

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390120

研究課題名（和文）

フロン代替物質による中枢神経脱髄を説明する酸化ストレス、グリア活性化に関する研究
 研究課題名（英文） Study on oxidative stress and glial activation explaining demyelination in the central nervous system induced by alternative to freons

研究代表者

市原 学 (ICHIHARA GAKU)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90252238

研究成果の概要（和文）：1-ブロモプロパン(1BP)曝露はラット小脳においてアストロサイト、ミクログリアを活性化するとともに、酸化ストレスを増大させた。さらに 1BP 曝露は海馬においてトリオースフォスフェイトイソメラーゼ (TPI) を含む様々な蛋白のカルボニル化を促進するとともに、TPI 活性低下、Advanced Glycation End-product 上昇を引き起こした。本研究は蛋白のカルボニル化が 1BP の中枢神経毒性と関わっていることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：Exposure to 1-bromopropane (1BP) induced oxidative stress as well as activating astrocyte and microglia in the cerebellum of rats. Exposure to 1BP also promoted carbonylation of various proteins including triosephosphate isomerase (TPI), decreased TPI activity and increased advanced glycation endproduct. The study suggested oxidative stress might be involved in toxicity of 1BP to the central nervous system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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：フロン代替物質、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

モントリオール議定書に始まる国際的合意に基づき、オゾン層破壊作用を有する化学物質に対する規制が強化されている。特定フロン類、1, 1, 1-トリクロロエタンに続き、代替フロンである HCF C への規制が予定されている。このような背景のもと、同じ不燃性のハロゲン化炭化水素に属しながらも、環境中での分解性にすぐれた臭素化炭化水素が産業現場に導入されている。1995 年、韓国の電子部品工場において 2-ブロモプロパンが導入された後、男性労働者の精子数減少、女性労働者の無月経、貧血が見つかった。

2-ブロモプロパンが原因物質であることが我々の動物実験により明らかにされた。その後、新しいフロン代替溶剤として導入された 1-ブロモプロパンの神経、生殖毒性を我々は動物実験に明らかにした。米国においてはじめて記録された 1-ブロモプロパン中毒症例の診断において、我々の初期の動物実験結果が根拠の一つとされた。

フロン代替物質 1-ブロモプロパンは金属洗浄剤、接着剤の噴射剤として多用され、最近ではドライクリーニングの溶剤としても使用されるようになり、労働者だけでなく妊婦、子どもを含む一般人口への曝露が懸念され

ている。我々は、米国および日本で 1-ブロモプロパン中毒症例を明らかにしたが、脳室周囲白質の MRI 上での異常を示す症例が見られ、脱髄性の変化が予想される。多くの 1-ブロモプロパン中毒症例において、多発性硬化症との鑑別が問題となっている。我々は、1-ブロモプロパン曝露が多発性硬化症様の中枢神経障害を引き起こすとの仮説をたてた。本研究では、1-ブロモプロパンの中枢神経ミエリンへの影響、オリゴデンドロサイトへの影響とともに、アストロサイト、ミクログリアへの影響の評価を行った。また、1-ブロモプロパンの中枢神経影響の作用機序の一つとして酸化ストレスが果たす役割についても評価した。

2. 研究の目的

本研究では、1-ブロモプロパンの中枢神経毒性作用機序としての酸化ストレス、グリア活性化を明らかにする。具体的には①ラットの脳、海馬におけるアストロサイトとオリゴデンドロサイトへの影響、②ラット小脳におけるミクログリアへの影響と酸化ストレス、③ラットの海馬における発現蛋白の変化、④ラットの海馬におけるカルボニル化蛋白を調べた。

3. 研究の方法

(アストログリア活性化)

