

2002/409

厚生労働科学研究費補助金
労働安全衛生総合研究事業

フロン代替溶剤1-ブロモプロパンのリスク評価

平成14年度 研究報告書

主任研究者 那 須 民 江

平成15 (2003) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
フロン代替溶剤1-プロモプロパンのリスク評価.....	1
那須 民江	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	90
III. 研究成果の刊行物・別刷.....	92

厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）
総括研究報告書

主任研究者 那須 民江 名古屋大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 1995年、韓国においてフロン代替溶剤として導入された2-プロモプロパン(2-BP)に曝露された労働者の中に、生殖障害、造血障害が発見されたが、動物実験による原因物質の解明により2-BPの溶剤としての使用は急速に減少した。一方、異性体1-プロモプロパン(1-BP)が新しいフロン代替溶剤として日本、米国を中心に導入された。1-BPは最近、その使用量が増加しているにもかかわらず、許容濃度が勧告されておらず、そのリスク評価は厚生労働行政の観点から重要かつ緊急性の高い課題と考えられる。本研究は、ヒト症例から推測される障害に関する動物実験による因果関係の証明、毒性機序の解明、動物からヒトへの外挿の際に有用な内部曝露マーカーの確立、ヒト調査を行うことによって総合的に1-BPのリスク評価を行い、衛生基準の設定のための科学的基礎資料を提供するものである。平成14年度の研究におけるラットを用いた実験の結果は、ヒト症例における中枢神経症状、感覚障害の原因が1-プロモプロパン曝露によるものであることを強く示唆する。内分泌系の攪乱は存在するが、そのメカニズムは今年度の研究では明らかにされなかった。雌生殖系においては卵胞の発達の障害を引き起こし、異性体2-プロモプロパンとは違ったメカニズムで毒性を発揮することが明らかになった。卵巣ろ胞卵胞の減少が200ppmで起こることが明らかとなった（LOAEL：最小毒作用量）。内部暴露指標である尿中N-Acetyl-S-propylcysteine、血液グロビン中蛋白付加物S-propylcysteineが、曝露を反映するすぐれた指標であることがInVivoで明らかにされ、特に後者は、長期暴露マーカーとして有効であることが明らかとなった。1-プロモプロパン曝露労働者の症状の解析では、中枢神経系の関与を疑わせる症状の他に粘膜刺激症状も顕著であった。

分担研究者	授
市原 学 名古屋大学大学院医学系 研究科 助教授	小川康恭 産業医学総合研究所 部 長
上島通浩 名古屋大学大学院医学系 研究科 講師	毛利一平 産業医学総合研究所 主 任研究官
山田哲也 名古屋大学大学院医学系 研究科 助手	平田 衛 産業医学総合研究所 主 任研究官
柴田英治 名古屋大学医学部 助教	

A. 研究目的

オゾン層保護等のため 1996 年以降特定フロン (CFC) 類は先進諸国での生産が禁止された。これらの溶剤は、電子・精密機械工業等で金属部品の洗浄剤として大量に用いられてきたため、その代替溶剤の開発が急がれた。1995 年、韓国においてフロン代替溶剤として導入された 2-プロモプロパン (2-BP) に曝露された労働者の中に、生殖障害、造血障害が発見された (Kim 1997)。動物実験による原因物質の解明 (Ichihara, 1996, 1997, Yu 1997) および労働省 (当時) の行政通達により日本での 2-BP による中毒を未然に防ぐことができた。一方、異性体 1-プロモプロパン (1-BP) は、2-BP よりも変異原性が低く、毒性が一般に低いと考えられたため、新しいフロン代替溶剤として日本、米国を中心に導入された。1-BP は最近、その使用量が増加しているにも関わらず、許容濃度が勧告されておらず、そのリスク評価は厚生労働行政の観点から重要かつ緊急性の高い課題と考えられる。我々は 2-BP との比較実験において 1-BP の神経毒性、生殖毒性を発見するとともに (Yu 1998, Ichihara 2000ab)、3つのヒト症例を報告した (Ichihara, 2002)。しかし、これらの症例は数に限りがあり、そのヒトにおける量-反応関係の推定、衛生基準設定のための科学的基礎資料は十分でない。本研究は、1-BP の衛生基準の設定に資し、この重要なフロン代替溶剤の安全な使用のための指針をつくり、労働者の健康を守る

という厚生労働行政に寄与することになる。さらに、より安全な代替溶剤の開発に貢献し予防的な厚生労働行政のための科学的基礎資料を提供する。

B. 研究方法

1 症例の解析から推測される毒性の動物での量-反応関係の解明

1) 中枢神経障害の解析

①形態学的解析 ウィスター系雄ラットに 200 ppm、400 ppm、800 ppm の 1-プロモプロパンを 12 週間および 1 週間曝露し、ペントバルビタール麻酔下で、ザンボニ液を用いて Perfusion した。1 時間氷上で固定後、脳、脊髄、後根神経節、末梢神経を切り出し、ザンボニ液に浸漬してさらに固定した後、パラフィン包埋またはエポキシ包埋を行い、HE 染色またはトリジンブルー染色を行い、障害部位の探索を行った。

②生化学的解析 脳各部位の CPK 活性、SH 基、グルタチオンを測定するとともに、酵素免疫法を用い、神経特異蛋白である γ -エノラーゼ、グリア特異蛋白である β -エノラーゼ、クレアチンキナーゼのアイソザイムを測定し、障害の局在を検索した。ウィスター系雄ラット 36 匹を 9 匹ずつの 4 群に分け、それぞれに 200 ppm、400 ppm、800 ppm の 1-プロモプロパンを一日 8 時間、週 7 日、12 週間曝露し、実験終了時にペントバルビタール麻酔下で、腹部大動脈よりヘパリン採血を行い、脳、脊髄 (横隔膜より上部 2 cm) を取り出し、

