

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18406020

研究課題名 (和文) トリクロロエチレン曝露による全身性皮膚・肝障害の環境・個体要因の解明と予防対策

研究課題名 (英文) Study on the environmental and individual factors of trichloroethylene-induced generalized skin disorder with hepatitis

研究代表者

那須 民江 (NASU TAMIE)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10020794

研究成果の概要：

トリクロロエチレン (TRI) を使用している健康労働者と全身性皮膚肝障害患者について、TRI 曝露状況、HLA-B 多型、サイトカイン、HHV6 の再活性化について調査した。TRI の個人曝露濃度は、日本の許容濃度を超えた環境で作業をしている者が 39%いた。HLA-B*1301 多型を持つものはゼロで、患者群の 31.9%よりはるかに低い頻度であった。HHV6 の再活性化を示した者は 9.1%で、患者の 54.8%より低かった。TNF α および IL10 がカットオフ値を超えた者はそれぞれ 7.2%と 1.7%であり、患者の 57.1%と 81%に比較してそれぞれ低かった。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2007年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学 衛生学

キーワード：トリクロロエチレン、健康労働者、全身性皮膚・肝障害、HLA-B 多型、HHV6、TNF α 、IL-10、許容濃度

1. 研究開始当初の背景

2003年から3年間にわたり、日本学術振興会の科学研究費基盤研究B (海外) の補助を受けて、中国南部の広東省深圳市で多発していたトリクロロエチレン (TRI) 曝露による全身性

皮膚・肝障害の患者の臨床像、環境的要因と個体要因について調査した。その結果、これらの疾病は2004年までに死亡者29名を含む208名の患者が発生し、男女差はなく、TRI曝露開始から1ヶ月以内に発生することが明らかと

なった。環境的要因としてTRIの比較的大量曝露（比較的低濃度 x 長時間曝露）が、内的要因としてヒトヘルペルウイルス6型（HHV6）の再活性化やTNF α 、IL-10等のサイトカインの上昇が関連していることが明らかとなった。問題点は、患者は発症から1週間から2週間経た後病院に入院しているため、発症から入院するまでのHHV6の再活性化やサイトカイン等の情報がなく、TRI曝露とどのような関連性があるか不明な点である。さらに発症率が低いことから、TRI曝露以外に感受性要因があることが想定された。

2. 研究の目的

この研究では、工場労働者と患者を対象として、

- (1) 労働者のTRI個人曝露濃度を測定して、職場環境濃度を把握、
- (2) 労働者の作業終了後の尿を採取し、TRI代謝物量を測定
- (3) HLA-B*の多型を解析し、感受性要因になるか検討、
- (4) HHV6の再活性化、サイトカイン (TNF α 、IL10)を測定

をおこなう。さらに、これらの結果の関連性を解析し、TRI曝露濃度、感受性要因、HHV6再活性化、サイトカインの上昇の相互の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象者および試料の収集

この研究は名古屋大学倫理委員会の承認を得て行われた。予め調査対象者には研究の目的、方法等を説明し、同意を得た後行われた。198名のTRIを使用している健康な労働者と、TRIによる全身性皮膚-肝障害患者82名を調査対象者とした。健康な労働者の中からランダムに31名を選択し、作業前に襟元にパッシブ型サンプラーを装着し、作業終了後回収した。

作業終了後の採尿時に血液も採取した。血漿を分離し、サイトカインの測定に使用した。残りの部分はHHV6再活性化、HLA-B多型解析に使用した。サンプルは測定時まで-80度で保存した。

患者は入院から約1~2週間の間隔で、5~6回採血し、健常者と同様に保存した。尿は入院時に採尿し、健常者と同様の方法でTRI尿中代謝物（トリクロロ酢酸、TCA）を測定した。尿中TCA濃度と作業終了から採尿日までの経過日数から、Ikeda and Imamura (1973)の方法で患者の作業終了直後のTCA量を推定した。

(2) 測定方法

TRI等の有機溶剤の個人曝露濃度は GC-MS法で測定した。健康労働者の尿は作業終了直後に採取し、TCAとトリクロロエタノール (TCE) の濃度を我々が開発したGC-MS法で測定した。サイトカインはR & D社のキットを用いた。TNF α とIL10のカットオフ値はそれぞれ15.6pg/ml、7.8pg/mlとした。

HHV6 は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 (Gautheret-Dejean et al., 2002)。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。使用したプライマーとプローブおよび内部標準として使用したアルブミンのプライマーとプローブは以下の通りである。

HHV6-primer

F; 5'-TGTAAGCGTGTGGTAATGGACTAA-3'

R; 5'-GACAATCACATGCCTGGATAATG-3'

HHV6-probe

5'-FAM-AGCAGCTGGCGAAAAGTGCTGTG

C-TAMRA-3'

Albumin-primer

F; 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3'
 R; 5'-ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC-3'
 Albumin-probe
 5'-FAM-CCTGTCATGCCACACAAATCTCT
 CC-TAMRA-3

