

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790445  
 研究課題名（和文）シンナー中毒者の肝毒性および肝障害の発生メカニズムに関する分子生物学的研究  
 研究課題名（英文）The study of molecular biology on mechanism of the development of hepatotoxicity and liver damage in thinner addicts  
 研究代表者 後藤田 貴子 (GOTOHDA TAKAKO)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
 研究者番号：50304506

## 研究成果の概要：

本研究はシンナーを吸引する人における肝障害について検討することである。トルエン存在下で培養したヒト肝癌細胞で障害が認められ、トルエンを吸入させたラットの肝臓でも障害が認められた。また、ラットのトルエン吸入群で肝線維化が認められ、肝線維化に影響を及ぼす因子も増加していた。よって、トルエンが直接、肝細胞の障害を引き起こし、さらに、トルエン吸入により肝線維化に影響を及ぼす因子が活性化することにより、肝臓に線維化をもたらす可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 0       | 1,800,000 |
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 450,000 | 3,750,000 |

## 研究分野：法医学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：法医学、薬毒物、トルエン、肝毒性、肝線維化、HepG2、CYP2E1、HSP70

## 1. 研究開始当初の背景

接着剤や塗料、印刷インクなどの溶剤として用いられているシンナーは、トルエンを主成分として、キシレンや酢酸エチル、メチルアルコール、エチルアルコールなどを含む混合有機溶剤であり、この溶剤を日常的に使用する職種においては、その慢性的吸引による作業従事者の健康被害が問題となっている。一方、最近では室内を構成する建築資材や家具にも使用されており、そこに居住する人た

ちに新たな被害を産み出している。また、日本においては比較的容易に入手できることから、青少年の濫用薬物の中心となっており、彼らの健康に対する悪影響のみならず、その精神的錯乱や人格破壊などを来たすことから大きな社会問題となっている。また、法医学領域においては、シンナー慢性中毒者の突然死の剖検例は重要である。

私は、これまで、トルエン吸入による中枢神経障害についてラットを用いて研究して

きた。その結果、小脳においては、形質転換成長因子、グリア系細胞由来神経栄養因子の産生が増加することを見出し、これらの因子が、トルエン毒性からのプルキンエ細胞の保護に作用している可能性を示唆している (Leg Med 4, 21-8, 2002)。また、トルエン吸入により、酸化的DNA障害のマーカーである8-OH-dGの形成が、肺、肝臓および腎臓で増加することを認めている (Leg Med 5, 34-41, 2003)。さらに、トルエン吸入によって、視床下部-下垂体-副腎系が活性化され、それぞれの部位において、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH)、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、副腎皮質ホルモンの分泌が亢進し、副腎が肥大することを明らかにしてきた (Life Sci, 76, 1929-1937, 2005)。

トルエンの慢性吸入によって肝障害が起こることは良く知られているが、その肝毒性や肝臓障害、特に肝繊維化の発生機序は未だに明らかにされてはいない。殊に、種々の生理活性物質である、アディポカイン、サイトカイン、ホルモン、活性ペプチドなどによる繊維化の促進あるいは抑制に関する研究は、現在までのところ、ほとんど行われていない。以上のような研究背景の下で、私は、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

トルエンの慢性的な吸入は、肝臓に種々の障害を引き起こすことが知られている。本研究の目的は、シンナーの肝臓に対する急性毒性に加え、シンナーを慢性的に吸引する人の肝臓の発生機序を明らかにすることである。

このような目的のもと、本研究期間内に、ヒト肝癌細胞を使用して、肝細胞に対するトルエンの直接作用について検討を加えると共に、トルエン吸入によるラットの肝臓、血液を試料として、サイトクローム P450 (CYP2E1) などの肝臓の代謝酵素発現の変化を測定することによってトルエンの肝臓に対する毒性について検討を行う。さらに、肝臓の線維化とその発生機序を明らかにする目的で、レプチンをはじめとするアディポカイン、グルココルチコイドなどのホルモンおよびサイトカインの関与について、それらの血液および組織内の濃度、あるいは各々の受容体発現の変化について検討を加える。