-80℃で凍結保存した。分析時、凍結した脳、脊髄を氷上で融解し、10倍量の中性緩衝液を加えてホモジェネートした後、45,000gで20分間遠心し、上清をCK活性、 γ Enolase, β S100, CKB, CKM測定に用いた。グルタチオン、非蛋白SH基の測定には、上記上清にトリクロロ酢酸を5%になるように加え除蛋白したサンプルを用いた。蛋白SH基は沈殿を1%SDSと0.025%EDTAを含む40mMリン酸緩衝液 (PH8.0) に溶解したものをを用いて測定した。SH基はDTMBを用いて吸光度で定量し、グルタチオン量は、酵素サイクリング法を用いて測定した。酸化型グルタチオン GSSG は、アクリルニトリルを最終濃度が295mMになるように加え、プレインキュベートした後、同様の方法で測定した。

2) 内分泌系の解析

ウイスター系雄ラット36匹を9匹ずつの4群に分け、1-ブロモプロパン200ppm、400ppm、800ppmおよび新鮮空気に一日8時間、週7日、12週間曝露を行った。曝露終了時にネンブータル麻酔下で腹部大動脈より採血し、血漿中LH, FSH, テストステロンを測定する。雌ラット36匹も同様に4群に分け、1-ブロモプロパン200ppm、400ppm、800ppmおよび新鮮空気に一日8時間、週7日、12週間曝露を行い、血漿中LH, FSHを測定した。

3) 生殖系の解析

ウイスター系雌ラット36匹を9匹ずつの4群に分け、1-ブロモプロパ

ンを200ppm、400ppm、800ppm、一日8時間、週7日、12週間曝露し、性周期を調べるとともに、卵巢連続切片を作成し、各発達段階の卵胞を計測した。4) 1週間曝露による神経、雄生殖器の標的(高感受性細胞)の検索と影響指標としての検討を行った。ウイスター系雄ラット36匹を9匹ずつの4群に分け、1-ブロモプロパンを200、400、800ppm一日8時間、週7日、1週間曝露し、各群8匹をペントバルビタール麻酔下で脳、脊髄を取り出し、凍結した。凍結した脳、脊髄は、Iと同様の方法で生化学的解析を行った。同時に精巣上体尾部を取り出し、ハンクス液内で細切、ろ過を行い、光学顕微鏡下で運動精子率、精子数を計測した。また、精子スメアを作り、形態異常を調べた。各群残りの1匹をザンボニ液を用いてPerfusionした。1時間氷上で固定後、脳、脊髄、後根神経節、末梢神経、精巣を切り出し、ザンボニ液に浸漬してさらに固定した後、パラフィン包埋またはエポキシ包埋を行い、HE染色またはトルイジンブルー染色を行い、早期障害部位の探索を行った。

2 内部曝露指標としての分子マーカーの検討

尿中 N-acetyl S-propylcystein, N-acetyl-S-2-hydroxypropylcystein を TBDMS 誘導体化し、GC マススペクトロメーター (Agilent5897N) で測定する (Ichihara2001)。血液中グロビン蛋白は酸加水分解の後、LC-MS/MS (Finnigan, TSQ) にて分析した。さ

らにプロパンジオールおよび HNE (4-hydroxynonenal) のフィールド研究で応用可能な測定法を確立し、バイオマーカーとしての有効性を検討した。

3 1-BP 使用職場調査

1-BP 使用職場、1-BP 製造工場の労働者を対象に、作業内容、作業時間、活性炭パッシブサンプラーによる暴露時間加重平均値を測定し、暴露状況、健康影響を把握した。症例の解析もあわせて行った。

4 Nrf2 ノックアウトマウスの増殖

Nrf2 ノックアウトマウスの微生物学的クリーニング、増殖、PCR による遺伝子型の確認を行った。

B. 研究結果

1 症例の解析から推測される毒性の動物での量-反応関係の解明

1) 中枢および末梢神経障害の解析

①形態学的解析

1-プロモプロパン 800ppm、一日 8 時間、12 週間曝露により、延髄薄束核軸索前末端の腫大、末梢神経ミエリンの変性が観察された。

1-プロモプロパン 800ppm、一日 8 時間、1 週間曝露により、延髄薄束核にミエリン鞘に暗色物質を含む軸索前末端の腫大が観察された (Fig.1)。小脳、脊髄後根神経節、胸髄において有意な変化は観察されなかった。

1-プロモプロパン 800ppm、一日 8 時間、1 週間曝露したラットから得た

後頸骨神経筋枝のエポン包埋切片標本、および解きほぐし標本において、とりわけ RanvierNode 近くのミエリン鞘の腫脹、濃染塊、シュワン細胞細胞質の肥大、シュミットランターマン切痕の神経単位長さあたりの出現頻度が減少していた (Fig. 2)。

1-プロモプロパン 800ppm、一日 8 時間、12 週間曝露したラットにおいて大脳皮質の萎縮が観察された。これは大脳重量の有意な低下と対応している。

②生化学的解析

1-プロモプロパン 12 週間曝露ラットにおいて、体重は 400ppm 以上で有意に減少していた (Fig.3 図は Mean を示し、ErrorBar は標準偏差を示す。以下同様)。800ppm で大脳重量が有意に低下していた (Fig.4) が、小脳、脳幹は重量の変化を示さなかった (Fig. 5, 6)。神経特異蛋白質 γ -エノラーゼは大脳において 400ppm 以上の濃度で有意に減少していた (Fig. 7) が、小脳、脳幹、脊髄においては有意な変化を示さなかった (Fig. 8-10)。グリア特異蛋白質 β S100 は大脳、小脳、脳幹、脊髄いずれの部位においても有意な変化を示さなかった (Fig. 11-14)。HeatShockProtein27 は、大脳においては有意な変化がなかった (Fig. 15) が、小脳、脳幹、脊髄において 800ppm で有意な上昇が観察された (Fig. 16-18)。CK 活性は、大脳、小脳、脳幹のすべての部位で 400ppm 以上の濃度で有意な減少が観察され (Fig. 19-21)、脊髄においては 200ppm 以上の濃度で有意な

