

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 25 日現在

機関番号：82629

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15862

研究課題名(和文)薬物代謝酵素CYP2E1による産業化学物質毒性評価システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of Toxicity Assessment System for Industrial Chemicals by Drug Metabolizing Enzyme CYP2E1

研究代表者

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・化学物質情報管理研究センター有害性評価研究部・
上席研究員

研究者番号：90467283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、労働現場で使用していた化学物質の曝露により胆管がんの多発する事例や化学工場での膀胱がんの発生が報告された。現場で使用される産業化学物質には、遺伝毒性作用の知見はあるが、発がんの発生要因や機序が未解明の物質が多く存在する。印刷事業所で多発した胆管がんの発生機序についても種差により、胆管がん発生について全てを解明するには至っていない。胆管がんの原因物質として洗剤として使用していた1,2-ジクロロプロパン(DCP)やジクロロメタン(DCM)や、膀胱がんの原因物質として報告のあるオルトトルイジンを含む芳香族アミン類の代謝にCYP2E1が関与することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CYP2E1は揮発性ハロゲン化合物、芳香族化合物、アルコールなど非常に多くの化学物質の代謝に関わり、代謝過程で産生される活性代謝物により毒性、変異原性、発がん等を誘発することが知られる薬物代謝酵素である。本研究では、CYP2E1に注目し、産業化学物質の遺伝毒性と遺伝毒性を有する中間代謝物の同定による毒性評価方法を確立させる。

この試験方法を用いた化学物質の毒性評価および中間代謝物の同定は、化学物質による労働災害や健康障害発生の予防(生物学的モニタリング手法の開発等)・対策に有用な情報を提供することを可能にする。

研究成果の概要(英文)：In recent years, multiple cases of bile duct cancer due to exposure to chemicals used at workplaces and the occurrence of bladder cancer at chemical plants have been reported. Although there is some knowledge of genotoxic effects among industrial chemicals used at workplaces, there are many substances for which the factors and mechanisms of carcinogenesis are still unknown. The mechanism of cholangiocarcinogenesis, which has occurred frequently in printing plants, has not yet been fully elucidated due to species differences. We suggested that CYP2E1 is involved in the metabolism of 1,2-dichloropropane (DCP) and dichloromethane (DCM), which were used as cleaning agents as causative agents of bile duct cancer, and o-toluidine, which has been reported as a causative agent of bladder cancer.

研究分野：衛生学

キーワード：CYP2E1 ジクロロプロパン オルトトルイジン 肝障害 中間代謝物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、労働現場で使用していた化学物質の曝露により胆管がんの多発する事件や化学工場での膀胱がんの発生が報告された。現場で使用される産業化学物質には、遺伝毒性作用の知見はあるが、発がんの発生要因や機序が未解明の物質が多く存在する。今回、胆管がんの事例を受け、安衛法の一部が改正された。そのため、安全データシート(SDS)の交付義務のある化学物質(640種類)について、業種や規模に関わらず、対象の化学物質を製造あるいは取り扱っているすべての事業者に対してリスクアセスメントの実施が義務化された。しかし、作業現場で使用される化学物質すべてについて曝露実験を行うことは困難である。現行の毒性試験では、主にげっ歯類を用いた *in vivo* 試験やげっ歯類やヒト由来の培養細胞を用いた *in vitro* 試験が行われている。しかし、動物とヒトでは代謝酵素活性に種差があり、ヒト特異的に発生しうる毒性を予測することは困難である。今後の労働現場での化学物質管理体制には、より多くの産業化学物質についての毒性情報や発生要因の解明が求められている。印刷事業所で多発した胆管がんの発生機序についても種差により、胆管がん発生について全てを解明するには至っていない。胆管がんの原因物質として洗浄剤として使用していた1,2-ジクロロプロパン(DCP)やジクロロメタン(DCM)が特定され、これらの化学物質の代謝にCYP2E1が関与することが報告されている。CYP2E1は揮発性ハロゲン化合物、芳香族化合物、アルコールなど非常に多くの化学物質の代謝に関わり、代謝過程で産生される活性代謝物により毒性、変異原性、発がん等を誘発することが知られる薬物代謝酵素である。本研究では、多くの産業化学物質の代謝に関与するであろうCYP2E1に着目し、産業化学物質の遺伝毒性と遺伝毒性を有する中間代謝物の同定による毒性評価方法を確立させる。本研究で用いる試験系から得られる知見は、労働衛生対策の策定に必須である。

