

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670329

研究課題名(和文) オフセット印刷工程で多発した胆管癌の原因解明と動物モデルの確立

研究課題名(英文) Animal model for cholangiocarcinoma associated with offset printing process

研究代表者

市原 学 (Ichihara, Gaku)

東京理科大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：90252238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：オフセット印刷工場で多発した胆管がんの原因候補物質として1,2-ジクロロプロパン(DCP)が挙げられているが、過去の同物質を用いた動物実験は胆管がんの発生を示していない。本研究は同物質への感受性の種差がグルタチオンS-トランスフェラーゼの分布で説明できないことを示した。さらに本研究は、マウスにおいてDCPが胆管上皮細胞増殖と細胞死を誘導し、それら作用に肝臓代謝酵素P450が貢献していることを世界で初めて示した。本研究結果は、DCPが胆管がんの原因物質であることを強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Although serial cases of cholangiocarcinoma found in an offset printing factory suggest that 1,2-dichloropropane (DCP) is the causative agent for them, the past bioassay studies did not show cholangiocarcinoma. The present study showed difficulty in explaining the species difference in susceptibility to DCP by distribution of glutathione S-transferase. Moreover the study is the first to demonstrate that exposure to DCP induce proliferation and apoptosis of cholangiocytes, as well as contribution of P450 to such effects. The present study strongly indicates that DCP is the causative agent for cholangiocarcinoma.

研究分野：環境労働衛生学

キーワード：胆管がんの原因物質

1. 研究開始当初の背景

2011年、分担研究者の熊谷は、大阪のオフセット校正印刷会社(X社)に1990年代および2000年代前半に働いた40人の男性労働者中5人に胆管癌が発症し、うち4人が死亡していたことをつきとめた。発症年齢は25-45歳と若く、入社から発症までの期間は7-19年であった。日本の一般人口における肝内胆管癌、肝外胆管癌による死亡率はそれぞれ2.61人/10万人、7.85人/10万人(2005年、男子)であり、X社校正印刷部門男性労働者における胆管癌死亡率は異常に高いことがわかる。X社校正印刷業務において1,2-ジクロロプロパン(DCP)、ジクロロメタン(DCM)が大量に使用されていた。詳細な暴露歴の調査により、これまで胆管癌を発症した労働者に共通して暴露があったのは、DCPであることが判明した(Kumagai, Ichihara et al Occupational and Environmental Medicine 2013)。DCPは様々な塩化有機化合物製造の中間物質として用いられるとともに洗浄剤としても使用されている。2014年、国際がん研究機関(IARC, International Agency for Research on Cancer)は、1,2-ジクロロプロパンをGroup3(分類不能)から、Group1(ヒトでの発がん性あり)に分類しなおした。これは日本における疫学研究に基づく判断である。ジクロロエタンやジプロモエタンなどのジハロゲン化炭化水素はグルタチオン抱合されることにより、極めて反応性の高いエピスルフォニウムイオンを生成し、これがDNA付加体を作り、癌を引き起こすことが長年の研究によって理解されてきている(Rannug 1979, Guengerich 1990)。同じジハロゲン化炭化水素であるDCPもグルタチオン抱合によりエピスルフォニウムイオンを生成することが予想される。一方、DCP、DCMの長期発がん性試験としては米国 National Toxicology Program (NTP)、日本バイオアッセイセンターによるものが過去に存在する。

しかし、これらの試験では、胆管癌の発生は観察されていない。また、これまでの研究はDCPの胆管がん誘導作用のメカニズムを十分に明らかにしていない。

2. 研究の目的

我々は、グルタチオン抱合により生成したエピスルフォニウムイオンが胆管に増殖性変化を引き起こすとの仮説を本研究において検証した。ラット、マウス、ハムスター、モルモットの胆管におけるGST発現状態を調べ、胆管癌を再現する有望な動物種の選択を試みた。P450阻害剤を用いてグルタチオン系代謝を促進させ、胆管での増殖性変化を調べた。