減少が観察された(Fig. 22)。サンドイッチタイプの酵素抗体法によって測定したアイソザイムCK-Bは、大脳、小脳、脳幹において800ppmの曝露濃度で有意な減少を示し(Fig. 23-15)、脊髄では200ppm以上で有意な減少を示した(Fig. 26)。アイソザイムCK-Mは、中枢神経系においてはCK-Bに比べて圧倒的に少量であるが、脳幹において400ppm以上で減少した(Fig. 29)。大脳、小脳、脊髄においては有意な変化は示されなかった(Fig. 27, 28, 30)。CK-Bに対するCK活性の値、CK活性/CK-Bは、大脳、脳幹において400ppm以上で減少し(Fig. 31, 33)、脊髄において800ppmの濃度で減少した(Fig. 34)。小脳においては有意な変化を示さなかった(Fig. 32)。

総グルタチオン量は、大脳、小脳、脳幹で、800ppmの曝露濃度で有意に減少した(Fig. 35-37)が、脊髄では反対に800ppmで有意な増加を示した(Fig. 38)。酸化型グルタチオンGSSGは大脳において800ppmで有意な増加が観察されたが(Fig. 39)、小脳、脳幹、脊髄では有意な変化が観察されなかった(Fig. 40-42)。非蛋白結合SH基は、大脳、脳幹において800ppmで有意に減少していたが(Fig. 43, 45)、小脳、脊髄では有意な変化が観察されなかった(Fig. 44, 46)。蛋白結合SH基は小脳では400ppm以上で(Fig. 48)、脳幹で800ppmで(Fig. 49)有意な減少が観察されたが、大脳、脊髄では有意な変化がなかった(Fig. 47, 50)。

可溶性蛋白は、大脳において800ppm

で有意な減少が示された(Fig. 51)が、小脳、脳幹、脊髄では有意な変化が示されなかった(Fig. 52-54)。

動物を用いた形態学的、生化学的方法による神経系障害部位の推定の結果と、ヒト症例で確認された障害との比較を表に示した(Table I)。

2) 内分泌系の解析

1-プロモプロパン 12週間曝露雄ラットでは、LH, FSHに有意な変化はなかったが、テストステロン濃度に有意な変化が見られた(Fig. 57-59)。雌ラットにおいては、LH, FSHに有意な変化は観察されなかった(Fig. 55, 56)。

3) 生殖系の解析

雌 12週間曝露実験では、800ppm曝露群は体重減少が著しかったため、7週で曝露を中断し、ペントバルビタール麻酔下で解剖した(Fig. 60)。

膣スメア検査では、800ppm群において、正常な性周期をもつラットの数は最初の3週間で有意に減少した(Table II)。さらに、次の3週間においては正常な性周期をもつラットはなかった。すべての性周期停止ラットは、Diestrus (発情間期)を示していた。400ppm群において、性周期は7-9週から徐々に延長し不整性周期を示すラットのすべてが、Diestrus期の延長を示していた。正常の性周期の数は、最後の6週間で有意に対照群に比して減少していた。すべての性周期停止ラットは400ppm群において一定の発情間期のスメアを示していた。200ppm群では対照群に比して有意

な性周期の変化は観察されなかった。200、400ppm の生殖臓器の重量は、対照群に比して有意な変化がなかった(Table III)。肝臓と腎臓の重量は、200、400ppm において有意に上昇していた。400ppm 群における脳重量は、対照群に比して有意に低下していた。卵巣の病理組織学的検討では、800ppm 群で正常な成長卵胞および濾胞卵胞が著しく減少しており、新鮮黄体は認められず(Fig. 66)、始原卵胞は増加の傾向にあった(Fig. 66)。(Fig. 64=対照群) 400ppm 群(Fig. 65)では成長卵胞・濾胞卵胞の有意な減少が認められたが、始原卵胞には有意な数の変化はなかった(Fig. 65)。200ppm 群では組織学的には一見正常にみえたが、後述するように卵胞数を計測すると濾胞卵胞の有意な減少がみられた(Fig. 63)。連続切片法による評価では、量依存的な成長卵胞(Fig. 62)、ろ胞卵胞(Fig. 63)の減少が観察されたが、一方、始原卵胞は減少せず、むしろ800ppm 群では対照群より有意に多かった(Fig. 61)。

4) 1週間曝露による神経、雄生殖器の標的(高感受性細胞)の検索と影響指標としての検討

1-ブプロプロパン1週間曝露ラットの体重に関しては曝露による有意な変化が観察されなかった(Fig. 67)。大脳、小脳、脳幹、脊髄重量は有意に変化を示さなかった(Fig. 68-71)。神経特異蛋白質 γ -Enolaseは、大脳、小脳において、400ppm以上で有意な減少を観察した(Fig. 72, 73)が、脳幹と

脊髄では変化を示さなかった(Fig. 74, 75)。一方、グリア特異蛋白質ベータS100は大脳、小脳、脳幹、脊髄のいずれの部位においても有意な変化を示さなかった(Fig. 76-79)。

クレアチンキナーゼ活性は、大脳では400ppm以上の濃度で(Fig. 80)、小脳では800ppmで(Fig. 81)、脳幹、脊髄では(Fig. 82, 83)200ppm以上の濃度で低下した。AST, LDH活性は、大脳、小脳、脳幹、脊髄のいずれの部位においても変化を示さなかった(Fig. 84-91)。

酵素抗体法によるアッセイでは、アイソザイムCK-Bは大脳では800ppmで低下を示した(Fig. 92)が、反対に脳幹では800ppmで上昇(Fig. 94)、脊髄では400ppmで上昇した(Fig. 95)。小脳では有意な変化を示さなかった(Fig. 93)。アイソザイムCK-Mは、大脳、小脳、脳幹、脊髄のいずれの部位においても有意な変化を示さなかった(Fig. 96-99)。

血漿CK活性は400以上で有意な減少を示した(Fig. 100)。血漿中のアイソザイムCK-Mも800ppmで有意な減少を示した(Fig. 101)。

総グルタチオンは大脳、小脳で800ppmで有意な増加を示し(Fig. 102, 103)、反対に脊髄においては200ppm以上で有意に、量依存的に増加した(Fig. 105)。脳幹においては変化がなかった(Fig. 104)。