## 3. 研究の方法

(1) トルエンによる肝障害について、ヒト肝癌細胞を用いて検討した。

### ①トルエンの直接作用

ヒト肝癌細胞にトルエン 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mM の存在下で、それぞれ 24,

48, 72 時間培養し、ニュートラルレッドの取り込みを指標として、HepG2 細胞の生存数を計測した。

### ②肝毒性に関わる因子

また、ヒト肝癌細胞にトルエン 0, 0.1, 1, 10 mM の存在下で 3 日間、37°C で培養し CYP2E1, HSP70 の免疫組織化学的な解析を行った。

(2) ヒト肝癌細胞モデルで得られた実験結果を生理的観点から確認する目的で、トルエン吸入ラットにおける肝毒性と線維化について、同様の実験手法を用いて検討を加える。

### ①トルエンの吸入実験

ウイスター系オスラット (9 週令, 180 - 200 g) にトルエン (1, 500 ppm) を 1 日 4 時間、7 日吸入させ、肝臓を採取した。

### ②肝毒性に関わる因子

ラットの肝臓の組織から CYP2E1, HSP70, HSP90 免疫組織染色を行うことによって、肝毒性について検討した。

### ③肝臓の線維化

肝臓の線維化の指標である  $\alpha$ -SMA やコラーゲンの免疫組織化学的な染色を行った。

### ④肝線維化に影響を及ぼす因子

レプチンやグルココルチコイドの受容体の免疫組織学的検討を行った。

### ⑤本研究のまとめ

以上の形態的結果をふまえて、シンナー濫用者にみられる肝毒性と線維化の発生機構を検討する。

## 4. 研究成果

本研究の成果は、トルエン吸入が肝細胞の障害を引き起こし、さらに、肝線維化に影響を及ぼすグルココルチコイドレセプターやレプチンレセプターが活性化することにより、肝臓に線維化をもたらすという機構を解明したことである。

まず、(1) トルエンによる肝障害について、ヒト肝癌細胞を用いて検討を行ったところ、①トルエンの肝臓への直接作用を見るために、ヒト肝癌細胞の培養液に 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mM のトルエンを溶かし、それぞれ 24, 48, 72 時間培養し、ニュートラルレッドの取り込みを指標として、HepG2 細胞の生存数を計測したところ、その結果、それぞれの群に差は認められず、肝細胞の死滅を引き起こすようなトルエンの毒性は認められなかった。

そこで、②ヒト肝癌細胞にトルエン 0, 0.1, 1, 10 mM の存在下で 3 日間培養し、トルエンの肝細胞に対する傷害作用について CYP2E1, HSP70 の免疫組織化学的な検討を行った。薬物代謝酵素である CYP2E1 は、有機溶剤などの毒性物質を代謝することにより更に毒性を強め、肝臓障害を引き起こすといわれている。HSP70 は、細胞障害を防御する役割があ