3. 研究の方法

DCPに構造が類似する1,2-ジクロロエタン、1,2-ジプロモエタンではグルタチオンS-トランスフェラーゼT1(GSTT1)によるグルタチオン抱合、エピスルフォニウムイオン形成による活性化が明らかにされているため、上記の胆管がん発生の種差がGSTT1の発現部位の種間での違いによって説明できる可能性がある。本研究では、GSTT1の発現の分布、DCPによる誘導状態をさまざまな実験動物について調べるとともに、ヒトの胆管がん誘発を再現する適切な動物種の同定、胆管がんの動物モデル確立を目指した。C57BL/6J、Balb/cA、F344、Syrian golden hamster、Guinea pigにDCPを0、300、1000、3000ppm、一日8時間、7日間曝露した。断頭して肝臓を剖出し、4%パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝液にて固定した。GSTM1、GSTT1、GSTPi、Ki67に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

次に行った実験ではマウスにおけるDCPの胆管上皮細胞への影響を、細胞増殖と細胞死の観点から明らかにするとともに、それらの影響におけるP450の貢献を明らかにした。マウスC57BL/6JにDCPを1日8時間、週

7日、4週間吸入曝露するとともに、一部のマウスにはP450阻害剤である1-aminobenzotriazoleの腹腔注射を毎日行ったうえでDCP吸入曝露を行った。

4. 研究成果

GST分布と誘導の種差を比較した7日間DCP曝露実験では、GSTT1発現には大きな種差があり、GSTT1はラット、マウスではほとんどの肝細胞で陽性であったのに対して、ハムスターでは一部の肝臓および胆管上皮細胞で陽性であった。対照群と曝露群との差は明瞭ではなかった。14日曝露において、ハムスターの400ppm群において肝臓類洞の軽度な拡張が観察されたが、壊死は線維化像は観察されなかった。200ppm群では肝細胞は空包が観察された。GSTM1:14日曝露実験では、肝細胞と胆管の両方でハムスターのGSTM1が発現していた。DCP14日間曝露によって、ハムスターのGSTM1の発現は若干の増加をみたが、Balb/cAマウスでは変化がなかった。GSTT1:14日曝露実験の結果は、Balb/cAマウスとハムスターで7日間曝露実験と同様であった。Balb/cAマウスは肝細胞と胆管の両方でGSTT1を発現していた。ハムスターではGSTT1は肝細胞と胆管細胞との両方で発現していたが、DCP曝露群と対照群との差は明らかでなかった。GSTPi:すべての動物においてGSTPiの発現が肝細胞より強かったが、DCP曝露群と非曝露群との間の明らかな差は見られなかった。Ki67:抗体によってそのKi67が認識されなかったGuineaPigを除いて、Ki67はラット、ハムスター、Balb/cAおよびC57BL/6Jマウスの肝細胞および胆管細胞において検出された。しかし、DCP曝露群と非曝露群との間の差は明瞭でなかった。本研究の結果、DCP非曝露ラットと2つマウス系統においてGSTT1が胆管細胞において発現していることがわかった。

グルタチオンS-トランスフェラーゼの分布と誘導に関する種差を調べた研究の結果、予想に反して、グルタチオンS-トランスフェラーゼの分布で種差を説明することが困難であり、適切な動物種選択には必ずしも役立たないと結論せざるを得なかった。

一方、マウスへのDCP曝露とP450阻害影響評価実験の結果、DCPへの曝露は、胆管細胞の増殖、胆管細胞のアポトーシス、肝細胞壊死を増加させたが、P450阻害剤1-aminobenzotriazole投与群ではこれらの影響は抑制された。本研究は、動物の胆管上皮細胞においてDCP曝露がマウスにおいて細胞増殖とアポトーシスを誘導することを示した初めての研究であるとともに、P450による代謝活性化が、これらの影響に貢献していることを示した。