2. 研究の目的

多くの産業化学物質の代謝に関わり、代謝過程で産生される中間代謝物が発がん性を誘発する可能性のある薬物代謝酵素CYP2E1に着目し、CYP2E1ノックアウトマウスやCYP2E1過剰発現株を用い、遺伝毒性を有する中間代謝物の同定を行うという。この試験系を用いた化学物質の毒性評価および活性代謝物の同定は、化学物質による労働災害や健康障害発生の予防(生物学的モニタリング手法の開発等)・対策に有用な情報を提供することを可能にする。

3. 研究の方法

(1) 1,2-DCPとジクロロメタン(DCM)の単独および複合曝露によるマウスの肝臓への影響
B6C3F1マウス(雄)8週齢のB6C3F1マウス(雄)(対照群:n=6,治療群:n=5)を用いた。実験には8週齢のマウス(対照群n=6,ばく露群n=5)を用いた。吸入曝露はスチールチャンバー(Shibata Scientific Technology, Tokyo, Japan)で行った。1,2-DCP濃度300ppmおよびDCM濃度800ppmは、ガスクロマトグラフ(島津GC-7A,京都)を用いてモニターし、曝露中は流量計で一定の目標値±5%に調整した。この濃度は、フィールドレポート(Yamada, Kumagai, Kubo, & Endo, 2015)で想定されているように、日本のその工場に存在する可能性がある。対照群はフィルタリングされた空気のみ曝露した。マウスを1,2-DCP, DCM, および1,2-DCPとDCMの混合物に6時間曝露した後、曝露開始から1, 2, 4, 6時間後、解剖をおこなった。血液サンプルは直ちに採取し、血液は直ちに採取し、生化学的分析を行い、肝臓は組織学的検査と組織学的検査とミトコンドリア機能の分析を行った。

(2) DCPの代謝物の同定について

DCPの代謝物を検出するため、雄の129/svマウス(野生型)とCYP2E1ノックアウトマウス(CYP2E1-KO型)から肝臓を摘出し、ホモジネート(CYP酵素、GST酵素を含む分画)、サイトゾル(GST酵素を含む分画)、ミクロソーム(CYP酵素を含む分画)に分け、それぞれの分画にDCP、co-factorを添加後、37℃で2分~60分間インキュベートし、酵素を失活させたサンプルについてGC/MSで測定した。野生型およびCYP2E1ノックアウトマウスを用いたDCP吸入ばく露実験を行い、ばく露後の動物の血漿および血液サンプルについてGC/MSで測定した。

(3) 膀胱がん原因物質(o-toluidine: OT)の代謝物の同定について

野生型のマウスを用い、OTを投与し、ばく露後の動物の尿および血液サンプルから代謝物の同定をLC/MSを用いて解析した。また、同定された代謝物を肝細胞に作用させ、遺伝毒性作用を観察した。

膀胱がん発生事例に関しては、経皮ばく露が示唆されていたことから、マウスを用いた経皮投与方法について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 1,2-DCPとジクロロメタン(DCM)の単独および複合曝露によるマウスの肝臓への影響
1,2-DCPは肝臓の壊死を有意に引き起こした。これは、1,2-DCPによるミトコンドリア呼吸鎖複

