

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82629

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460817

研究課題名(和文)塩素系有機溶剤の体内代謝と遺伝毒性発現の関係についての研究

研究課題名(英文) Study on the metabolic activation and genotoxic effects of chlorinated organic solvents

研究代表者

王 瑞生 (Wang, Rui-Sheng)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所・産業毒性・生体影響研究グループ・部長

研究者番号：10321895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物やヒト由来培養細胞を用いて1,2-ジクロロプロパン(DCP) DNA損傷性の有無及びその誘発機序を検討した。DCP暴露後にDNA損傷が誘発され、またCYP2E1などの酵素がその代謝活性化と遺伝毒性の発現に関与していることが判明した。中間代謝物であるmethyl glyoxal (MG) が胆汁から高濃度で検出され、DNA損傷を誘発することが確認された。活性酸素種濃度もDCP暴露に伴って上昇した。一連の検討からDCPは体内でCYP2E1などの酵素の触媒で代謝され、MGなどの活性中間代謝物による遺伝毒性や酸化代謝からの活性酸素種によるDNA損傷がDCPによる職業性胆管癌を誘発すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：1,2-Dichloropropane (DCP) is suspected to induce the cholangiocarcinoma among workers in an off-set printing company. Using experimental animals and human originated cell lines, we found that DCP can induce DNA damages, and CYP2E1 and other enzymes are involved in its metabolic activation and genotoxicity expression. After DCP exposure, methyl glyoxal (MG) can be detected with high concentrations in bile, and this intermediate metabolite shows high genotoxicity at very low concentrations. Besides, DCP exposure increases the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS), but addition of antioxidant attenuated the ROS level as well as DNA damages. These results suggest that DCP is metabolized by CYP2E1-mediated pathway and MG and ROS produced in the metabolic processes may contribute to the induction of occupational cholangiocarcinoma by this solvent.

研究分野：産業衛生

キーワード：職業性胆管癌 1,2-ジクロロプロパン 遺伝毒性 代謝活性化

1. 研究開始当初の背景

校正印刷業務に従事する労働者に若年の胆管がんが多発していることが2012年に報道され、社会的に高い関心を寄せられた。この業務は印刷機のインクを頻りに洗浄剤で落とす必要があり、その洗浄剤に塩素系有機溶剤1,2-ジクロロプロパン(DCP)やジクロロメタン(DCM)が含まれている。特にDCPについては、殆どの症例にそのばく露を受けた記録があり、発がんの原因物質として疑われている。実際、使用状況を想定した現場での再現実験では高濃度のDCPばく露が生じた。DCMやその他の使用物質である1,1,1-トリクロロエタン、灯油などは使用期間が短かったことから、主な原因物質ではないと推測された。

DCPの生体影響については動物実験の結果から報告された。マウスやラットを用いた急性・亜慢性実験では、肝細胞の変性、壊死などが観察された。また、事故などのヒトの急性中毒事例では急性肝障害が報告された。DCPの発がん性については、国際的に主要な機関による発がん性評価は「評価されていない」、「ヒトに対する発がん性については分類できない」となっている(その後2014年、国際がん研究機関で“人に対する発がん性が認められる”のグループ1に引き上げられた)。日本においては、校正印刷業の胆管がん多発が報告されたことを受け、日本産業衛生学会の委員会では、DCPおよび校正印刷工程の発がん性があると判断した。

マウスを用いたDCPの経口投与実験では、肝臓腫瘍の増加が観察されたが、ラットではばく露に関連した腫瘍性病変の増加は見られなかった。最近の報告では、マウスの吸入発がん実験では、雄にはハーダー腺の腺腫の発生増加、雌には細気管支-肺胞上皮がんを含む肺腫瘍の発生増加が認められた。ラットでは、雌雄ともに鼻腔腫瘍の発生増加が認められた。しかし、この吸入発がん実験では肝臓の腫瘍性病変が認められなかった。一方、北欧の研究者は北欧のがん登録データ解析の結果、印刷従事者の胆管がん発症率が高いことを発表し、日本での報告を支持した。

化学物質の遺伝毒性は発がん性との関連が強く、有害性評価の重要な指標である。DCPの遺伝毒性について、バクテリアを用いた*in vitro*試験では、塩基対置換型変異を惹起しやすい株では陽性であったが、フレームシフト変異を惹起しやすいとされる株については陰性であった。In vivoの遺伝毒性は、マウスの小核試験(陰性)、ラットの優性致死試験(陰性)の報告以外、見つからなかった。動物での変異原性についても報告されていない。

塩素系溶剤の遺伝毒性や発がん性は体内代謝と密接に関連している。DCPの代謝については、他の塩素系化合物と同様、酸化経路と抱合経路が提案されている。酸化反応におけるCYP2E1の関与が、精製したヒト由来の

