平成 30 年度厚生労働行政推進調査事業費
食品の安全確保推進研究事業

食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究

平成 30 年度　　総括・分担研究報告書

研究代表者　古江 増隆

平成 31（2019）年 3 月

平成 30 年度　　総括・分担研究報告書

食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究

平成３０年度研究班構成員氏名

研究代表者

古江 増隆　（九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 教授）

研究分担者

赤羽　学　（奈良県立医科大学　公衆衛生学講座　准教授）

石井　祐次　（九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野　准教授）

上松　聖典　（長崎大学病院眼科　講師）

香月　進　（福岡県保健環境研究所　所長）

川崎　五郎　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科　准教授）

古賀　信幸　（中村学園大学栄養科学部　教授）

近藤　英明　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　助教）

申　敏哲　（熊本保健科学大学リハビリテーション学科　准教授）

園田　康平　（九州大学大学院医学研究院眼科学分野　教授）

竹中　基　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 准教授）

月森　清巳　（福岡市立こども病院　周産期センター長）

辻　学　（九州大学病院皮膚科　講師）

辻　博　（北九州若杉病院 西日本総合医学研究所　所長）

戸高　尊　（公益財団法人北九州生活科学センター　室長）

鳥巣　剛弘　（九州大学病院消化管内科　助教）

中西　洋一　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　教授）

二宮　利治　（九州大学大学院医学研究院 衛生・公衆衛生学分野　教授）

福士　純一　（九州大学大学院医学研究院人工関節・生体材料学講座　准教授）

三苫　千景　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　准教授）

室田　浩之　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 准教授）

山下　謙一郎　（九州大学大学院臨床神経生理学分野　助教）

（五十音順）

研究協力者

池田　光政　（公益財団法人北九州生活科学センター　理事長）
今村　知明　（奈良県立医科大学　公衆衛生学講座　教授）
上原口奈美　（公益財団法人北九州生活科学センター　検査員）
太田　千穂　（中村学園大学栄養科学部　講師）
貝沼茂三郎　（九州大学大学院医学研究院地域医療教育ユニット　准教授）
梶原　淳睦　（福岡県保健環境研究所　保健科学部長）
片宗　千春　（福岡県保健環境研究所　計測技術課　主任技師）
加藤　聖子　（九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学　教授）
神奈川芳行　（奈良県立医科大学　公衆衛生学講座　非常勤講師）
神尾　芳幸　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　助教）
北岡　隆　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 眼科・視覚科学分野　教授）
小木曽俊孝　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　主任技師）
酒谷　圭一　（福岡県保健環境研究所　計測技術課　主任技師）
佐藤　環　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　主任技師）
新谷　依子　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　主任技師）
鈴木　邦裕　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教）
高尾　佳子　（福岡県保健環境研究所　企画情報管理課　研究員）
高橋　浩司　（福岡県保健環境研究所　計測技術課　課長）
田中　嘉孝　（九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野　教授）
田中　義人　（福岡県保健環境研究所　企画情報管理課　課長）
千々和勝己　（公益財団法人北九州生活科学センター　常務理事）
塚谷　裕子　（福岡県保健環境研究所　計測技術課　専門研究員）
富村　沙織　（長崎大学病院皮膚科・アレルギー科　講師）
中西加奈子　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　主任技師）
新谷　俊二　（福岡県保健環境研究所　企画情報管理課　専門研究員）
濱田　直樹　（九州大学病院呼吸器科　助教）
平川　周作　（福岡県保健環境研究所　水質課　研究員）
平川　博仙　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　専門研究員）
広瀬　勇気　（公益財団法人北九州生活科学センター　検査員）
藤本　景子　（九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野　助教）
堀　就英　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　生活化学課長）
松本　伸哉　（奈良県立医科大学　公衆衛生学講座　博士研究員）
宮崎　昭行　（医療法人山内診療所　診療所長）
宮脇　崇　（福岡県保健環境研究所　水質課　研究員）
諸隈　誠一　（九州大学大学院医学研究院統合基礎看護学　教授）
安武　大輔　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　専門研究員）
柳原　豊史　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野）
吉田　大悟　（九州大学大学院医学研究院 衛生・公衆衛生学分野　助教）
吉冨　泉　（諫早総合病院歯科口腔外科）
吉村　惠　（医療法人社団温故会直方中村病院　病院長）
李　任時　（九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野　助教）

（五十音順）

目　　次

I. 平成 30 年度総括研究報告書

食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握と
その治療法の開発等に関する研究…… 1
研究代表者　古江 増隆

II. 平成 30 年度分担研究報告書

01. 油症検診データを用いた基礎的解析…… 12
研究分担者　香月　進
研究協力者　新谷　俊二，高尾　佳子，田中　義人，梶原　淳睦

02. 油症患者血液中の PCDF 類実態調査…… 21
研究分担者　香月　進
研究協力者　梶原　淳睦，堀　就英，平川　博仙，安武　大輔，
新谷　依子，小木曽　俊孝，中西　加奈子，佐藤　環，
高橋　浩司，酒谷　圭一，片宗　千春，田中　義人，
新谷　俊二，高尾　佳子，宮脇　崇，平川　周作

03. 血液中ダイオキシン類分析における分析カラムの検討…… 32
研究分担者　戸高　尊
研究協力者　広瀬　勇気，上原口　奈美，千々和　勝己，池田　光政

04. 食品を介したダイオキシン類等の人体眼部への影響に関する研究…… 37
研究分担者　園田　康平

05. 油症患者における眼圧…… 39
研究分担者　上松　聖典
研究協力者　北岡　隆

06. 油症患者における口腔細菌数に関する検討…… 42
研究分担者　川崎　五郎
研究協力者　吉冨　泉

07. 油症患者における運動機能評価…… 44
研究分担者　福士　純一

08. 油症患者における手掌紅斑の検証…… 51
研究分担者　三苫　千景
研究協力者　貝沼　茂三郎，宮崎　昭行

09. ダイオキシン類により高濃度暴露された油症患者における不眠：
全国横断調査結果報告…… 54
研究分担者　近藤　英明

10. 油症における末梢血リンパ球亜集団に関する検討…… 74
研究分担者　辻　博

11. 長崎県油症認定患者におけるセマフォリン 7A（Sema7A）の検討……79
研究分担者　室田　浩之
研究協力者　神尾　芳幸

12. 油症認定患者における soluble IL-13 の検討……82
研究分担者　室田　浩之，竹中　基
研究協力者　富村　沙織

13. カネミ油症患者における末梢神経障害に関する文献的研究……86
研究代表者　山下　謙一郎

14. 地域住民における血中ダイオキシン類濃度と疾病および
疾病マーカーの関係の検討……88
研究分担者　二宮 利治
研究協力者　吉田　大悟

15. 油症患者における患者ごとの 2,3,4,7,8-PeCDF 半減期の変化に関する研究……95
研究分担者　赤羽　学
研究協力者　松本　伸哉，今村　知明，神奈川芳行

16. 油症曝露による継世代健康影響に関する研究
- 油症 2 世における皮膚・粘膜症状とダイオキシン類曝露状況との関連-……100
研究分担者　月森　清巳
研究協力者　加藤　聖子，諸隈　誠一

17. ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルにおける
肺サーファクタント蛋白に関する検討……106
研究分担者　中西　洋一
研究協力者　鈴木　邦裕，濱田　直樹，柳原　豊史

18. ベンゾピレン投与ラットに対する感覚評価を用いたケイヒの効果検討……111
研究分担者　申　敏哲
研究協力者　吉村　惠

19. ダイオキシン類で亢進する細胞接着とオートファジーに関する研究……115
研究分担者　鳥巣　剛弘

20. オートファジーによる酸化ストレスの調節機構に関する研究……118
研究分担者　辻　学

21. 2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体の動物肝ミクロゾームによる代謝…121
研究分担者　古賀　信幸
研究協力者　太田　千穂

22. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析：
芳香族炭化水素受容体欠損ラットでの検討……128
研究分担者　石井　祐次

23. ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質 1 (SelenBP1)の腎臓における役割:
SelenBP1 欠損マウスでの検討 …… 137
研究分担者　石井　祐次
研究協力者　李　任時, 田中　嘉孝, 藤本　景子

III.　研究成果の刊行に関する一覧表 …… 153

総括研究報告書

食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握と その治療法の開発等に関する研究

研究代表者　古江増隆　九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野　教授

研究要旨

【背景】油症はPCBやダイオキシン類の経口摂取による混合中毒で、少なくとも2000人ほどの住民が被害にあった。ダイオキシン類の生体への慢性影響については十分に解明されていない。油症研究班（以下、油症班）は発生当時より約50年にわたり検診を行い、直接曝露した患者、継世代への影響を追跡している。

【研究目的】PCB類・ダイオキシン類の生体への影響、生体内動態を把握し、ダイオキシン類の毒性を緩和する治療法・対処法を見出すことである。

【研究成果】

油症患者の支援と治療研究の推進

検診データベースに新たな情報を加え更新した。油症相談員、相談支援員制度は充実し、検診やアンケート調査、訪問検診などの補助業務に加え、死因調査の基盤が完成した。高齢化する患者の要望に応え、九州大学、長崎大学、五島中央病院の油症外来は油症ダイオキシン研究診療センター（油症センター）と連携し、順調に運用された。知識の共有、患者の生活の質の向上のため、運動、栄養、漢方セミナーを実施して好評を得た。患者におけるPCB異性体の特徴的な代謝蓄積に関与しているCYP分子種を推定し、患者血液中PCBの鏡像異性体（キラル体）分離定量法を検討した。血液中PCB・ダイオキシン類の測定精度を保つため、今年度は大量注入装置内の分析カラムの精度・感度について検証して、高度であることが分かった。

臨床的追跡調査・疫学研究

①平成29年度油症検診受検者は50歳以上が全体の89.7%を占めた。自覚症状では全身倦怠感が70.8%で最も多く、他覚所見では、肝・胆・脾エコーの有所見率が72.4%と最も高かった。また、血液中2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は患者で67 pg/g lipid、未認定者で14 pg/g lipid、総ダイオキシン類の平均濃度は認定患者で45 pg TEQ/g lipid、未認定者で25 pg TEQ/g lipidだった。②平成27年度に実施した一般住民を対象にした検診結果のうち、今年度はダイオキシン類曝露や酸化ストレスで上昇する糖化反応最終産物（AGEs）と2,3,4,7,8-PeCDF濃度との関連を検証した。年齢・性で補正するとAGEs量とダイオキシン類濃度との間に関連はなかった。③これまで患者全体のダイオキシン類の半減期を検証してきた。今年度は個々の患者について解析した結果、2001～2016年前半、後半とも半減期が延びていることが明らかになった。④患者の眼病変においては、福岡県検診では油症特有の眼症状のうち眼脂過多が多いこと、長崎県検診では平均眼圧は健常人と有意差がないことが分かった。⑤口腔細菌数と病変の関連については、患者に口腔粘膜色素沈着が多くみられたが、認定の有無と口腔乾燥、口腔細菌数、および口腔粘膜色素沈着と口腔乾燥および口腔細菌数との間には有意差はなかった。⑥末梢神経障害と油症との関連について、これまでの国内外の文献的検索を行った。⑦患者の骨・関節病変を評価すべ

く、今年度は運動機能を評価した。その結果、男性では total 06TEQ がファンクショナルリーチと握力と負の相関があることが分かった。⑧平成 30 年度福岡県検診で手掌紅斑の有症率を検証したところ、85.3％の患者に部分的、手掌全体に及ぶ紅斑がみられた。⑨患者の睡眠障害を検証した結果、不眠有症率は高く、様々なダイオキシン類 TEQ との相関がみられた。⑩サイトカイン産生と T 細胞の制御に関わり、アレルギー性疾患に寄与するとされるセマフォリン 7A(Sema7A)について解析したところ、患者と健常人とに有意差を認めなかったが、PCB のみ Sema7A と有意な相関がみられた。⑪Th2 サイトカインである IL-13 濃度は健常人と有意差がなかった。⑫患者において末梢血液中 T 細胞の低下が認められ，PCB の慢性影響が示唆された。⑬継世代への影響については、今年度は 2 世の皮膚・粘膜症状と母体のダイオキシン類濃度を検証した結果、ダイオキシン類の母児移行は少ないが、皮膚・粘膜の色素沈着に関与している可能性が示唆された。

基礎的研究

①ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を感覚刺激による定量的閾値評価と酸化ストレス・抗酸化力の測定方法を用いて検討した結果、ケイヒ等がベンゾピレンにより生じる感覚異常の症状改善に寄与する可能性が示唆された。②肺サーファクタント蛋白 SP-D は、ベンゾピレンが培養 Club 細胞に対して誘導するアポトーシスに対して保護作用があることが分かった。③ダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体（AHR）のリガンドとして働き細胞接着に影響がある。オートファジー不全状態であると細胞接着班の分解が抑制され細胞接着が亢進することを示した。④AHR を刺激するリガンドでヒト表皮細胞を刺激したところ、オートファジーが誘導された。⑤PCB 異性体の生体内での代謝を検証している。今年度は PCB155 の代謝を動物肝ミクロゾームを用いて検討した結果、PCB155 は代謝されやすく、代謝産物 M1 生成にフェノバルビツール誘導性 CYP2B 酵素が関与していることが分かった。⑥Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin（TCDD）母体曝露による出生時の性未成熟の機構を解明している。*Ahr* 遺伝子欠損ラットでは精子数の減少がみられ、AHR そのものが思春期における精巣の発達に影響している可能性が示唆され、解析を続けている。⑦ダイオキシン類曝露によって誘導される SeleBP1 の脂質代謝への関与が示唆された。

A．研究目的

PCB とダイオキシンおよびダイオキシン類似化合物（以下、ダイオキシン類）の混合中毒である油症が発生して 50 年が経過した。ダイオキシン類は人類への影響が懸念される、環境汚染物資でもある。患者生体内に長期間残存するダイオキシン類がどのような影響を及ぼしているかについては明らかでない。油症研究の目的は、ダイオキシン類が生体に及ぼす慢性影響を把握し、患者に残存する症状を緩和する方法を開発することにある。

（倫理面に対する配慮）

研究によって知りえた事実については患者のプライバシーに十分配慮しながら、公表可能なものは極力公表する。

B．研究方法

<u>I. 班長が担当する研究</u>

１．班長は、九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター（以下、油症センター）センター長を兼任する。

２．班の総括と研究班会議開催

３．油症検診の実施（各自治体に委託）と検診結果の全国集計

４．油症相談員・相談支援員制度

健康の問題を含め、様々な不安を抱く患者の相談を行う。また、患者に対して既往歴、症状、生活習慣の聞き取りまたは文書による調査を行う。
５．死因・次世代調査
ダイオキシンの生体への影響、継世代への影響を検証する。
６．台湾油症との情報交換
これまでの研究を通じて得た知識を相補的に交換し、互いの患者の健康増進につとめる。また、これからの研究の方向性を議論し、よりよい研究を目指す。
７．検診体制の見直し
患者の症状の変遷と高齢化にあわせて検診科目、検診項目を見直す。
８．臨床試験の実施
油症患者の様々な症状を軽減するために漢方方剤の臨床試験を施行する。
９．油症対策委員会の開催
患者代表者からなる油症対策委員会を開催し、研究成果の公表および次年度の実態調査票の改正点の検討、医療者向けのパンフレット案の検討を行う。
１０．情報の提供
本研究を通じて得られた知識で、情報公開可能なものについては極力情報公開につとめる。パンフレット、ホームページ、油症ニュース、あるいは書面で公表し、油症対策委員会で患者代表者に説明を行う。

Ⅱ．九州大学油症治療研究班と長崎油症研究班が行う調査、治療および研究
１．検診を実施し、油症患者の皮膚科、眼科、内科、歯科症状について詳細な診察を行い、年次的な推移を検討する。血液検査、尿検査、骨密度検査、神経学的検査を行う。検査結果は他覚的統計手法などを用いて統計学的に解析し、経年変化の傾向について調査する。
２．油症患者体内に残存するPCB、PCQやダイオキシン類の生体内動態を把握するために、血中濃度分析を行う。患者の症状、検査結果にいかに寄与しているかについても分析、検討する。
３．九州大学大学院医学研究院附属総合コホートセンターが一般住民対象に行う環境調査に協力し、一般対照群と患者の疾患、症状、血液中ダイオキシン類濃度を比較し、ダイオキシン類の慢性影響を明確にする。
４．油症の継世代に及ぼす影響に関する検討を行う。
５．PCBやダイオキシン類の体内動態を明らかにする。
６．基礎的研究を行い、PCBやダイオキシン類の慢性毒性の機序の解明およびダイオキシン類の毒性を緩和しうる薬剤の探索を行う。

Ｃ．結果および考察

Ⅰ. 油症患者の支援と治療研究の推進

１．油症相談員・相談支援員制度
高齢化や社会的偏見により検診を受診していない患者の健康状態や近況を把握し、様々な相談を受けるために、2002年に患者の集中する福岡県、長崎県、広島県で油症相談員事業を開始した。さらに、これ以外の自治体に居住する患者の要望に応えるべく、2016年に相談支援員制度を施行した。定期的に研修会を開催し、情報共有に努めている。今年度は相談支援員により死因調査の基盤が完成した。

２．情報の提示
パンフレットの更新作成、ホームページ、あるいは直接書面にて研究内容を患者に伝達した。さらに患者への情報提供のために、油症新聞を定期的に発行した。また、これまでの研究内容をひろく知らしめることを目的として、
油症の検診と治療の手引きは、
http://www.kyudai-derm.org/yusho/index.html に、
油症の現況と治療の手引きは、
http://www.kyudai-derm.org/member/index.html に、
カネミ油症の手引きは、
http://www.kyudai-

derm.org/kanemi/index.html に、
油症研究 - 30 年の歩み - は、
http://www.kyudai-derm.org/yusho_kenkyu/index.html に
油症研究 II 治療と研究の最前線は、
http://www.kyudai-derm.org/yusho_kenkyu/index02.html に、
1 年おきに福岡医学雑誌の特集号として発行している油症研究報告集は
http://www.kyudai-derm.org/fukuoka_acta_medica/index.html に
厚生労働省科学研究費補助金による研究結果は
http://www.kyudai-derm.org/kakenhoukoku/index.html にそれぞれ掲載している。

３．患者の実態把握と情報発信に関する研究
今年度の油症研究班の成果を患者団体に公表し、意見、要望を伺った。また、意見を基に次年度の健康実態調査票の改善を行った。

４．油症対策委員会の開催
患者代表者からなる油症対策委員会を開催し、研究成果の公表および次年度の実態調査票の改正点の検討を行った。加えて、医療者向けのパンフレットを油症対策委員会で検討し作成した。

５．*in silico* 解析による PCB と CYP のドッキングシミュレーション
患者におけるチトクローム P450（CYP）依存的な PCB 異性体の代謝能を調査した。ダイオキシン類や PCB に誘導される CYP 分子種は、多くの低塩素化 PCB 異性体に対して、塩素未置換炭素原子がヘム鉄から 6Å 以内に配置される基質結合ポケットを有することが示された。患者における PCB 異性体の特徴的な代謝蓄積に関与している CYP 分子種を推定した。さらに、患者血液中 PCB の鏡像異性体（キラル体）分離定量法を検討した。

６．血液中ダイオキシン類分析における分析カラムの検討
患者の血液中ダイオキシン類濃度の測定は、大量注入装置を装備したガスクロマトグラフ高分解能質量分析装置を用いて行っている。大量注入装置内の分析カラムに関しては、他のカラムを検討することもなく、現在まで同じカラムを用いて分析を行ってきた。今年度は、現在使用しているカラムと固定相の極性が類似したカラムを選択して、ダイオキシン類異性体の S/N 比の改善に関して検討を行った。その結果、従来使用していたカラムと比較して、低ブリードであること；各異性体のピーク強度が向上していること；すべての異性体で高い S/N 比が得られていることから、従来よりも高精度・高感度な分析を行うことが可能となった。

II. 臨床的追跡調査・疫学研究

１． 油症検診の追跡調査

１）油症検診データを用いた基礎的解析
平成 29 年度に実施された油症検診受診者の傾向把握のため、検診票を収集し集計を行った。検診受診者は 639 名で 50 歳以上が全体の 89.7%であった。自覚症状で最も訴えが多かったのは全身倦怠感で 70.8%であった。他覚所見では、肝・胆・脾エコーの有所見率が 72.4%と最も高かった。

２）油症患者血液中の PCDF 類実態調査
平成 29 年度に血液中ダイオキシン類濃度を測定した油症認定患者 148 名と未認定者 135 名についてデータ解析を行った。2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は認定患者で 67 pg/g lipid、未認定者で 14 pg/g lipid であった。総ダイオキシン類（Total TEQ）の平均濃度は認定患者で 45 pg TEQ/g lipid、未認定者で 25 pg TEQ/g lipid であった。平成 13～29 年の 17 年間に血液中ダイオキシン類検査を実

施した油症認定患者数は累計で1,043名となり、これは油症認定患者全体（総数2,327名、平成29年度時点）の約45%にあたる。血中ダイオキシン類の測定歴がある認定患者の2,3,4,7,8-PeCDF濃度の平均値は100 pg/g lipidであり、濃度分布は2.6～1,800 pg/g lipidと広範囲であるが、約60%の患者は50 pg/g lipid未満であった。平成25～29年に同居家族認定者149名が検診を受診したが、同居家族認定者の血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度の平均値は27 pg/g lipidで一般人に近い値であった。

２．油症患者における眼科的所見

１）福岡県検診における眼科的所見

平成30年度福岡県油症検診を受診した、212名（患者186名・未認定者26名）の眼科所見を検討した。自覚症状では眼脂過多を訴えるものが多かったが、その程度は軽く、油症の影響とは考えにくかった。他覚所見として慢性期の油症患者において診断的価値が高い眼症状である眼瞼結膜色素沈着と瞼板腺チーズ様分泌物を認めるものも少数みられた。患者の眼科領域における臨床所見は徐々に軽くなっていた。

２）長崎県検診を受診した患者における眼圧

長崎県油症検診の3地区において平成30年度油症検診の眼科部門を受診し、眼圧の測定が可能であった患者89名を対象にした。患者の平均眼圧は正常範囲内であり、血中PCB濃度やCB比との関連は認められなかった。

３．油症患者における口腔細菌数に関する検討

平成30年度の長崎県油症検診において、口腔粘膜色素沈着、口腔内細菌数、口腔乾燥症、義歯装着状態について検討を行った。今回の結果では、口腔粘膜色素沈着は認定者において有意に多くその発現が認められた。義歯装着患者の歯槽部・歯肉部においては有歯部においては色素沈着がみられたが、無歯部においては見られなかった。今回調査した症例においては認定の有無と口腔乾燥、口腔細菌数との間には相関性がみられず、口腔粘膜色素沈着と口腔乾燥および口腔細菌数との間にも有意差はみられなかった。今後さらに症例数を増やして検討する必要があると思われた。

４．油症患者における運動機能評価

今年度も、平成28年度福岡県検診における運動機能の評価（ロコチェック質問票を用いた問診、ファンクショナルリーチテスト、４m歩行に要する時間、手指筋力および足趾把持力）の結果を解析した。男性においては、total 06 TEQがファンクショナルリーチおよび握力と負に関連した。女性においては、ダイオキシン類濃度と運動機能との間に明らかな関連を認めなかった。