合体 I-IV 活性の阻害により、ミトコンドリアの機能不全と極度の ATP 消費が生じたためと考えられる。さらに、1,2-DCP はミトコンドリアのグルタチオン S-トランスフェラーゼ 1 (MGST1) 活性を阻害することで、ミトコンドリアの防御能力を低下させ、肝障害をさらに悪化させた。さらに、DCM を共存させると、1,2-DCP の毒性が増強される可能性があることを明らかにし、1,2-DCP による肝障害の抑制には、ミトコンドリア機能の阻害と MGST1 活性が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(2) DCP の代謝物の同定

DCP の代謝物を検出するため、雄の 129/sv マウス (野生型) と CYP2E1 ノックアウトマウス (CYP2E1-KO 型) から肝臓を摘出し、ホモジネート (CYP 酵素、GST 酵素を含む分画)、サイトゾル (GST 酵素を含む分画)、ミクロソーム (CYP 酵素を含む分画) に分け、それぞれの分画に DCP、co-factor を添加後、37 °C で 2 分 ~ 60 分間インキュベートし、酵素を失活させたサンプルについて GC/MS で測定した。2 分 ~ 60 分間のインキュベートにより、1-Chloro-2-propanol (CP) とメチルグリオキサル (MG) の濃度が時間とともに増加し、DCP の中間代謝物として CP や MG が産生される可能性が推察された。また、ばく露実験後の血中および血漿中の CP や MG が、ばく露濃度依存的に増加することも観察された。In vitro 実験では、ヒト肝細胞および胆管細胞を用いて CP、MG の DNA 損傷性を確認した。その結果、MG には DNA 損傷性が濃度依存的に観察され、DCP の発がん性に関与する代謝物の一つである可能性が示された。代謝物 1-Chloro-2-propanol 投与による DCP の代謝物および代謝経路の同定を行うため、1-Chloro-2-propanol (1,2-CP) と異性体 2-Chloro-1-propanol (2,1-CP) の野生型マウスおよび CYP2E1KO マウスを用いた投与実験を行った。その結果、CYP2E1 酵素を有する野生型では、1,2-CP は代謝を経て、MG と酸化プロピレンを生成することが明らかとなった。

(3) 膀胱がん原因物質 (o-toluidine) の DNA 損傷性について

LC/MS/MS による OT および代謝物の同時測定方法が確立し、以下記述の実験に関して解析を行った。代謝酵素および、代謝物の同定を行うためヒト肝ミクロソームおよび薬物代謝酵素組換え発現系 Supersome (CYP2E1) と OTD を反応させ、OT の濃度変化と代謝物の同定を行った。ヒト肝ミクロソームと OTD を 37 °C で 30 分反応させると、OT 濃度がミクロソームを添加していない時に比べ有意に減少し、ヒト肝ミクロソームで OT が代謝されることが示された。OT の代謝に CYP2E1 が関与するか否かを確認した。37 °C、120 分では、CYP2E1 を添加していない時に比べ、有意な減少が観察された。また、ヒト CYP2E1 の働きにより代謝物として 2-amino-m-cresol が検出され、OT から 2-amino-m-cresol への代謝には主に CYP2E1 が関与している可能性が示唆された。さらに、ヒト肝細胞およびヒト膀胱上皮細胞を用い、今回同定した 2 種類の代謝物のうち、2-amino-m-cresol は遺伝毒性作用のマーカーである H2AX の誘導が観察され、発がんにつながる代謝物の一つとなる可能性が推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wang H, Chen J, Suda M, Yanagiba Y, Weng Z, Wang RS.	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 Acute inhalation co-exposure to 1,2-dichloropropane and dichloromethane cause liver damage by inhibiting mitochondrial respiration and defense ability in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Appl Toxicol.	6. 最初と最後の頁 260-270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jat.3715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 小林 健一, 柳場 由絵	4. 巻 12
2. 論文標題 産業化学物質のマウス経皮ばく露方法の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 労働安全衛生研究	6. 最初と最後の頁 195-198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2486/josh.JOSH-2019-0013-GI	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------