

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82629

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790681

研究課題名(和文)ジメチルアセトアミド曝露による肝障害発生メカニズムと個体差要因の解明

研究課題名(英文)Study on the health effects of industrial chemical with potential hepatotoxicity

研究代表者

柳場 由絵 (Yanagiba, Yukie)

独立行政法人労働安全衛生総合研究所・健康障害予防研究・研究員

研究者番号：90467283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：DMACは工業的に幅広く使用されている溶剤である。DMACの毒性発現についてCYP2E1の代謝への関与に着目し、野生型とCYP2E1欠損型マウスを用い、2週間のDMAC吸入曝露実験を行った。両遺伝子型で肝機能値の上昇、組織学的な変化が観察された。更に、高濃度曝露によりCYP2E1欠損型では脂肪変性や巣状壊死も観察された。CYP2E1欠損型では野生型に比べ、DMAC、NMACが各ばく露濃度群で高く検出された。しかし、アセトアミドは野生型で高くなっていた。従って、DMACの代謝の多くはCYP2E1を介して速やかに行われる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：DMAC is widely used in pharmaceutical and industrial chemical compounds. The cyp2e1+/+ and cyp2e1-/- mice were exposed to inhalation of DMAC or vehicle control (10, 25, 50 and 250ppm) for 14 days. In cyp2e1+/+ and cyp2e1-/- mice, plasma AST and ALT activities were significantly increased at 50 and 250ppm of DMAC. The histological changes were observed in both genotypes. In addition, focal necrosis and fatty degeneration was also observed in the cyp2e1-/- at the high concentration exposure. cyp2e1-/- were detected in the exposed group for NMAC and DMAC in mice urine. Further, NMAC and DMAC was high concentration as compared to cyp2e1+/+ mice. cyp2e1+/+ were detected in the exposed group for acetamide in mice urine. Hence, most of the DMAC metabolism takes place via CYP2E1, but it is indicated that there is a possibility that other pathways also exist.

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：CYP2E1 DMAC 肝障害

1. 研究開始当初の背景

ジメチルアセトアミド (DMAC) は、ポリウレタン繊維の重合用溶剤、樹脂や医薬品などの反応溶剤、洗浄剤として工業的に幅広く使用される溶剤である。DMAC の国内生産・輸出量は平成 13 年で 1 万 ~ 10 万トン未満に区分されている。化学的特徴から、曝露経路は呼吸器からの蒸気吸入に加え、経皮吸収による寄与が大きいことが知られている。この経皮吸収は、液体だけでなく蒸気状でも約 40% 程度あると報告されている。また、疫学調査や動物実験の結果からこの化学物質の主たる標的臓器は肝臓と考えられている。管理濃度の設定は無いが、有害性評価の結果より、日本産業衛生学会、American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) では許容濃度 10ppm (皮) を勧告している。しかし、ヒトでの事例では 20 ~ 25ppm で黄疸がみられていることから、10ppm では不十分であるという意見もある。しかし、現在、これより小さい値を提案するための情報が見出せないため現行の 10ppm (皮) が慣用的に用いられている。日本国内で、鋳物金型の洗浄剤として日常的に 5 カ月間使用した作業者が急性肝炎を発症したことが報告されている他、DMAC を使用する作業者を対象にした研究では、慢性曝露による肝障害 (肝肥大、肝機能値の上昇)、頭痛、手の震え、高血圧等が報告されている。国外でも同様に DMAC 曝露による肝機能障害等の報告がなされている (Baum SL et al. 1997)。しかしながら、当該物質に起因する肝障害発生メカニズムについては解明されていないのが現状である。従って、労働者の安全と健康を維持するために DMAC 曝露による毒性メカニズムを明らかにし、曝露に対する予防方法の確立や許容濃度の再評価、管理濃度の策定を行うことが必要である。