５．油症患者における手掌紅斑の検証

手掌紅斑は末梢血管拡張を反映し、慢性肝疾患などの全身疾患患者にみられる皮膚所見である。近年の油症検診において、多くの油症患者に手掌紅斑がみられることに気付いた。そこで、平成30年度福岡県油症検診を受けた163名[認定者143名(男性68名、女性75名)、未認定者19名（男性4名、女性15名）]を対象に、手掌紅斑の有症率を調べた。その結果、手掌紅斑は認定患者の86.0%に部分的、もしくは手掌全体にみられた。中でも、男性の有症率が高かった。

６．ダイオキシン類により高濃度曝露された油症患者における不眠：全国横断調査結果報告

ダイオキシン類による健康被害である患者140名を対象としたパイロット研究では、不眠は高率に認められ、ダイオキシン類の血中濃度が高いことは睡眠の質の低下に影響を及ぼしていた。本研究は患者全体を対象として不眠とダイオキシン類の毒性との関連性を検証した。対象は

日本在住の認定患者で、これまでダイオキシン血中濃度測定が行われた899名（男性46.3%、年齢の中央値（IQR）：66（58-78）歳）を解析対象とした。不眠に関する症状とダイオキシン類21異性体の血中濃度から算出した毒性等量（toxic equivalent quantity：TEQ）の総和との関連性を検討した。その結果、入眠困難もしくは睡眠維持困難を有する者（difficulty initiating and/or maintaining sleep：DIMS）は753名（53.4%）であった。レストレスレッグス症候群/Willis-Ekbom病が疑われる者（RLS/WED群）とRLS/WEDとは判定されないものの下肢を動かしたい衝動感を訴える者（LMR群）はそれぞれ76名（9.1%）と299名（36.0%）であった。総TEQを四分位で4群にカテゴリー化（Q1-Q4：＜ 20（reference)、20－35、35－62、≧ 62 pg-TEQ/g lipid）すると、DIMS群に対するQ2-4の調整済みオッズ比（95%CI）は、それぞれ1.89（1.23－2.89)、1.62（1.02－2.57)、及び2.09（1.24－3.53)で、RLS/WED群とLMR群の調整済みオッズ比は、それぞれ1.74（1.04-2.91）、2.35（1.71-3.24)であった。患者における不眠の有症状率は高率であり、総TEQが最も高いダイオキシン類の毒性が高度な群だけでなく、一般住民でも確認される総TEQレベルにおいても不眠と関連していた。生体に取り込まれるダイオキシン類が睡眠・覚醒障害に与える影響について、今後も基礎・臨床の両面での研究が必要と考えられる。

７．油症における末梢血リンパ球亜集団に関する検討

平成30年度福岡県油症一斉検診受診者216名について末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中PCB濃度との関連について検討した。血中PCB濃度とT細胞を示すCD3陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に負の相関を認めた。油症患者では対照者に比較しCD3陽性細胞の比率および絶対数の低下を認めたが、B細胞を示すCD20陽性細胞の比率および絶対数は油症患者と対照者の間に差をみなかった。油症患者においてT細胞の低下が認められ、T細胞の低下にPCBの慢性的影響が示唆された。

８．患者の免疫機能の評価

１）長崎県油症認定患者におけるセマフォリン7A（Sema7A）の検討

平成29年度は患者における血清セマフォリン3A(Sema3A)の変化を検討した。その結果、認定患者ではSema3Aが高値であることが判明した。Sema3Aは神経系への影響のみならず、免疫調節機構への関与も報告されており、患者へ何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。平成30年度はサイトカイン産生とT細胞の制御に関わり、アレルギー性疾患に寄与するとされるセマフォリン7A(Sema7A)について解析し認定患者（N=31）と健常人(N=31)で比較、検討した。その結果、患者と健常人とに統計上の有意差を認めなかった（p=0.833)。Sema7AとPCB、PCQ、PCDFを比較したところ、PCBのみSema7Aと有意な相関を認めた。

２）油症認定患者における soluble IL-13の検討

以前の検討にて、患者において、血清IL-33値やIL-35値が優位に高値であることを確認した。これらのサイトカインはTreg細胞を活性化、あるいは維持するサイトカインであり、認定患者ではT細胞系の免疫が活性化している可能性がある。今回、主にTh2細胞から分泌される血清IL-13について、健常人との比較を行った。その結果、血清中IL-13値は油症患者419.3±338.7(pg/ml, mean±SD)、健常人366.6±66.07(pg/ml, mean±SD)であり、2群間に有意な差を認めなかった（p=0.3864)。

９．カネミ油症患者における末梢神経障害に関する文献的研究

患者に生じる末梢神経障害の報告は近年

減少している。PCB、PCDF、ダイオキシンによる中毒症状の発生減少とともに末梢神経障害が評価されていない可能性も考え、2009 年以降の文献を考察した。その結果、PCB、PCDF、ダイオキシンによる neuropathy の報告は 2009 年以降日本からのものはなく、世界的にも減少傾向であった。

１０．地域住民における血中ダイオキシン類濃度と疾病および疾病マーカーの関係の検討

血中ダイオキシン類濃度と糖化反応最終生成物（AGEs）の関連についての研究

平成 30 年度は、平成 27 年度に地域一般住民を対象に実施した断面調査の成績を用いて、血中ダイオキシン類濃度と酸化ストレスや高血糖、不健康な生活習慣により上昇すると考えられている糖化反応最終生成物(Advanced Glycation Endproducts: AGEs)との関連について検討した。AGEs 蓄積量は AGE Reader を用いて AGEs 皮膚蛍光（Advanced Glycation Endproducts Auto Fluorescence：AGEs-AF）値を測定し評価した。血中ダイオキシン類濃度を測定した地域住民 495 人のうち 489 人が AF を測定し、その集団における AF の平均値は 2.20（標準偏差 0.46）であった。血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の上昇に伴い、AGEs-AF の粗平均値は有意に上昇した（傾向性 P 値 <0.0001）。しかし性別、年齢、BMI、収縮期血圧、中性脂肪、HbA1c、eGFR、喫煙習慣、飲酒習慣、運動習慣を調整した検討では、その有意な関連は消失した（傾向性 P 値=0.07）。地域一般住民における血中ダイオキシン類濃度と糖化反応最終生成物（AGEs）の蓄積との間に明らかな関連は認められなかった。

１１．油症患者における患者ごとの 2,3,4,7,8-PeCDF 半減期の変化に関する研究

これまでにダイオキシン類の排出速度が変化し、排出が遅くなってきていることを報告してきたが、患者全体として排出が遅くなってきていることしか示すことができていなかった。今年度は、個々の患者における半減期の変化を検証した。2001～2016 年を前後半に分割し、前半と後半で示した半減期を比較した。個々の患者から得られた半減期は、体重の変動の影響や、摂取の影響により誤差を含む。このため、分布のばらつきがみられたが、全体的には、半減期が延びている傾向がみられた。

１２．油症曝露による継世代健康影響に関する研究

油症 2 世における皮膚・粘膜症状とダイオキシン類曝露状況との関連

油症発生後に油症患者より出生した児（油症 2 世）の皮膚・粘膜症状とダイオキシン類曝露状況との関連について検討した。対象は油症 2 世 170 名で、油症検診票データをもとに皮膚・粘膜症状の有症割合について検討した。ついで、皮膚・粘膜症状と油症 2 世およびその母親の血中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran（PeCDF）濃度との関連について解析した。油症 2 世の皮膚・粘膜症状としては、口腔内色素沈着の有所見率（58.3%）が最も高かった。油症 2 世およびその母親の血中 PeCDF 濃度の平均値は、各々9.6、103.5 pg/g lipid であった。皮膚・粘膜症状と血中 PeCDF 濃度との関連を検討すると、油症 2 世の血中 PeCDF 濃度は、症状がある群と症状がない群との間には有意な差はなかった。一方、かつての皮膚色素沈着、口腔内の色素沈着を認める油症 2 世では、母親の血中 PeCDF 濃度は症状がない群と比較して有意に高かった。以上、油症 2 世では、母親からのダイオキシン類の移行は少ないが、胎児期における高濃度のダイオキシン類曝露が皮膚・粘膜の色素沈着に影響を及ぼすことが示唆された。

III. 基礎的研究

１．ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルにおける肺サーファクタント蛋白に関する検討

マウスの肺に経気管的に芳香族炭化水素受容体（AHR）作動性物質であるBenzo[a]pyren(BaP)を投与し、気道分泌物の増加を示すモデルを作成している。Club 細胞は、肺サーファクタント蛋白などの肺の恒常性を維持する因子を産生している。今年度は、BaP による Club 細胞傷害における肺サーファクタント蛋白(SP-D)に役割に着目して *in vitro* での研究を行った。ヒト Club 細胞株 NCI-H441 細胞に BaP を投与すると apoptosis が誘導され、ヒトリコンビナント SP-D の投与により抑制された。油症肺傷害において SP-D が保護的役割を担っていることが考察された。

２．ベンゾピレン投与ラットに対する感覚評価を用いたケイヒの効果検討

ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を 3 種類の感覚刺激による定量的閾値評価と酸化ストレス・抗酸化力の測定方法を用いて検討した。その結果、5Hz、250Hz の電気刺激周波数において、各群有意な閾値の変化はみられなかった。2000Hz の電気刺激周波数ではベンゾピレン投与群で感覚閾値上昇がみられたが、その閾値上昇はケイヒの投与により抑制傾向にあった。また、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で抗酸化力の上昇傾向がみられた。本研究の結果から、ケイヒ等がダイオキシン類化合物による複合中毒でみられる感覚異常の症状改善に寄与する可能性が示唆された。

３．ダイオキシン類で亢進する細胞接着とオートファジーに関する研究

ダイオキシン類が生体に様々な影響を及ぼすことが知られているが、どのようなメカニズムで生体に影響するかはまだ不明な点が多い。ダイオキシン類は Ah 受容体のリガンドとして働き細胞接着に影響がある。Ah 受容体から Src や FAK の活性化を引き起こすことがメカニズムとして知られている。今回我々はオートファジーが細胞接着班を取り込み Src や FAK の分解に働くことを示した。その結果オートファジー不全状態であると細胞接着班の分解が抑制され細胞接着が亢進することを示した。今後類似する両者の関連を明らかにしたい。

４．オートファジーによる酸化ストレスの調節機構に関する研究

これまでの研究で、ダイオキシン類の受容体である芳香族炭化水素受容体(Aryl Hydrocarbon Receptor: 以下、AHR)が酸化ストレスを調節する因子であることを報告してきた。今回、酸化ストレスを調節機構として重要とされるオートファジーの活性化について AHR が関与するかを検討した。AHR を刺激するリガンドでヒト表皮細胞を刺激したところ、オートファジーが誘導されることが明らかとなった。現在は、AHR を介して誘導されたオートファジーが酸化ストレスをどのように調節するかを検討している。

５．2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有するPCB異性体の動物肝ミクロゾームによる代謝

今年度は、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体の 1 つである 2,2’,4,4’,6,6’-hexachlorobiphenyl (PCB155)につき、ラットおよびモルモット肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べた。まず、ラット肝では phenobarbital (PB)および dexamethazone 前処理でのみ、代謝物 M1 が生成され、代謝活性はそれぞれ 1.256 および 0.105 nmol/hr/mg protein であった。モルモット肝では、M1 は PB 前処理でのみ検出され、その活性は 0.030 nmol/hr/mg protein と低かった。次に、GC-MS の結果、M1 はそのメチル化体が分子量 388 [M^+]であることから、一水酸化体であると推定された。なお、水酸化の位置は、構造的に *meta* 位(3 位)しかないこと、およびフラグメントイ

オン 345　[M^+-43]が比較的多かったことから、3 位と考えられた。以上の結果から、①PCB155 は、PCB182 や PCB188 と同様に、代謝され易いこと、②M1 の生成活性は、モルモットに比べ、ラットで著しく高いこと、③M1 の生成には PB 誘導性の CYP2B 酵素が関与していることが明らかとなった。

６．2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析：芳香族炭化水素受容体欠損ラットでの検討

妊娠ラットへの 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) の低用量曝露は、出生児に性未成熟を惹起する。これまでの研究により、これが出生前後の性ホルモン合成抑制に起因することを突き止めてきた。さらに、芳香族炭化水素受容体 (AHR)欠損ラットを用いた解析から、上位制御因子の黄体形成ホルモン (LH)の調節に AHR が関与する事実も突き止めつつある。今年度の研究では、発達過程における精巣と性ホルモン合成への AHR の関与を、AHR 欠損ラットを用いて明らかにすることを目的とした。まず、AHR 欠損により脳の性分化の時期である周産期の脳下垂体における LHβの mRNA 発現が低下、精巣の性ステロイド合成系タンパク質である、steroidogenic acute regulatory protein (StAR)ならびに cytochrome P450 17 (CYP17)が減少傾向を示すことを確認した。このことから、AHR は周産期に脳下垂体-精巣系を制御し、性ステロイド合成に関与することで、脳の性分化に重要な働きを果たす可能性が示唆された。次いで、AHR の生殖腺への影響を検証すべく、成長後の精子形成や生殖器官の成熟に重要なテストステロンの血中濃度への AHR 欠損の影響を調べた。その結果、出生 2 日目 (PND2)の雄では、AHR 欠損により著しく血中テストステロン濃度が低いものの、4 週齢では、野生型と同レベルになっていた。一方、思春期に当たる 6 週齢では、AHR 欠損雄ラットで、テストステロン濃度が野生型ラットに比べ著しく低かった。これに合致して、精巣での CYP17 タンパク質発現レベルが有意に低下していた。そこで、テストステロンの合成、分泌を担うライディッヒ細胞に着目し、AHR 欠損により、形態学的な変化が現れるか否かを 8 週齢を用いて検討したが、ライディッヒ細胞に明らかな形態学的変化は見られなかった。一方、第 8 週、11 週、20 週において、AHR 欠損では精巣中の精子数が著しく少なかった。以上の結果から、1) AHR は周産期に脳下垂体-精巣系を制御し、性ステロイド合成に関与することで、脳の性分化に重要な働きを果たすこと、ならびに 2) 思春期特異的なテストステロンの減少とこれに伴う精子数の減少から、AHR には思春期における重要な働きがあることが強く示唆された。

７．ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質 1 (SelenBP1)の腎臓における役割：SelenBP1 欠損マウスでの検討

これまでに、ダイオキシンが肝臓のセレン結合性タンパク質 1 (SelenBP1)を誘導することを明らかにしてきた。また、SelenBP1 の遺伝子欠損マウスを作成して、ダイオキシン毒性発現、あるいは毒性軽減への寄与について検討を行って来たが、SelenBP1 と相同性の高いもう一つの分子種 SelenBP2 が発現しているため、その誘導の意義について理解することが難しかった。SelenBP2 の発現は腎臓において低いことが報告されているため、ダイオキシン誘導性 SelenBP1 の腎臓における役割を明らかにすることを目的として、ダイオキシン非投与条件下で、野生型の C57BL マウスと SelenBP1 欠損マウスの腎臓を用いたメタボロミクス解析を行った。その結果、脂質代謝関連因子の変動が確認され、SelenBP1 の脂質代謝への寄与が推定された。次に、DNA マイクロアレイ解析を行った。多数の遺伝子に発現変動が認められたが、その中で、変動

が示唆された脂質代謝関連因子に着目し、更に、リアルタイム RT-PCR にて発現変動を解析した。SelenBP1-KO マウスの腎臓では、脂肪酸のωおよびω-1 水酸化に関与することが知られている cytochrome P450 4a (Cyp4a)サブファミリーのうち、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現が有意に低下した。ペルオキシゾームでの分岐脂肪酸の不飽和化を触媒する acyl-CoA oxidase3 (Acox3)の発現も有意に低下した。マイクロアレイでは変動が示唆されていたものの、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor-α (Ppara)および Ppar-γ coactivator-1β (Ppargc-1b)の発現レベルには影響がなかった。しかし、Ppara とヘテロオリゴマーを形成して遺伝子発現を促進させる retinoid-X-receptor-α (Rxra)の発現は低下していた。また、carnitine palmitoyltransferase 1a (Cpt1a)や Cyp2e1 についても検討したが、発現変動は確認されなかった。以上の結果から、1) メタボロミクス解析より、TCDD 誘導性の SelenBP1 は、脂質代謝に関連した機能を有する可能性が示唆された。 2) マイクロアレイ解析の結果もこれを支持し、脂質酸化酵素に発現低下が確認されたこと、これらの遺伝子の発現に関与する Rxra も低下したことから、SelenBP1 が脂質代謝を促進的に調節している可能性が示唆された。

D．結論

＜油症患者の支援と治療研究の推進＞

油症相談員、相談支援制度は充実し、検診やアンケート調査、訪問検診などの補助業務に加え、死因調査の基盤作りが完成した。今年度も福岡、長崎、広島にて知識の共有、患者の生活の質の向上のため、運動、栄養、漢方セミナーを実施して好評を得た。患者における PCB 異性体の特徴的な代謝蓄積に関与している CYP 分子種を推定し、患者血液中 PCB の鏡像異性体（キラル体）分離定量法を検討した。また、血液中 PCB・ダイオキシン類の測定精度を保つため、大量注入装置内の分析カラムの精度・感度について検証した。

＜臨床的追跡調査・疫学研究＞

全国油症検診結果については、今年度は平成 29 年度油症検診結果を解析した。受検者の高齢化は進み、例年通り全身倦怠感と、肝・胆・脾エコーの有所見率が高かった。患者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度分布は広範囲だったが、約 60%の患者は 50 pg/g lipid 未満であった。患者における眼病変においては、福岡県検診では眼脂過多が多いこと、長崎県検診では平均眼圧は健常人と有意差がないことが分かった。口腔細菌数と病変の関連については、口腔粘膜色素沈着は認定者において有意に多くみられたが、口腔細菌数と口腔粘膜所見との間に関連はみられなかった。患者の運動機能を評価した結果、男性では total 06TEQ とファンクショナルリーチおよび握力との間に負の相関があることが分かった。患者の症状を東洋医学的に検証した。今年度の福岡県検診にて 8 割以上の患者に手掌紅斑がみられた。患者の不眠有症率は高く、様々なダイオキシン類 TEQ との相関がみられた。患者の免疫機能については、T 細胞の制御に関わり、アレルギー性疾患に寄与するとされる Sema7a は患者では高値ではないが PCB 濃度と関連していること、血清 IL-13 濃度は健常人と有意差がないことが分かった。また、患者において末梢血液中の T 細胞の低下に PCB の慢性的影響が示唆された。一般住民を対象にした検診結果の解析においては、年齢・性で補正すると AGEs 量と 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度との間に関連はなかった。2001～2016 年を前半、後半に分けて解析した結果、個々の患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 半減期も延びていることが明らかになった。継世代への影響については、ダイオキシン類の母体曝露による児への移行は少ないが、2 世における皮膚・粘膜の色素沈着に関与している可能性が示唆された。

＜基礎的研究＞

ベンゾピレンを用いて神経障害、肺傷害を検証した。SP-D はベンゾピレンによる培養 Club 細胞のアポトーシスに対して保護的役割を果たした。ケイヒ等がベンゾピレンにより生じる感覚異常の症状改善に寄与する可能性が示唆された。オートファジーに関する研究においては、オートファジー不全状態であると細胞接着班の分解が抑制され細胞接着が亢進すること、AHR を刺激するリガンドでヒト表皮細胞を刺激したところ、オートファジーが誘導されることを明らかにした。

2,4,6-三酸化置換ベンゼンを有する PCB 異性体、PCB155 は代謝されやすく、代謝産物 M1 生成にフェノバルビツール誘導性 CYP2B 酵素が関与していることが分かった。TCDD 母体曝露による出生時の性未成熟の機構については、*Ahr* 遺伝子欠損ラットでは精子数の減少がみられ、AHR そのものが思春期における精巣の発達に影響している可能性が示唆された。ダイオキシン誘導性蛋白、SeleBP1 の脂質代謝への関与が示唆された。

　このように、ダイオキシン類の慢性影響、生体内動態、毒性機構、次世代への影響について明らかになりつつある。将来的に、油症の症状を緩和する新しい治療薬の発見・開発につなげたい。

Ｅ．健康危険情報

なし。

分担研究報告書

油症検診データを用いた基礎的解析

研究分担者	香月　進	福岡県保健環境研究所　所長
研究協力者	新谷　俊二	福岡県保健環境研究所　企画情報管理課　専門研究員
	高尾　佳子	福岡県保健環境研究所　企画情報管理課　研究員
	田中　義人	福岡県保健環境研究所　企画情報管理課　課長
	梶原　淳睦	福岡県保健環境研究所　保健科学部長

研究要旨　2017 年度に実施された油症検診受診者の傾向把握のため、検診票を収集し集計を行った。検診受診者は 639 名で、50 歳以上が全体の 89.7%であった。自覚症状で最も訴えが多かったのは全身倦怠感で 70.8%であった。他覚所見では、肝・胆・脾エコーの有所見率が 72.4%と最も高かった。

A．研究目的

油症は発生から 40 年以上が経過しているが、患者の健康管理や改善のため、また、健康への影響を明らかにするため、現在でも継続して検診が実施されている。この検診の情報収集及び管理を行い、検診受診者の傾向を明らかにすることを目的とした。

B．研究方法

全国 11 追跡調査班（関東以北、千葉県、愛知県、大阪府、島根県、広島県、山口県、高知県、福岡県、長崎県、鹿児島県）において、全国油症一斉検診（以下、油症検診）が行われている。また、九州大学病院、長崎大学病院、長崎県五島中央病院の 3 施設に油症外来が設置され、随時検診が行われている。2017 年度は、7 月から 11 月の間に全国各地で検診が実施された。

油症検診では 1985 年に作成された統一の検診票を用いており、内科、小児科、皮膚科、眼科、歯科及び検査票がある。これらの検診票を追跡調査班の協力を得て、収集、電子データ化し、項目別に集計した。集計した患者データは、2018 年度の油症検診までに各追跡調査班に還元し、活用されている。

（倫理面への配慮）

本研究は「福岡県保健環境研究所疫学研究倫理審査委員会要綱」に基づき、審査を受け承認されたものである（受付番号第 30-7 平成 30 年 9 月 21 日承認）。

C．研究結果及び考察

受診者の内訳を表 1 に示す。2017 年度は、639 名（男性 303 名、女性 336 名）が受診し、認定者は 504 名（78.9%）（男性 243 名、女性 261 名）、未認定者は 135 名（21.1%）（男性 60 名、女性 75 名）であった。

年齢階級別では、60～69 歳が一番多く、次いで、70～79 歳、50～59 歳の順であり、50 歳以上は全体の 89.7%を占めていた。

表 2 及び 3 に内科検診の集計結果を示す。自覚症状については、＋、＋＋を所見有、他覚所見では、正常、純（心音）、－以外を所見有とし、全体に占める所見有の割合を有所見率として集計した。自覚症状は、全身倦怠感（70.8%）、関節痛（68.0%）、しびれ感（62.8%）で、6 割を超える受診者が訴えていた。他覚所見では、肝・胆・脾エコー（72.4%）、心電図（32.1%）、胸部レ線（22.5%）が高かった。