るといわれている。CYP2E1 と HSP70 の両方とも、トルエン処置により濃度が増すにすが、染色性の亢進が認められた (Fig. 1)。

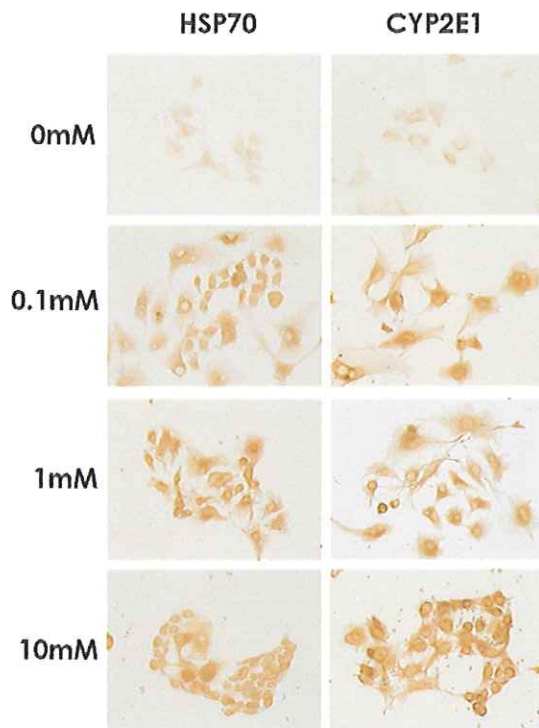


Fig.1 Immunoreactivities of HSP-70 and CYP2E1

(2) ヒト肝癌細胞モデルで得られた実験結果を生理的観点から確認する目的で、トルエン吸入ラットにおける肝毒性と線維化について検討を加えた。①ラットにトルエン (1,500ppm) を 1日4時間、7日吸入させ、肝臓を採取し、肝臓への影響を見るために、②肝毒性のマーカーである CYP2E1, HSP70, HSP90 の組織学的検討を行ったところ、トルエン吸入群で免疫染色性の亢進が認められた (Fig. 2)。

また、③肝臓の線維化を見るために、肝線維化の指標である  $\alpha$ -SMA やコラーゲン I の免疫組織化学的染色を行ったところ、トルエン吸入群において免疫染色性の亢進が認められた (Fig. 3)。さらに、シリウスレッド染色とアザンマロリー染色によりトルエン吸入群で肝臓に線維化が認められた (Fig. 4)。

④肝線維症の経過は、グルココルチコイドとレプチンによって媒介されるシグナル伝達経路の活性化により引き起こされるといわれており、そこで、それらの受容体である糖質コルチコイドレセプター (GR) とレプチン受容体 (Ob-R) について免疫組織学的検討

