

令和元年6月4日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15383

研究課題名(和文)トリクロロエチレンによる全身性皮膚-肝障害はCYP2E1自己抗体により惹起される

研究課題名(英文)Anti-CYP2E1-induced by trichloroethylene exposure might be involved in the hypersensitivity syndrome

研究代表者

那須 民江 (NASU, Tamie)

中部大学・生命健康科学部・特任教授

研究者番号：10020794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：トリクロロエチレン(TCE)による全身性皮膚肝障害(hypersensitivity syndrome、HS)患者67名、性と年齢をマッチさせたTCE HS-耐性controlとTCE非曝露controlそれぞれ67名の血清CYP2E1抗体を測定した。男性のTCE HS-耐性controlの血清CYP2E1抗体値は非曝露controlより高かったが、患者との間に差が認められなかった。女性のTCE HS-耐性controlの血清CYP2E1抗体値もTCE非曝露controlより高かったが、患者群とTCE非曝露群との差はなかった。喫煙と飲酒習慣はCYP2E1抗体値には影響を与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TCEによるHSはHLA-B*の遺伝子多型によって頻度が変わる。HLA-B*13:01はTCE HSの感受性遺伝子であり、この多型が多い中国や東南アジアでの発生頻度が多い。しかし発生頻度が少ないとはいえ、わが国でも発症している。これは作業環境のTCEをもっと低める必要があると同時にHS発症のメカニズムを明らかにすることの重要性を示す。この研究はHSがTCE曝露約28日後に発症することにヒントを得て、TCEによるHS発症のメカニズムが明らかにすることが目的である。学術的に意義あることであり、予防につながるもので社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：We recruited 67 blood samples of trichloroethylene (TCE)-induced hypersensitivity syndrome (HS) patients, those of sex- and age-matched TCE HS-tolerant control and TCE non-exposed control, respectively. Serum CYP2E1 antibody was measured in each group using ELISA method. In men, the value of TCE HS-tolerant control was higher than that of TCE non-exposed control, while no difference was observed between the antibody levels of the former and patient group. In women, although the value of TCE HS-tolerant control was higher than that of TCE non-exposed control, that of patient group was lower than the TCE HS-tolerant control group, and no difference was observed between patients and TCE non-exposed group. Smoking and drinking habits did not affect TCE-induced serum CYP2E1 antibody in both sexes.

研究分野：環境毒性学・健康科学

キーワード：トリクロロエチレン Hypersensitivity CYP2E1抗体 性差 喫煙 飲酒 皮膚病型 疫学研究

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の中国広東省職業病防治院との共同の研究によって、トリクロロエチレン (TCE) による全身性の皮膚-肝障害 (過敏症症候群、hypersensitivity syndrome: HS) の実態が明らかになってきた。この疾患は今まで報告されている量-反応関係が明らかな中枢神経系への影響などとは発症経緯が異なっている。即ち、HS は曝露開始から平均約 28 日で発症し、38 以上の発熱、肝炎、白血球や好酸球の増多 (Nakajima et al 2003; Huang et al 2007; Kamijima et al 2007; 2008) TNF や IL10 などのサイトカインの上昇を伴い、ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV6) の再活性化がみられることが多いなど、遅発性免疫性疾患である (Kamijima et al 2013)。しかも患者の TCE 作業終了後の尿中代謝物トリクロロ酢酸の 95% 予測区間の下限が 10mg/l と低いことから考えると (Nakajima et al 2018) 予防のためには TCE 曝露濃度の低減化が必要と考えられる。加えて、この発症には HLA-B*13:01 遺伝子多型が関与することが明らかにされてきた (Li et al 2007; Watanabe et al 2010)。しかし TCE 曝露と HLA-B*13:01 多型間、あるいは多型と HS 発症のメカニズムに関してはいまだ不明である。