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20件)

1. Zong C, Zhang X, Huang C, Chang J, Garner CE, Sakurai T, Kato M, Ichihara S, **Ichihara G**. Role of cytochrome P450s in the male reproductive toxicity of 1-bromopropane. *Toxicology Research* 2016; 5(6): 1522-1529. (査読有) 10.1039/c6tx00164e
2. Suzuki Y, Tada-Oikawa S, Hayashi Y, Izuoka K, Kataoka M, Ichikawa S, Wu W, **Ichihara G**, Ichihara S. Single- and double-wall carbon nanotubes enhance atherosclerogenesis by promoting monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial progenitor cell dysfunction. *Particle and Fibre Toxicology* 2016; 13:54. (査読有) 10.1186/s12989-016-0166-0
3. Lee E, Park JE, Iida M, Fujie T, Kaji T, **Ichihara G**, Weo YC, Kim Y. Magnetic resonance imaging of leukoencephalopathy in amnesic workers exposed to organotin. *Neurotoxicology* 2016; 57: 128-135. (査読有) 10.1016/j.neuro.2016.09.004
4. Ichihara S, Li W, Omura S, Fujitani Y, Liu Y, Wang Q, Hiraku Y, Hisanaga N, Wakai K, Ding X, Kobayashi T,

- Ichihara G.** Exposure assessment and heat rate variability monitoring in workers handling titanium dioxide particles: a pilot study. *J Nanopart Res* 2016; 18: 52. (査読有)
10.1007/s11051-016-3340-2
5. Huang F, Ichihara S, Yamada Y, Banu S, **Ichihara G.** Effect of 4-week inhalation exposure to 1-bromopropane on blood pressure in rats. *J Appl Toxicol* 2016; 37: 331-338. (査読有) 10.1002/jat.3364
 6. Zong C, Garner CE, Huang C, Zhang X, Zhang L, Chang J, **Toyokuni S**, Ito H, Kato M, Sakurai T, **Ichihara G.** Preliminary characterization of a murine model for 1-bromopropane neurotoxicity: Role of cytochrome P450. *Toxicol Lett* 2016; 258: 249-258. (査読有) 10.1016/j.toxlet.2016.07.006
 7. Tada-Oikawa S, **Ichihara G**, Fukatsu H, Shimanuki Y, Tanaka N, Watanabe E, Suzuki Y, Murakami M, Izuoka K, Chang J, Wu W, Yamada Y, Ichihara S. Titanium dioxide particle type and concentration influence the inflammatory response in Caco-2 cells. *Int Mol Sci* 2016; 17: E576. (査読有) 10.3390/ijms17040576
 8. Zhang L, Zong C, Ichihara S, Naito H, **Toyokuni S**, **Kumagai S**, **Ichihara G.** A trial to find appropriate animal models of dichloropropane-induced cholangiocarcinoma based on the hepatic distribution of glutathione S-transferase. *J Occup Health* 2015; 57: 548-54. (査読有) 10.1539/joh.15-0085-OA
 9. Chang J, **Ichihara G**, Shimada Y, Tada-Oikawa S, Kuroyanagi J, Zhang B, Suzuki Y, Sehsah R, Kato M, Tanaka T, Ichihara S. Copper oxide nanoparticles reduce vasculogenesis in transgenic zebrafish through down-regulation of vascular endothelial growth factor expression and induction of apoptosis. *J Nanosci Nanotechnol* 2015; 15: 2140-7. (査読有)