2. 研究の目的

本研究は工業的に幅広く使用されている溶剤であり、従来の許容濃度と同等レベルで肝障害に陥る可能性のあるジメチルアセトアミド (DMAC) について次の 2 つのことを検討する。(1) DMAC の代謝に係ることが推察される薬物代謝酵素 (CYP2E1) 遺伝子に注目し、DMAC 曝露による CYP2E1 を介した肝障害発生メカニズムの解明、(2) DMAC 職域曝露者と非曝露者を比較し、肝障害発生と CYP2E1 多型による個体差要因の検証を通じて、DMAC 曝露による高危険群の設定を行う。これらの結果を、許容濃度を再評価するための資料とするとともに、労働者の曝露による疾病 (とりわけ肝障害) 予防対策の立案に役立てる。

3. 研究の方法

CYP2E1 に着目し、DMAC 曝露によるマウスの肝臓への影響及び肝障害発生メカニズムの解明を行う。

(1) 野生型と CYP2E1-null 型マウスを用い、2 週間の DMAC 吸入曝露実験を行った。吸入曝

露実験は 0, 10, 25, 50, 250ppm の濃度吸入曝露実験を行う。DMAC 曝露終了後、麻酔剤過吸入による安楽死を施したのち、肝臓、血液を採取する。組織学的試験として、肝臓の炎症の度合いを観察するために組織標本を作製し、評価する。また、生化学的試験として、血漿からは ALT、AST の測定。肝臓での炎症関連やシグナル伝達遺伝子、酸化ストレス (8-OHdG、4-HNE 等) について解析を行う。

(2) DMAC 曝露形態 (曝露時間・濃度) と肝機能障害発生の関係について検討するため、野生型マウス (ICR) を用い、対照群、DMAC 曝露群 (10, 25, 50, 250, 500ppm) に分け、連続曝露群は 1 日 6 時間の曝露を行う。間欠曝露群は 1 時間の曝露 (DMAC 濃度 25, 50, 250, 500ppm) を 1 日に 4 回行う (図 1)。DMAC 曝露終了後、麻酔剤過吸入による安楽死を施したのち、肝臓、血液を採取する。曝露終了後の尿中代謝物の測定を行う。

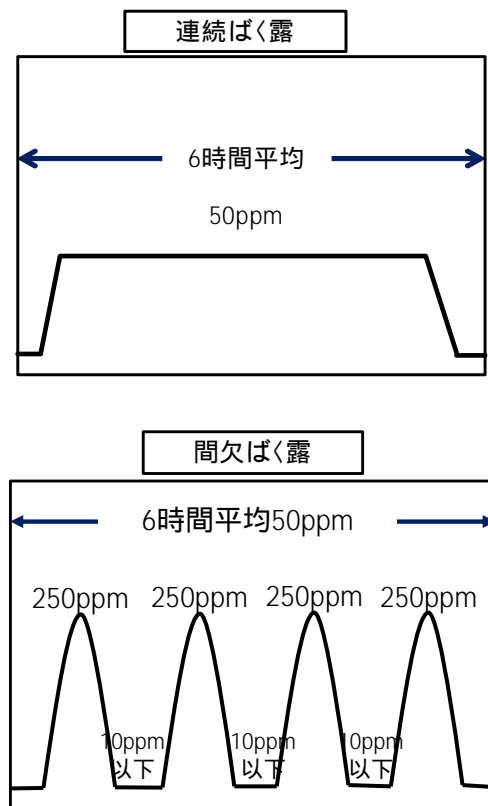


図 1 . 曝露形態

4. 研究成果

(1) 野生型と CYP2E1-null 型マウスを用い、2 週間の DMAC 吸入曝露実験を行った。吸入曝露実験は 0, 10, 25, 50, 250ppm の濃度で実施した。両遺伝子型で肝機能値の上昇が観察された (図 2)。また、組織学的な変化としても小葉中心性の肝細胞肥大、核の大小不同、グリコーゲンの蓄積、空胞化が観察された。更に、CYP2E1-null 型では、50, 250ppm の曝露群で脂肪変性や巣状壊死も観察された。

