

令和元年6月24日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07105

研究課題名（和文）アクリルアミド神経毒性発現機序の解明および、ビタミンB1による治療効果の検討

研究課題名（英文）Elucidation of expression mechanism of acrylamide-induced neurotoxicity, and development of therapeutic effects by vitamin B1.

研究代表者

長嶋 大地（Nagashima, Daichi）

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：20713720

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アクリルアミドによる神経毒性発現メカニズムの解明と、ビタミンB1による神経毒性に対する治療法の探索を試みた。プロテオーム解析で同定したタンパク質のうち、ウエスタンブロット法にて確認された5種類のタンパク質の発現をPC12細胞にて確認した。PC12細胞は神経伸長因子により伸長させ、アクリルアミドは0mMから10mMまでの濃度を検討した。その結果、動物実験とは異なり、5種類のタンパク質に有意な変化はなかった。一方、細胞内ATP濃度を測定したところ曝露30分後においてATP量の減少がみられた。ビタミンB1による同時投与を試みたが、ATP量の回復は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

acrylamideは疫学研究において、長期曝露により感覚障害や歩行障害といった末梢神経のみならず、記憶障害や言語障害、抑うつ症状といった中枢神経障害を引き起こすことが知られているが、その毒性発現メカニズムは十分に解明されていない。本研究結果では、acrylamide曝露時の影響マーカーを探索し、エネルギー産生量について検討することで、神経毒性発現メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to elucidate the mechanism of acrylamide-induced neurotoxicity and to search for a therapeutic effect for neurotoxicity by vitamin B1. The expression of five proteins confirmed by Western blotting was performed in PC12 cells. PC12 cells were elongated by nerve growth factor and acrylamide was exposed at concentrations from 0mM to 10mM. As a result of this study, there were no significant changes in the expression of five proteins, unlike the animal experiments. However, concentration of intracellular ATP was significantly reduced at 30 minutes after exposure. We administered vitamin B1 after exposure to acrylamide, there was no significant recovery through the amount of ATP.

研究分野：衛生学

キーワード：アクリルアミド 神経毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における acrylamide は、紙質増強剤、土壌凝固剤、塗料、接着剤の原料等といった産業現場での用途のみならず、核酸やタンパク質を電気泳動する際の支持体として多くの研究者が使用している。井戸水に流出した高濃度 acrylamide を飲水した慢性中毒、自殺企図による亜急性中毒といった事例も報告されている。一方、近年では食品中にも存在することが明らかとなった。2002年4月、スウェーデン国立食品局は、高温調理されたデンプンを含む食品中に acrylamide が高濃度に検出されたことを発表し、その後、世界各国で食品中の acrylamide 含有量を低減させる働きが活発になった。我が国においても、厚生労働省より積極的な情報提供及び情報収集が行われている。

acrylamide は疫学研究において、長期曝露によって感覚障害や歩行障害といった末梢神経障害のみならず、記憶障害や言語障害、抑うつ症状といった中枢神経障害を引き起こすことが知られているが、その毒性発現メカニズムは十分に解明されておらず、治療法も確立していない。

2. 研究の目的

本研究では以下の三点を通じて、acrylamide 曝露時における神経毒性発現メカニズムの解明および治療法の確率を試みた。

- (1) プロテオーム解析を行い、中枢神経毒性発現時の影響マーカーを探索する。
- (2) acrylamide 曝露によるミトコンドリアの器質的障害の有無を確認し、エネルギー産生能との関係を明らかにする。
- (3) ビタミン B1 の投与により、エネルギー産生能との関係及び、先行研究における発現変化のあった諸酵素群との関係を明らかにし、薬理的に有用性を検討する。

3. 研究の方法

(実験 1)

○プロテオーム解析

9-10週齢の Wistar ラットにアクリルアミド 0、2.0、20mg/kg、1週間または 0、0.2、2、20mg/kg、5週間の強制経口投与を行った。曝露実験終了後、断頭にて海馬を剖出、凍結保存を行った。海馬よりタンパク質を抽出し、プロテオーム解析に供した。その結果、アクリルアミド曝露において有意な発現量の変化が見られたタンパク質のうち、1週間曝露では 2 個、5週間曝露では 22 個のタンパク質を同定した。その後、5種類のタンパク質を選定し、ウエスタンブロット法を用いて定量することでプロテオーム解析の裏付けを図った。

(実験 2)

○ミトコンドリア機能とエネルギー産生障害が及ぼす神経障害の解明

ラット副腎褐色細胞腫 (PC12 細胞) を用いて、エネルギー産生能について検討した。PC12 細胞は神経伸長因子により神経突起を伸長させ実験に供した。細胞実験を行うにあたり、まず、曝露濃度および曝露時間を決定するための実験を行った。その後、形態学的観察およびエネルギー産生量を定量した。エネルギー産生量は Adenosine triphosphate (ATP) を測定することで評価した。また、タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法を用いてタンパク質の発現量を定量した。