48匹のF344ラットを1群12匹の4群に分け、400、800、1000ppmの1-ブロモプロパンに一日8時間、週7日、4週間、吸入曝露した。実験終了時に、1群9匹のラットを断頭し、脳海馬と小脳を取り出し、急速凍結し-80℃で保存した。凍結した脳サンプルからmRNAを抽出し、定量リアルタイムPCR法にて、glial fibrillary acidic protein (GFAP), myelin basic protein (MBP), oligodendrocyte lineage gene 2 (OLIG2), myelin oligodendrocyte glycoprotein (Mog), chondroitin sulfate proteoglycan 4 (NG2), interleukin 11 receptor α (IL 11ra), caspase 3 (CASP3) and tumor necrosis factor α (TNFA)のmRNA発現を調べた。1群あたり3匹のラットを4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて左心室より灌流固定した。凍結切片を作成し、免疫組織化学によってGFAP, MBP, oligodendrocyte marker O4の局在を調べた。

(ミクログリア活性化と酸化ストレス)

ウィスターラットを400ppm, 800ppm, 1000ppmの1-ブロモプロパンに一日8時間、週7日、4週間、吸入曝露した。実験終了時に、1群9匹のラットを断頭し、小脳を取り出し、急速凍結の後冷凍保存した。各群残り3匹は左心室より4%パラホルムアルデヒド中性緩衝液を用いて灌流固定を行った。小脳中Thiobarbituric acid (TBARS), protein carbonyl, reactive oxygen

species (ROS), nitric oxide (NO)を定量するとともに、cd11b/c陽性ミクログリアを免疫組織化学で調べた。、さらに抗cd11b/c抗体と抗cd11b/cPGP9.5抗体を持ちいた蛍光二重染色によって神経細胞変性との関係を調べた。

(プロテオミクス解析、酸化修飾蛋白)

ラットを1-ブロモプロパンに1日8時間、週7日、1週間および4週間吸入曝露し、曝露終了後、断頭し、海馬を剖出した。海馬をプロテアーゼ阻害剤入り緩衝液中でホモゲナイズした試料を2次元電気泳動にて分離後、スポットを切り出し matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS)解析を行った。ウェスタンブロットにより蛋白の変化を確認した。

4. 研究成果

(アストロサイトとオリゴデンドロサイトへの影響)

1-ブロモプロパン1000ppm曝露群において小脳プルキンエ細胞の細胞質、顆粒細胞核の濃染萎縮が観察された。免疫組織化学では、GFAP陽性アストロサイト突起長が小脳、海馬、歯状回において長くなった。ミエリン塩基蛋白は1000ppmにおいて減少していた。組織体積あたりのアストロサイトおよび顆粒細胞数は400ppm以上の曝露群で増加していた。ラット小脳においてMBP, MOG, NG2, TNFA, OLIG2のmRNAレベルが有意に減少した。一方GFAPのmRNAレベルは1000ppmで増加した。GFAP免疫染色は、1000ppm群において、グリア突起を含むアストロサイトにおいて発現が上昇し、アストログリア活性化が確認された。Oligodendrocyte marker O4 antigenの発現は、1000ppm群において減少した。本研究は、GFAPとO4が1-ブロモプロパン曝露影響のメカニズムとも関連した優れたマーカーであることを示唆した。

(酸化ストレス誘導とミクログリア活性化)

1-ブロモプロパン曝露によって、小脳における酸化ストレスマーカーTBARS、protein carbonyl、ROS、NOが量依存的に上昇し、蛋白濃度は量依存的に減少した。免疫組織化学では、1000ppm群において小脳半球白質におけるcd11b/c陽性ミクログリア面積、ミクログリア突起長が増加し、ミクログリア活性化が観察された。抗PGP9.5抗体により変性プルキンエ細胞が認識され、その近傍に活性化されたミクログリアの存在が確認された。2次元電気泳動では26の蛋白が同定された。

(発現変化蛋白の同定)

1、4週曝露の両方で変化があり、少なくとも一つの曝露濃度で非曝露群に比して有意な差が認められる蛋白を選択した。26の蛋白のうち、19の蛋白がMALDI-TOF/MSによって同定された。回帰分析により、1、4週曝露の両方で曝露量依存的に

変化した8つの蛋白を最終的に選定し、ウェスタンブロットで確認した。核細胞質トランスポート、免疫防御、エネルギー代謝、ユビキチン化-プロテアゾーム経路、神経伝達物質、プリン代謝に関わる蛋白が変化していた。

