

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659299

研究課題名(和文)トリクロロエチレンによるHypersensitivity特異蛋白の解明

研究課題名(英文)Analysis of specific protein to hypersensitivity induced by trichloroethylene

研究代表者

那須 民江 (NASU, Tamie)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：10020794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：トリクロロエチレン及び代謝物のトリクロロエタノール及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は雌雄で、トリクロロエタノールは雌において感作性が観察された。感作されたモルモットの肝臓には炎症細胞浸潤を伴った壊死像が観察された。また、感作動物のALTやIFNは感作されていない動物より高かった。感作した動物の血清にはCYP2E1抗体と反応する25と50KDの蛋白が多く、プロテオミクス解析で、IgGが増えていると推察された。ヒトCYP2E1発現細胞を作成し、患者と対照者の血清と反応させたところ、患者血清にはCYP2E1に反応するIgGが増加している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Trichloroethylene (TRI), trichloroacetic acid and trichloroethanol (TCE) maximization tests using guinea pigs (GPMT) were done. Sensitization to TRI was observed in males and females, whereas that to TCE was observed only in females. In guinea pigs with sensitization, focal necrosis with inflammatory cell infiltrations was observed in the livers at irregular intervals. In addition, serum ALT and IFN levels were higher in sensitized animals than those without sensitization. These findings were obviously observed in animals exposed to TRI. In serum of guinea pigs with sensitization, proteins having 25 and 50kD to react with anti-CYP2E1 were increased in animals with sensitization. Proteomics analysis showed that these proteins may be IgG. As a preliminary experiment, culture cells contained human CYP2E1 reacted with serum of patients with hypersensitivity and control workers. The reacted IgG to CYP2E1 appeared to be greater in the serum of patients than controls.

研究分野：社会医学

キーワード：トリクロロエチレン Hypersensitivity 肝障害 全身性皮膚炎 CYP2E1 GPMT ALT IFN

1. 研究開始当初の背景

職業的に使用されるトリクロロエチレンの Hypersensitivity (全身性皮膚-肝障害) は中国南部の工業地帯に多いが、日本でも報告されている。その特徴はトリクロロエチレンに曝露され始めてから平均 30 日前後で発症し、性差、年齢差がないことである。患者の皮膚の病型は剥奪性皮膚炎、多形紅斑、Stevens-Johnson 症候群および中毒性表皮壊死融解症の 4 つに分類された。患者の殆ど全員が肝障害を持ち、38 以上の発熱、白血球と好酸球増多が認められ、私たちの調査から、6 型ヒトヘルペスウイルス (HHV6) の抗体価が高い者が多いことが明らかとなった。

そこで、2005 年からは入院患者のサイトカインや HHV6 (ヒトヘルペスウイルス 6) の再活性化およびトリクロロエチレンの曝露濃度を調査するために、入院初日の採尿と、約 1 週間毎の採血を行い、患者の HHV6 の再活性化を検討した。血液からキアゲンのキットを用いて DNA を抽出し、HHV6 の DNA 量を TaqMan 法にて測定した。結果は HHV6 DNA コピー数/アルブミン (Alb) DNA コピー数に 10^6 を乗じた数値で表わし、50 以上を再活性化ありと判断した。健康労働者と患者の HHV6 再活性化、TNF α 、IL10 の上昇について検討した。患者では 54.8% に HHV6 の再活性化が見られたが、健康労働者では 9.6% であり、明らかに患者の方が再活性化している者が多かった。TNF α がカットオフ値を超えていた者は患者群で 57.1%、健康労働者で 7.2%、IL10 のカットオフ値を超えていた者は、患者群が 81%、健康労働者が 1.7% であり、それぞれ有意差が認められた。このように健康労働者で HHV6 の再活性化やサイトカインの上昇が見られる者は 10% 以下であり、TRI による全身性皮膚-肝障害患者に特徴的にみられることが明らかとなった。

患者の血清中の TNF、IFN、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL10 を測定した。IL-2 がカットオフ値を超えた者はいなかった。IL-1 と IL-4、IL-5、IFN がカットオフ値を超えた者はそれぞれ 1 (3.6%)、2 (7.1%)、9 (32.1%) および 12 名 (42.9%) であった。IL-6 は 15 名 (53.6%) であった。IL-10 と TNF がカットオフ値を超えた患者はそれぞれ 28 (100%) と 22 名 (78.6%) であった。一方、工場対照者の平均値に標準偏差の 3 倍を加えたカットオフ値を使用した場合、IL-5、IL-6、IL-10、TNF、IFN のカットオフ値を超えた患者は 7 (24%)、16 (57.1%)、23 (82.1%)、22 (78.6%) および 16 名 (57.1%) であり、患者のサイトカイン値は工場対照群より明らかに高かった。このように、患者群では、特に IL-10 と TNF がカットオフ値を超えるものが多く、これらがバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