酸化型グルタチオンGSSGは、大脳、小脳、脳幹、脊髄のいずれの部位においても変化がなかった(Fig. 106-109)。非蛋白結合SHは、大脳、小脳においては800ppmで(Fig. 110, 111)、脳幹

においては 400ppm 以上で (Fig. 112) 有意な減少が観察された。一方、脊髄では 800ppm で有意な増加を示した (Fig. 113)。蛋白結合 SH 基は脳、小脳、脳幹、脊髄のいずれの部位においても有意な変化が観察されなかった (Fig. 114-117)。

生殖系：精巣上体尾部精子数に有意な変化はなかった (Fig. 118)。運動精子率は、200ppm 以上で有意に、量依存的な増加を示した (Fig. 119)。尾欠損精子率は 800ppm で有意な増加を示した (Fig. 120)。形態異常頭部を有する精子は 400ppm 以上で有意な増加を示した (Fig. 121)。

精巣における標的：800ppm 群で、Postspermiation ステージ IX-XI の精細管において滞留精子 (ステップ 19) が観察された (Fig. 122B)。 (Fig. 122A は Control)

2 内部曝露指標としての分子マーカーの検討

1) 尿中 N-Acetyl-S-propylcysteine の定量

N-Acetyl-S-propylcysteine (Fig. 123, 126)。の標準物質は市販されていないため、標準品の合成を行った。

【標準物質の合成】N-アセチルシステイン (1.64 g, 10mmol) を 2 N の NaOH (10mL) に溶解し、3ml のエタノールに溶かした 1-ブロモプロパン (11mmol) と混合、室温にて攪拌した。反応液を酸性にした後、酢酸エチルにて抽出し、カラムクロマトグラフィーにて精製分離した。同様の方法で、重水素置換体 (d7) 1-ブロモプロ

ロパンを用いて、内部標準物質 N-Acetyl-S- (d7) propylcysteine を合成した。CDC13 内における ¹H NMR が過去のデータと一致していることを確認した。

標準物質 N-Acetyl-S-propylcysteine を TBDMS 誘導体化し (Fig. 127) GC-MS に導入して得たピーク (Fig. 124)、およびマススペクトルを示す (Fig. 125)。定量イオンとして 203、確認イオンとして 262 を採用した。さらに、内部標準 N-Acetyl-S- (d7) propylcysteine のマススペクトルより、内部標準は 210、269 でモニターした。測定法の概略を Fig. 128 に示した。検量線はすぐれた直線性を示した (Fig. 129)。曝露ラット尿において、量依存的に N-Acetyl-S-propylcysteine 排泄量が増加した (Fig. 130)。

2) 血液グロビン中蛋白付加物 S-PropylCysteine の検出

1-ブロモプロパンに曝露したラットから麻酔下でヘパリン採血を行った。赤血球を等張バッファーで3回洗浄後、5mM の低張リン酸バッファーで溶血し、アセトン-オキサリクアシッド抽出をアスコルビン酸存在下で行った。窒素で乾固し、グロビン蛋白として凍結保存した。付加物測定時、グロビン蛋白を無酸素条件下で酸加水分解させ、S-Propylcysteine を LC-MS/MS にて定量した (Fig. 131, 132) 曝露濃度とすぐれた直線関係を示し、1-ブロモプロパンの長期曝露指標として有効であることが示唆された (Fig. 132)。

3) 酸化ストレス指標、中間マーカーとしての HNE (4-Hydroxynonenal) 測定法の確立 (Fig. 133)

50 μ L の血漿に 250 μ l の 0.05MPFBHA HCl (0-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride) を加え、30分、室温にてインキュベートする。0.5ml のメタノール、2ml のヘキサン、6滴の濃硫酸を加え、攪拌し、5分間放置した。ヘキサン層を別のガラス試験管に移し、無水硫酸ナトリウムを加え、20分放置し、脱水した。40 μ l の BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) を加え、80 $^{\circ}$ C で一時間インキュベートした。352、242、181 のいずれのイオンを用いても (Fig. 136) すぐれた直線性が得られ (Fig. 134)、定量可能であることがわかった (Fig. 135)。

4) ヘキサンジオールの定量 (Fig. 137)

500 μ l のサンプルに内部標準 d6-1,2-propanediol を加え 0.5ml のアセトニトリルで抽出を行った。1.2% のフェニルボラン酸を 125 μ l 加え、無水硫酸ナトリウム 1g を加え、混合した。上清を別の試験管に移し、窒素で乾固、アセトニトリル 50 μ l に溶解したものを GC-MS に導入した。20 μ M の微量のプロパンジオール測定が可能であることがわかり (Fig. 138)、かつ検量線も良い直線性が得られた (Fig. 139)。

3 1-BP 使用職場調査

1) A 精密株式会社訪問 平成 15 年

2月21日 【会社の概要】昭和61年創業 【生産の内訳】時計部品(全体の1割) インクジェットプリンタヘッド 携帯電話の時計制御用水晶振動子 9ピンドットインパクトプリンターヘッド 【1-BPの使用状況】

QDHラインで使用(1-BP 96~98%)。プリンタヘッド組立時に塗布するシリコン樹脂が治具の噴射口につまることがあった。これを洗浄除去するために1-BPを使用する。シリコン塗布ラインは2ライン。ライン上で常時使用しているわけではなく、必要に応じて使用していた。1-BPはQDHラインですべて使用(1993年~) 3リットルハウロウビーカーに半分程度まで1-BPを入れ、手製の簡易ドラフト(幅1m, 奥行き60cm, 高さ50cmくらい、フレキシブルダクトにて排気)中で導電性ゴム手袋をはめた作業者が治具につまったシリコン樹脂を洗浄。一回の作業は10分程度。細かいドリルを使ってシリコンを落とす。1-BPの代替は検討中だが、シリコンを落とせる物質がなかなか見つからなかった。