表 4 に皮膚科検診の集計結果を示す。皮

膚科所見は、問診項目においては、有を、他覚所見においては、＋、＋＋、＋＋＋を所見有とし、黒色面皰、ざ瘡様皮疹、瘢痕化、色素沈着の項目については、いずれかの部位に所見が認められれば、所見有として集計を行った。問診項目では、かつてのざ瘡様皮疹は 48.6%が訴えており、次いで、かつての色素沈着が 27.4%であり、この 2 項目の訴えが比較的多かった。他覚所見は、黒色面皰の有所見率が最も高く（12.7%）、その他の項目の有所見率は 1 割未満であった。

表 5 に眼科検診の集計結果を示す。＋、＋＋、＋＋＋を所見有とすると、主訴である眼脂過多の訴えは 22.3%で、他覚所見の中で最も有所見率の高い眼瞼結膜色素沈着が 2.1%、次いで瞼板腺嚢胞形成が 1.3%であった。

表 6 に歯科検診の集計結果を示す。主訴、口腔所見は、有を、色素沈着所見は、＋、＋＋、＋＋＋を所見有とし、色素沈着所見は、上歯肉、下歯肉を歯肉、右頬粘膜と左頬粘膜を頬粘膜、上口唇粘膜と下口唇粘膜を口唇粘膜として集計した。主訴は 19.6%で、口腔所見は、辺縁性歯周炎（35.2%）、歯肉炎（16.5%）が高く、それら以外の項目は、1 割未満であった。色素沈着の有所見率は、歯肉の色素沈着(22.2%)が高く、それ以外は、1 割未満であった。

また、油症検診受診者の年度別推移を図 1 に示す。油症検診受診者は 2013 年度が最も多く、2017 年度は過去 6 番目の受診者数であった。

D．結論

2017 年度の油症検診受診者数は 639 名で、過去 6 番目に多い受診者数であり、50 歳以上が 89.7%であった。自覚症状で最も訴えが多かったのは全身倦怠感(70.8%)であった。他覚所見では、肝・胆・脾エコーの有所見率（72.4%）が最も高かった。

E．研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

なし

F．知的財産権の出願・登録状況

なし

表１　2017 年度検診受診者内訳

受診者区分及び年齢	計		男性		女性	
	n	%	n	%	n	%
総数	639	100.0	303	100.0	336	100.0
0－9 歳	1	0.2	－	－	1	0.3
10－19 歳	3	0.5	2	0.7	1	0.3
20－29 歳	6	0.9	3	1.0	3	0.9
30－39 歳	13	2.0	6	2.0	7	2.1
40－49 歳	43	6.7	23	7.6	20	6.0
50－59 歳	138	21.6	63	20.8	75	22.3
60－69 歳	183	28.6	87	28.7	96	28.6
70－79 歳	144	22.5	65	21.5	79	23.5
80－89 歳	100	15.6	51	16.8	49	14.6
90 歳以上	8	1.3	3	1.0	5	1.5
認定	504	100.0	243	100.0	261	100.0
0－9 歳	－	－	－	－	－	－
10－19 歳	－	－	－	－	－	－
20－29 歳	－	－	－	－	－	－
30－39 歳	－	－	－	－	－	－
40－49 歳	21	4.2	12	4.9	9	3.4
50－59 歳	116	23.0	54	22.2	62	23.8
60－69 歳	158	31.3	76	31.3	82	31.4
70－79 歳	120	23.8	54	22.2	66	25.3
80－89 歳	81	16.1	44	18.1	37	14.2
90 歳以上	8	1.6	3	1.2	5	1.9
未認定	135	100.0	60	100.0	75	100.0
0－9 歳	1	0.7	－	－	1	1.3
10－19 歳	3	2.2	2	3.3	1	1.3
20－29 歳	6	4.4	3	5.0	3	4.0
30－39 歳	13	9.6	6	10.0	7	9.3
40－49 歳	22	16.3	11	18.3	11	14.7
50－59 歳	22	16.3	9	15.0	13	17.3
60－69 歳	25	18.5	11	18.3	14	18.7
70－79 歳	24	17.8	11	18.3	13	17.3
80－89 歳	19	14.1	7	11.7	12	16.0
90 歳以上	－	－	－	－	－	－

表２　2017 年度内科検診の自覚症状集計結果

自覚症状		総数						認定						未認定					
		計		男性		女性		計		男性		女性		計		男性		女性	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
全身倦怠感	計	616	100.0	293	100.0	323	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	134	100.0	60	100.0	74	100.0
	無	180	29.2	105	35.8	75	23.2	139	28.8	80	34.3	59	23.7	41	30.6	25	41.7	16	21.6
	有	436	70.8	188	64.2	248	76.8	343	71.2	153	65.7	190	76.3	93	69.4	35	58.3	58	78.4
頭重・頭痛	計	616	100.0	293	100.0	323	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	134	100.0	60	100.0	74	100.0
	無	266	43.2	168	57.3	98	30.3	210	43.6	136	58.4	74	29.7	56	41.8	32	53.3	24	32.4
	有	350	56.8	125	42.7	225	69.7	272	56.4	97	41.6	175	70.3	78	58.2	28	46.7	50	67.6
咳嗽	計	616	100.0	293	100.0	323	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	134	100.0	60	100.0	74	100.0
	無	317	51.5	157	53.6	160	49.5	248	51.5	126	54.1	122	49.0	69	51.5	31	51.7	38	51.4
	有	299	48.5	136	46.4	163	50.5	234	48.5	107	45.9	127	51.0	65	48.5	29	48.3	36	48.6
喀痰	計	616	100.0	293	100.0	323	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	134	100.0	60	100.0	74	100.0
	無	353	57.3	157	53.6	196	60.7	272	56.4	122	52.4	150	60.2	81	60.4	35	58.3	46	62.2
	有	263	42.7	136	46.4	127	39.3	210	43.6	111	47.6	99	39.8	53	39.6	25	41.7	28	37.8
腹痛	計	615	100.0	292	100.0	323	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	133	100.0	59	100.0	74	100.0
	無	398	64.7	198	67.8	200	61.9	317	65.8	161	69.1	156	62.7	81	60.9	37	62.7	44	59.5
	有	217	35.3	94	32.2	123	38.1	165	34.2	72	30.9	93	37.3	52	39.1	22	37.3	30	40.5
下痢	計	616	100.0	293	100.0	323	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	134	100.0	60	100.0	74	100.0
	無	383	62.2	173	59.0	210	65.0	303	62.9	138	59.2	165	66.3	80	59.7	35	58.3	45	60.8
	有	233	37.8	120	41.0	113	35.0	179	37.1	95	40.8	84	33.7	54	40.3	25	41.7	29	39.2
便秘	計	615	100.0	292	100.0	323	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	133	100.0	59	100.0	74	100.0
	無	328	53.3	181	62.0	147	45.5	259	53.7	147	63.1	112	45.0	69	51.9	34	57.6	35	47.3
	有	287	46.7	111	38.0	176	54.5	223	46.3	86	36.9	137	55.0	64	48.1	25	42.4	39	52.7
しびれ感	計	616	100.0	293	100.0	323	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	134	100.0	60	100.0	74	100.0
	無	229	37.2	114	38.9	115	35.6	169	35.1	87	37.3	82	32.9	60	44.8	27	45.0	33	44.6
	有	387	62.8	179	61.1	208	64.4	313	64.9	146	62.7	167	67.1	74	55.2	33	55.0	41	55.4
関節痛	計	616	100.0	293	100.0	323	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	134	100.0	60	100.0	74	100.0
	無	197	32.0	110	37.5	87	26.9	143	29.7	79	33.9	64	25.7	54	40.3	31	51.7	23	31.1
	有	419	68.0	183	62.5	236	73.1	339	70.3	154	66.1	185	74.3	80	59.7	29	48.3	51	68.9
月経異常	計	174	100.0	－	－	174	100.0	127	100.0	－	－	127	100.0	47	100.0	－	－	47	100.0
	無	153	87.9	－	－	153	87.9	117	92.1	－	－	117	92.1	36	76.6	－	－	36	76.6
	有	21	12.1	－	－	21	12.1	10	7.9	－	－	10	7.9	11	23.4	－	－	11	23.4
その他	計	86	100.0	40	100.0	46	100.0	66	100.0	31	100.0	35	100.0	20	100.0	9	100.0	11	100.0
	無	48	55.8	23	57.5	25	54.3	37	56.1	18	58.1	19	54.3	11	55.0	5	55.6	6	54.5
	有	38	44.2	17	42.5	21	45.7	29	43.9	13	41.9	16	45.7	9	45.0	4	44.4	5	45.5

表３　2017 年度内科検診の他覚所見集計結果

他覚症状		総数						認定						未認定					
		計		男性		女性		計		男性		女性		計		男性		女性	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
栄養	計	613	100.0	292	100.0	321	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	131	100.0	59	100.0	72	100.0
	無	518	84.5	244	83.6	274	85.4	416	86.3	200	85.8	216	86.7	102	77.9	44	74.6	58	80.6
	有	95	15.5	48	16.4	47	14.6	66	13.7	33	14.2	33	13.3	29	22.1	15	25.4	14	19.4
心音	計	614	100.0	292	100.0	322	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	132	100.0	59	100.0	73	100.0
	無	596	97.1	285	97.6	311	96.6	468	97.1	226	97.0	242	97.2	128	97.0	59	100.0	69	94.5
	有	18	2.9	7	2.4	11	3.4	14	2.9	7	3.0	7	2.8	4	3.0	－	－	4	5.5
呼吸音	計	614	100.0	292	100.0	322	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	132	100.0	59	100.0	73	100.0
	無	598	97.4	284	97.3	314	97.5	467	96.9	225	96.6	242	97.2	131	99.2	59	100.0	72	98.6
	有	16	2.6	8	2.7	8	2.5	15	3.1	8	3.4	7	2.8	1	0.8	－	－	1	1.4
肝腫	計	610	100.0	290	100.0	320	100.0	480	100.0	232	100.0	248	100.0	130	100.0	58	100.0	72	100.0
	無	602	98.7	286	98.6	316	98.8	476	99.2	230	99.1	246	99.2	126	96.9	56	96.6	70	97.2
	有	8	1.3	4	1.4	4	1.3	4	0.8	2	0.9	2	0.8	4	3.1	2	3.4	2	2.8
脾腫	計	609	100.0	289	100.0	320	100.0	479	100.0	231	100.0	248	100.0	130	100.0	58	100.0	72	100.0
	無	609	100.0	289	100.0	320	100.0	479	100.0	231	100.0	248	100.0	130	100.0	58	100.0	72	100.0
	有	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
浮腫	計	614	100.0	292	100.0	322	100.0	482	100.0	233	100.0	249	100.0	132	100.0	59	100.0	73	100.0
	無	587	95.6	284	97.3	303	94.1	461	95.6	227	97.4	234	94.0	126	95.5	57	96.6	69	94.5
	有	27	4.4	8	2.7	19	5.9	21	4.4	6	2.6	15	6.0	6	4.5	2	3.4	4	5.5
リンパ節腫大	計	613	100.0	291	100.0	322	100.0	481	100.0	232	100.0	249	100.0	132	100.0	59	100.0	73	100.0
	無	612	99.8	290	99.7	322	100.0	480	99.8	231	99.6	249	100.0	132	100.0	59	100.0	73	100.0
	有	1	0.2	1	0.3	－	－	1	0.2	1	0.4	－	－	－	－	－	－	－	－
四肢けん反射	計	611	100.0	291	100.0	320	100.0	480	100.0	232	100.0	248	100.0	131	100.0	59	100.0	72	100.0
	無	495	81.0	222	76.3	273	85.3	388	80.8	178	76.7	210	84.7	107	81.7	44	74.6	63	87.5
	有	116	19.0	69	23.7	47	14.7	92	19.2	54	23.3	38	15.3	24	18.3	15	25.4	9	12.5
感覚障害	計	604	100.0	291	100.0	313	100.0	474	100.0	232	100.0	242	100.0	130	100.0	59	100.0	71	100.0
	無	533	88.2	257	88.3	276	88.2	413	87.1	203	87.5	210	86.8	120	92.3	54	91.5	66	93.0
	有	71	11.8	34	11.7	37	11.8	61	12.9	29	12.5	32	13.2	10	7.7	5	8.5	5	7.0
胸部レ線	計	590	100.0	283	100.0	307	100.0	467	100.0	229	100.0	238	100.0	123	100.0	54	100.0	69	100.0
	無	457	77.5	212	74.9	245	79.8	353	75.6	167	72.9	186	78.2	104	84.6	45	83.3	59	85.5
	有	133	22.5	71	25.1	62	20.2	114	24.4	62	27.1	52	21.8	19	15.4	9	16.7	10	14.5
心電図	計	604	100.0	285	100.0	319	100.0	476	100.0	229	100.0	247	100.0	128	100.0	56	100.0	72	100.0
	無	410	67.9	174	61.1	236	74.0	320	67.2	137	59.8	183	74.1	90	70.3	37	66.1	53	73.6
	有	194	32.1	111	38.9	83	26.0	156	32.8	92	40.2	64	25.9	38	29.7	19	33.9	19	26.4
肝・胆・脾エコー	計	243	100.0	120	100.0	123	100.0	176	100.0	89	100.0	87	100.0	67	100.0	31	100.0	36	100.0
	無	67	27.6	26	21.7	41	33.3	48	27.3	21	23.6	27	31.0	19	28.4	5	16.1	14	38.9
	有	176	72.4	94	78.3	82	66.7	128	72.7	68	76.4	60	69.0	48	71.6	26	83.9	22	61.1

表４　2017年度皮膚科検診集計結果

問診及び他覚症状		総数						認定						未認定					
		計		男性		女性		計		男性		女性		計		男性		女性	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
問診																			
最近の化膿傾向	計	613	100.0	293	100.0	320	100.0	480	100.0	233	100.0	247	100.0	133	100.0	60	100.0	73	100.0
	無	521	85.0	246	84.0	275	85.9	412	85.8	200	85.8	212	85.8	109	82.0	46	76.7	63	86.3
	有	92	15.0	47	16.0	45	14.1	68	14.2	33	14.2	35	14.2	24	18.0	14	23.3	10	13.7
最近の粉りゅう再発傾向	計	612	100.0	292	100.0	320	100.0	479	100.0	232	100.0	247	100.0	133	100.0	60	100.0	73	100.0
	無	526	85.9	251	86.0	275	85.9	406	84.8	200	86.2	206	83.4	120	90.2	51	85.0	69	94.5
	有	86	14.1	41	14.0	45	14.1	73	15.2	32	13.8	41	16.6	13	9.8	9	15.0	4	5.5
かつてのざ瘡様皮疹	計	609	100.0	289	100.0	320	100.0	476	100.0	229	100.0	247	100.0	133	100.0	60	100.0	73	100.0
	無	313	51.4	138	47.8	175	54.7	239	50.2	107	46.7	132	53.4	74	55.6	31	51.7	43	58.9
	有	296	48.6	151	52.2	145	45.3	237	49.8	122	53.3	115	46.6	59	44.4	29	48.3	30	41.1
かつての色素沈着	計	606	100.0	287	100.0	319	100.0	473	100.0	227	100.0	246	100.0	133	100.0	60	100.0	73	100.0
	無	440	72.6	205	71.4	235	73.7	331	70.0	156	68.7	175	71.1	109	82.0	49	81.7	60	82.2
	有	166	27.4	82	28.6	84	26.3	142	30.0	71	31.3	71	28.9	24	18.0	11	18.3	13	17.8
他覚所見																			
黒色面皰	計	613	100.0	293	100.0	320	100.0	480	100.0	233	100.0	247	100.0	133	100.0	60	100.0	73	100.0
	無	535	87.3	246	84.0	289	90.3	414	86.3	193	82.8	221	89.5	121	91.0	53	88.3	68	93.2
	有	78	12.7	47	16.0	31	9.7	66	13.8	40	17.2	26	10.5	12	9.0	7	11.7	5	6.8
ざ瘡様皮疹	計	613	100.0	293	100.0	320	100.0	480	100.0	233	100.0	247	100.0	133	100.0	60	100.0	73	100.0
	無	573	93.5	272	92.8	301	94.1	453	94.4	222	95.3	231	93.5	120	90.2	50	83.3	70	95.9
	有	40	6.5	21	7.2	19	5.9	27	5.6	11	4.7	16	6.5	13	9.8	10	16.7	3	4.1
瘢痕化	計	613	100.0	293	100.0	320	100.0	480	100.0	233	100.0	247	100.0	133	100.0	60	100.0	73	100.0
	無	563	91.8	259	88.4	304	95.0	437	91.0	206	88.4	231	93.5	126	94.7	53	88.3	73	100.0
	有	50	8.2	34	11.6	16	5.0	43	9.0	27	11.6	16	6.5	7	5.3	7	11.7	－	－
色素沈着	計	613	100.0	293	100.0	320	100.0	480	100.0	233	100.0	247	100.0	133	100.0	60	100.0	73	100.0
	無	575	93.8	278	94.9	297	92.8	452	94.2	223	95.7	229	92.7	123	92.5	55	91.7	68	93.2
	有	38	6.2	15	5.1	23	7.2	28	5.8	10	4.3	18	7.3	10	7.5	5	8.3	5	6.8
爪変形	計	612	100.0	292	100.0	320	100.0	479	100.0	232	100.0	247	100.0	133	100.0	60	100.0	73	100.0
	無	593	96.9	285	97.6	308	96.3	462	96.5	226	97.4	236	95.5	131	98.5	59	98.3	72	98.6
	有	19	3.1	7	2.4	12	3.8	17	3.5	6	2.6	11	4.5	2	1.5	1	1.7	1	1.4

表５　2017 年度眼科検診集計結果

主訴及び他覚所見		総数						認定						未認定					
		計		男性		女性		計		男性		女性		計		男性		女性	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
主訴																			
眼脂過多	計	606	100.0	293	100.0	313	100.0	475	100.0	234	100.0	241	100.0	131	100.0	59	100.0	72	100.0
	無	471	77.7	219	74.7	252	80.5	372	78.3	176	75.2	196	81.3	99	75.6	43	72.9	56	77.8
	有	135	22.3	74	25.3	61	19.5	103	21.7	58	24.8	45	18.7	32	24.4	16	27.1	16	22.2
他覚所見																			
眼瞼浮腫	計	606	100.0	292	100.0	314	100.0	475	100.0	233	100.0	242	100.0	131	100.0	59	100.0	72	100.0
	無	602	99.3	292	100.0	310	98.7	472	99.4	233	100.0	239	98.8	130	99.2	59	100.0	71	98.6
	有	4	0.7	−	−	4	1.3	3	0.6	−	−	3	1.2	1	0.8	−	−	1	1.4
眼瞼結膜色素沈着	計	607	100.0	293	100.0	314	100.0	476	100.0	234	100.0	242	100.0	131	100.0	59	100.0	72	100.0
	無	594	97.9	287	98.0	307	97.8	464	97.5	228	97.4	236	97.5	130	99.2	59	100.0	71	98.6
	有	13	2.1	6	2.0	7	2.2	12	2.5	6	2.6	6	2.5	1	0.8	−	−	1	1.4
瞼板腺嚢胞形成	計	607	100.0	293	100.0	314	100.0	476	100.0	234	100.0	242	100.0	131	100.0	59	100.0	72	100.0
	無	599	98.7	289	98.6	310	98.7	468	98.3	230	98.3	238	98.3	131	100.0	59	100.0	72	100.0
	有	8	1.3	4	1.4	4	1.3	8	1.7	4	1.7	4	1.7	−	−	−	−	−	−
瞼板腺ﾁｰｽﾞ様分泌物圧出	計	606	100.0	293	100.0	313	100.0	475	100.0	234	100.0	241	100.0	131	100.0	59	100.0	72	100.0
	無	601	99.2	289	98.6	312	99.7	471	99.2	231	98.7	240	99.6	130	99.2	58	98.3	72	100.0
	有	5	0.8	4	1.4	1	0.3	4	0.8	3	1.3	1	0.4	1	0.8	1	1.7	−	−

表６　2017 年度歯科検診集計結果

主訴及び他覚症状		総数						認定						未認定					
		計		男性		女性		計		男性		女性		計		男性		女性	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
主訴	計	362	100.0	192	100.0	170	100.0	268	100.0	146	100.0	122	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	291	80.4	161	83.9	130	76.5	214	79.9	122	83.6	92	75.4	77	81.9	39	84.8	38	79.2
	有	71	19.6	31	16.1	40	23.5	54	20.1	24	16.4	30	24.6	17	18.1	7	15.2	10	20.8
口腔所見																			
歯肉炎	計	364	100.0	193	100.0	171	100.0	270	100.0	147	100.0	123	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	304	83.5	159	82.4	145	84.8	223	82.6	120	81.6	103	83.7	81	86.2	39	84.8	42	87.5
	有	60	16.5	34	17.6	26	15.2	47	17.4	27	18.4	20	16.3	13	13.8	7	15.2	6	12.5
辺縁性歯周炎	計	364	100.0	193	100.0	171	100.0	270	100.0	147	100.0	123	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	236	64.8	112	58.0	124	72.5	168	62.2	79	53.7	89	72.4	68	72.3	33	71.7	35	72.9
	有	128	35.2	81	42.0	47	27.5	102	37.8	68	46.3	34	27.6	26	27.7	13	28.3	13	27.1
歯牙萌出異常	計	364	100.0	193	100.0	171	100.0	270	100.0	147	100.0	123	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	360	98.9	190	98.4	170	99.4	268	99.3	146	99.3	122	99.2	92	97.9	44	95.7	48	100.0
	有	4	1.1	3	1.6	1	0.6	2	0.7	1	0.7	1	0.8	2	2.1	2	4.3	−	−
歯牙着色	計	364	100.0	193	100.0	171	100.0	270	100.0	147	100.0	123	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	361	99.2	192	99.5	169	98.8	267	98.9	146	99.3	121	98.4	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	有	3	0.8	1	0.5	2	1.2	3	1.1	1	0.7	2	1.6	−	−	−	−	−	−
歯牙形成不全	計	363	100.0	193	100.0	170	100.0	269	100.0	147	100.0	122	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	360	99.2	191	99.0	169	99.4	267	99.3	145	98.6	122	100.0	93	98.9	46	100.0	47	97.9
	有	3	0.8	2	1.0	1	0.6	2	0.7	2	1.4	−	−	1	1.1	−	−	1	2.1
咬合異常	計	357	100.0	187	100.0	170	100.0	263	100.0	141	100.0	122	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	340	95.2	181	96.8	159	93.5	254	96.6	138	97.9	116	95.1	86	91.5	43	93.5	43	89.6
	有	17	4.8	6	3.2	11	6.5	9	3.4	3	2.1	6	4.9	8	8.5	3	6.5	5	10.4
その他	計	357	100.0	187	100.0	170	100.0	263	100.0	141	100.0	122	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	338	94.7	178	95.2	160	94.1	247	93.9	134	95.0	113	92.6	91	96.8	44	95.7	47	97.9
	有	19	5.3	9	4.8	10	5.9	16	6.1	7	5.0	9	7.4	3	3.2	2	4.3	1	2.1
色素沈着所見																			
歯肉	計	365	100.0	194	100.0	171	100.0	271	100.0	148	100.0	123	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	284	77.8	146	75.3	138	80.7	212	78.2	113	76.4	99	80.5	72	76.6	33	71.7	39	81.3
	有	81	22.2	48	24.7	33	19.3	59	21.8	35	23.6	24	19.5	22	23.4	13	28.3	9	18.8
頬粘膜	計	365	100.0	194	100.0	171	100.0	271	100.0	148	100.0	123	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	338	92.6	175	90.2	163	95.3	245	90.4	130	87.8	115	93.5	93	98.9	45	97.8	48	100.0
	有	27	7.4	19	9.8	8	4.7	26	9.6	18	12.2	8	6.5	1	1.1	1	2.2	−	−
口蓋粘膜	計	364	100.0	194	100.0	170	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	358	98.4	192	99.0	166	97.6	265	98.1	146	98.6	119	97.5	93	98.9	46	100.0	47	97.9
	有	6	1.6	2	1.0	4	2.4	5	1.9	2	1.4	3	2.5	1	1.1	−	−	1	2.1
口唇粘膜	計	365	100.0	194	100.0	171	100.0	271	100.0	148	100.0	123	100.0	94	100.0	46	100.0	48	100.0
	無	345	94.5	187	96.4	158	92.4	253	93.4	141	95.3	112	91.1	92	97.9	46	100.0	46	95.8
	有	20	5.5	7	3.6	13	7.6	18	6.6	7	4.7	11	8.9	2	2.1	−	−	2	4.2