(カルボニル化蛋白の同定)

活性酸素種、蛋白カルボニルは有意に増加し、1-ブロモプロパンに関連する酸化ストレスの増加、蛋白損傷が確認された。MALDI-TOF/MSによって10のカルボニル化された蛋白が確認された。同定された蛋白は、Glycolysis、ATP産生、チロシン代謝、GTP結合、グアニン分解、ドーパミン代謝などを含む様々な生物学的プロセスに参与している。トリオースフォスフェートイソメラーゼ活性は有意に減少し、同酵素のカルボニル化と活性とが負の相関を示した。Advanced Glycation End-product (AGE)レベルは、海馬および血漿中で増加していた。海馬におけるAGEはトリオースフォスフェートイソメラーゼ活性と負の相関を示した。1-ブロモプロパンによる神経毒性には、細胞蛋白の酸化的損傷、トリオースフォスフェートイソメラーゼ活性低下、AGE上昇と関連していることが本研究により明らかとなった。

(結論) 本研究により、1-ブロモプロパン曝露によりラット小脳においてアストロサイト、ミクログリアが活性化する一方、オリゴデンドロサイトは活性化せず、ミエリン塩基性蛋白発現が減少することがわかった。小脳の顆粒細胞とアストロサイトの密度増加は、ニューロビルまたはグリア突起の萎縮を示唆し、最も敏感な指標であった。上記病理組織学的変化と関連し、蛋白のカルボニル化が観察され、そのうちのトリオースフォスフェートイソメラーゼのカルボニル化が同酵素の活性を低下させ、AGE増加につながる可能性が示唆された。がん原遺伝子産物Ranの量依存的増加が注目されるが、その神経毒性との関連の解明は今後の課題である。

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18件)

1. Kumagai S, Ichihara G 他2名. Cholangiocarcinoma among offset colour proof-printing workers exposed to 1,2-dichloropropane and/or dichloromethane. *Occup Environ Med.* 印刷中, 2013(査読有) 10.1136/oemed-2012-101246
2. Zhang L, Ichihara G 他8名. Effects of sub-acute and sub-chronic inhalation of 1-bromopropane on neurogenesis in adult rats. *Toxicology.* 304:76-82, 2012(査読有)

- 10.1016/j.tox.2012.12.009.
3. Mohideen SS, Ichihara G 他5名. Effects of Exposure to 1-Bromopropane on Astrocytes and Oligodendrocytes in Rat Brain. *J Occup Health.* 55 : 29-28, 2012(査読有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23183024>
4. Samukawa M, Ichihara G, Oka N, Kusunoki S. A case of severe neurotoxicity associated with exposure to 1-bromopropane, an alternative to ozone-depleting or global-warming solvents. *Arch Intern Med.* 172 (16) :1257-1260, 2012(査読有) 10.1001/archinternmed.
5. Subramanian K, Ichihara G 他10名. Exposure to 1-bromopropane induces microglial changes and oxidative stress in the rat cerebellum. *Toxicology.* 302 (1) :18-24, 2012(査読有) 10.1016/j.tox.2012.07.006.
6. Huang Z, Ichihara G 他6名. Proteomic identification of carbonylated proteins in F344 rat hippocampus after 1-bromopropane exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 263 (1) : 44-52, 2012(査読有) 10.1016/j.taap.2012.05.021.
7. Meyer-Baron M, Ichihara G 他3名. Occupational exposure to neurotoxic substances in Asian countries - Challenges and approaches. *Neurotoxicology.* 33 (4) : 853-861, 2012(査読有) 10.1016/j.neuro.2011.12.012.
8. Ichihara G, 他5名. Neurotoxicity of 1-bromopropane: Evidence from animal experiments and human studies. *Journal of Advanced Research.* 3 (2) : 91-98, 2012(査読有) 10.1016/j.jare.2011.04.005
9. Ichihara G, 他11名. Dose-dependent neurologic abnormalities in workers exposed to 1-bromopropane: authors' response. *Journal of Occupational and Environmental Medicine.* 53: 1095-1098, 2011(査読有) 10.1097/JOM.0b013e3182300a4f.
10. Nagai H, Ichihara G, Toyokuni S (他15名). Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA.* 108 (49) : E1330-338, 2011(査読有) 10.1073/pnas.1110013108.