 10. Wu W, **Ichihara G**, Hashimoto N, Hasegawa Y, Hayashi Y, Tada-Oikawa S, Suzuki Y, Chang J, Kato M, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC, Ichihara S. Synergistic effect of bolus exposure to zinc oxide nanoparticles on bleomycin-induced secretion of pro-fibrotic cytokines without lasting fibrotic changes in murine lungs. *Int J Mol Sci* 2014; 16: 660-76. (査読有) 10.3390/ijms16010660
 11. Huang Z, Ichihara S, Oikawa S, Chang J, Zhang L, Hu S, Huang H, **Ichihara G.** Hippocampal phosphoproteomics of F344 rats exposed to 1-bromopropane. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 282: 151-60. (査読有) 10.1016/j.taap.2014.10.016
 12. **Kumagai S**, Kurumatani N, Arimoto A, **Ichihara G.** Time course of blood parameters in printing workers with cholangiocarcinoma. *J Occup Health* 2014; 56: 279-84. (査読有)
 13. Suzuki Y, Tada-Oikawa S, **Ichihara G**, Yabata M, Izuoka K, Suzuki M, Sakai K, Ichihara S. Zinc oxide nanoparticles induce migration and adhesion of monocytes to endothelial cells and accelerate foam cell formation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 278: 16-25. (査読有) 10.1016/j.taap.2014.04.010
 14. Ichihara S, Tada-Oikawa S, Suzuki Y, Wu W, **Ichihara G.** Effects of Nanomaterials on Cardiovascular System -Analysis of in Vitro and Animal Experiments. *Trans Mater Res Soc Jpn* 2014 in press(査読有)
 15. Chang J, Oikawa S, Iwahashi H, Kitagawa E, Takeuchi I, Yuda M, Aoki C, Yamada Y, **Ichihara G**, Kato M, Ichihara S. Expression of proteins associated with adipocyte lipolysis was significantly changed in the adipose tissues of the obese spontaneously hypertensive/NDmcr-cp rat. 2014; 6: 8. (査読有) 10.1186/1758-5996-6-8
 16. Wu W, **Ichihara G**, Suzuki Y, Izuoka K, Oikawa-Tada S, Chang J, Sakai K, Miyazawa K, Porter D, Castranova V, Kawaguchi M, Ichihara S. Dispersion method for safety research on manufactured nanomaterials. *Ind Health* 2014; 52: 54-65. (査読有)
 17. Sakai K, Hisanaga N, Shibata E, Kamijima M, **Ichihara G**, Takeuchi Y, Nakajima T. Trends in asbestos and non-asbestos fibre concentrations in the lung tissues of Japanese patients with mesothelioma. *Ann Occup Hyg* 2014; 58: 103-20. (査読有) 10.1093/annhyg/met055
 18. 市原学、小林隆弘、市原佐保子 ナノトキシコロジーと労働環境衛生学 医学のあゆみ 2016; 259 (3): 247-253
 19. 市原 学、張 靈逸、豊國伸哉、熊谷信二 IV 職業性胆管癌の原因物質解明のための動物実験 産業医学レビュー 2015; 28: 151-6.
 20. 市原 学 特定化学物質障害予防規則等の改正について ファルマシア 2015; 51: 808-809.

〔学会発表〕(計 102 件)