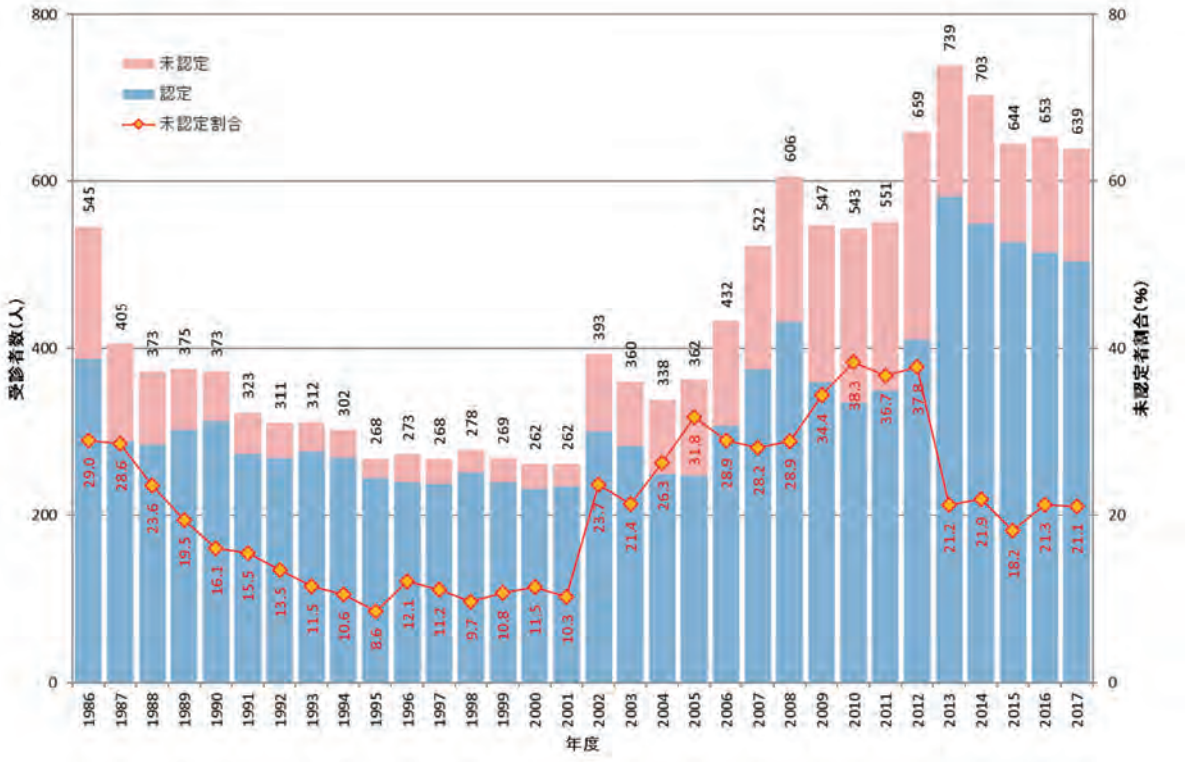


図１　油症検診受診者の年度別推移

分担研究報告書

油症患者血液中の PCDF 類実態調査

研究分担者	香月　進	福岡県保健環境研究所	所長
研究協力者	梶原　淳睦	福岡県保健環境研究所	保健科学部長
	堀　　就英	福岡県保健環境研究所	生活化学課　生活化学課長
	平川　博仙	福岡県保健環境研究所	生活化学課　専門研究員
	安武　大輔	福岡県保健環境研究所	生活化学課　専門研究員
	新谷　依子	福岡県保健環境研究所	生活化学課　主任技師
	小木曽　俊孝	福岡県保健環境研究所	生活化学課　主任技師
	中西　加奈子	福岡県保健環境研究所	生活化学課　主任技師
	佐藤　環	福岡県保健環境研究所	生活化学課　主任技師
	高橋　浩司	福岡県保健環境研究所	計測技術課　課長
	酒谷　圭一	福岡県保健環境研究所	計測技術課　主任技師
	片宗　千春	福岡県保健環境研究所	計測技術課　主任技師
	田中　義人	福岡県保健環境研究所	企画情報管理課　課長
	新谷　俊二	福岡県保健環境研究所	企画情報管理課　専門研究員
	高尾　佳子	福岡県保健環境研究所	企画情報管理課　研究員
	宮脇　崇	福岡県保健環境研究所	水質課　研究員
	平川　周作	福岡県保健環境研究所	水質課　研究員

研究要旨　油症診定および治療の基礎資料作成のため、油症一斉検診受診者の中で血液中ダイオキシン類検査希望者の血液中ダイオキシン類濃度を継続的に測定している。平成 29 年度(2017 年)に血液中ダイオキシン類濃度を測定した油症認定患者 148 名と未認定者 135 名についてデータ解析を行った。

平成 29 年度に血液中ダイオキシン類を測定した油症認定患者の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 67 pg/g lipid であった。また 2,3,7,8-TeCDD 毒性等価係数（WHO-2005）を用いて毒性等量（TEQ）に換算した総ダイオキシン類（Total TEQ）の平均濃度は 45 pg TEQ/g lipid であった。一方、未認定者の 2,3,4,7,8-PeCDF 平均濃度は 14 pg/g lipid、Total TEQ の平均濃度は 25 pg TEQ/g lipid であった。

平成 13～29 年の 17 年間に血液中ダイオキシン類検査を実施した油症認定患者数は累計で 1,043 名となり、これは油症認定患者全体（総数 2,327 名、平成 29 年度時点）の約 45%にあたる。血中ダイオキシン類の測定歴がある認定患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均値は 100　pg/g lipid であり、濃度分布は 2.6～1,800 pg/g lipid と広範囲であるが、約 60%の患者は 50 pg/g lipid 未満であった。

平成 25～29 年に同居家族認定者 149 名が検診を受診したが、同居家族認定者の血液中

2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均値は 27 pg/g lipid で一般人に近い値であった。
油症患者におけるチトクローム P450 (CYP) 依存的な PCB 異性体の代謝能を調査するため、*in silico* 解析による PCB と CYP のドッキングシミュレーションを実施した。この結果、ダイオキシン類や PCB に誘導される CYP 分子種は、多くの低塩素化 PCB 異性体に対して、塩素未置換炭素原子がヘム鉄から 6Å 以内に配置される基質結合ポケットを有することが示された。油症患者における PCB 異性体の特徴的な代謝蓄積に関与している CYP 分子種を推定した。このほか、油症患者血液中 PCB の鏡像異性体（キラル体）分離定量法を検討した。

A．研究目的

平成 16 年 (2004 年) に血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 値が新たな油症診断基準に加えられた。また平成 24 年(2012 年)12 月には油症診断基準追補(同居家族の条件追補)が加わり、平成 29 年度現在の認定患者の総数は 2,327 名である。

全国油症治療研究班では、油症認定患者の治療と追跡、ならびに未認定者の患者診定に資することを目的として、毎年全国で油症一斉検診を行っている。本分担研究では、福岡県保健環境研究所で開発した微量高感度のダイオキシン類分析法を用いて、油症一斉検診受診者のうち、平成 13 年 (2001 年)度は福岡県の受診者中の希望者、平成 14～18 年 (2002～2006 年) 度の 5 年間は全国の検診受診者中の全希望者、平成 19 年 (2007 年) 度からは未認定者と油症認定患者のうち初回及び過去 3 年以内に測定歴の無い認定患者の血液中ダイオキシン類濃度を測定してきた。未認定者の測定結果は油症診定委員会に供するとともに、油症認定患者に対しては血液中ダイオキシン類濃度の経年推移や油症認定患者中のダイオキシン類濃度分布の解析を行っている。

本年度は、①平成 29 年度油症一斉検診を受診した未認定者と検査対象の認定患者の血液中ダイオキシン類濃度をとりまとめた。次に、②平成 13 年度から 29 年度までの 17 年間に測定した 1,043 名の油症認定患者の血液中ダイオキシン類濃度を、対照群（福岡県内の 60 歳以上の 127 名の一般人、平成 16 年度に採取）と比較し、油症認定患者の血液中ダイオキシン類濃度の特徴を解析した。また、③平成 25 年度から同居家族認定者が検診に参加したため、同居家族認定者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度等を集計し解析した。さらに、④平成 13 年度から 29 年度までの 17 年間に未認定者として油症検診を受診した 674 名について受診回数や血液中ダイオキシン類濃度の特徴を解析した。また、⑤患者体内における PCB 蓄積の特徴を調べることを目的として、*in silico* 解析手法による油症患者体内の PCB 代謝特性に関する検討ならびに血液中 PCB の鏡像異性体（キラル体）分離定量法について技術検討を行った。

B．研究方法

１．ダイオキシン類分析法及び信頼性確保

血液中ダイオキシン類の測定は、平成 13 年度に開発した高感度分析法で行った。油症一斉検診に対応できる分析体制を維持するため、抽出や定量分析の工程に先進技術を導入して運用している。一方、試料の少量化、検査の高感度化に伴い、定量結果の

信頼性を確保するため、血液試料 22 件につき操作ブランク試験 1 件、内部精度管理のコントロール試料としてヒト血清 1 件の計 24 件を「1 ロット」として前処理を並行して行い、操作ブランクや回収率等を解析し、各ロットの操作工程が適切であったか確認した。また、国内分析機関に同一試料を配布して測定結果を比較するクロスチェックを実施し、分析値の信頼性を確認した。

定量値の 2,3,7,8-TCDD 毒性等量（TEQ）への換算には、2005 年に WHO が策定した毒性換算係数（WHO-2005）を用いた。

２．ダイオキシン類測定対象試料

平成 29 年度の油症一斉検診受診者のうち、初回及び過去 3 年以内に血液中ダイオキシン類測定歴が無い認定患者 148 名及び未認定者 135 名から血液を採取し、測定を実施した。血液はヘパリン入り真空採血管を用いて採血し、検査まで 4℃以下で冷蔵保存した。

平成 30 年度（2018 年）調査（296 名）については現在分析中である。

３．油症検診を受診した認定患者の血液中ダイオキシン類濃度の解析

平成 13 年度から 29 年度までの 17 年間に、血液中ダイオキシン類濃度を分析した油症認定患者の検体総数は 2,987 名分であるが、複数回受診した油症認定患者が存在するため、実数は 1,043 名であった。これら血液中ダイオキシン類濃度を測定した油症認定患者の血液中ダイオキシン類濃度を集計し解析した。患者の年齢は採血時点での年齢を用い分類した。血液中ダイオキシン類濃度は、経年変化を解析したところ短期間ではほとんど変化しなかったので、1 度しか分析していない場合はその濃度を、複数回測定している場合は最後に測定した濃度（最新の濃度）を、その認定患者の血液中ダイオキシン類濃度として解析した。

４．油症検診を受診した未認定者の血液中ダイオキシン類濃度の解析

平成 13 年度から 29 年度までの 17 年間に未認定者として油症検診を受診し、血液中ダイオキシン類濃度を測定したのは 2,375 名であるが、複数回受診した未認定者が存在するため、実数は 674 名であった。未認定者について受診回数や血液中ダイオキシン類濃度の特徴を解析した。

５．油症患者における PCB の蓄積特性の解析及び血液中 PCB の鏡像異性体（キラル体）分離定量法の検討

愛媛大学沿岸環境科学研究センターの協力を得て、分子シミュレーションソフトウェア Molecular Operating Environment (MOE) プログラム を利用し、PCB 異性体 69 種類と薬物代謝酵素チトクローム P450(CYP) 分子種 7 種についてドッキングシュミレーションを行い、体内での PCB 代謝に関与する CYP 分子種の予測を行った。

また、高分解能 GC/MS を用いて血液中の 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (PCB183) の鏡像異性体（キラル体）の分離定量法について測定条件の検討を行った。

（倫理面への配慮）

血液中ダイオキシン類の測定は、本人の同意が得られた者のみを対象とした。研究成果の発表に際しては統計的に処理された結果のみを使い、個人を特定できるような情報は存在しない。また、本研究は「福岡県

保健環境研究所疫学研究倫理審査委員会要綱」に基づき、審査を受け承認されたものである（受付番号第 28-1 号平成 28 年 6 月 16 日承認）。

C．研究結果・考察

１．ダイオキシン類分析の信頼性確保

１－１．ブランク補正

平成 29 年度の油症ダイオキシン類検査では計 8 ロットの分析を行い、その度ブランク試験を行った。ブランク試験結果と血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアルの定量下限値と比較し、ブランク値が定量下限値の 40%以上となっている異性体は分析ロットごとにブランク補正を行った。

１－２．コントロール血清の分析

各分析ロットで市販ヒト血清試料（コンセーラ L）5 g を血液試料と同じ方法を用いて分析した。コントロール血清の 5 回分の測定値を解析したところ、1,2,3,7,8-PeCDD の CV 値は 22%となり比較的大きかったが、その他の異性体濃度の CV 値は 10%程度と良好な結果であった。油症診定基準に採用されている 2,3,4,7,8-PeCDF の CV 値も同様で、各分析ロット間の分析値のバラツキは小さく精度は維持されていた。

２．平成 29 年度油症一斉検診受診者の血液中ダイオキシン類濃度分析

表 1 に平成 29 年度の油症一斉検診の油症認定患者及び未認定者の血液中ダイオキシン類濃度の分析結果及び平成 16 年度に福岡県で実施した一般住民の血液中ダイオキシン類濃度を示した。平成 19 年度以降、油症検診受診者のうち初回及び過去 3 年以内に測定歴の無い認定患者の血液中ダイオキシン類濃度を測定している。平成 29 年度の油症認定患者の血液中ダイオキシン類測定対象者は 148 名であった。また、未認定者は 135 名で前年と比べ 3 名減少した。平成 24 年 12 月に油症診断基準に同居家族条項が追加され、多くの患者同居家族が患者に認定されたため、未認定者の受診者は僅かながら減少した。

油症認定患者の血液中ダイオキシン類濃度（Total TEQ）は平均で 45 pg TEQ/g lipid であり、対照群の一般住民の平均 Total TEQ（37 pg TEQ/g lipid）に比べて約 1.2 倍高い濃度であった。次に、未認定者の Total TEQ の平均値は 25 pg TEQ/g lipid であり、対照群の一般住民（37 pg TEQ/g lipid）より低い値となったが、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が 50 pg/g lipid を超える受診者が 2 名認められた。

３．油症検診を受診した認定患者の血液中ダイオキシン類濃度の解析

平成 13 年度から 29 年度までの 17 年間に血液中ダイオキシン類濃度を分析した油症認定患者 1,043 名の平成 28 年末現在の平均年齢は 70.4 歳（38～105 歳）で、これは平成 29 年度時点の全認定患者（2,327 名）の約 45%に相当した。

表 2 に油症認定患者 1,043 名及び平成 16 年度に福岡県で実施した一般住民の血液中ダイオキシン類濃度を示した。油症認定患者の Total TEQ 濃度は平均 60 pg TEQ/g lipid で、対照群の一般住民の平均（37pg TEQ/g lipid）に対して約 1.7 倍高い値であった。ダイオキシン類の同族体別に見ると、油症認定患者の血液中濃度が一般住民と比べて 2 倍以上高い化合物は、2,3,7,8-TeCDF、2,3,4,7,8-PeCDF 、 1,2,3,4,7,8-HxCDF 、

3,3',4,4',5,5'-HxCB (PCB169)の4化合物であった。一般住民と比較して最も血中濃度比が高い 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は油症診断基準に採用されている。油症患者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の分布は 2.6～1,800 pg/g lipid と広範囲であるが約60%の認定患者は50 pg/g lipid 未満であった。

平成 24 年(2012 年)12 月に油症診断基準追補(同居家族の条件追補)が加わったことから、これまでに 295 名が同居家族の条件による油症患者と認定されている。このうち平成 25 年度に 51 名、平成 26 年度に 24 名、平成 27 年度に 13 名、平成 28 年度に 51 名、平成 29 年度に 10 名の同居家族認定患者が油症検診を受診した。表 3 に油症認定患者 1,043 名のうち同居家族認定患者 149 名とその他の油症患者894名及び平成16年度に福岡県で実施した一般住民の血液中ダイオキシン類濃度を示した。同居家族認定患者を除く油症認定患者の平均 Total TEQ は67 pg TEQ/g lipid 、同居家族認定患者および対照群の一般住民の平均 Total TEQ はそれぞれ32、37 pg TEQ/g lipid であった。同居家族認定患者と一般住民の平均 Total TEQ はほぼ同様の値であった。同居家族認定者を除く油症認定患者、同居家族認定患者および対照群の一般住民の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均値はそれぞれ120、27 および17 pg /g lipid であった。同居家族認定患者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均値は認定患者全体の平均値より低く、一般人に近い値であった。一方、同居家族認定患者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の分布は2.8～440 pg /g lipid であり、油症診断基準で「高い濃度」に区分される 50 pg/g lipid を超える受診者が15名存在した。

４．油症検診を受診した未認定者の血液中ダイオキシン類濃度の解析

平成13年度から29年度までの17年間に血液中ダイオキシン類濃度を分析した未認定者数はのべ 2,396 名であり、実数は 674 名であった。平成 29 年末現在の平均年齢は57.5歳 (5～90 歳) で、内訳は男性 305 名、女性 369 名であった。

約半数の未認定受診者の受診回数は 1 回であるが、油症の診定には油症検診を受診することが必須であり、最大で16回受診した未認定者が 2 名認められた (図 1)。複数回受診した未認定者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の変動は僅かであった。

17年間の油症検診で、その時点で未認定者として受診した 674 名のうち、75 名は 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が 50 pg/g lipid 以上となり、油症診断基準の「高い濃度」に区分された。一方、未認定者 674 名全体の 2,3,4,7,8-PeCDF 平均濃度は14 pg/g lipid であり、多くは一般人と同等のレベルであった。

５．油症患者における PCB の蓄積特性及び血液中 PCB の鏡像異性体（キラル体）分離定量法

CYP の活性中心にあるヘム鉄と基質の標的部位の距離について 5Å (または 6Å) 以内が効率的に代謝される目安とされている。*In silico* 解析の結果、ダイオキシン類や PCB 誘導される CYP 分子種は、多くの低塩素化 PCB 異性体に対して、塩素未置換炭素原子がヘム鉄から 6Å 以内に配置される基質結合ポケットを有することが示された。また、7 つの分子種のうち CYP2A6 と CYP2B6 においては、条件を 5Å 未満に設定

した場合でも、解析した8割以上の PCB 異性体が条件に合致し、PCB 代謝に特に大きな役割を担っている分子種と考えられた（表4)。

高分解能 GC/MS を用いて血液中の 2,2’,3,4,4’,5’,6-heptachlorobiphenyl（PCB183）の鏡像異性体（キラル体）について測定条件の検討を行った。種々のキャピラリーカラムを用いて GC 昇温条件等を検討した。この結果、表 5 に示す測定条件で血液中 PCB183 の鏡像異性体（+）及び（-）を保持時間 55 分付近で分離定量する方法を確立した。

D．結論

血液 5ｇからダイオキシン類を迅速かつ正確に測定できる分析方法を確立し、さらに、分析データの信頼性を確保するためブランク試験、コントロール試験を実施し、分析法の改良を続けている。また、国内の分析機関とクロスチェックを実施し分析データの信頼性を確保した。その結果、平成16年度の血液中ダイオキシン類濃度を加えた改訂油症診断基準による未認定者の診断にも対応した。また、多数の信頼性の高い油症認定患者の血液中ダイオキシン類濃度のデータベースを構築することができ、臨床症状、半減期や遺伝子型との関係の解析に利用されている。

平成29年度（2017年）の血液中ダイオキシン類濃度測定対象は、油症認定患者 135名と未認定者148名であった。平成29年度に測定した油症認定患者と未認定者の平均 Total TEQ（WHO-2005）はそれぞれ45、25pg TEQ/g lipid、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均はそれぞれ67、14 pg/g lipid であった。平成 29 年度の同居家族認定者の検診受診者は10名で、血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均値は14 pg/g lipid で認定患者全体の平均値より低く、一般人とほぼ同じレベルであった。また、平成29 年度油症検診を受診した未認定者（135 名）の中に 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が50 pg/g lipid を超える受診者が2名認められた。

平成13年度から29年度までの16年間に血液中ダイオシン類濃度を分析した油症認定患者は1043名に達した。この 1043 名の油症認定患者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は2.6～1,800 pg/g lipid と広範囲であるが約60%の患者は50 pg/g lipid 以下であった。平成25～29年度に149名の同居家族認定患者が油症検診を受診した。油症認定患者 1043 名のうち、同居家族認定患者149 名とその他の油症患者 894 名及び一般住民の血液中ダイオキシン類濃度を比較すると、同居家族認定者の平均 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度及び Total TEQ は一般住民とほぼ同様の値であった。同居家族認定患者の中に血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が 50 pg/g lipid を超える受診者が 15 名認められた。

平成13年度から29年度までの17年間に血液中ダイオキシン類濃度を分析した未認定者 674 名の血液中ダイオキシン類濃度の平均 Total TEQ は14 pg TEQ/g lipid であり、一般住民の平均 Total TEQ とほぼ同じ値であった。複数回受診した未認定者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の変動は僅かであった。

患者体内における油症原因物質の動態を解明するアプローチとして、PCB 異性体の特徴的な代謝に関与している CYP 分子種を推定した。油症患者血液中 PCB の鏡像異性体（キラル体）分離定量法を確立した。今後

も検討を継続する計画である。

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

F．研究発表

１．論文発表

１） Sakatani, K., Takahashi, K., Takenaka, S., Kajiwara, J., Katsuki, S., Mitoma, C., Furu,e M. Ionic liquid extraction for the determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in soil and sediment. Organohalogen Compounds. 2018. 80.In press.

