/j.taap.2014.10.016. 査読有. 巻 282. 151-160. 2015
  5. Synergistic effect of bolus exposure to zinc oxide nanoparticles on bleomycin-induced secretion of pro-fibrotic cytokines without lasting fibrotic changes in murine lungs. Wu W, Ichihara G, Hashimoto N, Hasegawa Y, Hayashi Y, Tada-Oikawa S, Suzuki Y, Chang J, Kato M, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC, Ichihara S. Int J Mol Sci. DOI: 10.1016/j.taap.2014.04.010. 査読有. 巻 16. 660-676. 2014
  6. Zinc oxide nanoparticles induce migration and adhesion of monocytes to endothelial cells and accelerate foam cell formation. Suzuki Y, Tada-Oikawa S, Ichihara G, Yabata M, Izuoka K, Suzuki M, Sakai K, Ichihara S. Toxicol Appl Pharmacol. DOI: 10.1016/j.taap.2014.04.010. 査読有. 巻 278. 16-25. 2014
  7. Expression of proteins associated with adipocyte lipolysis was significantly changed in the adipose tissues of the obese spontaneously hypertensive/NDmcr-cp rat. Chang J, Oikawa S, Iwashashi H, Kitagawa E, Takeuchi I, Yuda M, Aoki C, Yamada Y, Ichihara G, Kato M, Ichihara S. Diabetol Metab Syndr. DOI: 10.1186/1758-5996-6-8. 査読有. 巻 6. 8. 2014
  8. Dispersion method for safety research on manufactured nanomaterials. Wu W, Ichihara G, Suzuki Y, Izuoka K, Oikawa-Tada S, Chang J, Sakai K, Miyazawa K, Porter D, Castranova V, Kawaguchi M, Ichihara S. Ind Health. PMID: 24305513. 査読有. 巻 52. 54-65. 2014
  9. Trends in asbestos and non-asbestos fibre concentrations in the lung tissues of Japanese patients with mesothelioma. Sakai K, Hisanaga N, Shibata E, Kamijima M, Ichihara G, Takeuchi Y, Nakajima T. Ann Occup Hyg. DOI: 10.1093/annhyg/met055. 査読有. 巻 58. 103-120. 2014
  10. Time course of blood parameters in printing workers with cholangiocarcinoma. Kumagai S, Kurumatani N, Arimoto A, Ichihara G. Journal of Occupational Health. PMID: 24826961. 査読有. 巻 56. 279-284. 2014
- 〔学会発表〕(計 23 件)
1. 宗 才、黄 晋彦、エドウィン ガーナ、張 靈逸、張 堯、市原 佐保子、市原 学、1-プロモプロパン神経毒性のマウスモデルの確立、日本薬学会第 135 年会、神戸サンポーホール他 兵庫、2015 年 3 月 25-28 日
  2. 宗 才、黄 晋彦、エドウィン ガーナ、張 靈逸、張 堯、櫻井 敏博、加藤 昌志、市原 佐保子、市原 学、1-プロモプロパン神経毒性のマウスモデルの確立、第 85 回日本衛生学会学術総会、和歌山県民文化センター ホテルアパローム紀の国 和歌山市、2015 年 3 月 26-28 日
  3. Cai Zong, Edwin Garner, Chin-Yen Huang, Lingyi Zhang, Xiao Zhang, Shinya Toyokuni, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara、Establishment of mouse model for neurotoxicity of 1-bromopropane, an alternative to ozone-depleting solvents、SOT 54th Annual Meeting and ToxExpo、San Diego California, USA、2015 年 3 月 22-27 日
  4. Chin-Yen Huang, Edwin Garner, Cai Zong, Lingyi Zhang, Xiao Zhang, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara、Administration of 1-aminobenzotriazole reduces adverse effects of 1-bromopropane on epididymal sperm、SOT 54th Annual Meeting and ToxExpo、San Diego California, USA、2015 年 3 月 22-27 日
  5. Lingyi Zhang, Shinji Kumagai, Shinya Toyokuni, Hisao Naito, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara、Animal models for cholangiocarcinoma induced by chemicals associated with the offset printing、SOT 54th Annual Meeting and ToxExpo、San Diego California, USA、2015 年 3 月 22-27 日
  6. 鈴木悠加、市原 学、及川(多田)佐枝子、村上理彦、出岡 淑、市原佐保子、単球の血管内皮細胞への接着能に及ぼす酸化チタンナノ粒子の影響、第 14 回分子予防環境医学研究会、大阪市立大学医学部 大阪市、2015 年 2 月 13-14 日