11. Huang Z, Ichihara G 他 8 名. Proteomic analysis of hippocampal proteins of F344 rats exposed to 1-bromopropane. *Toxicology and Applied Pharmacology*.257: 93-101,2011(査読有) 10.1016/j.taap.2011.08.023.
12. Mohideen SS, Ichihara G, Ichihara S, Nakamura S. Exposure to 1-bromopropane causes degeneration of noradrenergic axons in the rat brain. *Toxicology*.285:67-71,2011(査読有) 10.1016/j.tox.2011.04.005.
13. Li W, Ichihara G 他 10 名. Dose-dependent neurologic abnormalities in workers exposed to 1-bromopropane. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*.52:769-777,2010(査読有) 10.1097/JOM.0b013e3181eade7.
14. Liu F, Ichihara G 他 6 名. Increased susceptibility of Nrf2 null mice to 1-bromopropane-induced hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*.115:596-606,2010.(査読有) 10.1093/toxsci/kfq075.

[学会発表] (計 109 件)

1. L. Zhang, Ichihara G 他 8 名. Effects of Short- and Long-Term Exposure to 1-Bromopropane on Neurogenesis in Adult Rats. The 52th Annual Meeting of the Society of Toxicology.(2013.3.10-14, SanAntonio,USA).
2. L. ZHANG, Ichihara G 他 7 名. Exposure to 1-bromopropane decreases neuron proliferation in adult rat dentate gyrus. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology. (2012.7.17-20, 仙台国際センター (仙台市))
3. Zhenlie HUANG, Ichihara G 他 6 名. 1-bromopropane increases triosephosphate isomerase carbonylation and advanced glycation end-products in the hippocampus of F344 rats. 同上.
4. Gaku Ichihara, 他 7 名. Susceptibility to 1-bromopropane exposure and gene expression in two rat strains. *Eurotox 2012 (48th congress of European Societies of Toxicology)* (2012.6.17-20, Stockholm,Sweden)
5. Zhenlie Huang, Ichihara G 他 6 名. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins in F344 Rat Hippocampus after 1-Bromopropane

Exposure. The 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology. (2012.3.11-15, San Francisco, USA)

6. Kaviarasan Subramanian, Ichihara G 他 4 名. Central nerve system toxicity of 1-bromopropane: an oxidative stress hypothesis. The 13th International Neurotoxicology Association Meeting & 11th International Symposium on Neurobehavioral Methods and Effects in Occupational and Environmental Health.(2011.6.5-10, Xi'an, China)
7. Sahabudeen Sheik Mohideen, Ichihara G 他 4 名. Effects of 1-bromopropane exposure on myelination and glia in rat brain.同上.
8. Zhenlie Huang, Ichihara G 他 6 名. Proteomic analysis of hippocampal protein in f344 rats exposed to 1-bromopropane.同上.
9. Lingyi Zhang, Ichihara G 他 6 名. Effects of 1-bromopropane exposure on monoamine levels in brain and hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression in rats. 同上.
10. S. SheikMohideen, Ichihara G 他 5 名. Effects of 1-bromopropane exposure on myelination and astroglia in rat brain. The 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology.(2011.3.6-10, Washington DC, USA)
11. G. Ichihara, 他 3 名. Exposure to 1-bromopropane degenerates noradrenergic axons in the rat brain. 同上.

[図書] (計 6 件)

1. 市原学, 産業安全保健ハンドブック/労働科学研究所, 1332, 2013 年
2. 市原学, 12 化学的健康障害要因とその対策-33.感作性物質 34.生殖毒性物質. 産業保健マニュアル/南山堂. 改訂 6 版:270-272,2013 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市原 学 (ICHIHARA GAKU)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90252238

(2) 研究分担者

豊國 伸哉 (TOYOKUNI SHINYA)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90252460

(3) 連携研究者なし