２．学会発表

１）新谷依子、堀　就英、平川博仙、安武大輔、梶原淳睦、香月　進、岸　玲子、古江増隆, 血液中 PCB 濃度分析のクロスチェック（2017 年度）, 第 27 回環境化学討論会(那覇市)、2018 年 5 月 22-25 日

２） Sakatani, K., Takahashi, K., Takenaka, S., Kajiwara, J., Katsuki, S., Mitoma, C., Furu,e M. Ionic liquid extraction for the determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in soil and sediment. Organohalogen Compounds. 38TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM HALOGENATED PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, Krakow, Poland, 2018, August. 26-31

H. 知的所有権取得

１．特許取得　　なし

２．実用新案登録　なし

３．その他　　なし

表１　油症検診受診者の血液中ダイオキシン類濃度調査結果（2017 年）

(pg/g lipid)

	2017年検診結果								一般の人			
	認定(N=148)				未認定(N=135)				(2004年 , N=127)			
Congeners	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
2,3,7,8-TCDD	1.2	0.83	ND	4.1	1.2	0.91	ND	4.4	1.9	0.84	ND	4.3
1,2,3,7,8-PeCDD	6.1	4.0	ND	19	5.5	3.7	ND	19	9.0	3.4	3.2	20
1,2,3,4,7,8-HxCDD	5.1	39.1	ND	48	2.1	1.7	ND	11	3.6	1.9	ND	13
1,2,3,6,7,8-HxCDD	30	28	ND	160	16	14	ND	96	28	11	7.3	70
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2.5	1.8	ND	9.4	2.9	2.4	ND	15	4.5	2.8	ND	16
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	32	43	6.1	500	37	42	5.8	380	78	55	18	470
OCDD	420	281	76	2200	500	550	80	4200	1200	640	180	7600
Total PCDDs	500	322	99	2700	570	600	100	4600	1300	1000	210	8200
2,3,7,8-TCDF	2.5	1.7	ND	8.0	2.2	2.6	ND	14	1.0	0.72	ND	4.5
1,2,3,7,8-PeCDF	1.0	0.9	ND	8.7	1.1	1.1	ND	5.4	0.67	0.55	ND	4.6
2,3,4,7,8-PeCDF	67	111	2.6	560	14	12	1.4	79	17	7.7	6.0	63
1,2,3,4,7,8-HxCDF	14	29	ND	260	3.7	3.2	ND	25	5.0	2.7	ND	20
1,2,3,6,7,8-HxCDF	7.1	10	ND	84	3.8	3.5	ND	28	5.7	2.6	ND	16
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.2	0.66	ND	5.6	1.2	0.61	ND	5.4	1.2	0.8	ND	5.2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND				ND				ND			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2.4	3.5	ND	34	1.7	1.3	ND	9.5	2.2	2.1	ND	14
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND				ND				ND			
OCDF	2.1	0.9	ND	13	ND				2.1	1.4	ND	18
Total PCDFs	99	148	13	910	32	20	10	140	37	14	15	86
344'5-TCB(81)	5.4	2.3	ND	22	5.3	1.6	5.0	16	5.6	2.3	ND	24
33'44'-TCB(77)	9.5	6.4	ND	39	11	6.8	5.0	36	8.4	4.8	ND	31
33'44'5-PenCB(126)	69	52	ND	260	77	84	5.0	510	110	80	17	520
33'44'55'-HxCB(169)	130	120	11	650	73	65	5.0	300	64	27	16	190
Total Non-*ortho* PCBs	220	151	36	770	170	147	20	830	190	110	59	740
Total	810	480	160	2900	770	707	140	5200	1600	1000	290	8500
PCDDs-TEQ	12	8.2	1.8	58	9	6.3	1.5	36	16	5.9	5.1	35
PCDFs-TEQ	23	37	1.4	200	5.5	4.2	0.9	25	6.6	2.5	2.3	14
Non-*ortho* PCBs-TEQ	11	7.4	1.7	33	10	10	0.65	59	13	8.6	2.6	58
Total TEQ	45	47	5.2	250	25	19	3.1	94	37	16	12	100

表２　油症患者及び一般人の血液中ダイオキシン類濃度比較（2001-2017 年）

(pg/g lipid)

	油症患者(N=1043)					一般の人（N=127、2004年 ）				
Congeners	Mean	SD	Min	Max	Median	Mean	SD	Min	Max	Median
2,3,7,8-TCDD	1.6	1.1	ND	8.6	1.4	1.9	0.84	ND	4.3	1.8
1,2,3,7,8-PeCDD	8.7	5.6	ND	48	7.5	9.0	3.4	3.2	20	8.7
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.9	15	ND	480	2.2	3.6	1.9	ND	13	3.2
1,2,3,6,7,8-HxCDD	36	36	ND	320	24	28	11	7.3	70	25
1,2,3,7,8,9-HxCDD	3.8	3.1	ND	26	3.0	4.5	2.8	ND	16	3.9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	42	48	5.5	1200	33	78	55	18	470	62
OCDD	580	524	72	7900	470	1200	640	180	7600	940
Total PCDDs	680	575	99	9200	560	1300	1000	210	8200	1000
2,3,7,8-TCDF	2.4	4.7	ND	83	1.4	1.0	0.72	ND	4.5	ND
1,2,3,7,8-PeCDF	1.2	1.3	ND	13	ND	0.67	0.55	ND	4.6	ND
2,3,4,7,8-PeCDF	100	178	2.6	1800	33	17	7.7	6.0	63	16
1,2,3,4,7,8-HxCDF	24	54	ND	580	5.9	5.0	2.7	ND	20	4.4
1,2,3,6,7,8-HxCDF	11	18	ND	170	5.4	5.7	2.6	ND	16	5.2
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.2	0.77	ND	8.7	ND	1.2	0.8	ND	5.2	ND
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0	0.38	ND	13	ND	ND				
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2.3	2.8	ND	36	ND	2.2	2.1	ND	14	ND
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.0	0.72	ND	24	ND	ND				
OCDF	2.1	1.6	ND	38	ND	2.1	1.4	ND	18	ND
Total PCDFs	152	247	12	2600	57	37	14	15	86	35
344'5-TCB(#81)	5.6	3.4	ND	49	ND	5.6	2.3	ND	24	ND
33'44'-TCB(#77)	8.6	9.7	ND	150	ND	8.4	4.8	ND	31	ND
33'44'5-PenCB(#126)	95	82	ND	680	74	110	80	17	520	90
33'44'55'-HxCB(#169)	160	140	10	1300	120	64	27	16	190	58
Total Non-*ortho* PCBs	270	200	25	1500	220	190	110	59	740	160
Total	1100	770	161	9700	930	1600	1000	290	8500	1300
PCDDs-TEQ	14	9.6	1.8	76	12	16	5.9	5.1	35	11
PCDFs-TEQ	32	54	1.3	440	11	6.6	2.5	2.3	14	10
Non-*ortho* PCBs-TEQ	14	11	0.82	94	11	13	8.6	2.6	58	9.5
Total-TEQ	60	67	5.2	560	39	37	16	12	100	31
Lipid(%)	0.30	0.07	0.13	0.80	0.29	0.33	0.05	0.22	0.49	0.31
Age(years)	66.4	13	31	98	67	68.1	5.4	60	86	67

表３　油症患者と同居家族認定患者の血液中ダイオキシン類濃度比較（2001–2017 年）

(pg/g lipid)

	油症患者（同居家族認定を除く、N=894）					同居家族認定者（N=149）					一般
Congeners	Mean	SD	Min	Max	Median	Mean	SD	Min	Max	Median	Mean
2,3,7,8-TCDD	1.6	1.1	ND	8.6	1.5	1.4	1.1	ND	7.4	1.3	1.9
1,2,3,7,8-PeCDD	9.4	5.8	ND	48	8.1	6.7	3.8	ND	28	6.3	9.0
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.5	1.9	ND	15	2.2	2.1	1.6	ND	10	ND	3.6
1,2,3,6,7,8-HxCDD	38	37	ND	320	25	22	16	2.9	91	18	28
1,2,3,7,8,9-HxCDD	3.8	3.3	ND	36	3.0	3.6	3.2	ND	17	2.7	4.5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	44	55	ND	1200	35	37	25	7.2	170	31	78
OCDD	610	566	72	7900	490	480	390	77	2900	380	1200
Total PCDDs	710	622	100	9200	590	550	420	100	3200	430	1300
2,3,7,8-TCDF	2.3	5.1	ND	83	1.2	1.5	1.5	ND	7.5	1.0	1.0
1,2,3,7,8-PeCDF	1.2	1.3	ND	13	ND	1.1	1.0	ND	8.3	ND	0.67
2,3,4,7,8-PeCDF	120	191	2.8	1800	41	27	48	2.8	440	15	17
1,2,3,4,7,8-HxCDF	28	59	ND	580	7.5	5.8	11	ND	89	3.2	5.0
1,2,3,6,7,8-HxCDF	13	19	ND	170	6.1	4.7	5.2	ND	35	3.6	5.7
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.2	0.79	ND	8.7	ND	1.1	0.59	ND	5.6	ND	1.2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0	0.11	ND	3.3	ND	1.1	1.0	ND	13	ND	ND
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2.3	3.6	ND	74	ND	1.8	1.8	ND	12	ND	2.2
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.0	0.06	ND	2.7	ND	1.2	1.9	ND	24	ND	ND
OCDF	2.0	1.2	ND	38	ND	2.2	2.9	ND	38	ND	2.1
Total PCDFs	170	265	12	2600	67	48	65	12	570	31	37
344'5-TCB(#81)	5.6	3.4	ND	49	ND	5.3	1.8	5.0	18	5	5.6
33'44'-TCB(#77)	8.2	10	ND	150	ND	7.0	4.4	5.0	23	5	8.4
33'44'5-PenCB(#126)	98	84	ND	680	76	84	72	5	520	68	110
33'44'55'-HxCB(#169)	170	149	10	1300	130	92	68	12	390	69	64
Total Non-*ortho* PCBs	280	206	25	1500	240	190	130	32	840	160	190
Total	1200	810	170	9700	990	780	520	180	3500	660	1600
PCDDs-TEQ	15	10	1.8	76	13	11	6.4	2.6	48	10	16
PCDFs-TEQ	37	59	1.4	437	14	10	16	1.3	140	5.7	6.6
Non-*ortho* PCBs-TEQ	15	11	0.82	94	12	11	8.7	1.0	60	9.3	13
Total-TEQ	67	73	6.3	564	43	32	27	5.7	210	26	37
Lipid(%)	0.29	0.07	0.13	0.80	0.29	0.30	0.06	0.20	0.59	0.30	0.33
Age(years)	66.3	13.6	31	98	67	62.0	10.7	45	90	60	68.1

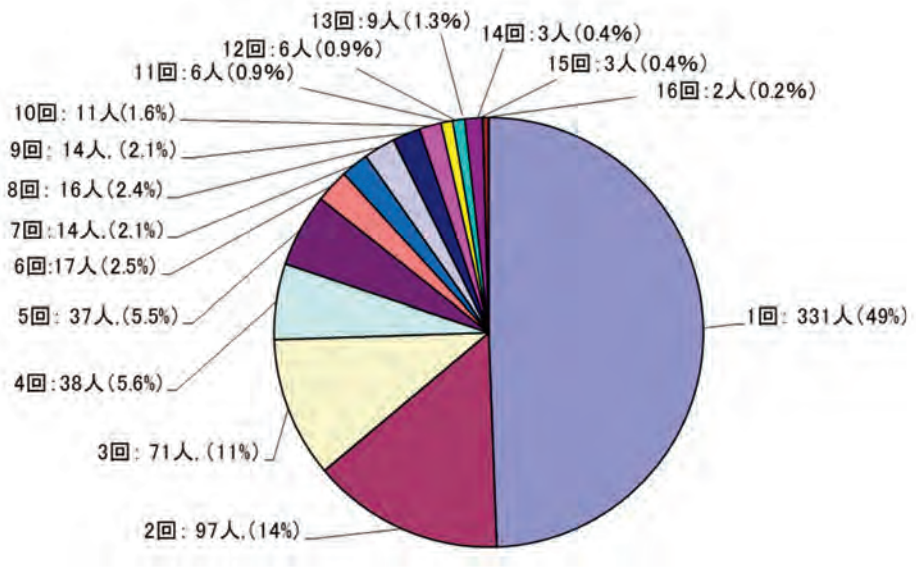


図１　未認定者の検診受診回数（2001-2017 年）

表４　CYP7 種分子種と PCB69 異性体のドッキングシミュレーション結果

酵素標的部位への距離	PCB異性体数						
	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C9	CYP3A4
<5 Å	46	23	37	59	60	5	1
<6 Å	60	64	63	65	65	13	3

表５　血液中 PCB183 の鏡像異性体（キラル体）分離定量条件

GC(7890A, Agilent)	
Column	BGB172, 30 m × 0.25 mm i.d. Film thickness: 0.18 μm
Oven temp.	Initial temperature at 120 °C hold for 2 min → heat up to 250 °C at 2 °C/min → hold at 250 °C for 23 min
Injection port temp.	230 °C
Injection mode and volume	Splitless (Purge time is 1 min), 1 μL
Carrier gas	Helium gas with a purity of greater than 99.999% 1.0 mL/min constant flow
MS(JMS-800D UltraFOCUS, JEOL)	
Resolution	Equal to or greater than > 10000 (10% valley)
Ionization voltage	38 eV
Ionization current	500 μA
Temperature of ion source	260 °C
Accelerating voltage	10kV

分担研究報告書

血液中ダイオキシン類分析における分析カラムの検討

研究分担者　戸高　尊　　公益財団法人北九州生活科学センター　室長
研究協力者　広瀬勇気　　公益財団法人北九州生活科学センター　検査員
上原口奈美　公益財団法人北九州生活科学センター　検査員
千々岩勝己　公益財団法人北九州生活科学センター　常務理事
池田光政　　公益財団法人北九州生活科学センター　理事長

研究要旨　油症患者の血液中ダイオキシン類濃度の測定は、大量注入装置を装備したガスクロマトグラフ高分解能質量分析装置を用いて行っている。大量注入装置内の分析カラムに関しては、他のカラムを検討することもなく、現在まで同じカラムを用いて分析を行ってきた。今回、現在使用しているカラムと固定相の極性が類似したカラムを選択して、ダイオキシン類異性体のS/N比の改善に関して検討を行った。その結果、従来使用していたカラムと比較して、低ブリードであること；各異性体のピーク強度が向上していること；すべての異性体で高いS/N比が得られていることから、従来よりも高精度・高感度な分析を行うことが可能となった。

A．研究目的

油症はポリ塩化ジベンゾダイオキシン(PCDDs)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs),ポリ塩化ビフェニール(PCBs)およびポリ塩化クアテルフェニル(PCQs)が混入したカネミオイルを摂取して発症した複合中毒である。油症の発生から45年以上経過しているが、いまでも何人かの患者が、ダイオキシン類特有の症状に悩まされている。我々は、油症患者のダイオキシン類による人体汚染とその健康影響を把握する目的で、患者の血液中PCDDs, PCDFs, PCBsおよびPCQs濃度の測定を行ってきた.

油症患者の血液中ダイオキシン類濃度の分析は、大量注入装置を装備したガスクロマトグラフ高分解能質量分析装置を用いて行っている。大量注入装置内の分析カラムに関しては、他のカラムを検討することもなく、常に同じカラムを用いて分析を行ってきた。近年、カラムブリードによる測定への悪影響が顕著になり、高精度・高感度な分析を維持するのが困難な状況なので、他の分析カラムを検討する必要性が生じた。今回、現在使用しているカラムと固定相の極性が類似しているカラムを選択し、ダイオキシン類異性体のS/N比の改善に関して検討を行った。

B．研究方法

1．分析カラム

これまで血液中ダイオキシン類の測定に用いていたカラムは、プレカラムとして、BPX5 (5%フェニルポリシルフェニレンシロキサンカラム、7m×0.25 mm)で膜厚0.25μm、分析カラムとして、BPX 系(30 m×0.15 mm)を使用してきた (膜厚に関

する情報は企業秘密)。今回、Agilent Technologies の VF-5ms(5%フェニルメチルカラム) を現在使用しているカラムと同じ長さおよび同じ径のサイズで、プレカラムとして膜厚 0.15、0.20 および 0.25μm の 3 種類と、分析カラムとして膜厚 0.10、0.15 および 0.20μm の 3 種類を製造依頼した。ダイオキシン類の分析条件に関しては、従来使用していたカラム使用時と、すべて同じ条件下で行った。

2. 分析方法

ダイオキシン類の分析には、胃袋型インサートを取り付けた PTV 注入口装置 (LVI-S200、アイスティサイエンス社製) と Solvent cut large volume injection system (TRAJAN 社製)を装備した高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置 (HRGC/HRMS) を使用した (図 1)。HRGC/HRMS に関して、GC 部は Agilent 社製 7890A、MS 部は Micromass 社製 AutoSpec Premier を用い, 注入には 100μl のシリンジを備えたオートサンプラー Combi-PAL (CTC Analytics 社製)を使用した[1)2)]。

(倫理面への配慮)

本研究の結果においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C. 研究結果・考察

膜厚 0.10μm の分析カラム(30 m×0.15 mm)を用い、ダイオキシン類異性体の溶出パターンおよび S/N 比に及ぼすプレカラムの膜厚の影響を調べた。プレカラム(7 m×0.25 mm)として膜厚 0.15、0.20 および 0.25μm を用い、ダイオキシン類標準液 (0.25pg) を注入後に得られた各クロマトグラムを比較した結果、各異性体の溶出パターンは従来使用していたカラムとすべて同様であった。各プレカラム使用時に得られたクロマトグラムから算出したダイオキシン類異性体の S/N 比は、顕著な差はなくほとんど同じで、プレカラムの膜厚はダイオキシン類異性体の分析にほとんど影響を及ぼさなかった。従来法と同様に、プレカラムとして膜厚 0.25μm のカラム、分析カラムとして膜厚 0.10、0.15 および 0.20μm のカラムを用いて、標準液 (0.25pg) を注入後、得られたクロマトグラムを比較した。各異性体の S/N 比に関しては、膜厚が薄いカラムの方が若干高い S/N 比が得られたが、膜厚 0.10 および 0.15μm の分析カラムを使用した場合、高塩素化体のピークがテーリングしていた。hexaCDDs および hexaCDFs の分離に関しては、膜厚が厚いタイプの方が、分離が良好であった。以上の結果から、今回検討した分析カラムの中で、膜厚 0.20μm の分析カラムを用いた場合に最も良好な結果が得られた。この条件下で、標準液 (0.25pg) を注入後に得られた各異性体のクロマトグラムから算出した S/N 比を従来法の結果と比較した。その結果、今回検討したカラムの方が、従来使用していたカラムよりカラムブリードが少なく、すべてのダイオキシン類異性体で高い S/N 比が得られていた (表 1)。

D. 結論

近年、血液中ダイオキシン類の分析に使用していた分析カラムのカラムブリードによる測定への悪影響が顕著に見られ、この問題を解決するために現在使用しているカラムと固定相の極性が類似したカラムを選択して、ダイオキシン類異性体の S/N 比の改善に関して検討を行った。今回、Agilent Technologies 製のカラムに関する検討を行い、プレカラムとして膜厚 0.25μm および分析カラムとして膜厚 0.20μm のカラムを用いた場合、従来使用していたカラムと比較して、低ブリ

ードであること；各異性体のピーク強度が向上していること；すべての異性体で高いS/N比が得られていることから、従来よりも高精度・高感度な分析を行うことが可能となった。

血液中ダイオキシン類の分析を、胃袋型インサートを備えた大量注入法とSCLV injection systemを連結して行った場合、試料注入後、注入した試料中の溶媒がほとんどプレカラムにより系外に排出され、分析目的成分のみが分析カラムに導入される。そのため、ダイオキシン類異性体の良好な分離が得られるばかりでなく、ピークの半値幅が狭くなり、ピーク強度が向上する。この原理を応用して、さらに内径の細い分析用ナローボアカラムを用いることでダイオキシン類異性体のピーク強度が向上しS/N比の改善が期待される。この新しいテクニックを現在検討中である。

Ｅ．研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

1）広瀬勇気、戸髙尊、上原口奈美、福島直、今地政美、三苫千景、古江増隆：血液中ダイオキシン類分析における分析カラムの検討、第27回環境化学討論会（沖縄）、2018年5月22-25日。

Ｆ．知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

1) Todaka T, *et al.* Concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins,polychlorinated dibenzofurans,and non-*ortho* and mono-*ortho* polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. Chemosphere 2007; 66: 1983-1989.

2) Todaka T, *et al.* Development of a Newly Large-Volume Injection System for Dioxin Determi-nations in Blood of Yusho Patients. Fukuoka Acta Medica 2013; 104(4).

表 1　10fg注入時におけるダイオキシン類異性体のS/N比

Congeners	S/N比	
	従来法のカラム	検討したカラム
2,3,7,8-TetraCDD	8.3	13.6
1,2,3,7,8-PentaCDD	5.1	14.4
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	6.9	18.9
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	7.1	19.6
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	7.6	19.7
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	9.6	17.3
OctaCDD	6.2	12.3
2,3,7,8-TetraCDF	6.5	10.8
1,2,3,7,8-PentaCDF	10.4	15.8
2,3,4,7,8-PentaCDF	8.7	15.8
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	5.6	17.0
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	6.3	17.2
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	5.0	15.4
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	5.1	10.4
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	12.7	28.9
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	8.9	22.2
OctaCDF	5.2	9.7
TetraCB-81	12.5	12.8
TetraCB-77	12.4	12.7
PentaCB-126	12.4	19.9
HexaCB-169	11.8	18.0

CDD : chlorinated dibenzo-*p*-dioxin.
CDF : chlorinated dibenzofuran.
CB : chlorinated biphenyl.