【1-BP以外の使用状況】時計部品製造ラインにて、フロン→トリクロロエタン→トリクロロエチレン(回収装置付き)の順に使用してきたが、現在ではライン自体が無くなっているため、使用していなかった。PRTR法で規制されている物質としては、HF、重クロム酸、シアン系、KOHなど。

洗浄作業は多いが、水系がほとんど。有機溶剤はIPAが多い。ハンダは3年くらい前に鉛フリー化を完了済み。

【安全衛生管理体制について】

全ての物質について「化学物質取扱手順書」を作成（MSDS等を参考）。A4版でパウチ処理したものを各貯蔵所脇に常に閲覧できるように置いてあった。

2) B工場における症例の解析：35歳男性 1996年より、光学機器の組み立て、プリズムとレンズの接着に従事している。作業後、頭痛、悪心、不快感を訴え、医療機関を受診した。使用溶剤の中に1-プロモプロパンを主成分とする製品が含まれていた。1996年以前は、塩化メチレン、フロン、アセトン、MEKを使用していたが、このような症状は経験しなかった。LH、FSH、Testosterone、体脂肪率、運動機能（Fingertap, Dynamometer, Grooved Pegboard）は正常範囲内であった。

2) C工場におけるBP暴露労働者の症状調査

症状として変なにおいがする、鼻が刺激される、喉の痛み、目が痛いなど、粘膜刺激症状が最も多く、次にめまい、浮遊感、頭痛などの中枢神経症状が多いことがわかった（Table V）。女性労働者について、血液検査、内分泌学的検査を行うとともに、月経異常の有無を調べた。貧血を示す労働者が発見されたが暴露濃度との関係は明らかでなかった。また、月経異常あるいは、内分泌学的変化を呈した労働者は比較的高齢であり、暴露による影響と断定することはできなかった（Table VI）。作業中の個人暴露濃度をパッシブサンプラー（柴田科学）を用いて調べる

とともに、作業後の尿を採取し、N-acetyl-S-propylcysteine量を測定した。その結果、実際に曝露された労働者に対してN-acetyl-S-propylcysteineが内部曝露量のマーカーとして有効であることがわかった（Fig. 140, 141）。

4 Nrf2ノックアウトマウスの増殖（Fig. 142）

Nrf2ノックアウトマウス（6週齢）を自然交配させ、子宮切断術により胎児を取り出し、微生物学的検査を行い、クリーニング完了動物として生育させた。体外受精、卵管移植法も併せて行った。生育させたマウスの遺伝子型をPCR法を用いて確認した。

（倫理面への配慮）1-プロモプロパン曝露労働者に対しては、ヘルシンキ宣言に基づき、文書によるインフォームドコンセントを得た。得られた情報と個人とを結びつける情報を外部に漏らさないように留意した。動物実験は、名古屋大学医学部動物実験指針にのっとり、動物実験委員会の許可を得て行う。さらに、本研究では、遺伝子改変動物を用いるが、これは名古屋大学医学部組換え遺伝子実験指針に基づき行う。

C. 考察（中枢神経障害の解析）形態学的解析によって、末梢神経ミエリン鞘の変性、延髄薄束核前末端の肥大、大脳皮質の萎縮が明らかとなった。しかし、今回の実験では、中枢神経系の障害の局在を限定するには至らなかった。一方、生化学的分析によって、形態学的

には把握できないレベルの変化を明らかにすることに成功した。それは、大脳皮質における神経特異蛋白質 γ -Enolase の低下である。この酵素は中枢神経において神経細胞のみに特異的に発現し、グリア細胞には発現しないことが知られている。一方、グリア特異的に発現することが知られている β S100 蛋白質は有意な変化を示さなかった。ただし、神経特異蛋白質の減少がただちに神経細胞数の減少を示すわけではない。神経細胞数の変化がなくても、この酵素量の減少は起きうるからである。この結果によって、形態学的変化を起こさないレベル (400ppm 以上) で、大脳皮質の神経細胞に影響を与え、それが機能的にも悪影響を与えている可能性があることが明らかとなった。ヒト症例における頭痛、記憶障害をはじめとする様々な症状が 1-ブロモプロパン曝露による中枢神経系への悪影響を基盤として起きていることを今回の実験結果は強く示唆するものである。今回の研究結果は、症例のみの解析では不十分であった曝露と症状との因果関係の解明に大きく貢献したと考えられる。ところで、一般に、中枢神経系において、構造 (形態) は生化学指標よりも頑健であり、形態が変化を受けた場合には大きな機能破綻があるとされている。今回の結果においても、生化学的変化が形態学的変化

より低いレベルでおきたが、この生化学的変化が中枢神経機能とどのように関係しているかを今後、さらに明らかにしていく必要がある。また、さらに、脳の微小局在における生化学的変化を明らかにし、ヒト症例における様々な中枢神経症状の責任部位との関係を検討する必要がある。

本研究では、クレアチンキナーゼ活性の低下、総グルタチオンの低下、蛋白、非蛋白 SH 基の低下、酸化型グルタチオンの上昇が観察された。クレアチンキナーゼ活性低下は、アクリルアミドなど既知の神経毒性物質でも知られており、神経毒性のメカニズムを考える上で興味深い。さらに、グルタチオンあるいは SH 基の枯渇と、酸化型グルタチオンの上昇は、酸化ストレスの神経毒性への関与を示唆している。この毒性メカニズムの解明は、リスク評価に有用である。すなわち、後述するように、本研究で同時に行う 1-ブロモプロパンによる蛋白付加物、グルタチオン抱合物による内部曝露量が、1-ブロモプロパンの SH 基への結合量を反映し、毒性発現とより強く関係した曝露指標と想定できるからである。このことによって、動物からヒトへ外挿する上で有効な、あるいは代謝の個体差を超えた Universal な内部曝露指標を確立することによって、メカニズムを基礎としたリスク評価を可能にす