TCE の主な代謝酵素は CYP2E1 である。この酵素の触媒の下、抱水クロラールを経て、トリクロロエタノールとトリクロロ酢酸に代謝される (Nakajima 1997)。TCE による急性肝障害は TCE から CH に代謝される過程にあることは解明されているが、活性代謝物について十分研究されていない。Gilbert は (2010) 「TCE による自己免疫性肝炎の原因として CYP2E1 によって生成するジクロロアセチルリジン付加体」を上げていたので、申請者はこの付加体の検出を平成 24 年~26 年の挑戦的萌芽研究で試みた。しかし該当する付加体をさがすことは出来なかった。

一方、TCE はモルモットのマキシミゼーションテストに陽性反応を示す (Tang et al 2008)。このモデル動物と TCE HS 患者 (5 名) の血清に CYP2E1 抗体に反応する 25kD と 50kD 付近の蛋白が増えていることを発見した。プロテオミクス解析により、この蛋白は IgG であった (平成 26~27 年度挑戦的萌芽研究報告書)。麻酔薬のハロタンは TCE と同じく CYP2E1 で代謝され肝炎を引き起こす。この一因として CYP2E1 自己抗体の上昇があげられている (Eliasson and Kenna 1996)。このように CYP2E1 は代謝過程で自己抗体を作ると報告されているので、TCE 曝露によっても「CYP2E1 に対する自己抗体が上昇する」という仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

「TCE 曝露によって誘導される Hypersensitivity は CYP2E1 に対する自己抗体による」という仮説を検証すること。

3. 研究の方法

(1) 対象者 中部大学の倫理委員会の承認を経て行われた。申請者らは 15 年間の中国との共同研究によって、107 名の患者と 180 名の TCE 曝露対照者 (TCE 曝露を 66 日以上受けたが、疾病を発症していない健康労働者) の調査を行ってきた。これらに TRI 非曝露対象者 (TRI を使用していない健康診断受診者から選択) を加えて対象者を抽出した、2004 年から 2008 年中国広東省職業病防治院に入院した TCE HS 患者 67 名、性・年齢 (± 2) でマッチさせた患者発生および非発生 12 工場で働く TCE HS-tolerant control および健診来訪者 (TCE 非曝露 control) それぞれ 67 名を解析対象者とした。患者の採血は入院日に、TCE HS-耐性 control の採血と採尿は作業終了時に行った。TCE 非曝露 control の採血は健診時に行った。性・年齢、喫煙・飲酒習慣および TCE の使用歴は質問紙により調査した。

(2) ヒト P450 の精製

CYP2E1 細胞の抽出

HepG2 細胞より mRNA を抽出した。その cDNA を template として LA-taq (TAKARA) を用い、プライマー 5' -ATGCTGCCCTCGGAGTCACCGT-3'、5' -TGAGCGGGGAATGACACAGAGTTTGTAACG-3' で CYP2E1 遺伝子を増幅した。PCR 産物は pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA ベクターに組換え、クローン化した組換えベクター (CYP2E1 遺伝子) を NIH3T3 細胞 (マウスケラチノサイト) に導入し培養した。RIPA バッファーを用いてヒト CYP2E1 を培養細胞から抽出した。

CYP2E1 蛋白の精製

細胞抽出液を anti-CYP2E1 と Protein A SepharoseTM CL-4B (IgG を特異的に補足する) に混合して、免疫沈降し、anti-CYP2E1 (rabbit) と anti-rabbit-HRP (horseradish peroxidase) で視覚化し、CYP2E1 たんぱく質を精製した。精製したものがヒト CYP2E1 であることを、ベクターを導入していない細胞と比較することによって確認した。

(3) 血清 CYP2E1 抗体測定法

ELISA 法 (サンドイッチ法) を開発した。血清は 800 倍希釈後の検体を用いた。CYP2E1 抗体に結合した HRP 標識抗ヒト IgG を o-phenylenediamine で発色させ、490nm の吸光度を測定し、この吸光度を抗体値とした。