酵素を用いた試験管系で報告されたが、体内での関与や他の酸化酵素の役割についてはまだ報告はない。一方で、DCPの代謝過程でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)によるGSHの抱合反応が起こるが、DCPの酸化代謝物と抱合するか、またはDCPに直接抱合するか、不明である。一般的にGSHとの抱合反応は、塩素系化合物の発がん性が生じると考えられている。さらに、GSTの分子種は数種類もあるが、DCMの代謝に関与しているGST T1-1がDCPの代謝にも関与しているか、または他の分子種が関与しているかは、解明されていない。GST T1-1は、マウスでは肝細胞の核に局限して発現しているが、ヒトでは肝細胞だけではなく、胆管内皮細胞にも発現している。この違いはDCMがそれぞれヒトでは胆管がん、マウスでは肝細胞腫瘍を誘発する現象の原因と思われている。

DCPの職業性胆管がん発生における役割については、発がん試験だけでは解明できない。重要なのは、体内におけるDCP代謝経路の解明、DCP代謝物/代謝経路と遺伝毒性・発がん性との関係の解明などである。しかし、この問題はほとんど検討されていないのが現状である。

2. 研究の目的

校正印刷工場の胆管がん多発に長期・多量に使用されていた1,2-ジクロロプロパン(DCP)が原因物質として疑われているが、その体内代謝経路や遺伝毒性などが殆ど不明である。本研究は、代謝酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いて、毒性学だけではなく、分子生物学や分析化学などの技法を併用して、DCPの代謝経路と活性代謝物の同定、遺伝毒性の有無とその発生メカニズムの解明などを行い、DCPの発がん性を究明し、有効な労働衛生対策の策定や基準値設定に根拠を提供することが目的である。

3. 研究の方法

野生型や代謝酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いてDCPの急性と亜慢性吸入ばく露実験を行い、肝臓および他の組織におけるDNA・染色体上の種々の損傷や肝障害をエンドポイントとして、DCPの生体影響を検討する。また、これらのマウスを用いて、尿、血液と肝組織におけるDCPの各種代謝物の変化、体内動態を解析し、遺伝毒性発現パターンとの関係を解明する。DCPの代謝酵素に誘導、抑制、または競合しうる他の因子について検討し、多方面からDCPの生体影響の解明を行う。

4. 研究成果

吸入ばく露実験では、DCP吸入ばく露したマウスの肝組織におけるDNA二本鎖切断(パルスフィールドゲル電気泳動法解析)やそれに伴って誘導されるヒストンH2AXの

リン酸化レベルが上昇した。また、アルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) 遺伝子ノックアウトマウスを用いた吸入ばく露実験では、ばく露マウスの肝 DNA 損傷 (コメットアッセイ法による解析) が有意に上昇し、代謝酵素 CYP2E1 の抑制剤である 4-methylpyrazole の投与によって、DNA 損傷の程度が抑制された。この結果から、DCP の代謝に CYP2E1 や ALDH2 が関与しており、この過程での中間代謝物が遺伝毒性を誘発することが示唆された。

DCP の代謝や毒性発現における GST の役割については、研究期間中に GST はあまり大きな役割を果たしていないことを示唆した他の研究報告が出たので、CYP による酸化経路を重点的に検討することとなった。

DCP の遺伝毒性に係わる代謝経路についてさらに検討した。マウス肝のホモジネートとミクロソーム分画に DCP を添加し、1-chloro-2-propanol と methyl glyoxal が検出された。また培養細胞を用いた実験でもこれらの中間代謝物は基質用量依存的に産生されることが確認できた。酵素阻害剤を用いた実験から、CYP2E1、1A2 及び ADH がこの代謝過程に関与していることも明らかにした。

インビトロ解析では、ヒト肝由来細胞及び胆管由来細胞に DCP と上記 2 種類の間接代謝物を作用した後、いずれもヒストン H2AX のリン酸化が上昇し、特に methyl glyoxal は低濃度においても DNA 損傷性を有することが認められた。

以上の結果、低濃度でも遺伝毒性を示す methyl glyoxal が DCP の遺伝毒性作用・発がん性に係わっており、また CYP や ADH がこの活性化経路を媒介することが示唆された。

マウスを用いて DCP ばく露後これらの代謝物の体内動態を解析した。ばく露後の血液、肝臓及び胆嚢胆汁のいずれの試料からも、1-chloro-2-propanol と methyl glyoxal が DCP ばく露濃度依存的に検出された。しかし、methyl glyoxal は胆汁中での濃度は血液中の 100 倍以上と、著しく高かった (図 1)。代謝物は肝細胞で生成されるが、その後血液や胆

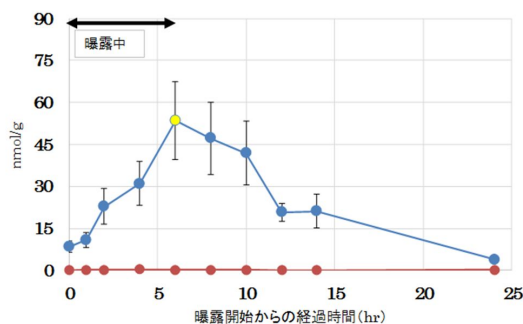


図 1. 300 ppm の DCP に 6 時間ばく露したマウスの血中 (赤線) 及び胆汁中 (青線) における methyl glyoxal 濃度の変化。

汁に移行すると考えられる。Methyl glyoxal は何らかのメカニズムによって胆汁で濃縮され、胆管上皮細胞がこの高濃度な代謝物にばく露されることが考えられる。