また、HHV6 の再活性化と TNF α の上昇に

は関連性が認められたが、IL-10 との間には有意な相関関係は見られなかった。興味深いのは、HHV6 の再活性化者は剥奪性皮膚炎患者に多く、多形紅斑患者は少ない点であった。

2. 研究の目的

雌雄のモルモットを用いて、トリクロロエチレンのマキシメーションテストを行い、Hypersensitivity のモデル動物を確立させることが第一の目的である。ついで、皮膚・肝臓・尿を採取し、トリクロロエチレンの代謝を明らかにすると同時に、皮膚と肝臓の病理解析を行う。肝臓あるいは血清のトリクロロエチレン代謝物・特異蛋白のプロテオミクス解析し、抗原を明らかにすると同時に、そのプロテオミクス解析によって得られた蛋白のアミノ酸構造を参考に抗体を作成する。作成した抗体を用いて、トリクロロエチレン曝露によるモルモットの特異抗原の解析を肝臓と血清で行う。Hypersensitivity 患者と健康労働者の血清の抗原の解析を行うことにより、その発現の差異を明らかにする。動物における特異抗原と皮膚の障害 (発赤) や肝障害との関連を明らかにする。ヒトにおける特異抗原とトリクロロエチレンの曝露濃度、感受性因子である HLA-B*1301、肝障害、皮膚の病型等と、今まで収集した研究情報 (ヒト) との関連性を明らかにし、Hypersensitivity の特異診断技術としての妥当性を検討する。

3. 研究の方法

(1) トリクロロエチレンによるマキシメーションテストを行い、肝障害を伴った皮膚障害動物を作成する。尿、肝、皮膚、血液を採取し、肝臓と皮膚の一部はホルマリンあるいはパラホルムアルデヒドで固定をしておく。残りの組織、尿、血清は使用まで -80 で使用まで保存しておく。

(2) プロテオミクス解析による特異蛋白の解析：モルモットの肝臓や血清を用いて、CYP2E1 抗体に反応するたんぱく質の同定を行う。

(3) トリクロロエチレン代謝の主要酵素ヒト CYP2E1 と反応する患者血清中の抗体の検索。

4. 研究成果

(1) Hypersensitivity 動物モデルの作成

各群 10 匹の雌雄の Hartley モルモットを使用した。Tang らの方法、即ち、OECD のガイドラインに従い、トリクロロエチレンとその代謝物トリクロロエタノールおよびトリクロロ酢酸のマキシメーションテストを行った。トリクロロエチレンの感作率は雄 70%、雌 90%、トリクロロ酢酸は雄 10%、雌 0%、トリクロロエタノールは雄 20%、雌は 50% であった。トリクロロエチレン曝露群では、真皮層に局所的に好酸球やリンパ球の浸潤が見られた。トリクロロエタノール曝露群でも

同様な皮膚障害が見られたが、トリクロロエチレン曝露群に比べ軽度で、頻度も少なかった。トリクロロ酢酸曝露群の皮膚は、ほぼ正常であった。

トリクロロエチレン曝露は、雄の感作性動物の血清中 IFN- γ 、ALT および γ -GTP を上昇させたが、トリクロロ酢酸曝露やトリクロロエタノール曝露ではこのような現象は観察されなかった。各曝露群の肝/体重比は、対照群に比べ低値であり、トリクロロエチレン曝露群の雄については、非感作性動物よりも、感作性動物の肝/体重比が明らかに低かった。肝臓中の CYP2E1 の発現が対照群に比べ、トリクロロエチレン曝露群は雄 1.9 倍、雌 1.3 倍、トリクロロ酢酸曝露群は雄 1.4 倍、雌 1.1 倍、トリクロロエタノール曝露群は雄 1.4 倍、雌 1.1 倍であり、それぞれの曝露による誘導の程度に雌雄差が見られた。トリクロロエチレン曝露群の雄の肝臓では、中心静脈周囲にリンパ球浸潤を伴う大きな巣状壊死が、局所的に観察された(図 1)。トリクロロ酢酸曝露群とトリクロロエタノール曝露群では、肝臓の辺縁部の一部にリンパ球浸潤や小脂肪滴が認められたのみであった。