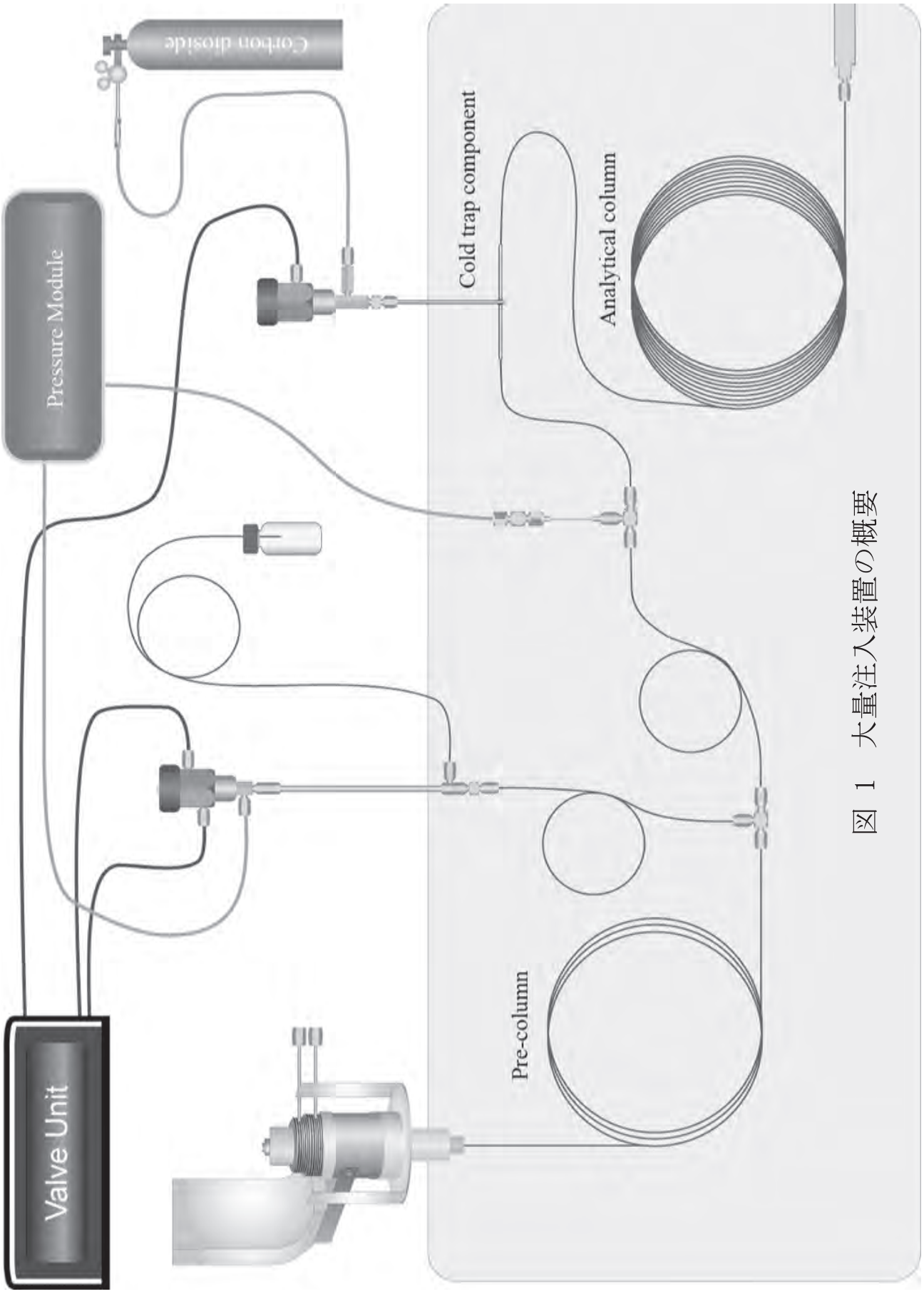


図 1　大量注入装置の概要

分担研究報告書

食品を介したダイオキシン類等の人体眼部への影響に関する研究

研究分担者　園田康平　九州大学大学院医学研究院眼科学分野　教授

研究要旨　平成 30 年度油症患者の眼症状を追跡調査した。

A．研究目的

研究の目的は、油症患者の眼所見の把握および治療法の確立である。したがって、患者の眼症状を把握し、その症状、苦痛を除くことに関する研究である。

B．研究方法

平成 30 年度の油症検診が下記の通り行われた。
8 月 9 日久留米会場・受診者数 24 名（うち患者 21 名・未認定者 3 名)、8 月 18 日福岡会場・受診者 62 名（うち患者 58 名・未認定者 4 名)、8 月 22 日北九州会場・受診者 36 名（うち患者 33 名・未認定者 3 名)、8 月 23 日北九州会場・受診者 39 名（うち患者 36 名・未認定者 3 名)、9 月 1 日福岡会場・受診者 55 名（うち患者 42 名・未認定者 13 名)。受診者合計は 212 名（うち患者 186 名・未認定者 26 名）であった。

眼科的所見として、眼脂過多、眼瞼浮腫、眼瞼結膜色素沈着、瞼板腺嚢胞形成、瞼板腺チーズ様分泌物圧出の 5 項目を検討した。

C．研究結果

今年の受診者は 212 名であり、前年度よりも 27 名少なかった。

自覚症状では眼脂過多を訴えるものが多かったが、その程度は軽く、油症の影響とは考えにくかった。他覚所見として慢性期の油症患者において診断的価値が高い眼症状である眼瞼結膜色素沈着と瞼板腺チーズ様分泌物を認めるものも少数見られた。

D・E．考察・結論

受診者の高齢化が進み臨床所見は少なくなってきている。また、油症患者の眼科領域における臨床所見は徐々に軽くなっているが、今後の慎重な経過観察が必要である。さらに油症との直接の関係はないが、白内障の手術を受けた受診者が多く見られた。これは受診者の高齢化が主な原因と思われる。

F．研究発表

１．論文発表　なし
２．学会発表　なし

G．知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得　なし

２．実用新案登録　なし

３．その他　なし

分担研究報告書

油症患者における眼圧

研究分担者　上松 聖典　長崎大学病院眼科　講師
研究協力者　北岡 隆　　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 眼科・視覚科学分野　教授

研究要旨：眼圧が高値になると緑内障となり不可逆的な視野欠損をきたすことがある。今回油症認定患者の眼圧を測定し、血中のPCB濃度およびCB比が眼圧と関連するか検討した。

A. 研究目的

眼圧は眼球の形状を保つために必要な内圧であり、正常値は10～20mmHgとされている。緑内障では視神経乳頭陥凹により不可逆的な視野欠損をきたすが、高眼圧が視神経乳頭陥凹の最も重要な原因である。今回油症認定患者での眼圧について調査し、血中のPCB濃度およびCB比が眼圧と関連するか検討した。

B. 研究方法

長崎県油症検診の3地区すなわち、玉之浦、奈留、長崎地区において2018年度油症検診の眼科部門を受診し、眼圧の測定が可能であった油症認定患者89人を対象とし、アイケア®を用いて眼圧を測定した。左右の平均眼圧と血中PCB濃度が関連するか統計解析を行った。またCB比のデータを得られた87人においては眼圧とCB比が関連するか統計解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究のデータ解析においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C. 研究結果

対象者は男性51人、女性38人で、年齢は中央値69歳（54～94歳）であった。眼圧は13.7±2.1mmHg（平均±標準偏差）であった。血中PCB濃度は1.39±1.07ppbであり、CB比は2.48±1.99であった。眼圧と血中PCB濃度に有意な関連はなく（P=0.28）（図1）、眼圧とCB比有意な関連はなかった（P=0.60）（図2）。

D. 考察

眼圧の上昇は緑内障を引き起こす。緑内障は、厚生労働省研究班の調査によると、我が国における失明原因の第1位を占めている。日本緑内障学会で行った大規模な調査（多治見スタディ）では、40歳以上の日本人における緑内障有病率は5.0％であり、平均眼圧は14.5±2.5mmHg、正常の眼圧は10～20 mmHgであることが報告された。[1)]

今回の調査では油症認定患者での眼圧は正常範囲で、血中PCB濃度やCB比との関連は認められなかった。血中PCDF濃度については得られたデータが少なく、眼圧との関連は調査していない。これまでダイオキシン類の摂取や血中PCB濃度と眼圧との関連を指摘した報告は、

我々の調べた限りなく、今回の調査でも明らかな関連は認められなかった。

E. 結論

油症認定患者の平均眼圧は正常範囲内であり、血中PCB濃度やCB比との関連は認められなかった。

F. 研究発表　なし

G. 知的財産権の出願・登録状況　なし

参考文献

1) Iwase A, et al. Ophthalmology. 2004; 111 (9) : 1641-1648

図 1. 油症認定患者における血中 PCB 濃度と平均眼圧

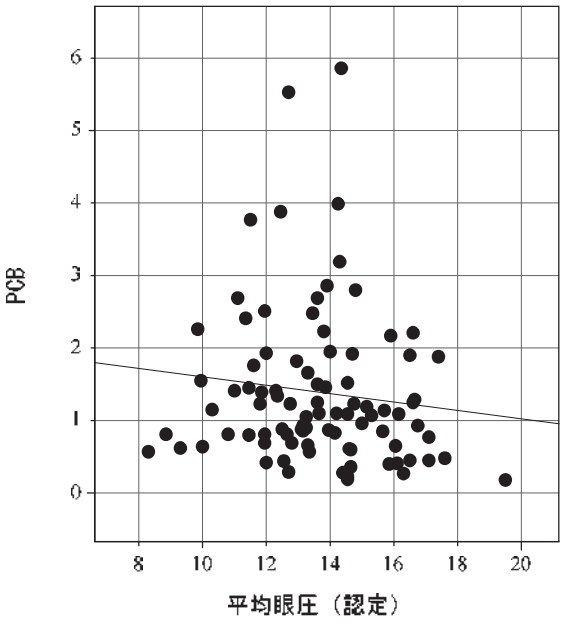
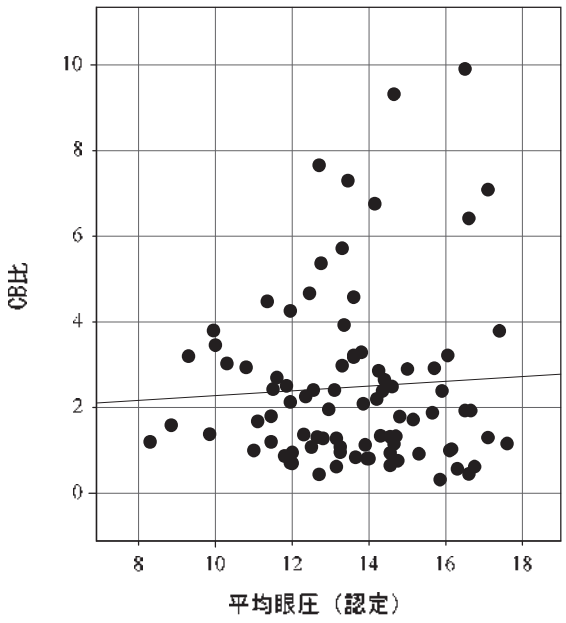


図 2. 油症認定患者における CB 比と平均眼圧



分担研究報告書

油症患者における口腔細菌数に関する検討

研究分担者　川崎　五郎　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
吉冨　泉　諫早総合病院歯科口腔外科

研究要旨　油症患者において口腔粘膜色素沈着は現在でもよくみられる症状のひとつである。今回、平成 30 年度の長崎県油症検診において、口腔粘膜色素沈着、口腔内細菌数、口腔乾燥症、義歯装着状態について検討を行った。今回の結果では、口腔粘膜色素沈着は認定者において有意に多くその発現が認められた。義歯装着患者の歯槽部・歯肉部においては有歯部においては色素沈着がみられたが、無歯部においては見られなかった。今回調査した症例においては認定の有無と口腔乾燥、口腔細菌数との間には相関性がみられず、口腔粘膜色素沈着と口腔乾燥および口腔細菌数との間にも有意差はみられなかった。今後さらに症例数を増やして検討する必要があると思われた。

A．研究目的

油症患者における口腔領域の症状として、歯肉および口腔粘膜色素沈着が主症状として挙げられる。しかしながら、口腔乾燥症の訴えも多く、また多くの油症患者が歯科治療を受けているにもかかわらず、歯周疾患を訴える患者もしばしばみられる。これまで、臨床的検討として年度毎に口腔乾燥に関する調査や口腔カンジダおよび口腔細菌数に関する調査を行ってきたが、全数調査ではないものの、油症患者においてこれらの症状に対する明らかな統計学的に有意な差はみられなかった。しかしながら、例年施行している歯科検診の結果では、油症発症以来 50 年ほど経過するが、明らかに口腔粘膜色素沈着を有する油症患者数は多く、また、歯周疾患を有する患者も多い。今回は、口腔粘膜色素沈着に対して、義歯の使用状況、口腔細菌数、口腔乾燥との関係について検討を行った。

B．研究方法

平成 30 年度長崎県地域における油症検診において、通常の歯科検診を行うことのできた患者の中からを任意に測定する患者を選択した。その際、義歯の使用状況を調査し、口腔乾燥の訴えについて問診した。細菌数の測定は、舌背における細菌数を細菌カウンターを用いて測定した。

（倫理面への配慮）

本研究の解析結果においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C．研究結果

平成 29 年度長崎県油症検診で歯科検診を行った患者を対象者とした。 内訳は長崎地区 18 名、五島玉之浦地区 20 名の計 38 名であった。性別では男性 18 名、女性 20 名で、年齢別では 35 歳から 88 歳で平均 66 歳であった。認定の有無に関しては、認定者 32 名、未認定者は 6 名であった。口腔粘膜に色素沈着に関しては、色素沈着の見られる者が 21 名で、認められない者が 17 名であった。可撤性義歯の装着に関しては、義歯装着者が 16 名（27 顎）であった。義歯の種類に関しては総義歯が 12 顎、部分義歯が 15 顎であった。口腔乾燥の訴えに関しては、訴え有りが 13 名、訴えなしが 25 名であった。口腔内細菌数の

測定が可能であったのは18名で、測定値は3.21 x10^6から64.2 x10^6（平均21.5x10^6）であった。口腔粘膜色素沈着は認定者に有意に多かったが、口腔乾燥、義歯装着状態、口腔細菌数と認定、未認定には有意差は認められなかった。口腔粘膜色素沈着と口腔乾燥の間には関連性がみられなかったが、色素沈着のある患者に口腔細菌数が高い傾向がみられた。口腔粘膜色素沈着と義歯装着の有無との間には有意差がみられなかったが、部位別にみると、特に歯肉において義歯の有床部位には色素沈着が認められなかった。

D．考察

油症発症当時、さまざまな口腔症状が報告されているが、現在でも、多くの油症患者に口腔粘膜色素沈着が認められる。われわれが調査した2016年度の歯科検診においても統計学的に有意に油症患者で口腔粘膜色素沈着が多く発現していた。今回の調査では、口腔粘膜色素沈着と口腔乾燥、義歯との関連、口腔細菌数との関連について検討した。

口腔乾燥は油症における歯科検診で訴えの多い症状であるが、以前の検討では、口腔乾燥を測定する装置を用いて調査した口腔乾燥状態の数値とは必ずしも一致しなかった。口腔粘膜色素沈着を有する患者では辺縁歯肉部における色素沈着も多く、口腔乾燥状態との何らかの関連の可能性も考えられたが、今回の結果では口腔乾燥と色素沈着には関連は認められなかった。しかしながら、のどの渇きを口腔乾燥と訴えているケースがあることや、実際の口腔乾燥と比較していないため明確ではない。今後検討の必要性があると思われる。

口腔細菌数に関しては、歯周組織の炎症には関連する可能性があるが、認定の有無との関連性は認められなかった。口腔粘膜色素沈着を有する患者では口腔細菌数が増加する傾向がみられたが、測定した患者数が少なく、測定部位が舌背部であったことから、今後は歯槽部をはじめ他部位での検討が必要と思われた。

口腔粘膜色素沈着の有無と義歯装着の有無とで検討したが、両者に統計的有意差は認められなかった。しかしながら、部分床義歯を有する場合、残存歯の部位の歯肉部には色素沈着の認められる症例もあったが、無歯部には色素沈着が認められなかった。さらに総義歯の患者においては、頬粘膜や口唇に色素沈着がみられる場合はあったが、義歯で覆われる部位の粘膜部には色素沈着が認められなかった。歯の喪失によって色素沈着がなくなるのか、義歯床の刺激によって色素沈着がなくなるのかなど、今後の検討が必要と思われる。今回は対象症例が少なく、これらの調査は困難な点も多々あるが、多数症例での検討や、これまでの記録を利用した検討が必要と思われる。

E．結論

油症患者における口腔粘膜色素沈着、口腔細菌数、口腔乾燥について検討をおこなった。口腔粘膜色素沈着は認定者に多く認められた。義歯との関係や口腔乾燥との関係は今後さらに検討する必要があると思われた。

F．研究発表

学会発表

なし

G．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

なし

分担研究報告書

油症患者における運動機能評価

研究分担者　福士純一　九州大学大学院医学研究院
人工関節・生体材料学講座　准教授

研究要旨　2016 年度全国油症一斉検診の福岡県での受診者において、運動機能を評価した。ファンクショナルリーチテスト、４ｍ歩行に要する時間、手指筋力および足趾把持力を計測した。男性においては、total 06 TEQ がファンクショナルリーチおよび握力と負に関連した。女性においては、ダイオキシン類濃度と運動機能との間に明らかな関連を認めなかった。

A. 研究目的

油症被害者の高齢化が進むに伴い、運動器機能の低下が懸念されるが、ダイオキシン類が運動器疾患に及ぼす影響については不明な点が多い。油症検診受診者における運動器機能について評価検討することが、本研究の目的である。

B. 研究方法

2016 年度油症一斉検診の福岡県での受診者（142 名）を対象とした。身体所見として、身長、体重に加えて、体組成計を用いて筋肉量、脂肪量を計測した。運動機能評価として、ファンクショナルリーチテストおよび４ｍ歩行に要する時間を測定した。さらに、手指の握力および足趾把持力を測定した。左右で測定したが、有意な左右差を認めなかったため、握力、足趾ともに右側の測定値を用いた。

ダイオキシン類濃度については、2013 年から 2015 年の間に一斉検診にて測定された結果を用いて解析を行った。ダイオキシン類濃度としては、総合的な曝露の指標として total 06 TEQ の対数値を用いた。両側 $p<0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。

（倫理面への配慮）

データ解析は、匿名化された結果を用いて行われ、個人情報の保護につい厳重な配慮がなされた。

C. 研究結果

解析対象者は男性 65 名（認定者 58 名,89%）、女性 77 名（認定者 57 名、74%）で、平均年齢は男性 65.7 才、女性 64.7 才、平均 BMI は男性 23.8、女性 22.3 であった。

ファンクショナルリーチに関連する因子を表１に示す。年齢、身長、筋肉量、握力、足趾把持力、total 06 TEQ にて多変量解析を行うと、男性では total 06 TEQ とファンクショナルリーチに有意な負の関連を認めた（$p = 0.017$）。女性では身長と握力のみ有意な関連を認めた。

４ｍ歩行時間に関連する因子を表

２に示す。年齢、身長、筋肉量、握力、足趾把持力で調整すると、男女ともにtotal 06 TEQとの有意な関連を認めなかった。

握力に関連する因子を表３に示す。年齢、身長、筋肉量、足趾把持力で調整すると、男性でのみ total 06 TEQと有意な負の関連を認めた(p = 0.0245)。

足趾把持力に関連する因子を表４に示す。年齢、身長、筋肉量、握力で調整すると、男女とも total 06 TEQとの有意な関連を認めなかった。

D. 考察

ダイオキシン類が運動器に及ぼす影響については、不明な点が多い。Sevesoでの TCDD曝露の疫学研究では、握力、歩行速度、手指の巧緻握力との関連が検討されたが、いずれも TCDD濃度との間に明らかな関連がなかったと報告されている(Ames, 2018)。今回はファンクショナルリーチ、４m歩行速度、握力および足趾把持力を評価し、total 06 TEQとの関連の有無を検討した。身長、体重、筋肉量で調整すると、男性において、ファンクショナルリーチと握力でダイオキシン類濃度との有意な負の関連を認めた。

ファンクショナルリーチテストは、動的バランスを簡便に評価できる方法で、立位において前方へどれだけ手を伸ばすことができるかを測定するものである。リーチの低下は、転倒しやすさと関連することが報告されている（Alenazi, 2017)。また握力は、サルコペニアの診断基準に含まれ、総合的な運動機能の優れた指標として用いられている。近年、握力が死亡リスクの指標となることも示されている（Leon, Lancet 2015)。

今回の検討では、運動器機能に影響を与える他の要因、既往歴や併存症について解析に加えていない。今後は整形外科疾患や脳血管疾患の既往を調査に加え、ダイオキシン類が運動器機能に与える影響について解析を進めたい。

E. 結論

Total 06 TEQは男性において、ファンクショナルリーチおよび握力と負に関連した。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

Ames J, et al. 2018. Neurocognitive and physical functioning in the Seveso Women's Health Study. Environ. Res. 162:55-62.

Alenazi AM, et al. 2017. Functional Reach, Depression Scores and Number of Medications are Associated with Number of Falls in People with Chronic Stroke. PM R. doi: 10.1016/j.pmrj.2017.12.005.

Leong DP et al. 2015. Prognostic

value of grip strength: fi ndings from the Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study. Lancet 386:266-273.