(4) 統計的検定

得られた吸光度値の3群間比較はTucky検定を、2群間の検定にはt検定を用いた。またCYP2E1抗体値誘導に与える因子の解析はTCE HS-tolerant control群とTCE非曝露control群に対してマッチングを考慮した2元配置共分散分析で行った。いずれの解析も有意水準 $p < 0.05$ を用いた。

4. 研究成果

(1) CYP2E1 タンパク

精製したCYP2E1タンパクの電気泳動解析の結果を図1に示す。市販のCYP2E1タンパクのバンドはぼやけていたが、我々が合成したタンパクは50kDより少し上にはっきりと下バンドが認められた。このバンドは、組み込まない細胞には確認されなかった。また、市販品よりは精製度が高いと考えられた。

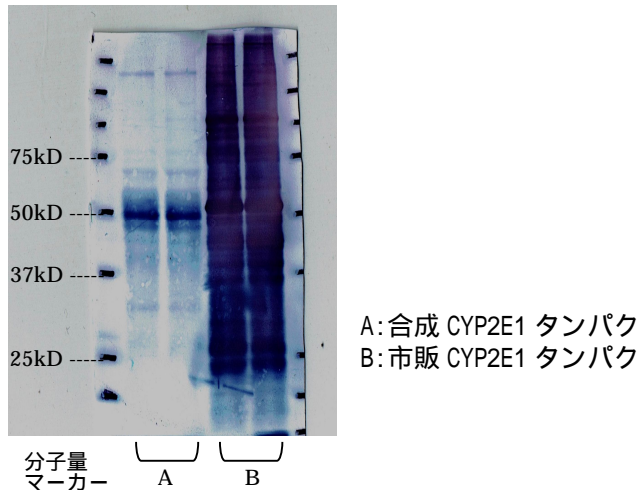


図1 合成CYP2E1と市販CYP2E1のウエスタンブロット

(2) ELISAによるCYP2E1抗体の検出方法の検討

血清200倍から1000倍希釈でCYP2E1抗体の測定を行った。この範囲内で血清の希釈倍数と抗体値のlog変換値の間に良い直線関係がみられた、以後、血清800倍希釈のサンプルを使用した。

(3) HS患者、HS-tolerant control、およびTCE非曝露control群のCYP2E1抗体の測定結果

男性と女性の結果を図2と図3に示す。男性において、TCE HS-tolerant controlのCYP2E1抗体はTCE非曝露controlの2.3倍上昇していた。TCE HS患者群のCYP2E1抗体値はTCE非曝露controlより1.8倍高かったが、TCE HS-tolerant controlとの間に有意差は認められなかった。女性においては、TCE HS-tolerant controlのCYP2E1抗体はTCE非曝露controlの2.7倍上昇しており、女性の方が男性より誘導割合が高かった。しかし女性のTCE HS患者群のCYP2E1抗体値はTCE非曝露controlと変わらず、TCE HS-tolerant controlより低かった。