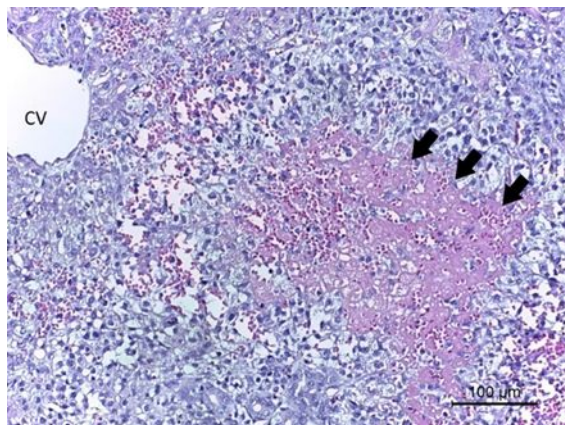


図1 肝臓のHE染色 トリクロロエチレン曝露群雄肝臓のHE染色像。矢印は巣状壊死を示す。

(2) 感作性メカニズムの解析

感作性の原因を明らかにするため、血清 5 μ l に Ezaply(ATTO)を等量入れ、95 $^{\circ}$ C 5分加熱後、SDS-PAGE(5~20%, gradient gel)でたんぱく質を分離した。ゲル中のたんぱく質は SYPRO Ruby (Molecular Probes)で製造元の方法で染色した。即ち 50%メタノール、7%酢酸溶液でゲルを固定後、SYPRO Rubyで一晩染色、10%メタノール、7%酢酸溶液で洗った。染色されたバンドを UV 照射して トランスイルミネーターで可視化した。

図1 (Guinea Pig)

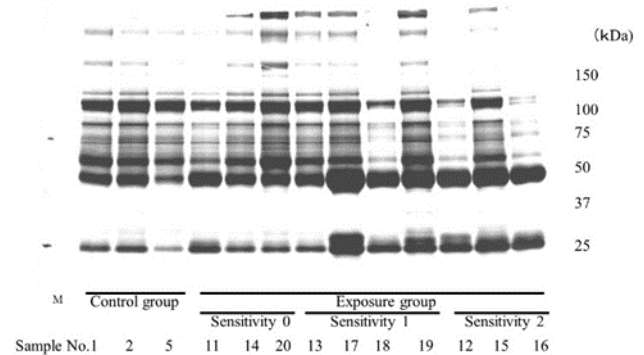


図2 雄モルモット血清の CYP2E1 による免疫沈降分析
Sensitivity0、1、2 は1それぞれ皮膚の感作性なし、1および2を示す。

感作性動物(Sensitivity1と2)では25kDa、27kDa および 50kDa の蛋白が増加していることが判明した。次いで 25KD と 50KD のバンドを切り出し、LC/MS/MS (LC がナノフロー LC の Ultimate3000、MS がイオントラップ型質量分析計の LTQ-XL サーマフィッシャーサイエンティフィック社製)でたんぱく質の同定を行った。25KD と 50KD のバンドに共通して検出されたのは IgG であった。他は皮膚-肝障害に関連したたんぱく質は検出されなかった。野生型および CYP2E1 ノックアウトマウス血清も同時に分析したが、これらには、25KD、50KD 付近の蛋白の発現は認められなかった。

(3) CYP2E1 と 25 および 50KD 蛋白の交叉に関する研究

Anti-CYP2E1 抗体に交差したのは IgG のみであったので、抗体を作成する研究方法を変更した。トリクロロエチレンの主要代謝酵素である CYP2E1 に反応する IgG が発生していると予想した。ヒト CYP2E1 cDNA を pcDNA3.1D/V5 His TA ベクターに組み替えて HK293 細胞(ヒト腎臓がん)あるいは、NIH3T3(マウスメラノサイト)にベクターを導入後、これらの細胞にヒト CYP2E1 の発現を確認した。これらの細胞を 2名の患者および 2名の対照者の血清で試験的に反応後、anti-Human-HRP 標識抗体を用いて化学発光で視覚化し、対象の血清中にヒト CYP2E1 に反応する IgG があるか否かの確認をした。これらの結果から、患者の血清には CYP2E1 に反応する IgG が多く発現している可能性が示唆された。今後患者と対照者、あるいはモルモットのマキシミゼーションテスト後の血清を用いて、この研究を進展させ、Hypersensitivity のメカニズム解明研究を完成させたい。

<参考文献>

- (1) Huang H, Kamijima M, Wang H, Li S, Yoshikawa T, Lai G, Huang Z, Liu H, Chen