曝露後、尿中のDMACとその代謝物としてNMAC、アセトアミドをGC/MSで測定した。CYP2E1-null型では野生型に比べ、NMACは各曝露濃度群で約10倍程度高く検出された。また、DMACはCYP2E1-null型では非常に高値に検出された。しかし、アセトアミドは野生型ではCYP2E1-null型マウスの約5倍程度高く検出された。従って、DMACの代謝の多くはCYP2E1を介して速やかに行われ、その多くはアセトアミドとして尿中へと排泄される(図3)。しかし、CYP2E1-null型ではDMAC、NMACとして排泄される。DMACによる曝露を尿中代謝物により評価する場合、CYP2E1活性の違いを考慮する必要があるかもしれない。DMAC曝露による肝機能値への影響は両遺伝子型で観察されたが、組織学的な変化としてはCYP2E1-null型では野生型では観察されなかった脂肪変性や巣状壊死が観察された。これらの変性はDMACの代謝速度の違いによるものかもしれない。

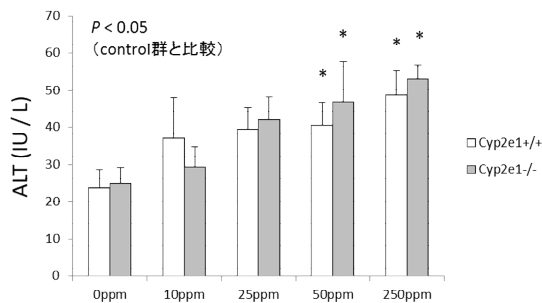


図2. 曝露後肝機能値

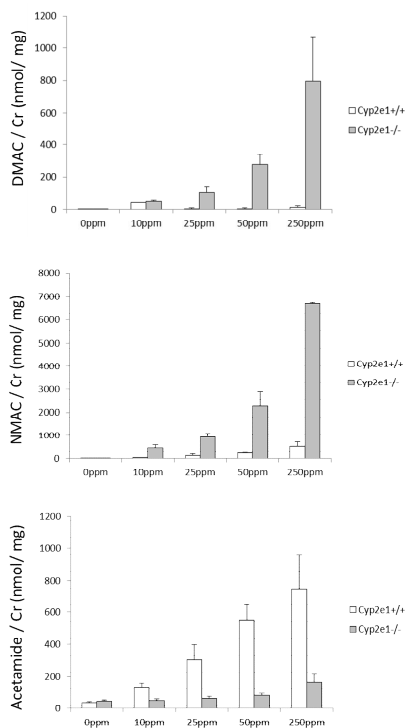


図3. 曝露後尿中代謝物の変化

(2) 野生型とCYP2E1-null型マウスにDMACの腹腔内投与を行い、血中のDMAC濃度の経時変化をGC/MSで測定した。野生型マウスでは血中DMACは投与後60分でピークとなりその後減少していく。一方、CYP2E1-null型では、投与後120分にピークとなり、その後緩やかに減少した(図4)。野生型ではCYP2E1による酸化代謝により体外へと速やかに排泄されるが、CYP2E1-null型では酸化代謝を受けないため蓄積性が高くなることが示唆される。

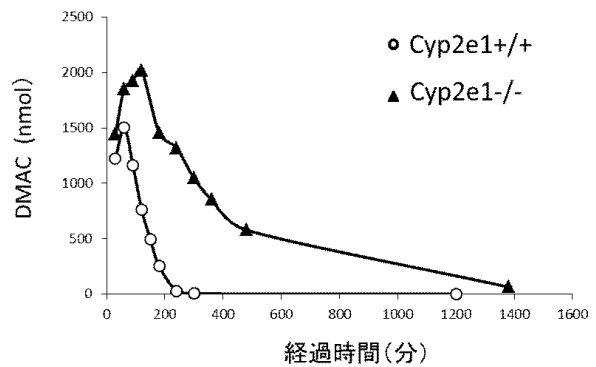


図4. 血中DMAC濃度の経時変化

(3) DMAC曝露形態(曝露時間・濃度)と肝機能障害発生の関係について検討するため、野生型マウスを用い、対照群、DMAC曝露群に分け、曝露形態は1日6時間の曝露を行う連続曝露群(10, 25, 50, 250, 500ppm)と1時間の曝露を1日に4回行う間欠曝露群(DMAC濃度25, 50, 250, 500ppm)とし、14日間の吸入曝露実験を行った。連続曝露、間欠曝露ともに尿中NMAC量は増加している(図5)。