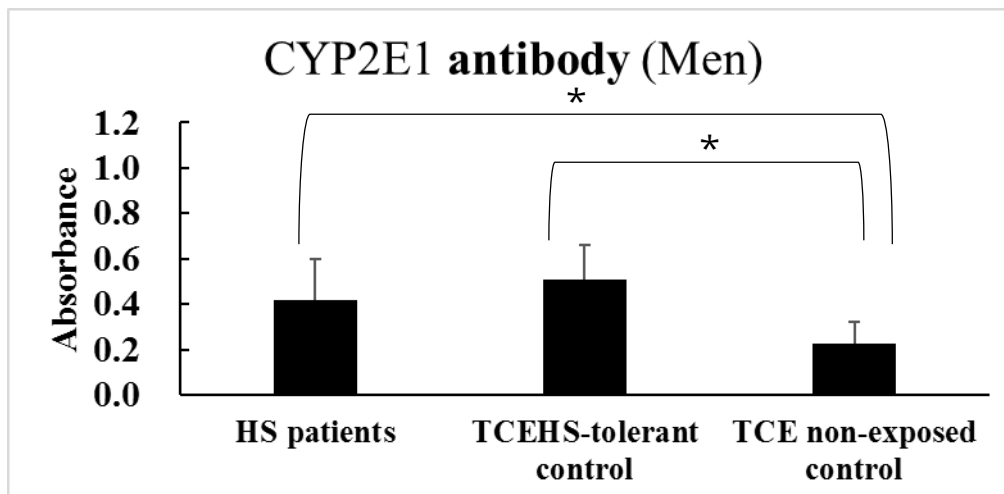


図2 血清CYP2E1抗体値(平均±SD,男性)
* 2群間に有意差あり($p < 0.05$)

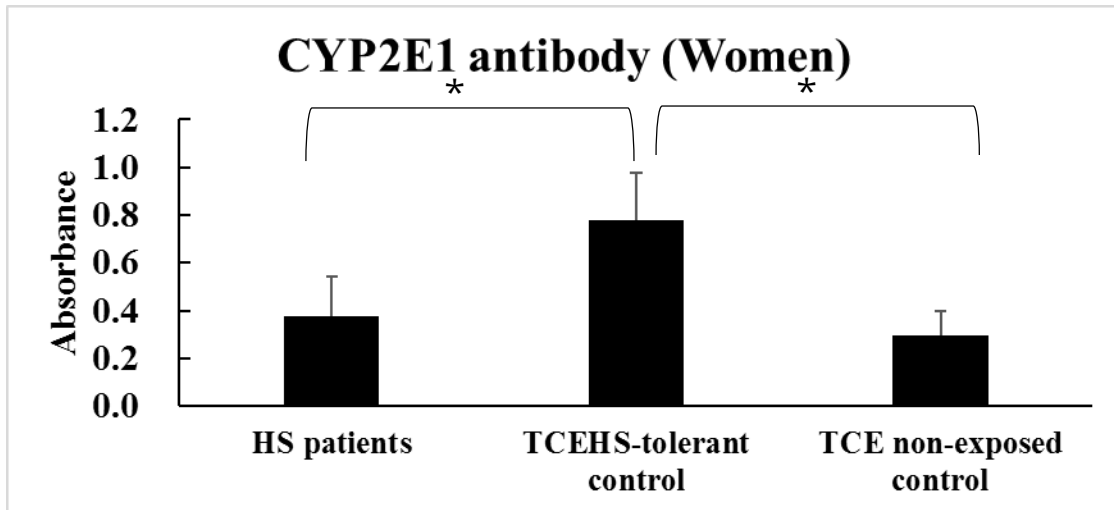


図 3. 血清 CYP2E1 値 (平均 ± SD、女性)
* 2 群間に有意差あり ($p < 0.05$)

TCE HS-tolerant control と TCE 非曝露 control の CYP2E1 抗体値を用い、CYP2E1 抗体値に与える影響を解析した。CYP2E1 抗体値に影響を与える因子は TCE に曝露されることのみであり、飲酒や喫煙習慣は影響を与えなかった。尿中トリクロロ酢酸濃度も影響を与えなかった。この結果は男性のみならず女性においても観察された。患者の CYP2E1 抗体レベルに皮膚の病型による差異は認められなかった。