るからである。

(内分泌系の解析) InVivoにおいて雄、雌ともにLH, FSHに変化はなかったが、雄においてテストステロンが減少していた。LH、FSHはパルス状の分泌が知られており、今回のように一つの時点での解析ではこのパルス分泌変動が捉えられないため、今回の結果をもって、LH, FSHに変化がないとする結論をつけることは慎重にする必要がある。むしろ1-プロモプロパンは中枢神経系への影響があることから、LH、FSH分泌に対して何らかの影響があるとする仮説は依然として有力である。一方、性ステロイドホルモンに対する直接影響の可能性も否定できない。今後、精巣あるいは卵巣除去ラットにおける、LH, FSHパルス状分泌に対する1-プロモプロパン曝露の影響を解析する必要がある。米国で発見された3人の女性労働者のうち、閉経前の女性は2人であった。その2人とも、一過性の月経不順を呈したが、内分泌系への影響は調べられていなかった。

(生殖系の解析) 雌ラットに1-プロモプロパンを曝露した実験では、量依存的な、性周期(発情間期)の延長、最終的には性周期の停止が観察された。さらに、興味深いことに、卵巣の連続切片解析により、始原卵胞にはほとんど影響を与えないのに対し、成長卵胞、ろ胞卵胞を減らすことが明らかとなった。これは、異性体2-プロモプロパンが始原卵胞を特異的にアポトーシスさせるのとは対照的に、卵胞の発達を阻害することを示すものである。こ

の量依存的な卵巣における卵胞発達障害は、性周期の変化を完全に説明するものであり、ヒト症例における月経周期異常が1-プロモプロパン曝露によって起きたことを強く示唆するものである。また、この結果は、衛生基準設定の基礎資料としても重要である。すなわち、卵巣ろ胞卵胞の減少が200ppmで起こることが明らかとなった(LOAEL:最小毒作用量)。

(1週間曝露による神経、生殖器の標的細胞の検索と影響指標としての検討)

1週間曝露実験において、末梢神経においては、シュワン細胞細胞質の拡張などの初期変化が観察されるとともに、早期に神経特異蛋白 γ -Enolase、グルタチオン、クレアチンキナーゼ活性の低下が観察されるとともに、アイソザイムCK-Bも低下していた。しかし、グリア特異蛋白である β S100は変化していなかった。また、精巣においては精細管からの精子放出障害が起きていた。アイソザイムCK-Bはグリアに多いと考えられているが、 β S100ほど特異的ではないとされている。この1週間曝露により、中枢神経においては神経細胞に早期の影響があることが示唆された。末梢においては、シュワン細胞の変化が見られたが、これは必ずしもPrimaryな変化と断定することはできない。というのは、神経線維の切断によって二次的にSchwann細胞が活性化されることが知られているからである。精巣においては、精祖細胞、精母細胞には影響が観察されな

かったが、精子放出障害が早期に現れた。精子放出にはセルトリ細胞が大きく関与していることが形態学的研究により明らかにされており、セルトリ細胞が一つの標的であることが明らかとなった。以上、灌流固定による形態学的方法、酵素抗体による蛋白同定定量は、早期影響を調べる上で有効であることが明らかとなった。

(内部曝露指標としての分子マーカーの検討) 尿中 N-Acetyl-S-propylcysteine が 1-ブロモプロパン曝露に対して量依存的に増加することが明らかとなった。血液グロビン蛋白付加物 S-propylcysteine は、InVivo における曝露濃度とすぐれた直線の関係を示し、蛋白付加物が 1-ブロモプロパン長期曝露指標として有効であることが示唆された。この蛋白付加物は、リスク評価において重要な意味をもつ。なぜならば、1-ブロモプロパンのような有機溶剤は、曝露濃度の変化が作業内容に伴って変化しやすく、短期の曝露評価では、曝露の総量が評価しにくく、そのために、労働者集団での量-反応関係の評価に今まで困難が伴っていたからである。赤血球の末梢血における寿命は 2-3 ヶ月に及ぶため、グロビン中付加物量を測定することにより、比較的長期の曝露の総量を評価することが可能になるからである。

以上の曝露指標が、1-ブロモプロパンのグルタチオンとの反応物、そして SH 基との反応物であるのに対し、1,2-Propanediol は、P450 系の代謝産物で

あると考えられる。現在、P450 による代謝活性化の可能性は毒性との関係では十分解明されていないが、今後の毒性メカニズムの研究によって、1,2-Propanediol が P450 系による代謝(活性化)を反映する優れたバイオマーカーとして活用されることが期待できる。

4-HNE(4-Hydroxynonenal)は、脂質由来の過酸化物質であり、この物質そのものが生体内高分子と反応し、毒性を発揮することが知られている。本研究では、この 4-HNE の測定法も同時に確立し、1-ブロモプロパンによる酸化ストレス毒性影響を推定する指標として開発をすすめた。1-ブロモプロパンによって酸化ストレスが発生することは、12 週曝露実験における GSSG の増加、Hsp27 の増加によって示されている。この指標は、曝露そのものというよりも、毒性発現にいたるプロセスに深く関わる可能性のあるバイオマーカーであり、中間マーカーとして、毒性を予測する役割をもつことが期待できる。

E. 結論 ラットを用いた実験の結果は、ヒト症例における中枢神経症状、感覚障害の原因が 1-ブロモプロパン曝露によるものであることを強く示唆する。内分泌系の攪乱は存在するが、そのメカニズムは今年度の研究では明らかにされなかった。雌生殖系においては卵胞の発達の障害を引き起こし、異性体 2-ブロモプロパンとは違ったメカニズムで毒性を発揮すること

が明らかとなった。また、卵巣ろ胞卵胞の減少が 200ppm で起こることが明らかとなり (LOEL: 最小毒作用量)、これは衛生基準設定のための科学的基礎となりうる。内部暴露指標である尿中 N-Acetyl-S-propylcysteine、血液グロビン中蛋白付加物 S-propylcysteine が、暴露を反映するすぐれた指標であることが InVivo で明らかにされ、特に後者は、長期暴露マーカーとして有効であることが明らかとなった。1-プロモプロパン曝露労働者の症状の解析では、中枢神経系の関与を疑わせる症状の他に粘膜刺激症状も顕著であった。