を行ったところ、トルエン吸入群で免疫染色性の亢進が認められた (Fig. 5)。

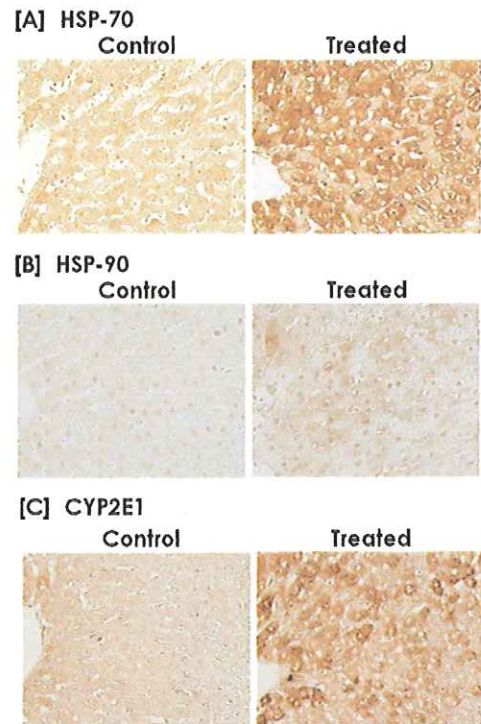


Fig.2 Immunoreactivities of HSP-70, HSP-90 and CYP2E1

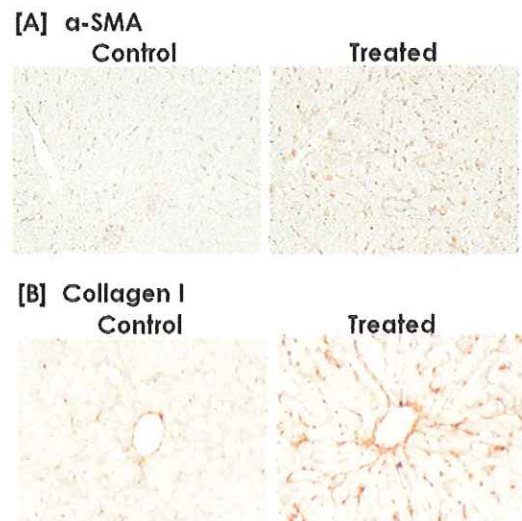


Fig.3 Immunoreactivities of  $\alpha$ -SMA and collagen I

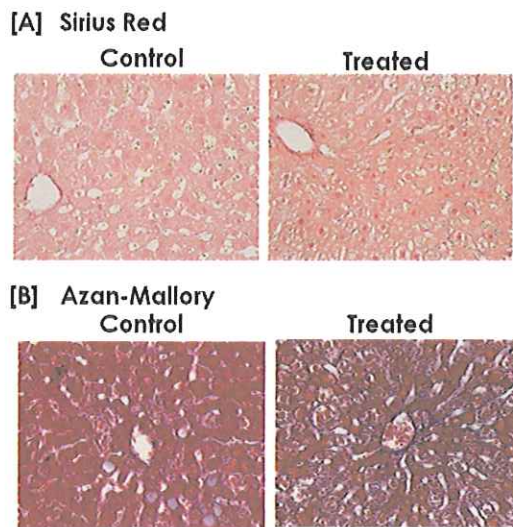


Fig. 4 Sirius Red staining and Azan-Mallory staining

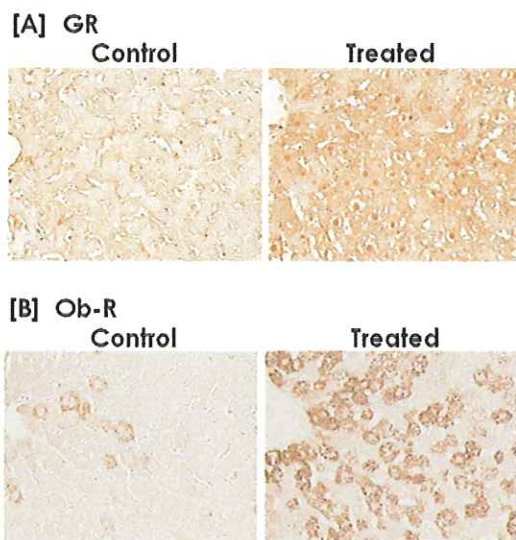


Fig. 5 Immunoreactivities of GR and Ob-R

以上の形態的結果より、トルエン吸入により肝臓の毒性が引き起こされ、また、トルエン吸入ラットで肝臓の線維化が確認され、肝線維化に影響を及ぼすグルココルチコイドレセプターやレプチンレセプターが活性化することにより、肝臓に線維化をもたらすという可能性が示唆された。

これらの結果は、シンナーを慢性的に吸引す

る人の肝臓への影響を警鐘するものである。また、日本および世界で、シンナー中毒者の死亡が後を絶たない現状では、本研究から得られる結果は、シンナー中毒者の剖検例において生前の状態を予測し、直接的死因の診断に役立つことが予想され、法医解剖実務において意義あるものと考えられる。

さらに、国外においては、シンナー濫用者の研究は少なく、職業環境障害としての研究がほとんどである。一方、国内においては、トルエンに代表される有機溶剤による生体の障害として最近「シックハウス症候群」が問題となっている。このことから、本研究はトルエンによる肝臓の毒性および障害を形態学的、生化学的に解明しようとするもので、法医中毒学のみならず環境医学に関する基礎的研究と位置づけられ、公衆衛生学および産業医学的にも意義のあるものと考えられる。

今後さらに肝臓障害の発生メカニズムや、トルエンの生体に及ぼす影響について検討を行いたい。

#### 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1件)

Takako Gotohda, Akiyoshi Nishimura, Kyoji Morita, Immunohistochemical studies on early stage of hepatic damage induced by subacute inhalation of toluene vapor in rats, The Journal of Applied Toxicology, 査読有, 2009, In press

〔学会発表〕(計1件)

Takako Gotohda, Immunohistochemical studies on the induction of hepatic fibrosis by subacute inhalation of toluene vapor in rats, 7th ISLM, September 5, 2008, Osaka Central Public Hall

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤田 貴子 (GOTOHDA TAKAKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50304506