培養細胞を用いた実験では、DCP の代謝過程で活性酸素種濃度が上昇し、DNA 損傷度も上昇した。CYP 2E1 の阻害剤は両方の上昇を抑制した。一方で、活性酸素除去剤の処理によって、活性酸素種濃度の低下とともに、DNA 損傷度も明らかに抑制された。(図 2。発表論文から引用)。これらの結果から、DCP の遺伝毒性作用は一部は活性酸素種によるもので、CYP2E1 はこの過程にも関与していることが示唆された。

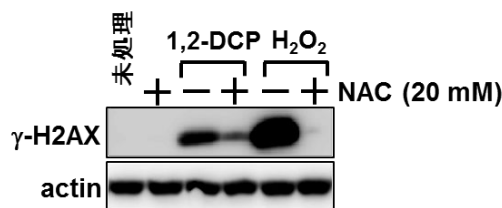


図 2. 活性酸素除去剤 NAC の事前処理によって、ヒト肝由来細胞で DCP または H₂O₂ 処理による H2AX リン酸化 (γ -H2AX, DNA 損傷マーカー) が軽減された。Actin は相対定量用の内在性コントロールマーカーである。

一連の検討から DCP は体内で CYP2E1 などの酵素の触媒で代謝され、methyl glyoxal などの活性中間代謝物による遺伝毒性や酸化代謝からの活性酸素種による DNA 損傷が生じることによって、胆管部位のがんが誘発されると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Toyooka T, Yanagiba Y, Suda M, Ibuki Y, Wang RS (2017) 1,2-Dichloropropane generates phosphorylated histone H2AX via cytochrome P450 2E1-mediated metabolism. Toxicology Letters 272, 60–67. 査読有。
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.03.009>

[学会発表](計 8 件)

王 瑞生, 鈴木哲矢, 柳場由絵, 須田 恵 (2014) Aldh2 遺伝子ノックアウトマウスにおける 1,2-ジクロロプロパンの遺伝毒性について. 第 42 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 抄録, p28.
 王 瑞生, 豊岡達士, 柳場由絵, 須田 恵 (2015) 1,2-ジクロロプロパン吸入ばく露後のマウス肝臓における DNA 損傷について. 第 43 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, プログラム・講演要旨集, p26.

Wang RS, Suzuki T, Yanagiba Y, Suda M (2015) Mechanistic Study on the Hepatotoxic Effects of 1,2-Dichloropropane in ALDH2 Knockout Mice. 51st Congress of the European Society of Toxicology, Toxicology Letters, page s313-314, 238 (2S), 2015.

Wang RS, Toyooka T, Yanagiba Y and Suda M (2016) Detection of DNA double-strand breaks in the liver of mice exposed to 1,2-dichloropropane. The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans. The Toxicologist, pages 95-96, 150(1), 2016.

須田 恵, 柳場由絵, 鈴木哲矢, 豊岡達士, 王 瑞生 (2016) 1,2-ジクロロプロパン曝露時の血液・胆汁中の代謝物濃度の比較. 第44回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 抄録集, p23.

王 瑞生, 豊岡達士, 柳場由絵, 須田 恵 (2016) インピトロ及びインピボにおける1,2-ジクロロプロパンのDNA損傷について. 第89回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 58 (Suppl.), 420.

Wang RS, Yanagiba Y, Toyooka T and Suda M (2016) Intermediate metabolites of 1,2-dichloropropane are responsible for the genotoxic effects in mice. 52nd European Congress of the European Societies of Toxicology. Toxicology Letters 258S, S91.

Wang RS, Toyooka T, Yanagiba Y, Suda M (2016) 1,2-Dichloropropane and its metabolites display genotoxicity in human liver- and bile duct-derived cells. 14th International Congress of Toxicology. Toxicology Letters 259S, S179.

〔図書〕

なし。

〔産業財産権〕

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 瑞生 (WANG, Rui-Sheng)

独立行政法人 労働者健康安全機構 労働安全衛生総合研究所 部長

研究者番号：10321895

(2) 研究分担者

柳場由絵 (YANAGIBA, Yukie)

独立行政法人 労働者健康安全機構 労働安全衛生総合研究所 主任研究員

研究者番号：90467283

須田 恵 (SUDA, Megumi)

独立行政法人 労働者健康安全機構 労働安全衛生総合研究所 統括研究員

研究者番号：90415969

鈴木哲矢 (SUZUKI, Tetsuya)

広島大学 大学院 医歯薬保健学研究院 助教

研究者番号：20573950