表1：ファンクショナルリーチとの関連：多変量

	男性				女性			
	b	Standard error	t	p	b	Standard error	t	p
Age	0.1626322	0.128636	1.26	0.2128	−0.125487	0.091258	−1.38	0.1742
Height	0.3945988	0.288482	1.37	0.1783	0.4872851	0.192674	2.53	0.0141
Muscle mass（kg）	0.0918823	0.320907	0.29	0.776	−0.184179	0.306455	−0.6	0.5501
Grip power R（kg）	−0.050298	0.25642	−0.2	0.8454	0.4034887	0.189326	2.13	0.0372
Toe grip power R(kg)	0.5216215	0.336659	1.55	0.1284	0.2633973	0.289112	0.91	0.3659
Log[Total 06-TEQ]	−4.078505	1.644629	−2.48	0.017	−0.9811	0.952079	−1.03	0.3069

平成30年度厚生労働行政推進調査事業費補助金

表2：4M歩行時間との関連：多変量

	男性				女性			
	b	Standard error	t	p	b	Standard error	t	p
Age	−0.006762	0.114333	−0.06	0.9531	0.0206167	0.011568	1.78	0.0797
Height	−0.609405	0.258061	−2.36	0.0226	−0.088157	0.023294	−3.78	0.0004
Muscle mass（kg）	0.4899113	0.274994	1.78	0.0816	0.1333505	0.038684	3.45	0.001
Grip power R（kg）	−0.14679	0.226209	−0.65	0.5197	−0.049477	0.024021	−2.06	0.0437
Toe grip power R(kg)	0.295504	0.298024	0.99	0.3267	−0.048862	0.036686	−1.33	0.1878
Log[Total 06-TEQ]	0.4234022	1.471497	0.29	0.7749	0.2401731	0.120897	1.99	0.0515

表3：握力との関連：多変量

	男性				女性			
	b	Standard error	t	p	b	Standard error	t	p
Age	−0.054754	0.077114	−0.71	0.4812	−0.060692	0.060673	−1	0.321
Height	0.2518264	0.171928	1.46	0.1497	0.1866969	0.120852	1.54	0.1275
Muscle mass（kg）	0.1496828	0.179455	0.83	0.4084	0.1607535	0.203498	0.79	0.4326
Toe grip power R(kg)	0.6377272	0.1788	3.57	0.0008	0.51006	0.182821	2.79	0.007
Log[Total 06−TEQ]	−2.204849	0.948922	−2.32	0.0245	−0.233044	0.638498	−0.36	0.7164

平成30年度厚生労働行政推進調査事業費補助金

表4：足趾把持力との関連：多変量

	男性				女性			
	b	Standard error	t	p	b	Standard error	t	p
Age	−0.064577	0.055311	−1.17	0.2489	0.0049657	0.040042	0.12	0.9017
Height	−0.002612	0.127234	−0.02	0.9837	0.0939571	0.079752	1.18	0.2433
Muscle mass（kg）	−0.003309	0.130831	−0.03	0.9799	0.0345901	0.133844	0.26	0.7969
Grip power R（kg）	0.3340187	0.093649	3.57	0.0008	0.218682	0.078382	2.79	0.007
Log[Total 06−TEQ]	0.9202673	0.712587	1.29	0.2029	0.0130998	0.418522	0.03	0.9751

分担研究報告書

油症患者における手掌紅斑の検証

研究分担者　三苫千景　九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　准教授
研究協力者　貝沼茂三郎　九州大学大学院医学研究院地域医療教育ユニット　准教授
研究協力者　宮崎昭行　医療法人　山内診療所　診療所長

研究要旨　手掌紅斑は末梢血管拡張を反映し、慢性肝疾患などの全身疾患患者にみられる皮膚所見である。近年、油症検診において、多くの油症患者に手掌紅斑がみられることに気付いた。そこで、平成 30 年度福岡県油症検診受検者の手掌紅斑の有症率を検証した。

A．研究目的

油症発生当初、多くの患者の顔面、耳前部、外陰部にざ瘡様皮疹、黒色面皰や色素沈着がみられた。発生から約 50 年が経過し、これらの皮膚症状は軽減している。検診時の皮膚診察において両手掌が紅く腫脹した方をみる機会が多い。手掌紅斑は、皮膚の血管拡張を反映した所見で、手掌の母指球、小指球や手指の基部に小紅斑が集簇し融合する。皮膚温は高く、毛細血管と細小動脈の拡張、増加を反映している。慢性肝疾患患者の 77.2%にみられ[1]、エストロゲン不活化障害やアンドロゲンの関与が推測される。しかし、肝疾患以外の全身疾患患者にもみられるため、他の要因の関与も考えられている。

手掌紅斑は血流障害により生じる、東洋医学的にいう“お血”スコアの一つでもある。油症患者において駆お血剤の一つ、桂枝茯苓丸は全身症状、皮膚症状、呼吸器症状を改善しており[2]、ダイオキシン類曝露が“お血”状態を生じるのに寄与しているかもしれない。そこで、まず手掌紅斑の有症率を把握すべく、平成 30 年度福岡県油症検診において、手掌紅斑の有症率を検証した。

B．研究方法

平成 30 年度福岡県油症検診を受けた 163 名[認定者 143 名(男性 68 名、女性 75 名)、未認定者 19 名（男性 4 名、女性 15 名)]を対象にした。一眼レフカメラ(NIKON D5600）を用いて、黒布上で両手掌を撮影した。手掌紅斑の有無は、複数の小紅班が手掌、手指腹部全体に及ぶ場合を“あり”、母指球、小指球や手指基部に限局する場合を“部分的にあり”、ない場合を“なし”と 3 段階で写真画像により判定した。

（倫理面への配慮）
本研究は、カネミ油症の実態調査（許可番号 30-70）の研究の一つで、九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

C．研究結果

認定者の年齢（中央値、最小―最大値、標準偏差）は、男性（66、42-89、12.09)、女性（68、48-86、10.5）だった。未認定者の年齢の最小、最大値は、男性は 4 名で 48―65 歳、女性は 15 名で 23―71 歳だった。
直近の血液中
2,3,4,7,8-pentanchlorodizennbofuran（PeCDF）濃度[中央値（標準偏差)、最低―最高]は、認定者男性（68 名）で 15.4975(80.4326) pg/g lipid、2.646―478.914 で、認定者女性(73 名)、41.355

(228.016) pg/g lipid、3.512―1150.607だった。手掌紅斑の有症率は表1に示す。手掌紅斑“あり”は、認定者143名中93名（65.0%、男性55名、女性38名）にみられ、そのうち女性2名が非常に強い紅斑、女性5名に強い紅斑がみられた。“部分的にあり”は認定者30名（21.0%、男性7名、女性23名）、“なし”は20名（14.0%、男性6名、女性14名）だった。認定者の86.0%に手掌全体もしくは部分的に紅斑がみられ、中でも男性では68名中62名（91.2%）と高率にみられ、女性では、75名中61名（81.3%）にみられた。未認定者の対象者は19名で、“あり”が9名（47.4%、男性2名、女性7名）、“部分的にあり”が8名（42.1%、男性1名、女性7名）、“なし”が2名（10.5%、男性1名、女性1名）だった。

D．考察

手掌紅斑は認定患者の 86.0%に部分的、もしくは手掌全体にみられた。中でも、男性の有症率が高かった。今回の研究は対照群の人数が少なく、性別、年齢などで補正していないため、解釈に注意を要する。今後、血液中ダイオキシン類濃度との相関、サーモグラフィーによる皮膚表面温度との関連について解析する予定である。

E．結論

油症患者において、手掌紅斑の高い有症率が確認された。

F．引用文献

1) 北村啓次郎、他. 肝疾患の皮膚病変―自験肝疾患患者73例にみられた皮膚病変とその頻度について. 皮膚臨床 31: 15-21, 1989.

2) Mitoma C, et al. Current state of yusho and prospects for therapeutic strategies. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018; 25(17): 16472-80.

研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

なし

G．知的財産権の出願・登録状況

該当なし

認定

手掌紅斑	あり	部分	なし	計
男性	55	7	6	68
女性	38	23	14	75
計	93	30	20	143

未認定

手掌紅斑	あり	部分	なし	計
男性	2	1	1	4
女性	7	7	1	15
計	9	8	2	19

表1. 手掌紅斑の有症率

分担研究報告書

ダイオキシン類により高濃度暴露された油症患者における不眠：全国横断調査結果報告

研究分担者　近藤　英明　九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　助教

研究要旨

【研究背景】ダイオキシン類による健康被害である油症患者140人を対象としたパイロット研究では、不眠は高率に認められ、ダイオキシン類の血中濃度が高いことは睡眠の質の低下に影響を及ぼしていた。本研究は油症患者全体を対象として不眠とダイオキシン類の毒性との関連性を明らかにするために実施した。

【方法】対象は日本在住の油症認定患者で、これまでダイオキシン血中濃度測定が行われた899人（男性46.3%、年齢の中央値（IQR）：66（58-78）歳）を解析対象とした。不眠に関する症状とダイオキシン類21異性体の血中濃度から算出した毒性等量（toxic equivalent quantity：TEQ）の総和との関連性を検討した。

【結果】入眠困難もしくは睡眠維持困難を有する者（difficulty initiating and/or maintaining sleep：DIMS）は753人（53.4%）であった。レストレスレッグス症候群/Willis-Ekbom病が疑われる者（RLS/WED群）とRLS/WEDとは判定されないものの下肢を動かしたい衝動感を訴える者（LMR群）はそれぞれ76人（9.1%）と299人（36.0%）であった。総TEQを四分位で4群にカテゴリー化（Q1-Q4：＜ 20（reference）、20－35、35－62、≧ 62 pg-TEQ/g lipid）すると、DIMS群に対するQ2-4の調整済みオッズ比（95%CI）は、それぞれ1.89（1.23－2.89）、1.62（1.02－2.57）、及び2.09（1.24－3.53）で、RLS/WED群とLMR群の調整済みオッズ比は、それぞれ1.74（1.04-2.91）、2.35（1.71-3.24）であった。

【結語】油症患者における不眠の有症状率は高率であり、総TEQが最も高いダイオキシン類の毒性が高度な群だけでなく、一般住民でも確認される総TEQレベルにおいても不眠と関連していた。生活環境から生体に取り込まれるダイオキシン類は、油症患者だけでなく一般住民の不眠を含めた睡眠・覚醒障害の病態生理に関係する環境因子の一つとして基礎・臨床の両面での研究が必要とされている。

A．研究目的

2017年に我々が行った油症患者140人を対象とした睡眠障害の調査では，不眠症状とレストレスレッグス症候群/Willis-Ekbom病（restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease：RLS/WED）は高率であった．また，高いダイオキシン類血中濃度とRLS/WEDの症状とは，睡眠の質の低下に影響を及ぼしていた[1]．この研究は，ダイオキシン類が睡眠の質の低下に関わりうることを示した世界で初めての報告であったが，油症の主要原因物質の2,3,4,7,8- PeCDFのみとの関連性を検討しており，その他の異性体を含めた毒性との関連は評価していなかった．また，対象者は一部の地域の140人のみであった．

そこで，今回，ダイオキシンの毒性と

不眠，RLS/WED との関連性をより多数例で明らかにするために本研究を計画した．毎年行われている全国の油症認定患者を対象とする実態調査に不眠と RLS/WED に関連する症状を質問する項目を追加して，1,410 人から回答・同意を得た．ダイオキシン類の血中濃度はこれまでに測定されている 21 異性体の測定結果を今回のデータと突合した．その結果，ダイオキシン類の毒性は油症患者で認められる明らかに高い範囲だけでなく，一般住人でも観察されるより低いレベルにおいても，入眠困難や睡眠維持困難と関連していることが明らかとなった．また，RLS/WED 関連症状も入眠困難や睡眠維持困難と関連していた．

B．研究方法

対象および倫理面への配慮

各都道府県が把握している 2018 年 3 月時点の油症認定患者 1,588 を対象に郵送で調査協力を依頼し，研究参加の同意と質問票の回答が得られた 1410 人（男性 665 人，女性 745 人）のなかで，これまでダイオキシン類血中濃度測定が行われていた 899 人を解析対象とした．解析対象は男性 416 人，女性 483 人であった．本研究は九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った（許可番号 30－384）．

評価項目

質問票の回答から得られた，年齢，性別，body mass index（BMI），飲酒習慣，喫煙習慣，1 日の歩行時間，運動習慣，1 日の野菜摂取量，1 日の果物摂取量，睡眠時間，不眠症状，日中の眠気，及び RLS/WED 関連症状を解析に使用した．習慣性飲酒者は週 3 回以上，1 回に純エタノール換算で 20g 以上の飲酒者とした．

不眠症状は入眠困難（difficulty initiating sleep：DIS），睡眠維持困難（difficulty maintaining sleep：DMS），及び早朝覚醒（wake up too early：WE）の有無について尋ねた．DIS，DMS，及び WE のいずれかの症状を訴える者を不眠症状ありとした．また，DIS もしくは DMS のいずれかの症状を有する者を difficulty initiating and/or maintaining sleep（DIMS）群とした．

RLS/WED の症状に関しては，下肢を主体とする動かしたい衝動感がある者で，症状は安静時に出現し動かすことで軽減し，症状は朝以外の時間帯に多い者を ELS/WED が疑われる者（RLS/WED 群）とした [2]．下肢を主体とする動かしたい衝動感のみで，その他の症状をすべて含まない者を leg motor restlessness（LMR）群とした [3]．それ以外の者は non-LMR 群とした．

ダイオキシン類の血中濃度測定は高分解能ガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析（high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry：HRGC/HRMS）を用いて行った [4]．WHO は polychlorinated dibenzo-p-dioxin（PCDD），polychlorinated dibenzofuran（PCDF），及び polychlorinated biphenyl（PCB）のうちダイオキシン類特有の毒性を有するものをダイオキシン類と定めている．ダイオキシン類の各異性体の毒性（毒性等量（toxic equivalent quantity：TEQ））は最も毒性が強いダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachrolodibenzo-p-dioxin に対する毒性相対値を示す毒性等価係数（toxic equivalency factors：TEFs）に基づき計算される（Van den Berg et al. 2006）．今回の検討では 2005 年に WHO が発表した TEFs を用いた．各異性体の TEQ は脂肪重量当たりの定量結果に TEF

を乗じて算出し，ダイオキシン類の総合的な毒性評価は，その総和（総 TEQ）が用いられる.今回は21の異性体のTEQから総TEQを計算した．油症患者におけるダイオキシン類血中濃度は3年に1回測定されているが，その排出半減期は予想以上に長く，最近の研究では特に血中濃度が高値であるもので半減期が延長している例も確認されている[5-7]．そのため，本研究では間近の調査で得られたダイオキシン類血中濃度[8]と突合して検討した.

統計処理

データ解析はR ver. 3.4.1とEZR ver. 1.36[9]を用いて行った．正規性の検定はShapiro-Wilk検定を行った.連続変数である年齢,BMI,ダイオキシン類血中濃度及びTEQは正規性を認めなかったため，代表値とそのばらつきはmedian（interquartile range:IQR)で示した.2群間の比較はMann-WhitneyのU検定を行った．3群間の比較はKruskal-Wallisの検定を行い，post-hoc testはSteel-Dwassの多重比較を用いた．名義変数間の独立性の検定はFisherの正確確率検定を行った．3群以上を有する名義変数間の独立性の検定はFisherの正確確率検定では計算が困難であり，$\chi 2$検定を用いた．その際に数が10未満と少ないセルが存在する場合には2つの群を加算処理して検定を行った．有意水準は0.05とした.

DIMSに対するダイオキシン類毒性とRLS/WED関連症状の影響はロジスティック回帰分析を用いて解析した．総TEQは四分位数毎（< 20 (reference: ref), 20-35, 35-62, ≧ 62 pg-TEQ/g lipid）にカテゴリー化した．単変量解析を行った後に，性別，年齢，BMI，習慣性飲酒，及び喫煙状況で調整したオッズ比（95% confidence interval：CI）を算出した．年齢は4分位数毎（< 57 (ref), 57-64, 64-76, ≧ 76）にカテゴリー化し，BMIはBMI <25 kg/m2 (ref), BMI ≧25 kg/m2に2分割した．習慣性飲酒は非習慣性飲酒を，喫煙習慣は喫煙習慣がなかった者を，さらにRLS/WED関連症状ではnon-LMR群をreferenceとした.

C．研究結果

不眠及びRLS関連症状の有症状率(Table 1)

DIS, DMS, 及びWEはそれぞれ273人（30.4%), 402人（44.7%), 及び283人（31.5%)に認められた.いずれかの不眠症状を有する者は584人(65.0%)と高率で，508人（56.5%）はDISもしくはDMSを有していた．日中の眠気を自覚している者は387人(43.0%)であった.RLS/WEDに対する質問は回答が不十分であった68人を除いた831人を対象に検討した.RLS/WEDが疑われる者は76人(9.1%)で，LMRを判定された者は299人（36.0%）であった.

性差（Table 1, 2)

男性と女性の年齢の中央値（interquartile range：IQR）はそれぞれ65 (58-77), 67 (59-78)で有意な男女差は認めなかった（p = 0.15）．男女のBMIの中央値（IQR）はそれぞれ23.0 (21.5-25.4), 22.2 (20.1-24.6) kg/m^2と男性が高値であった（p < 0.001）．男性では習慣性飲酒者，飲酒者が多く（p < 0.001），女性では野菜や果物摂取量が多かった（p < 0.001）．1日に90分以上歩行している者や，運動習慣は有意な性差を認めなかった（それぞれp = 0.05, p = 0.21）.

睡眠時間は女性が男性と比較して短時間睡眠者が多い傾向であったが統計

学的に有意ではなかった（p = 0.06）．DIS と DMS を訴える者は女性で有意に多いものの（それぞれ p < 0.001, p = 0.01），WE は有意な性差を認めなかった（p = 0.67）．RLS/WED 関連症状に関しては有意な性差を認めなかった（p = 0.38）．
女性のダイオキシン類血中濃度は男性と比較して有意に高値であった．油症の主たる原因物質である 2,3,4,7,8-PeCDF の中央値（IQR）は男性と女性でそれぞれ 20.5（11.0-44.0），38.3（15.4-115.7）pg/g lipid であった（p < 0.001）．総 TEQ の中央値（IQR）は男性と女性でそれぞれ 30（18-51），40（23-76） pg-TEQ/g lipid であった（p < 0.001）．

ダイオキシン類血中濃度（Table 2, 3）

PCDDs, PCDFs, 及び PCBs のそれぞれの TEQ の中央値は総 TEQ の中央値の概ね 1/3 を占めていた．総 TEQ は四分位数毎（Q1-Q4：< 20, 20-35, 35-62, ≧ 62 pg-TEQ/g lipid）にカテゴリー化した．Q4 では男性が少なくなり（p < 0.001），習慣性飲酒者と喫煙者が少なかった（それぞれ p = 0.001, p < 0.001）．年齢は総 TEQ が高値となるほど高値となっていた（p < 0.001）．1 日の野菜摂取量と果物摂取量は総 TEQ が高値の群で多くなる傾向が認められた（p < 0.001）．

睡眠時間は総 TEQ が高値となると長くなる傾向が認められた（p < 0.001）．DIS と DMS を訴える者は Q4 で有意に多いものの（p < 0.001），WE は有意差を認めなかった（p = 0.79）．また，一般住民でも認められる Q2 においても DIS や DMS は Q3 と同程度に高率であった．RLS/WED 関連症状に関しては RLS/WED 群は有意な傾向を認めないものの，LMR 群は総 TEQ が高値をなるほど多くなる傾向が認められた（p = 0.01）．

不眠症状（Table 4-7）

DIS, DMS, 及び WE のいずれの不眠症状の有無（Table 4, 5）よりも，DIMS の有無（Table 6, 7）で 2 群にカテゴリー化することで 2 群間の差異が明瞭であった．DIMS 群では男性が少なく（p < 0.001），年齢は高値であった（p < 0.001）．身体活動性や野菜摂取量との関連は認めなかったが，非 DIMS 群では果物摂取量が少ない傾向が認められた（p = 0.002）．DIMS 群では短時間睡眠傾向が認められ（p < 0.001），日中の眠気を自覚している者が多かった（p < 0.001）．また，RLS/WED 関連症状では DIMS 群で LMR 群が多い傾向が認められた（p < 0.001）．ダイオキシン類の血中濃度は 2,3,4,7,8-PeCDF をはじめとしてほとんどの異性体で DIMS 群が有意に高値であった．総 TEQ の中央値（IQR）は DIMS 群と Non-DIMS 群でそれぞれ 39（23-71），30（17-51） pg-TEQ/g lipid と DIMS 群で有意に高値であった（p < 0.001）．

RLS/WED 関連症状（Table 8, 9）

Non-LMR 群と比較すると RLS/WED 群以上に LMR 群において短時間睡眠傾向で（p < 0.001），不眠症状を有する者が多く（p < 0.001），日中の眠気を自覚している者が多かった（p < 0.001）．

2,3,4,7,8-PeCDF の中央値（IQR）は non-LMR 群, LMR 群, 及び RLS/WED 群でそれぞれ 22.5（12.1-59.6），29.0（15.0-85.2），及び 29.3（10.6-82.2） pg/g lipid と LMR 群で non-LMR 群と比較して有意に高値であった（p = 0.01）が，RLS/WED は他の 2 群と統計学的に有意差を認めなかった（*vs.* non-LMR 群 p = 0.81, *vs.* LMR 群 p = 0.58）．総 TEQ の中央値（IQR）は non-LMR 群, LMR 群, 及び RLS/WED 群でそれぞれ 31（18-54），39（23-69），及び 32（19-59） pg-TEQ/g lipid と LMR 群で non-LMR 群と比較して

有意に高値であった（p = 0.002）が，RLS/WED は他の 2 群と統計学的に有意差を認めなかった（vs. non-LMR 群 p = 0.88, vs. LMR 群 p = 0.30）.

不眠症状に対するロジスティック回帰分析（Table 10）

DIMS に対するダイオキシン類の総 TEQ と RLS/WED 関連症状の影響を明らかにするために，年齢，性別，BMI，習慣性飲酒，及び喫煙状況で調整したロジスティック回帰分析を行った．総 TEQ の first quartile のく 20 pg-TEQ/g lipid を reference とするといずれの四分位も DIMS に対するオッズ比（odds ratio：OR）は有意に高値であった．総 TEQ の fourth quartile の ≧ 62 pg-TEQ/g lipid の DIMS に対する OR（95% CI）が 2.09（1.24-3.53）と高いだけでなく，一般住民でも認められることがある second quartile の 20-35 pg-TEQ/g lipid においても DIMS の OR は 1.89 （1.23-2.89）と関連性が認められた．RLS/WED 関連症状では non-LMR 群を reference とすると LMR 群，RLS/WED 群いずれも OR（95% CI）は 2.35（1.71-3.24），1.74（1.04-2.91）と DIMS との関連していた.

D．考察

本研究はダイオキシンの被害者である油症患者における全国規模で行った初めての不眠に関する調査である．ダイオキシン類の毒性が高いことは入眠困難や睡眠維持困難といった不眠のリスクを高めるだけでなく，一般住民でも観察される範囲の血液中のダイオキシン類レベルにおいても不眠のリスクを高めていることは注目すべきである．さらに RLS/WED とは質問票で判断されないものの，下肢を動かしたい衝動感を有する LMR 群は不眠症状と関わっていた．今後，LMR 群のより詳細な検討が必要とされている.

ダイオキシンと不眠

油症患者における不眠の有症状率は日本人成人と比較すると明らかに高率である．今回の対象者と同年齢層である 50 歳以上の日本人成人の DIS と DMS はそれぞれ男性では 6.4-16.1%， 13.5-29.0%，女性では 13.5-31.5%，16.2-32.3% と報告されている [10,11]．140 人の油症患者に直接聞き取り調査を行った結果では中等症以上の重度の DIS と DMS の有症状率が今回の結果とほぼ同じであった．軽症例まで含めると DIS と DMS はそれぞれ 54.0%と 65.0%とさらに高率であった [1]．今回は不眠症状の重症度までは質問していないが，不眠の重症度まで確認すると有症状率は今回の調査でもさらに高率となるかもしれない.

ダイオキシン類血中濃度が高まり，その毒性の指標である TEQ が高値となると不眠症状が顕在化していることは注目に値する．ダイオキシン類が直接中枢神経における睡眠・覚醒に影響を及ぼしているかどうかについての基礎的な研究は行われていない．しかしながら，複数の研究成果がダイオキシン類の睡眠・覚醒系へ影響する可能性を示している.

ダイオキシン類の核内受容体である aryl hydrocarbon receptor（AHR）は視床下部から脳幹の神経系に発現している [12]．ダイオキシン類は AHR を介して異物代謝に関わる遺伝子を含む様々な遺伝子発現を調節している [13]．モノアミン系ではダイオキシン投与でチロシン合成酵素発現が高まり [14,15]，脳内のドパミン，ノルアドレナリン，セロトニンの増加が実験的に確認されている [16]．モノアミン系は覚醒時に活動し，睡眠時には活動が低下する [17]．ダイオキシン暴露はモ

ノアミン系の活性化を介して不眠症における過覚醒状態[18-20]をもたらすことが懸念される.

時計遺伝子とAHRとのクロストークも不眠の病態に影響する可能性がある. AHR系の活性化は視交叉上核（suprachiasmatic nucleus：SCN）における時計遺伝子発現の振幅を減少させる. 逆に, AHR系の抑制はSCNにおける発振機構の振幅を増加させる[21]. 睡眠・覚醒リズムは時計遺伝子群の発現の発震機構による概日リズムプロセスにより調整されている[22]. ダイオキシン類はこの概日リズム形成の発震機構を減弱させることで不眠に影響することが推察される.