F. 健康危険情報

本研究によって卵巣ろ胞卵胞の減少が 200ppm で起こることが明らかとなった (LOEL: 最小毒作用量)。これは、過去の雄の実験と併せて動物実験から得た衛生基準設定の根拠となりうる情報である。これは、後述する米国症例における曝露濃度とも近い。

米国における症例では、1-プロモプロパンを接着剤の溶剤として用い、スプレー作業に従事していた3人の労働者に、下肢、腰部の無感覚が起きることが市原によって報告されている。

(Ichihara 2002) 換気改善後のデータであるが、そのうち1人の労働者の曝露濃度は 60-261ppm であった。また、中国の1-プロモプロパン製造工場労働者において、50ppm 前後の1-プロモプロパンに曝露された労働者に下肢振動覚の低下、下肢神経伝導速度の

低下が観察された。(Ichihara 2002) 長期曝露濃度と障害との関係はまだ十分に明らかにされたとはいえないが、スプレー作業および製造工場など、数百ppm以上の曝露が起きるような条件では、神経障害などが起きる危険性があり、注意が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada T, Ichihara G, Wang H, Yu X, Maeda K, Tsukamura H, Kamijima M, Nakajima T, Takeuchi Y. Exposure to 1-bromopropane caused ovarian dysfunction in rats. *Toxicol Sci* 2003; 71:96-103.

Wang H, Ichihara G, Ito H, Kato K, Kitoh J, Yamada T, Yu X, Tsuboi S, Moriyama, Y. Takeuchi Y. Dose-dependent biochemical changes in rat central nervous system after 12-week exposure to 1-bromopropane. *Neurotoxicology* 2003; 24: 199-206.

Wang H, Ichihara G, Ito H, Kato K, Kitoh J, Yamada T, Yu X, Tsuboi S, Moriyama Y, Sakatani R, Shibata E, Kamijima M, Itohara S, Takeuchi Y. Biochemical changes in the central nervous system of rats exposed to 1-bromopropane for seven days.

Toxicol Sci 2002; 67: 114-120.

Ichihara G, Miller JK, Ziolkowska A, Itohara S, Takeuchi Y. Neurological disorders in three workers exposed to 1-bromopropane. *J Occup Health* 2002; 44: 1-7.

Nakajima T, Ichihara G, Kamijima M, Itohara S, Aoyama T. Functional activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) by environmental chemicals in relation to their toxicities. *Nagoya J Med Sci* 2002; 65: 85-94.

Nakajima T, Yamanoshita, Kamijima M, Kishi R, Ichihara G. Generalized skin reactions in relation to trichloroethylene exposure: A review from the viewpoint of drug-metabolizing enzymes. *J Occup Health* 2002; 45: 8-14.

Takagi A, Yamada T, Hayashi K, Nakade Y, Kojima T, Takamatsu J, Shibata E, Ichihara G, Takeuchi Y, Murate T. Involvement of caspase 3 mediated apoptosis in hematopoietic cytotoxicity of metabolites of ethylene glycol monomethyl ether. *Ind Health* 2002; 40: 371-374.

市原 学、竹内康浩 有機溶剤中毒

総合臨牀 2002 ; 5 1 : 768-773.

市原 学、那須民江 毒性学入門 産業衛生学雑誌 2002 ; 44 : 70-71.

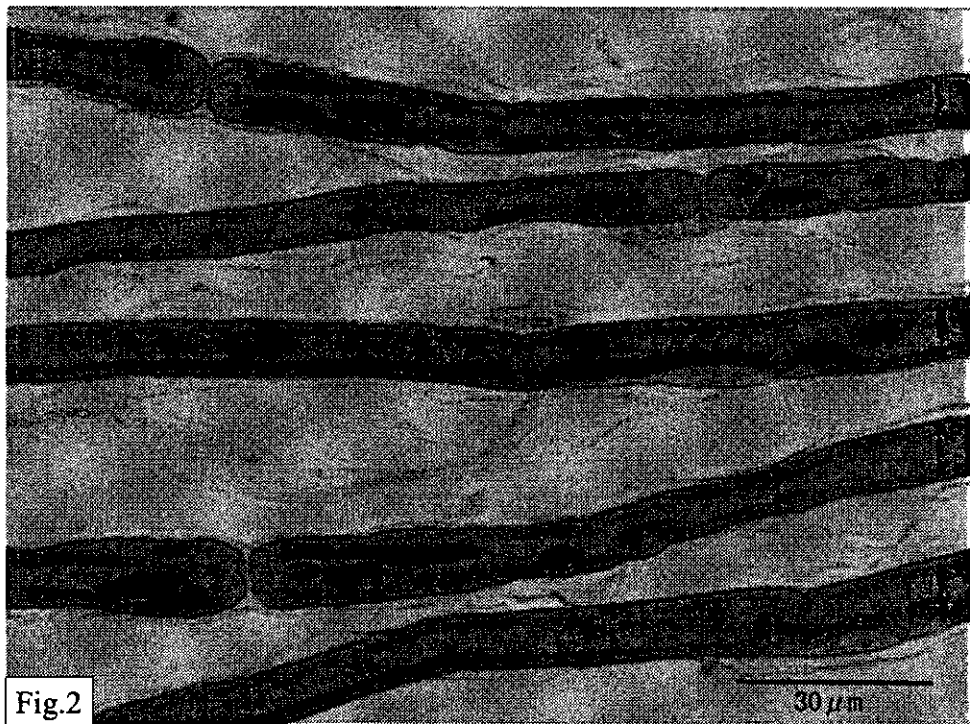
2. 学会発表

Ichihara G, Li Weihua, Shibata E, Ding X, Kamijima M, Wang H, Liang Y, Simeng P, Itohara S, Fan Q, Zhang Y, Zhong E, Wu X, Tsukahara T, Yamada T, Valentine WM, Takeuchi Y. Neurological abnormality in workers exposed to 1-bromopropane, an alternative to ozone-depleting solvents. The 8th International Symposium on Neurobehavioral and Effects in Occupational and Environmental Health, June 23-26, 2002, Brescia, Italy