以上の結果は、ハロタン肝炎と同様に、TCE HS 発症、特に肝障害発症に CYP2E1 抗体生成が関わっている可能性を示す。

<引用文献>

- Eliasson E, Kenna J. Cytochrome P450 2E1 is a cell surface autoantigen in halothane hepatitis. *Mol Pharm* 50:573-582, 1996
- Gilbert K. Xenobiotic exposure and autoimmune hepatitis. *Hepatitis Res and Treat* vol.2010, Article ID 248157, 10pages, DOI:10.1155/2010/248157, 2010
- Huang H, Kamijima M, Wang H, Li Sm 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(6):417-23, 2006
- Kamijima M, Wang H, Huang H, Li L, Shibata E, Lina B, Sakai K, Liu H, Tsuchiyama F, Chwn J, Okamura A, Huang X, Hisanaga N, Huang Z, Ito Y, Takeuchi Y, Nakajima T. Trichloroethylene causes generalized hypersensitivity skin disorders complicated by hepatitis. *J Occup Health* 50(4):328-38, 2008
- Kamijima M, Hisanaga N, Wang H, Nakajima T. Occupational trichloroethylene exposure as a cause of idiosyncratic generalized skin disorders and accompanying hepatitis similar to drug hypersensitivities. *Int Arch Occup Environ Health* 80:357-370, 2007
- 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 Dend 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 Derm Sci* 72:218-224, 2013
- Li H, Dai Y, Huang H, Li L, Leng S, Cheng J, Niu Y, Duan H, Liu Q, Zhang X, Huang X, Xie J, Feng Z, Wang J, He J, Zheng Y. Li HLA-B*1301 as a biomarker for genetic susceptibility to hypersensitivity dermatitis induced by trichloroethylene among workers in China. *Environ Health Perspect* 115:1553-1556, 2007
- Nakajima T. Cytochrome P450 Isoforms and the Metabolism of Volatile Hydrocarbons of Low Relative Molecular Mass. *J Occup Health* 39:83-91, 1997
- Nakajima T, Yamanosgita O, Kamjima M, Kishi R, Ichihara G Generalized skin reaction to trichloroethylene exposure: a review from viewpoint of drug-metabolizing enzymes. *J Occup Health* 45:8-14, 2003
- Nakajima T, Wang H, Ito Y, Naito H, Wang D, Zhao N, Li H, Qui X, Xia L, Chen J Wu Q, Li L, Huang H, Qifeng WU2, Laiyu LI2, Huang H, Kamijima M. Exposure reconstruction of trichloroethylene among patients with occupational trichloroethylene hypersensitivity syndrome. *Ind Health* 56:300-307, 2018
- Tang X, Que B, Song Z, Li S, Yang Z, Wang H, Huang H, Kamijima M, Nakajima T, Lin Y, Li L. Characterization of Liver Injury Associated with Hypersensitive Skin

Reactions Induced by Trichloroethylene in the Guinea Pig Maximization Test. J Occup Health 50:14-21, 2008

Watanabe H, Thoyama M, Kamijima M, Nakajima T, Yoshida T, Hashimoto K, Iijima M. Occupational trichloroethylene hypersensitivity syndrome with human herpesvirus-6 and cytomegalovirus reactivation. Dermatology 221:17-22, 2010

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

(英語論文は旧姓 Nakajima を使用)

Nakajima T, Wang H, Ito Y, Naito H, Wang D, Zhao N, Li H, Qiu X, Xia L, Chen J, Wu Q, Li L, Huang H, Kamijima M. Exposure reconstruction of trichloroethylene among patients with occupational trichloroethylene hypersensitivity syndrome. Ind Health 56(4):300-307, 2018. 査読有. DOI:10.2486/indhealth.2017-0202.

Azuma K, Endo G, Endo Y, Fukushima T, Hara K, Hori H, Horie S, Horiguchi H, Ichiba M, Ichihara G, Ikeda M, Ishitake T, Ito A, Ito Y, Iwasawa S, Kamijima M, Karita K, Katoh T, Kawai T, Kawamoto T, Kishi R, Kumagai S, Kusaka Y, Matsumoto A, Miyagawa M, Miyauchi H, Morimoto Y, Nagano K, Naito H, Nakajima T, Nomiyama T, Okuda H, Omae K, Sakurai H, Sato K, Sobue T, Suwazono Y, Takebayashi T, Takeshita T, Takeuchi A, Tanaka M, Tanaka S, Tsukahara T, Tsunoda M, Ueno S, Ueyama J, Umeda Y, Yamano Y, Yamauchi T, Yano E. Occupational exposure limits for ethylene glycol monobutyl ether, isoprene, isopropyl acetate and propyleneimine, and classifications on carcinogenicity, occupational sensitizer and reproductive toxicant. J Occup Health 59(4):364-366, 2017. 査読有. DOI:10.1539/joh.17-0148-OP.