- J, Takeuchi Y, Nakajima T, Li L. Human herpesvirus 6 reactivation in trichloroethylene-exposed workers suffering from generalized skin disorders accompanied by hepatic dysfunction. *J Occup Health* 48: 417-423, 2006
- (2) Kamijima M, Wang H, Huang H, Li L, Shibata E, Lin B, Sakai K, Liu H, Tsuchiyama F, Chen J, Okamura A, Huang X, Hisanaga N, Huang Z, Ito Y, Takeuchi Y, Nakajima T. *J Occup Health* 50: 328-338, 2008
- (3) Tang X, Que B, Song X, Li S, Yang X, Wang H, Kamijima M, Nakajima T, Lin Y, Li L. *J Occup Health* 50:114-121, 2008.
- (4) Kamijima M, Wang H, Yamanoshita O, Ito Y, Xia L, Yanagiba Y, Chen C, Okamura A, Huang Z, Qiu X, Song X, Gai T, Liu L, Ge Y, Deng Y, Naito H, Yoshikawa T, Tohyama M, Huang H, Nakajima T. Occupational trichloroethylene hypersensitivity syndrome: human herpesvirus 6 reactivation and rash phenotypes. *J Dermatol Sci* 72:218-224, 2013

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)

英文は旧姓 Nakajima を使用しています。

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hibino Y, Wang H, Naito H, Zhao N, Wang D, Jia X, Li H, Song X, Liu L, Huang Y, Ito Y, Huang H, Kamijima M, Nakajima T. Sex differences in metabolism of trichloroethylene and trichloroethanol in guinea pigs. *J Occup Health*. 査読有、55(6):443-449, 2013.

DOI:10.3136/joh.55.443

Kamijima M, Wang H, Yamanoshita O, Ito Y, Xia L, Yanagiba Y, Chen C, Okamura A, Huang Z, Qiu X, Song X, Cai T, Liu L, Ge Y, Deng Y, Naito H, Yoshikawa T, Tohyama M, Li L, Huang H, Nakajima T.

Occupational trichloroethylene hypersensitivity syndrome: Human herpesvirus 6 reactivation and rash phenotypes. *J Dermatol Sci*. 査読有、72(3):218-224, 2013. DOI:10.1016/j.jdermsci.2013.07.003

Huang Z, Yue F, Yang X, Xia L, Chen C, Qiu X, Huang J, Li L, Kamijima M, Nakajima T, Huang H. Upregulation of calprotectin and downregulation of retinol binding protein in the serum of workers with trichloroethylene-induced hypersensitivity dermatitis. *J Occup Health*. 査読有、54(4):299-309, 2012. DOI:10.1539/joh.12-0012-OA

〔学会発表〕(計 8 件)

那須民江、環境と健康の調和～衛生学におけるリスク評価のための研究の重要性～、第 84 回日本衛生学会学術総会学会賞受賞講演(招待講演) 2014.5.27、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

山ノ下理、上島通浩、内藤久雄、伊藤由起、那須民江、トリクロロエチレンによる重症皮膚肝障害の個体感受性マーカーの解析、第 87 回日本産業衛生学会、2014.5.22、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

上島通浩、那須民江、Occupational trichloroethylene hypersensitivity syndrome: Human herpesvirus 6 reactivation and rash phenotypes、3rd International Symposium on Mechanism and Preventive Measures for Occupational Hazard Caused by Trichloroethylene、2014.3.20、Meeting Hall, 8th floor of the Emergence Building of GDHOD(中国広東省職業病防治院)

山ノ下理、那須民江、Analysis of Biomarkers of Individual Susceptibility of Trichloroethylene Hypersensitivity Syndrome According to the Solvent Exposure Levels、2014.3.20、Meeting Hall, 8th floor of the Emergence Building of GDHOD(中国広東省職業病防治院)

内藤久雄、那須民江、Not only trichloroethylene but also trichloroethanol may have sensitizing potential in Guinea Pig、2014.3.20、Meeting Hall, 8th floor of the Emergence Building of GDHOD(中国広東省職業病防治院)

日比野優衣、内藤久雄、王棟、趙娜、宋向栄、王海蘭、伊藤由起、上島通浩、那須民江、トリクロロエチレンとその代謝物の Hypersensitivity に関する検討、第 83 回日本衛生学会学術総会、2013.3.24～2013.3.26、金沢大学(石川県金沢市)

日比野優衣、トリクロロエチレン Hypersensitivity とその代謝物に関する検討、第 83 回日本衛生学会学術総会、2013.3.24～2013.3.26、金沢大学(石川県金沢市)

日比野優衣、トリクロロエタノールの代謝における CYP2E1 の役割、第 40 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2012.11.15～2012.11.16、マホロバマイズ三浦(神奈川県三浦市)

〔図書〕(計 1 件)

Kamijima M, Wang H, Yamanoshita O, Ito Y, Nakajima T. Trichloroethylene: Toxicity and health risks (molecular and integrative toxicology). Springer-Verlag London.

Hypersensitivity Dermatitis and
Hepatitis. Chapter 3. 37-52. 2014.
ISBN: 978-1-4471-6310-7

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 民江 (NASU, Tamie)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号: 10020794

(2) 研究分担者

内藤 久雄 (NAITO, Hisao)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号: 90547556