HLA-B の多型は Cerebら(1995)の報告にあるプライマーを用いて、HLA-B の exon2, 3 を PCR にて増幅し、Cerebら (1997) のシーケンスプライマーを用いて塩基配列を決定し、DNA 型を決定した。exon2, 3 のプライマー(Cerebら 1995) は、

AggCgggggCgCaggACCCgg、
 AggCgggggCgCaggACCTgA、
 ggAggCCATCCCCggCgACCTAT であった。

PCR 産物の塩基配列の決定は BigDye™ v1.1(Applied Biosystems)を用い、(Cerebら 1997)の 4 種のプライマー
 ggAgCCgCgCCgggAggAgggTC、
 ggATggggAgTCgTgACCT、
 ACKgKgCTgACCgCgggg、
 ggAgATggggAAggCTCCCCACT
 を用い、それぞれ説明書に従い反応させ、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer を使用して塩基配列を決定した。決定した塩基配列は WU-BLAST2 - Nucleotide Database で検索し、HLA-B の多型を決定した。

4. 研究成果

(1) TRIの個人曝露濃度

パッシブ型サンプラーを用い、GC-MSで測定したトリクロロエチレンの個人曝露濃度は0.7~97.3ppmであった。日本の許容濃度(25ppm)を超えたトリクロロエチレン曝露を受けていた労働者は31名中たった1名であった。トリクロロエチレン以外にトルエンとメチルエチルケトンが検出されたが、高々0.3ppmであった。従って、労働者は主にTRIのみに曝露されていることが判明した。一方、尿中代謝物(TCA)が日本産業衛生学会許容

濃度委員会で定めている生物学的許容値(50mg/L)を超えていた労働者は70名中28名であった。これらの労働者は日本の許容濃度を超えた作業環境で働いていたことになる。即ち、モニターによる個人曝露濃度からは想像できない量の代謝物が検出されており、調査日以前の高濃度トリクロロエチレン曝露があったことが判明した。パッシブ型サンプラーによるトリクロロエチレン個人曝露濃度と尿中代謝物量との関連をみると、代謝物量は個人曝露濃度から想定される量を遥かに超えている労働者が多く(図1)、この理由を明らかにすることが必要である。以前の調査で、労働者の中には、1ヶ月殆ど休暇なく、長時間労働しているものが多かったので、今回の調査対象者も長時間TRIの曝露を受けている可能性がある。労働形態の改善が必要である。

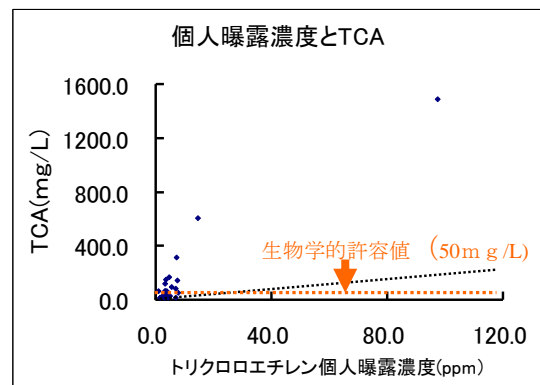


図1 個人TRI曝露濃度と尿中TCAの関係
 (黒い波線はTRII曝露濃度から推定される尿中TCA量を示す)

(2) 患者のTRI曝露濃度の推定

2002年から2009年の患者の尿中TCA濃度を測定し、Ikeda and Imanuraの方法(1973年)で作業終了後のTCA濃度を推測した。結果を日本産業衛生学会許容濃度委員会の生物学的許容値50mg/L未満と以上に分類した(表1)。患者81名中68名の尿中TCA量が50mg/Lを超えて

いた。即ち、許容濃度以上のTRI環境下で作業をしていたと想像される者は健康労働者より明らかに多かった。尿の採取時期が健康労働者と違うので、この点を考慮しなければならないが、患者の多くはTRIの許容濃度を越えた作業環境下で作業をしていたかもしれない。即ち、TRIの高濃度曝露が全身性皮膚-肝障害発生の一つの要因であるかもしれない。

表1 患者と健康労働者の尿中TCA

	患者	健康労働者
尿中TCA		
50mg/L以上	68	28
50mg/L未満	13	42

$p < 0.001$

(3) 健常者と患者のHLA-B多型

患者69名と健康労働者84名のHLA-Bの多型を解析した。患者でHLA-B*1301多型保有者は22名で31.9%であった。一方、健康労働者でHLA-B*1301保有者はいなかった。Liらの2007年の報告よりは頻度が低い、明らかに患者のHLA-B*1301の保有率が高く、全身性皮膚-肝障害の一つの感受性要因かもしれない。しかし、HLA-B多型の解析方法がLiらの方法と若干異なっており、直接比較するためにはさらに検討が必要である。この多型は皮膚の病型(剥脱性皮膚炎、多形紅斑)には関係なく、後述のHHV6の再活性化、サイトカインの上昇にも関係なかった点も注目された。

(4) 健常者と患者のHHV6再活性化、およびサイトカイン

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高かった。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。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。一方、HHV6の再活性化やTNF α の上昇はHLA-B*1301多型との間には関連性は認められなかった。