那須民江、有機溶剤中毒予防の新しい展開、Peripheral Nerve 28(2):202-207、2017、査読有

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=et2perip/2017/002802/025&name=0202-0207j&UserID=157.110.132.2>

青木康展、上田佳代、内山巖男、上島通浩、祖父江友孝、武林亨、中杉修身、那須民江、新田裕史、野見山哲生、山崎新、トリクロロエチレン健康リスク評価作業部会、トリクロロエチレン健康リスク評価作業部会報告書 トリクロロエチレンに係る健康リスク評価について、大気環境学会誌、第 52 巻、第 2 号、A25-A57、2017。査読有、

<http://www.jsae-net.org/magazine/pdf/Vol52.pdf>

Azuma K, Endo G, Endo Y, Hara K, Harada K, Hori H, Horie S, Horiguchi H, Ichiba M, Ichihara G, Ikeda M, Ishitake T, Ito A, Iwasawa S, Kamijima M, Karita K, Kawai T, Kawamoto T, Koizumi A, Kumagai S, Kusaka Y, Miyagawa M, Morimoto Y, Nagano K, Nasu T, Nomiyama T, Omae K, Sato K, Okuda H, Sakurai H, Sobue T, Suwazono Y, Takebayashi T, Takeshita T, Takeuchi A, Tanaka M, Tanaka S, Tsukahara T, Tsunoda M, Ueno S, Yamano Y, Yamauchi T, Yano E. Occupational exposure limits of lead, dimethylamine, n-butyl-2,3-epoxypropyl ether, and 2-ethyl-1-hexanol and carcinogenicity and occupational sensitizer classification. J Occup Health 58(4 Spec No):385-387, 2016. 査読有. DOI:10.1539/joh.16-0155-OP.

ENDO Y, IKEDA M, KAWAI T, KISHI R, KOIZUMI A, NAGANO K, NASU T, SAKURAI H, SATOH H, SHIMIZU H, TANAKA M, TAKHEUCHI Y, YANO E. Recommendation of Occupational Exposure Limits(2015-2016). J Occup Health 57(4):394-417,2015. 査読有.

DOI:10.1539/joh.R0EL2015.

〔学会発表〕(計 4 件)

那須民江、王海蘭、袁媛、内藤久雄、伊藤由起、八谷寛、上島通浩、トリクロロエチレン(TCE)による CYP2E1 抗体上昇と hypersensitivity syndrome との関係、第 92 回日本産業衛生学会総会、2019 年

那須民江、王海蘭、伊藤由起、内藤久雄、柳場由絵、八谷寛、上島通浩、トリクロロエチレンによる過敏症候群(HS)に対する曝露濃度と感受性因子の交互作用、第 88 回日本衛生学会学術総会、2018 年

那須民江、有機溶剤中毒予防の新しい展開、第 28 回日本末梢神経学会学術集会、2017 年
那須民江、トリクロロエチレンによる Hypersensitivity-患者の曝露濃度から許容濃度再考の必要性を考察する-、第 89 回日本産業衛生学会、2016 年

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：王 海蘭

ローマ字氏名：(WANG, hai lan)

研究協力者氏名：袁 媛
ローマ字氏名：(YUAN yuan)
研究協力者氏名：上島 通浩
ローマ字氏名：(KAMIJIMA, michihiro)
研究協力者氏名：伊藤 由起
ローマ字氏名：(ITO, yuki)
研究協力者氏名：内藤 久雄
ローマ字氏名：(NAITO, hisao)
研究協力者氏名：川本 善之
ローマ字氏名：(KAWAMOTO, yoshiyuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。