Yamada T, Ichihara G, Wang H, Yu X, Maeda KI, Tsukamura H, Kamijima M, Nakajima T, Takeuchi Y. Exposure to 1-bromopropane disrupts development of ovarian follicles in adult rats The 42nd Annual Meeting of Society of Toxicology, March 9-13, 2003, Salt Lake City, USA

市原 学、Kalyani Amarnath, Venkataraman Amarnath, Holly

Valentine, William M. Valentine 1 溶剤中毒研究会 10月11-12日、下津
ーブロモプロパン曝露指標としての 井
尿中N-acetyl-S-propylcysteine. 有機



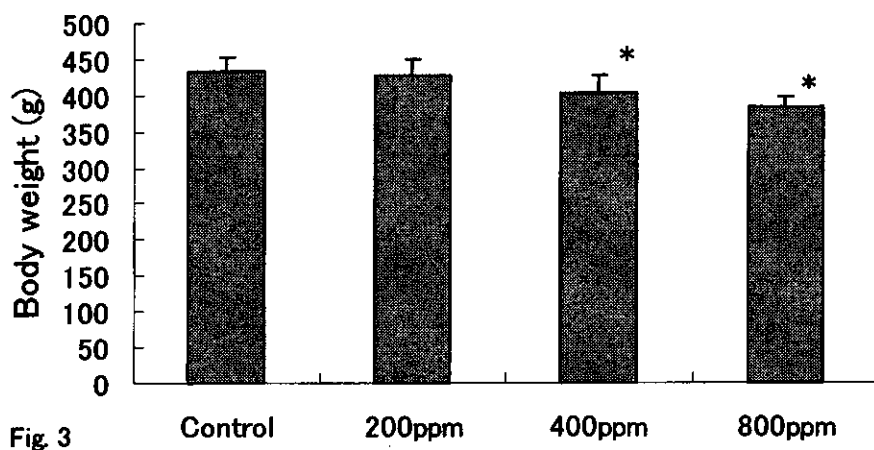


Fig. 3

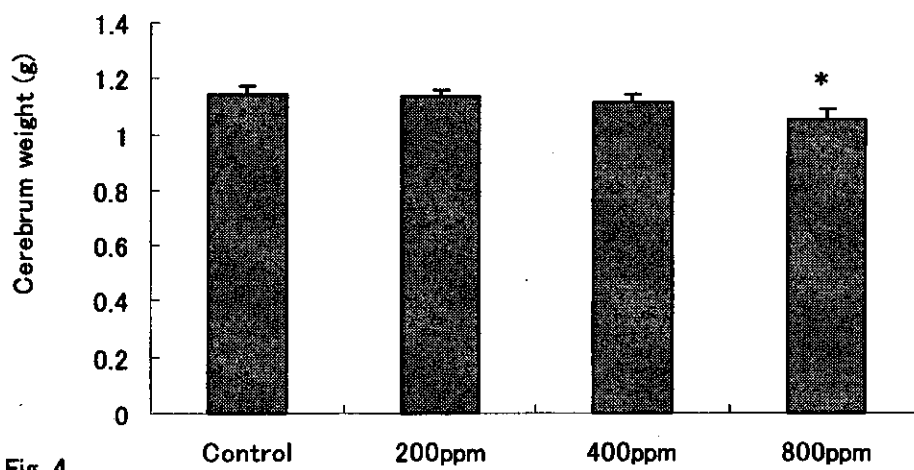


Fig. 4

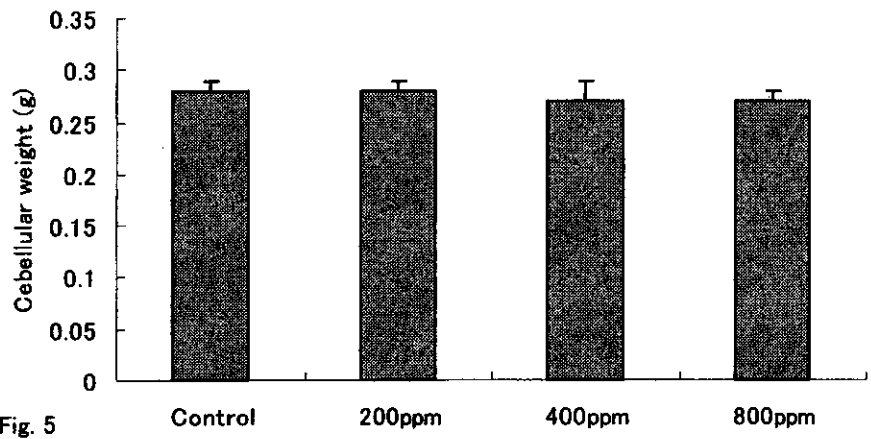


Fig. 5

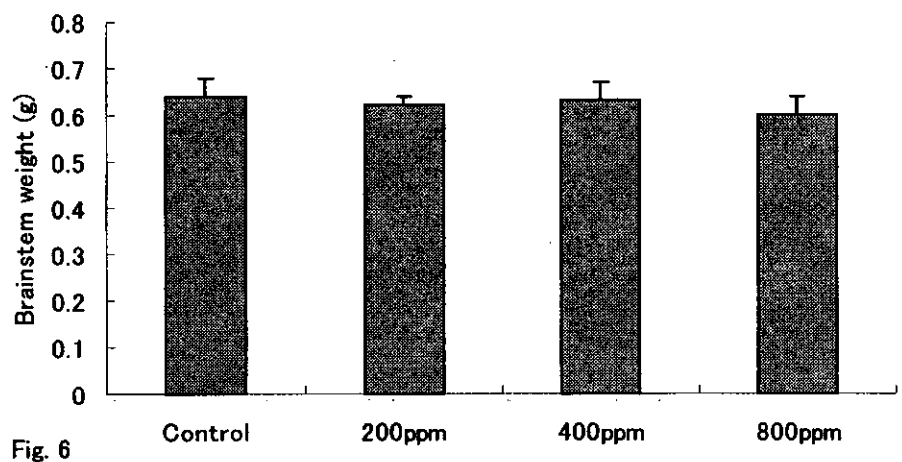


Fig. 6