1. K. Morita, L. Zhang, S. Hara, H. Ichinose, M. Sakai, Y. Wakayama, H. Katano, T. Sakurai, S. Ichihara and G. Ichihara. Exposure To Acrylamide Reduces Noradrenaline Level, Noradrenergic Axons And Adult Neurogenesis In Brain Of Rats Similarly To Exposure To 1-Bromopropane. Society of Toxicology 56th Annual Meeting (SOT2017). (2017.3.12-3.16, ボルチモア、米国)
2. S. Takasu, T. Sakurai, Y. Kimura, S. Ichihara, Y. Endo, G. Endo and G. Ichihara. Exposure To 1,2-dichloropropane Enhances mRNA Expression Of Activation-induced Cytidine Deaminase In Human Cholangiocytes. Society of Toxicology 56th Annual Meeting (SOT2017). (2017.3.12-3.16, ボルチモア、米国)
3. D. Nagashima, L. Zhang, Y. Kitamura, S. Ichihara, Y. Wakayama, K. Morita, H. Katano, M. Sakai, E. Watanabe, T. Sakurai, S. Oikawa and G. Ichihara. Proteomic Analysis Of Hippocampal Proteins Of Rats Exposed To Acrylamide. Society of Toxicology 56th Annual Meeting (SOT2017). (2017.3.12-3.16, ボルチモア、米国)
4. 木村 優介, 高巢 成惟, 櫻井 敏博, 市原 佐保子, 圓藤 陽子, 圓藤 吟史, 市原 学. 1,2-ジクロロプロパンのヒト胆管細胞への曝露による遺伝子改変酵素 AID の mRNA 発現上昇. 第 87 回日本衛生学会 学術総会(2017.3.26-28, フェニックス・シーガイア・リゾート、宮崎市、宮崎県)
5. 張 驍, 宗 才, 張 靈逸, エドウィン ガーナー, 黄 晉彦, 吳 文亭, 常 杰, 櫻井 敏博, 市原 佐保子, 市原 学. ジクロロプロパン曝露マウスの胆管細胞増殖と肝臓毒性における P450 の役割. 第 87 回日本衛生学会学術総会(2017.3.26-28, フェニックス・シーガイア・リゾート、宮崎市、宮崎県)
6. 市原 学, 近藤直登, 木村雄介, 高巢成惟, 櫻井敏博, 市原佐保子, 圓藤陽子, 圓藤吟史. ジクロロプロパンへの曝露はヒト胆管細胞において 活性化誘導シチジンデアミナーゼ発現を誘導する. 第 16 回分子予防環境医学研究会(2017.2.3-4, 熊本市国際交流会館、熊本県)
7. Gaku Ichihara. Human studies and experimental studies for nanosafety. 5th Thailand International Nanotechnology Conference (NanoThailand2016). (2016.11.27-29, Nakhon Ratchasima, Thailand)
8. 市原 学. 産業中毒の原因解明と予防のための症例・疫学・実験研究 - 科学の本質の一つである予見性を産業医学でどのように獲得するか. 第 26 回日本産業衛生学会全国協議会(2016.9.8-10, 京都テルサ、京都府)
9. Xiao Zhang, Cai Zong, Lingyi Zhang, Edwin Garner, Chinyen Huang, Wenting Wu, Jie Chang, Toshihiro Sakurai, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara. Role of P450 in Hepatotoxicity and Proliferation in Bile Duct Induced by Exposure to 1,2-Dichloropropane in Mice. 第 44 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(日本産業衛生学会). (2016.8.4-5, 東京理科大学 神楽坂キャンパス 森戸記念館)
10. 張 驍, Cai ZONG, Lingyi ZHANG, Edwin GARNER, Chinyen HUANG, Wenting WU, Jie CHANG, 櫻井 敏博, 市原 佐保子, 市原 学. 1,2-ジクロロプロパン曝露マウスの肝毒性と胆管細胞の増殖における P450 の役割. 第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.29-7.1, 愛知県産業労働センター、名古屋市)
11. Gaku Ichihara. Epidemiological and Toxicological Studies on the Carcinogenicity of 1,2-dichloropropane. ICCA-LRI and NIHS Workshop 2016(2016.6.15-16, 淡路夢舞台国際会議場、兵庫県)
12. Sahoko Ichihara, Yuka Suzuki, Eri Watanabe, Yurika Osada, Arisa Hayashida, Tomoki Furutani, Kiyora Izioka, Gaku Ichihara. Effects of nano-sized TiO₂ on the adhesion of monocytes to endothelial cells. The Society of Toxicology 55th Annual Meeting and ToxExpo. (2016.3.13-17, New Orleans, Louisiana, USA)
13. Xiao Zhang, Cai Zong, Lingyi Zhan, Edwin Garner, Chinyen Huang, Wenting Wu, Jie Chang, Toshihiro Sakurai, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara. Role of P450 in Hepatotoxicity and Proliferation in Bile Duct Induced by Exposure to 1,2-dichloropropane in Mice. The Society of Toxicology 55th Annual Meeting and ToxExpo. (2016.3.13-17, New Orleans, Louisiana, USA)
14. 櫻井 敏博, 市原 学, 高巢 成惟, 木村 優介, 圓藤 陽子, 圓藤 吟史. 胆管由来細胞を用いたハロゲン化炭化水素の遺伝毒性評価系の確立. 日本産業衛生学会 第 43 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(2015.10.2-10.3, まるは食堂旅館 南知多 豊浜本店、知多郡南知多郡、愛知県)