- 7、宗 才、黄 晋彦、エドウィン ガーナ、張 靈逸、張 堯、加藤昌志、市原佐保子、市原 学、1-プロモプロパン神経毒性のマウスモデルの確立、第 14 回分子予防環境医学研究会、大阪市立大学医学部 大阪市、2015 年 2 月 13-14 日
- 8、市原 学、2-ジクロロプロパンの発がん性発症機序から、第 42 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、松本市中央公民館 松本市、2014 年 10 月 25-26 日
- 9、宗 才、黄 晋彦、エドウィン ガーナ、張 靈逸、張 堯、市原 佐保子、市原 学、1-プロモプロパン神経毒性のマウスモデルの確立、第 42 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、松本市中央公民館 松本市、2014 年 10 月 25-26 日、
- 10、市原 学、呉 文亭、Radwa Sehsah、Esteban C Gabazza、伊東 健、山本 雅之、市原 佐保子、工業ナノマテリアルの生態影響機序解明のための動物モデル、日本薬学会環境・衛生部会学術年会 フォーラム 2014:衛生薬学・環境トキシコロジー、つくば国際会議場 つくば市、2014 年 9 月 19-20 日
- 11、Sandra Vranic, Sahoko Ichihara, Yasuhito Shimada, Toshio Tanaka, Wenting Wu, Sonja Boland, Lang Tran and Gaku Ichihara、Biodistribution and effects of SiO<sub>2</sub> NPs in mice and in a transgenic model of Zebra fish (*Danio rerio*)、IUMRS-ICA2014、福岡大学 福岡市、2014 年 8 月 24-26 日
- 12、市原 学、Animal models for mechanistic studies on biological effects of manufactured nanomaterials、The Third Workshop on the Risk Management of Engineered Nanomaterials、NIMS 並木地区 MANA 棟大会議室 つくば市、2014 年 8 月 22 日
- 13、Radwa Sehsah, Wenting Wu, Sahoko Ichihara, Naozumi Hashimoto, Yoshinori Hasegawa, Ken Ito, Masayuki Yamamoto, Emily Kamel, Gaku Ichihara、Involvement of Nrf-2 in zinc oxide nanoparticles-induced pulmonary inflammation、第 41 回日本毒性学会学術年会、神戸コンベンションセンター 神戸市、2014 年 7 月 2-4 日
- 14、Wenting Wu, Gaku Ichihara, Naozumi Hashimoto, Yoshinori Hasegawa, Yasuhiko Hayashi, Masashi Kato, Saeko Tada-Oikawa, Yuka Suzuki, Jie Chang<sup>1</sup>, Corina N. D'Alessandro-Gabazza, Esteban C. Gabazza, Sahoko Ichihara、Synergistic effect of exposure to zinc oxide nanoparticle on inflammatory response to bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice、第 41 回日本毒性学会学術年会、神戸コンベンションセンター 神戸市、2014 年 7 月 2-4 日
- 15、宗 才、黄 晋彦、エドウィン ガーナ、張 靈逸、張 堯、市原 学、1-アミノベンゾトリアゾールの投与は 1-プロモプロパン曝露による肝障害を減弱、第 84 日本衛生学会、岡山コンベンションセンター 岡山市、2014 年 5 月 26-27 日
- 16、及川(多田) 佐枝子、市原 学、鈴木 悠加、出岡 淑、三島 隆、市原 佐保子、酸化亜鉛ナノ粒子の血管内皮前駆細胞に対する影響、第 84 日本衛生学会、岡山コンベンションセンター 岡山市、2014 年 5 月 26-27 日
- 17、鈴木 悠加、市原 学、宗才、及川(多田) 佐枝子、出岡 淑、市原 佐保子、単層、二層カーボンナノチューブによる動脈硬化症への影響とその作用機序の検討、第 84 日本衛生学会、岡山コンベンションセンター 岡山市、2014 年 5 月 26-27 日
- 18、張 靈逸、宗 才、鯉淵 典之、市原 佐保子、藤田 博美、内藤 久雄、加藤 昌志、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 1-プロモプロパン曝露の影響、第 84 日本衛生学会、岡山コンベンションセンター 岡山市、2014 年 5 月 26-27 日
- 19、ブラニッチ サンドラ、市原 佐保子、島田 康人、田中 利男、呉 文亭、ポーランド ソニア、トラン ラン、市原 学、マウスと遺伝子改変ゼブラフィッシュにおけるシリカナノ粒子の生態分布と影響、第 84 日本衛生学会、岡山コンベンションセンター 岡山市、2014 年 5 月 26-27 日
- 20、セサ ラドワ、呉 文亭、市原 佐保子、橋本 直純、長谷川 好規、伊東 健、山本 雅之、カメル エミリ、市原 学、酸化亜鉛ナノ粒子が誘導する肺炎症における Nrf2 の関与、第 84 日本衛生学会、岡山コンベンションセンター 岡山市、2014 年 5 月 26-27 日
- 21、呉 文亭、市原 学、及川(多田) 佐枝子、鈴木 悠加、常 杰、橋本 直純、長谷川 好規、ガバザ コリナ、ガバザ エステバン、市原 佐保子、ナノ酸化亜鉛が、プレオマイシンによって誘導されるマウスの肺線維症に与える影響、第 84 日本衛生学会、岡山コンベンションセンター 岡山市、2014 年 5 月 26-27 日
- 22、市原 佐保子、李 衛華、尾村 誠一、藤谷 雄二、平工 雄介、久永 直見、丁 訓誠、小林 隆弘、市原 学、中国酸化チタン粒子取扱工場労働者に対する心肺機能を中心とした調査研究、第 87 回日本産業衛生学会、2014 年 5 月 21-24 日
- 23、Sandra Vranic, Sahoko Ichihara, Yasuhito

Shimada, Toshio Tanaka, Wenting Wu, Sonja Boland, LangTran, Gaku Ichihara、  
Biodistribution and effects of SiO<sub>2</sub> NPs in mice and in a transgenic model of Zebra fish (Danio rerio)、NANOTOX 2014, 7th International Nanotoxicology Congress、トルコ、アンタルヤ 2014 年 4 月 23-26 日  
〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

市原 学 (ICHIHARA, Gaku)  
東京理科大学 薬学部 教授  
研究者番号：90252238

### (2) 研究分担者

若井 建志 (WAKAI, Kenji)  
名古屋大学 医学系研究科 教授  
研究者番号：50270989

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：