(実験 3)

○acrylamide 神経毒性に対するビタミン B1 の効果及び、エネルギー産生能との関係の解明
曝露濃度および、曝露時間が決定した後、ビタミン B1 を同時投与し、エネルギー産生量とタンパク質の変化から治療効果の有用性を検討した。

4. 研究成果

(実験 1)

プロテオーム解析の結果から、1週間曝露群では 2 種類のタンパク質の発現量が増加した。5週間曝露群では計 22 種類のタンパク質に変化があり、そのうち 9 種類のタンパク質の発現量が増加し、13 種類のタンパク質の発現量が減少した。また、ウエスタンブロットの結果から、5種類のタンパク質はプロテオーム解析と同様な発現量の変化を示し、プロテオーム解析の結果を裏付け、本実験により同定されたタンパク質は影響マーカーとしての可能性を見出した。

(実験 2)

PC12 細胞の生存率は acrylamide の曝露により、濃度依存的・時間依存的に減少を認めた。曝露後 24 時間において、acrylamide 濃度は 1.25mM 以下では、生存率に影響がないことが確認された。曝露後の ATP 量を測定した結果、曝露 30 分後での 0.1mM、1mM において有意な減少が見られ、短時間でエネルギー産生量に変化を示すことが明らかとなった。形態学的には神経突起の伸長が抑制傾向にあるが、有意な変化は見られなかった。実験 1 で確認した 5 種類のタンパク質の発現量を PC12 細胞にて確認したが、発現量に有意な変化は見られなかった。ミトコンドリアの器質的障害については走査型電子顕微鏡を用いて現在確認中である。

(実験3)

PC12細胞を用いた実験において、acrylamideの曝露濃度および曝露時間は決定し、ビタミンB1の同時投与を試みたが、acrylamide単独曝露時と同様にATP量に有意な変化は見られなかった。また、影響マーカーとしての有用性が示唆されたタンパク質についても、動物実験と同様な結果にはならなかった。

以上より、本研究結果は動物実験と細胞実験ではコンディションが異なるものの、acrylamide曝露後、早期にエネルギー産生量の低下を示し、毒性発現への関与が示唆された。一方、ビタミンB1によるエネルギー産生量の回復は見られず、治療法としての確立には更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Nagashima D, Zhang L, Kitamura Y, Ichihara S, Watanabe E, Zong C, Yamano Y, Sakurai T, Oikawa S, Ichihara G. Proteomic analysis of hippocampal proteins in acrylamide-exposed Wistar rats. Arch Toxicol. 査読有. 2019. [Epub ahead of print].

Zong C, Hasegawa R, Urushitani M, Zhang L, Nagashima D, Sakurai T, Ichihara S, Ohsako S, Ichihara G. Role of microglial activation and neuroinflammation in neurotoxicity of acrylamide in vivo and in vitro. Arch Toxicol. 査読有. 2019. [Epub ahead of print].

〔学会発表〕(計4件)

長嶋大地、黄振烈、市原佐保子、及川伸二、市原学、山野優子. 中枢神経毒性を有する親電子性物質曝露時の影響マーカーの探索. 第92回日本産業衛生学会. 2019.

X. Zhang, K. Morikawa, Y. Mori, C. Zong, L. Zhang, E. Garner, C. Huang, W. Wu, J. Chang, D. Nagashima, T. Sakurai, S. Ichihara, S. Oikawa and G. Ichihara. Proteomic Analysis of Liver Proteins of Mice Exposed to 1,2-dichloropropane. Society of Toxicology 58th Annual Meeting. 2019.

森川浩太、張驍、森有利絵、宗才、張靈逸、エドウィン ガーナ、黄晉彦、呉文亭、常杰、長嶋大地、櫻井敏博、市原佐保子、及川伸二、市原学. 1,2-ジクロロプロパン曝露マウスにおける肝臓のプロテオミクス. 第13回ナノ・バイオメディカル学会. 2018.

M. Yamamura, K. Morita, T. Matsuzoe, L. Zhang, K. Morita, C. Zhong, D. Nagashima, T. Sakurai, S. Ichihara, G. Ichihara. Autophagy in the cerebellar Purkinje cell induced by exposure to acrylamide. 10th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health. 2017.

〔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:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山野優子、市原学、市原佐保子、櫻井敏博

ローマ字氏名：Yuko Yamano, Gaku Ichihara, Sahoko Ichihara, Toshihiro Sakurai

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。