(5) まとめ

今回の調査研究で、調査日のパッシブ型サンプラーによるTRI個人曝露濃度の推定は通常の曝露を殆ど反映せず、尿中代謝物から曝露濃度を推定することの有用性が明らかとなった。調査をすることが介入となり、調査日のTRI曝露濃度が低い可能性があるからである。

尿中代謝物(TCA)から判断すると、推定の仕方の違いはあるが、患者の多くはTRIの許容濃度を越えた環境で作業していた。しかし、TRIの許容濃度を越えた環境で作業していた者でも全身性皮膚-肝障害に罹患しない者もいれば、反対に、TRIの許容濃度以下の環境下で作業していても、全身性皮膚-肝障害に罹患している者もいることに注意すべきかもしれない。

今回の調査では一部の労働者に関してはHLA-B多型の解析をした。結果は健康労働者にHLA-B*1301多型を保有する者はゼロで、患者は31.9%であった。この患者の頻度はLiら(2007)の報告より低い、明らかに患者の方が高い。即ち、HLA-B*1301多型はTRIによる全身性皮膚-肝障害の感受性遺伝子となるかもしれない。この遺伝子は予防に重要な役割を果たすかも知れず、今後検討が必要である。

我々は以前の研究で、患者の多くにHHV6の

再活性化がみられること、またTNF α やIL-10がカットオフ値を超える者が多いことを明らかにした。これらの要因は健康労働者で認められる頻度は非常に低く、患者に特徴的に見られる現象かもしれない。興味深いことは、HLA-B*1301多型とHHV6の再活性化、TNF α やIL-10の上昇は関係なかった。これらは、TRIの高濃度曝露というより、疾病の進展過程に関連しているかもしれない。

極最近になって、わが国でもTRI曝露に起因した全身性皮膚-肝障害患者の症例が報告された。この職業病の発症に注視すると同時に予防戦略を構築するために、研究をさらに継続する必要がある。

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)

[雑誌論文] (計6件)

- ① 上島通浩、王海蘭、那須民江 環境と予防医学-重症薬疹と有機溶剤中毒の接点 現代医学 36(2) 399-401、2008 (査読無)
- ② Ramadhan DH, Kamijima M, Yamada N, Ito Y, Yanagiba Y, Nakamura D, Okamura A, Ichihara G, Aoyama T, Gonzalez FJ, Nakajima T. Molecular mechanism of trichloroethylene-induced hepatotoxicity mediated by CYP2E1. Toxicology and Applied Pharmacology 231: 300-307, 2008 (査読有)
- ③ 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. Trichloroethylene causes generalized hypersensitivity skin disorders complicated by hepatitis. J Occup Health. Jul;50(4):328- 338, 2008 (査読有)

- ④ Tang X, Que B, Song X, Li S, Yang X, Wang H, Huang H, Kamijima M, Nakajima T, Li L. Characterization of liver injury associated with hypersensitivity skin reactions induced by trichloroethylene in the guinea pig maximization test. J Occup Health 50(2), 114-121, 2008 (査読有)
- ⑤ 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(5): 357-370, 2007 (査読有)
- ⑥ Huang H, Kamijima M, Wang H, Li S, Yoshokawa T, Lai G, Huang Z, Liu H, Chen J, Taleuchi 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 (査読有)

[学会発表] (計20件)

- ① 那須民江 トリクロロエチレンによる全身性皮膚-肝障害の背景 第79回日本衛生学会「生体応答研究会企画セッション」2009年3月29-31日 東京都
- ② 上島通浩、伊藤由起、柳場由絵、岡村愛、山ノ下理、王海蘭、黄漢林、那須民江 トリクロロエチレンによる全身性皮膚-肝障害ではヒトヘルペスウイルス6型が再活性化する 第79回日本衛生学会 2009年3月29-31日 東京都
- ③ 柳場由絵、伊藤由起、柳場由絵、岡村愛、上島通浩、那須民江 HHV6 variant と再活性化 第79回日本衛生学会 2009年3月29-31日 東京都
- ④ Ramadhan DH, Kamijima M, Yamada N, Ito Y,

Yanagiba Y, Nakamura D, Okamura A,
Ichihara G, Aoyama T, Gonzalez FJ, Nakajima
T. Molecular mechanism of
trichloroethylene-induced hepatotoxicity
mediated by CYP2E1. Joint EASL-AASLD
Monothematic Conference Nuclear Receptors
and Liver Disease 2009/2/27-3/1 Vienna

- ⑤ 上島通浩、王海蘭、黄漢林、吉川哲史、
那須民江 トリクロロエチレンによる全
身性皮膚肝障害における HHV-6 再活性化
第 15 回ヘルペス感染症フォーラム「要望
演題」 2008 年 8 月 22-23 日 札幌市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須・民江

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10020794

(2) 研究分担者

上島・通浩

名古屋市立大学・大学院医学系研究科・

教授

研究者番号：80281070

研究協力者

王・海蘭

中国広東省職業病防治院・主任医師

黄・漢林

中国広東省職業病防治院・院長