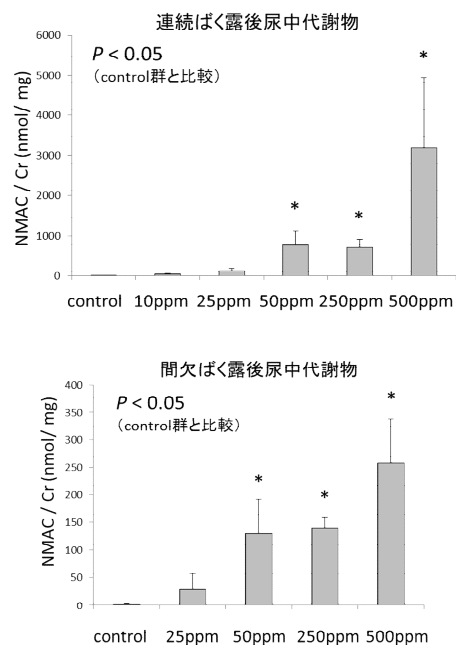


図5. 曝露後尿中代謝物

曝露後の肝機能値については、連続曝露後の肝機能値は対照群と比較し、50ppm以上の曝露群で有意に上昇した。また、間欠曝露群では対照群と比較し、50ppm以上で有意に上昇した。従って、連続で吸入曝露をした場合と間欠で吸入曝露を行った場合、肝機能値は曝露濃度のピーク値に依存して上昇する傾向がみられた(図6)。

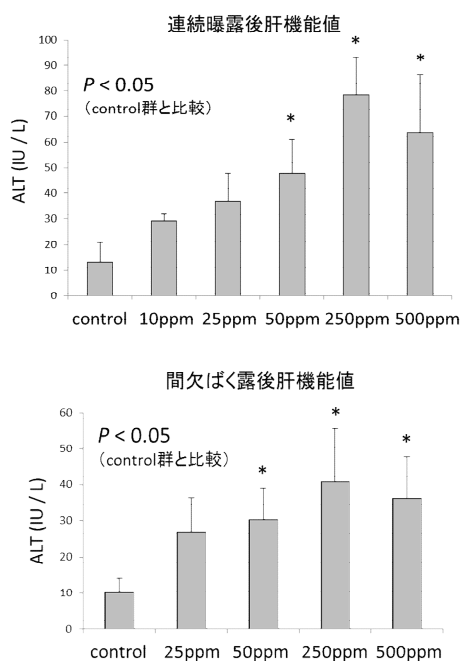


図6. 曝露後肝機能値

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

(柳場由絵) 須田恵、王瑞生、扇祖銓、久保田久代、北條理恵子、那須民江、ジメチルアセトアミド吸入曝露による肝臓における酸化ストレスの増加、第 82 回日本衛生学会、2012 年 3 月 25 日、京都大学

(柳場由絵) 須田恵、王瑞生、扇祖銓、久保田久代、北條理恵子、那須民江、DMAC 吸入曝露による肝臓における酸化ストレスの増加、第 85 回日本産業衛生学会、2012 年 6 月 1 日、名古屋国際会議場

(柳場由絵) 須田恵、王瑞生、久保田久代、北條理恵子、那須民江、ジメチルアセトアミド吸入ばく露による肝臓での酸化的代謝への影響について、第 39 回日本毒性学会、2012 年 7 月 18 日、仙台国際センター

Oxidative metabolism effects of inhalation exposure to dimethylacetamide、The 6th

International Congress of Asian Society of Toxicology、2012 年 7 月 20 日、仙台国際センター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳場 由絵 (YANAGIBA YUKIE)

独立行政法人労働安全衛生総合研究所

研究者番号：90467283

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：