15. 張 靈逸, 宗 才, 市原 佐保子, 内藤 久雄, 豊國 伸哉, 熊谷 信二, 市原 学. グルタチオン S-トランスフェラーゼ肝臓内分布はジクロロプロパンによる胆管癌誘導の種差を説明しない. フォーラム 2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2015.9.17-9.18, 神戸学院大学ポートアイランドキャンパス B 号館、神戸市、兵庫県)
16. Lingyi Zhang, Cai Zong, Sahoko Ichihara, Hisao Naito, Shinya Toyokuni, Shinji Kumagai, Gaku Ichihara. Hepatic distribution of GST cannot explain the gap between humans and rodents for induction of cholangiocarcinoma following exposure to dichloropropane. 51st Congress of the European Societies of Toxicology Bridging Sciences for Safety (EUROTOX2015). (2015.9.13-9.16, Porto, Portugal)
17. Lingyi Zhang, Cai Zong, 市原 佐保子, 内藤 久雄, 豊國 伸哉, 熊谷 信二, 市原 学. グルタチオン S-トランスフェラーゼの肝臓内における分布は、1, 2-ジクロロプロパン曝露による胆管癌誘導作用におけるヒトとげっ歯類の違いを説明できない. 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6.29-7.1, 石川県立音楽堂他、金沢)
18. Cai Zong, Edwin Garner, Chin-Yen Huang, Lingyi Zhang, Xiao Zhang, Shinya Toyokuni, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara. Establishment of mouse model for neurotoxicity of 1-bromopropane, an alternative to ozone-depleting solvents. 19th International Conference on Cytochrome P450. (2015.6.12.-15, 国立オリンピック記念青少年総合センター国際交流棟、渋谷区)
19. Gaku Ichihara. Occupational health in nanotechnology. 31th International Congress on Occupational Health (2015.5.31-6.5, Seoul, Korea)
20. Lingyi Zhang, Shinji Kumagai, Shinya Toyokuni, Hisao Naito, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara. Animal models for cholangiocarcinoma induced by chemicals associated with the offset printing. SOT 54th Annual Meeting and ToxExpo(2015.3.22-26, San Diego, California, USA)
21. 市原 学. 2-ジクロロプロパンの発がん性 発症機序から. 第 42 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2014.10.25-26, 松本市中央公民館, 松本市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 市原 学 8 章 労働衛生 コンパス

衛生薬学 健康と環境 改訂第 2 版 編集: 鍛冶利幸、佐藤雅彦 南江堂、総ページ 610 (119-127) 2016

〔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

市原 学 (Gaku Ichihara)
 東京理科大学・薬学部・教授
 研究者番号: 90252238

(2) 研究分担者

熊谷信二 (Shinji Kumagai)
 産業医科大学・産業保健学部・教授
 研究者番号: 50250329

(3) 連携研究者

豊國伸哉 (Shinya Toyokuni)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号: 90252460

(4) 研究協力者

張 靈逸 (Lingyi Zhang)
 東京理科大学・薬学部・ポストドクトラルフェロー

張 堯 (Xiao Zhang)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課程

宗 才 (Cai Zong)
 東京理科大学・薬学部・ポストドクトラルフェロー

杉江茂幸 (Shigeyuki Sugie)
 朝日大学・歯学部・教授