今回の検討において一般住民, 健常者でも確認されるダイオキシン類血中濃度範囲内[8,23]でも, 総TEQが高まると不眠のリスクを高めていた. 平均年齢（±SD）68.1±5.4歳の一般住民127人の総TEQの中央値(最小値-最大値)は31(12-100) pg-TEQ/g lipidと報告されている[8]. 今回の油症認定患者における総TEQの中央値（最小値-最大値）は35（5-564）pg-TEQ/g lipidであった. 健常者と比較すると油症患者の総TEQは著しく高値の者が認められる一方で, 一般住民と同程度の結果の者も認められた. 総TEQ値がsecond quartileの範囲でも不眠のリスクが高まっていることは, 一般住民の不眠の病態にダイオキシンの影響が無視できない.

ダイオキシンとRLS/WED

今回の検討ではRLS/WED群以上にLMR群が不眠と関わっていた. LMR群と判定された者の中に相当数のRLS/WED患者が混在する可能性には配慮が必要である. 先のパイロット研究において質問票のみではRLS/WEDの主要症状を満たす者は12.9%であったが, 医師の問診で病状を確認したところ, 30.7%がRLS/WEDの診断基準を満たしていた[1]. LMR群に分類されていたものに, 重症患者でRLS/WEDの典型的な日内変動を認めない者や, 動きで容易には症状軽減が得られない者が含まれていた. この点はRLS/WEDの診断において注意すべき点であり[2], 今後, LMR群のより詳細な評価が望まれる. 筋肉痛, 攣縮, 及び四肢のしびれは油症患者で高頻度であり, これらの症状の一部はRLS/WEDと関連していることが推察される.

日本人のRLS/WEDの有病率は1.8%と報告されており[24], 油症患者では日本人成人よりもRLS/WEDの有病率が高いものと考えられる. 油症におけるRLS/WEDの病態生理においてダイオキシン類のドパミン神経系への影響が想定される. ダイオキシン投与により培養細胞や動物実験で中枢神経系でドパミン合成が高まるものの, 長期にわたるダイオキシン暴露は神経系の酸化的ストレスを高めることが報告されている[14-16]. ダイオキシン類によるドパミン神経系への慢性的な酸化ストレスはドパミン神経系の機能異常や細胞死をもたらすことが懸念される.

本研究の限界

本研究は限界として, まず, 油症患者における生活状況については回答されていたが, 併存する精神・身体疾患についての情報は不十分な状態で, 今回の解析に利用できなかった. 当然ながら不眠の問題は併存疾患により影響をうけることが予想される. 多変量解析において主要な併存疾患の影響も考慮される必要がある. また, 服用している薬剤についても確認されていない. 睡眠薬だけでなく, 多数の薬剤が不眠には影響する.

ドパミン系に影響する薬剤であればRLS/WEDとも関連する．服用中の薬剤情報も考慮される必要がある．さらに，今回は油症患者対象に行われた調査であり，健常者との比較は行われていない．一般住民においてもダイオキシン類血中濃度やTEQが不眠を含む睡眠・覚醒障害と関わるのかについても検討される必要がある．

E．結論

油症患者における不眠の有症状率は高率であり，ダイオキシン類血中濃度から算出した毒性が最も高い群でそのリスクは最大であった．さらに，一般住民でも確認されるダイオキシン類血中濃度範囲内でも，総TEQが高まると不眠のリスクを高めていた．ダイオキシン類は，人工的に合成されるのみならず，住宅火災，森林火災，火山噴火により生成されている[25,26]．ダイオキシン類は古来より自然界にも存在し，生体内には異物代謝システムを構築して対応している．ダイオキシンと多くの疾患との関連が精力的に検討されてきたが，睡眠・覚醒を含めた中枢神経系に対するダイオキシン類の影響についてはほとんど検討されていない．ダイオキシン類と睡眠・覚醒との諸問題は，油症患者だけでなく一般住民の不眠を含めた睡眠・覚醒障害の病態生理の一部として基礎と臨床の両面での研究が必要とされている．

F．研究発表

1．論文発表

Kondo H, Tanio K, Nagaura Y, Nagayoshi M, Mitoma C, Furue M, Maeda T. Sleep disorders among Yusho patients highly intoxicated with dioxin-related compounds: A 140-case series. Environmental Research. 2018 Oct; 166: 261-68.

2．学会発表

1 近藤英明，谷尾恵子，長浦由紀，永吉真子，三苫千景，古江増隆，前田隆浩：ダイオキシンによる健康被害としての不眠．第9回九州睡眠研究会（2018年2月24日，福岡）

2 近藤英明，谷尾恵子，長浦由紀，永吉真子，三苫千景，古江増隆，前田隆浩：ダイオキシンによる健康被害である油症における不眠とレストレスレッグス症候群．第9回日本プライマリ・ケア連合学会学術大会（2018年6月16日～17日，三重）

3 近藤英明，谷尾恵子，長浦由紀，永吉真子，三苫千景，古江増隆，前田隆浩：ダイオキシンによる健康被害である油症患者における睡眠障害の実態．日本睡眠学会第43回定期学術集会（2018年7月11日～13日，札幌）

4 近藤英明，谷尾恵子，長浦由紀，永吉真子，三苫千景，古江増隆，前田隆浩：ダイオキシンによる健康被害である油症患者における睡眠障害の実態．第1回長崎睡眠呼吸障害セミナー（2018年8月4日，長崎）

5 近藤英明，谷尾恵子，長浦由紀，永吉真子，三苫千景，古江増隆，前田隆浩：ダイオキシンによる健康被害である油症患者における睡眠障害の実態．不眠研究会第34回研究発表会(2018年11月17日，東京)

G．知的財産権の出願・登録状況

なし

謝辞

本研究に関してはデータ提供に関して，厚生労働省並びに福岡県保健環境研究所管理部 企画情報管理課の新谷俊二氏に御協力頂いた．九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター看護師の中村優子氏にはデータの匿名化作業に関わって頂いた．同センターメディカルソーシャルワーカーの谷尾恵子氏には立案の際に御協力頂いた．同センターの勝野裕子氏と九州大学医学部皮膚科学教室の梶嶋啓子氏には各種事務手続きでお世話になった．同センターの三苫千景准教授と古江増隆センター長には御助言を頂いた．最後に，本研究に御協力頂いた油症認定患者さん，及び御関係の皆様に深く感謝申し上げる．なお，本研究は厚生労働科学研究費補助金「食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究」（課題番号：H30−食品−指定−005）に負うものである．ここに記して謝意を表する．

参考文献

1 Kondo, H. *et al.* Sleep disorders among Yusho patients highly intoxicated with dioxin-related compounds: A 140-case series. *Environmental research* **166**, 261-268, doi:https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.05.033 (2018).

2 Allen, R. P. *et al.* Restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease diagnostic criteria: updated International Restless Legs Syndrome Study Group (IRLSSG) consensus criteria--history, rationale, description, and significance. *Sleep medicine* **15**, 860-873, doi:10.1016/j.sleep.2014.03.025 (2014).

3 Gjerstad, M. D., Tysnes, O. B. & Larsen, J. P. Increased risk of leg motor restlessness but not RLS in early Parkinson disease. *Neurology* **77**, 1941-1946, doi:10.1212/WNL.0b013e31823a0cc8 (2011).

4 Iida, T. & Todaka, T. Measurement of dioxins in human blood: improvement of analytical method. *Industrial health* **41**, 197-204 (2003).

5 Matsumoto, S. *et al.* Change in decay rates of dioxin-like compounds in Yusho patients. *Environmental health : a global access science source* **15**, 95, doi:10.1186/s12940-016-0178-0 (2016).

6 Matsumoto, S. *et al.* Unexpectedly long half-lives of blood 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) levels in Yusho patients. *Environmental health : a global access science source* **14**, 76, doi:10.1186/s12940-015-0059-y (2015).

7 Matsumoto, S. *et al.* Variation in half-life of penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) blood level among Yusho patients. *Chemosphere* **77**, 658-662, doi:10.1016/j.chemosphere.2009.08.009 (2009).

8 香月進 *et al.* 油症患者血液中の PCDF 類実態調査. 56-70 (2018).

9 Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone marrow transplantation* **48**, 452-458, doi:10.1038/bmt.2012.244 (2013).

10 Doi, Y., Minowa, M., Okawa, M. & Uchiyama, M. Prevalence of sleep disturbance and hypnotic medication use in relation to sociodemographic factors in

the general Japanese adult population. *Journal of epidemiology* **10**, 79-86 (2000).

11 Kaneita, Y. *et al.* Excessive daytime sleepiness among the Japanese general population. *Journal of epidemiology* **15**, 1-8 (2005).

12 Petersen, S. L. *et al.* Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem. *The Journal of comparative neurology* **427**, 428-439 (2000).

13 Wu, D. & Rastinejad, F. Structural characterization of mammalian bHLH-PAS transcription factors. *Current opinion in structural biology* **43**, 1-9, doi:10.1016/j.sbi.2016.09.011 (2016).

14 Akahoshi, E., Yoshimura, S., Uruno, S. & Ishihara-Sugano, M. Effect of dioxins on regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by aryl hydrocarbon receptor: a neurotoxicology study. *Environmental health : a global access science source* **8**, 24, doi:10.1186/1476-069x-8-24 (2009).

15 Tanida, T. *et al.* Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin transactivates aryl hydrocarbon receptor-responsive element III in the tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons of the mouse midbrain. *Journal of applied toxicology : JAT* **34**, 117-126, doi:10.1002/jat.2839 (2014).

16 Byers, J. P., Masters, K., Sarver, J. G. & Hassoun, E. A. Association between the levels of biogenic amines and superoxide anion production in brain regions of rats after subchronic exposure to TCDD. *Toxicology* **228**, 291-298, doi:10.1016/j.tox.2006.09.009 (2006).

17 Scammell, T. E., Arrigoni, E. & Lipton, J. O. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron* **93**, 747-765, doi:10.1016/j.neuron.2017.01.014 (2017).

18 Edinger, J. D., Means, M. K. & Krystal, A. D. Does physiological hyperarousal enhance error rates among insomnia sufferers? *Sleep* **36**, 1179-1186, doi:10.5665/sleep.2882 (2013).

19 Vgontzas, A. N. *et al.* Chronic insomnia is associated with nyctohemeral activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: clinical implications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**, 3787-3794, doi:10.1210/jcem.86.8.7778 (2001).

20 Stepanski, E., Zorick, F., Roehrs, T., Young, D. & Roth, T. Daytime alertness in patients with chronic insomnia compared with asymptomatic control subjects. *Sleep* **11**, 54-60 (1988).

21 Jaeger, C. & Tischkau, S. A. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in Circadian Clock Disruption and Metabolic Dysfunction. *Environmental health insights* **10**, 133-141, doi:10.4137/ehi.s38343 (2016).

22 Takahashi, J. S. Molecular components of the circadian clock in mammals. *Diabetes, obesity & metabolism* **17 Suppl 1**, 6-11, doi:10.1111/dom.12514 (2015).

23 Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Tobiishi, K. & Iida, T. Improvement in dioxin analysis of human blood and their concentrations in blood of Yusho patients. *Journal of Dermatological Science Supplement* **1**, S21-S28, doi:https://doi.org/10.1016/j.descs.2005.03.004 (2005).

24 Nomura, T., Inoue, Y., Kusumi, M.,

Uemura, Y. & Nakashima, K. Prevalence of restless legs syndrome in a rural community in Japan. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **23**, 2363-2369, doi:10.1002/mds.22274 (2008).

25 Salamanca, M., Chandia, C. & Hernandez, A. Impact of forest fires on the concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofurans in coastal waters of central Chile. *The Science of the total environment* **573**, 1397-1405, doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.113 (2016).

26 Organtini, K. L. *et al.* Quantitative Analysis of Mixed Halogen Dioxins and Furans in Fire Debris Utilizing Atmospheric Pressure Ionization Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Analytical chemistry* **87**, 10368-10377, doi:10.1021/acs.analchem.5b02463 (2015).

Table 1. 対象者背景

	Total	Men	Women	p value
N	899	416	483	
Age, median (IQR)	66 (58-78)	65 (58-77)	67 (59-78)	0.15
BMI kg/m^2, median (IQR)	22.7 (20.7-25.1)	23.0 (21.5-25.4)	22.2 (20.1-24.6)	< 0.001
Habitual drinker, n (%)	187 (21.0)	152 (37.0)	35 (7.3)	< 0.001
Smoking status				
Never, n (%)	557 (62.7)	151 (36.7)	406 (85.3)	< 0.001
Past, n (%)	175 (19.7)	142 (34.5)	33 (6.9)	
Current, n (%)	156 (17.6)	119 (28.9)	37 (7.8)	
Walking				
>= 60 min / day, n (%)	440 (49.2)	189 (45.7)	251 (52.2)	0.05
Exercise				
>= 2 times /week, n (%)	340 (38.0)	166 (40.2)	174 (36.1)	0.21
Vegetable intake				
70-140 g / day, n (%)	432 (48.9)	239 (58.6)	193 (40.6)	< 0.001
140-280 g / day, n (%)	358 (40.5)	143 (35.0)	215 (45.3)	
>= 280 g / day, n (%)	93 (10.5)	26 (6.4)	67 (14.1)	
Fruit intake				
< 50 g /day, n (%)	429 (48.5)	229 (55.9)	200 (42.1)	< 0.001
50-100 g /day, n (%)	248 (28.0)	98 (23.9)	150 (31.6)	
>=100 g / day, n (%)	208 (23.5)	83 (20.2)	125 (26.3)	
Sleep time				
< 5 hours, n (%)	85 (9.6)	36 (8.7)	49 (10.3)	0.06
5-6 hours, n (%)	214 (24.0)	85 (20.6)	129 (27.0)	
6-7 hours, n (%)	293 (32.9)	136 (32.9)	157 (32.9)	
7-8 hours, n (%)	162 (18.2)	79 (19.1)	83 (17.4)	
8-9 hours, n (%)	90 (10.1)	52 (12.6)	38 (8.0)	
> 9 hours, n (%)	46 (5.2)	25 (6.1)	21 (4.4)	
Insomnia symptoms, n (%)	584 (65.0)	256 (61.5)	328 (67.9)	0.05
DIS, n (%)	273 (30.4)	90 (21.6)	183 (37.9)	< 0.001
DMS, n (%)	402 (44.7)	167 (40.1)	235 (48.7)	0.01
DIS and/or DMS, n (%)	508 (56.5)	205 (49.3)	303 (62.7)	< 0.001
WE, n (%)	283 (31.5)	134 (32.2)	149 (30.8)	0.67
Daytime sleepiness, n (%)	387 (43.0)	181 (43.5)	206 (42.7)	0.84
RLS/WED symptoms				
Non-LMR, n (%)	456 (54.9)	224 (57.4)	232 (52.6)	0.38
LMR, n (%)	299 (36.0)	132 (33.8)	167 (37.9)	
RLS/WED, n (%)	76 (9.1)	34 (8.7)	42 (9.5)	

BMI, body mass index; DIS, difficulty initiating sleep; DMS, difficulty maintaining sleep; IQR, interquartile range; LMR, leg motor restlessness; RLS/WED, restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease; WE, wake up too early.

Table 2. 男女別ダイオキシン類血中濃度（pg/g lipid）

	Total	Men	Women	p value
N	899	416	483	
2,3,7,8-TCDD	1.3 (0.5-1.9)	1.2 (0.5-1.8)	1.4 (0.5-2.0)	0.002
1,2,3,7,8-PeCDD	6.8 (4.5-10.2)	6.0 (3.8-9.1)	7.5 (5.0-11.1)	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.1 (1.0-3.1)	1.0 (1.0-2.9)	2.2 (1.0-3.3)	0.009
1,2,3,6,7,8-HxCDD	21.5 (13.4-37.8)	18.5 (11.5-30.9)	25.5 (15.9-46.1)	< 0.001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2.8 (1.0-4.5)	2.4 (1.0-3.9)	3.0 (1.0-5.1)	< 0.001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	31.6 (21.6-46.5)	29.5 (20.5-44.3)	32.9 (22.4-49.1)	0.007
OCDD	441.0 (279.5-682.3)	425.7 (272.1-682.1)	454.7 (284.7-682.4)	0.22
Total PCDDs	518.5 (335.4-779.9)	489.0 (312.7-773.8)	539.8 (352.2-797.1)	0.04
2,3,7,8-TCDF	1.4 (0.5-2.6)	1.4 (0.5-2.6)	1.4 (0.5-2.6)	0.72
1,2,3,7,8-PeCDF	0.5 (0.5-1.5)	0.5 (0.5-1.6)	0.5 (0.5-1.4)	0.08
2,3,4,7,8-PeCDF	27.0 (13.3-74.1)	20.5 (11.0-44.0)	38.3 (15.4-115.7)	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	5.0 (2.8-12.5)	3.9 (2.4-7.5)	7.4 (3.3-19.0)	< 0.001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4.6 (2.8-8.6)	4.0 (2.5-6.4)	5.7 (3.3-11.6)	< 0.001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.40
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.88
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.0 (1.0-2.5)	1.0 (1.0-2.4)	1.0 (1.0-2.6)	0.24
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.04
OCDF	2.0 (2.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	0.06
Total PCDFs	47.9 (28.2-107.3)	38.9 (25.0-72.1)	64.5 (31.6-161.8)	< 0.001
3,4,4',5-TCB (#81)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	< 0.001
3,3',4,4'-TCB (#77)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	0.15
3,3',4,4',5-PeCB (#126)	67.8 (38.2-114.3)	66.9 (38.2-123.3)	69.2 (38.2-109.1)	0.75
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	103.7 (58.7-184.7)	110.2 (61.2-178.4)	100.7 (55.5-191.5)	0.31
Total Non-ortho PCBs	193.2 (116.1-319.8)	198.1 (116.6-321.2)	187.6 (115.5-316.7)	0.79
Total	846.5 (522.9-1275.4)	784.7 (500.0-1185.3)	887.6 (538.0-1338.6)	0.004
Total PCDDs-TEQ	12 (8-17)	10 (7-15)	13 (8-20)	< 0.001
Total PCDFs-TEQ	10 (5-25)	7 (4-15)	13 (6-38)	< 0.001
Total Non-ortho PCBs-TEQ	11 (6-18)	11 (6-18)	11 (6-17)	0.99
Total TEQ	35 (20-62)	30 (18-51)	40 (23-76)	< 0.001

CB, chlorinated biphenyl; CDD, chlorinated dibenzo-p-dioxins; CDF, chlorinated dibenzofurans; Hx, hexa; Hp, hepta; OCDD, octachlorodibenzo-p-dioxin; OCDF, octachlorodibenzofurans; PCB, polychlorinated biphenyl; PCDD, polychlorinated dibenzo-p-dioxin; PCDF, polychlorinated dibenzofuran; Pe, penta; TCB, tetrachlorobiphenyl; TCDD, tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TCDF, tetrachlorodibenzofuran; TEQ, toxic equivalent quantity.

Table 3. 総 TEQ 四分位毎の背景因子，不眠症状，RLS/WED 関連症状の比較

TEQ pg-TEQ /g lipid	< 20, n = 225	20-35, n = 225	35-62, n=224	>=62, n=225	p value
Men, n (%)	128 (56.9)	108 (48.0)	113 (50.4)	67 (29.8)	< 0.001
Age, median (IQR)*	56 (51-62)	64 (58-73)	69 (62-80)	78 (70-84)	< 0.001
BMI kg/m^2, median (IQR)	22.6 (20.3-24.9)	22.4 (20.9-24.8)	23.0 (21.3-25.2)	22.7 (20.3-25.1)	0.199
Habitual drinker, n (%)	48 (21.4)	57 (25.7)	55 (24.7)	27 (12.2)	0.001
Smoking status					
Never, n (%)	100 (44.6)	133 (59.6)	139 (62.9)	185 (84.1)	< 0.001
Past, n (%)	55 (24.6)	49 (22.0)	49 (22.2)	22 (10.0)	
Current, n (%)	69 (30.8)	41 (18.4)	33 (14.9)	13 (5.9)	
Walking					
>= 60 min / day, n (%)	132 (58.7)	133 (59.4)	93 (41.7)	82 (36.8)	< 0.001
Exercise					
>= 2 times /week, n (%)	72 (32.0)	94 (42.0)	84 (37.7)	90 (40.4)	0.138
Vegetable intake					
70-140 g / day, n (%)	121 (54.3)	112 (50.7)	106 (48.0)	93 (42.7)	0.34
140-280 g / day, n (%)	81 (36.3)	87 (39.4)	93 (42.1)	97 (44.5)	
>= 280 g / day, n (%)	21 (9.4)	22 (10.0)	22 (10.0)	28 (12.8)	
Fruit intake					
< 50 g /day, n (%)	142 (63.7)	107 (48.4)	92 (41.3)	88 (40.4)	0.34
50-100 g /day, n (%)	46 (20.6)	75 (33.9)	65 (29.1)	62 (28.4)	
>=100 g / day, n (%)	35 (15.7)	39 (17.6)	66 (29.6)	68 (31.2)	
Sleep time					
< 5 hours, n (%)	23 (10.4)	20 (9.0)	16 (7.2)	26 (11.7)	< 0.001
5-6 hours, n (%)	69 (31.1)	52 (23.3)	46 (20.6)	47 (21.2)	
6-7 hours, n (%)	79 (35.6)	84 (37.7)	78 (35.0)	52 (23.4)	
7-8 hours, n (%)	34 (15.3)	32 (14.3)	51 (22.9)	45 (20.3)	
8-9 hours, n (%)	12 (5.4)	24 (10.8)	20 (9.0)	34 (15.3)	
> 9 hours, n (%)	5 (2.3)	11 (4.9)	12 (5.4)	18 (8.1)	
Insomnia symptoms, n (%)	126 (56.0)	148 (65.8)	149 (66.5)	161 (71.6)	0.006
DIS, n (%)	46 (20.4)	67 (29.8)	66 (29.5)	94 (41.8)	< 0.001
DMS, n (%)	74 (32.9)	105 (46.7)	107 (47.8)	116 (51.6)	< 0.001
DIS and/or DMS, n (%)	96 (42.7)	133 (59.1)	128 (57.1)	151 (67.1)	< 0.001
WE, n (%)	69 (30.7)	74 (32.9)	73 (32.6)	67 (29.8)	0.88
Daytime sleepiness, n (%)	96 (42.7)	101 (44.9)	99 (44.2)	91 (40.4)	0.79
RLS/WED symptoms					
Non-LMR, n (%)	134 (62.6)	121 (56.8)	113 (54.1)	88 (45.1)	0.01
LMR, n (%)	58 (27.1)	74 (34.7)	78 (37.3)	89 (45.6)	
RLS/WED, n (%)	22 (10.3)	18 (8.5)	18 (8.6)	18 (9.2)	

*すべての群間で $p < 0.001$. BMI, body mass index; DIS, difficulty initiating sleep; DMS, difficulty maintaining sleep; IQR, interquartile range; LMR, leg motor restlessness; RLS/WED, restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease; TEQ, toxic equivalent quantity; WE, wake up too early.

Table 4. 不眠症状の有無による背景因子の比較

	Non-insomnia	Insomnia	p value
N	315	584	
Men, n (%)	160 (50.8)	256 (43.8)	0.05
Age, median (IQR)	64 (57-77)	67 (59-78)	0.01
BMI kg/m^2, median (IQR)	22.6 (20.8-24.9)	22.7 (20.6-25.2)	0.84
Habitual drinker, n (%)	67 (21.6)	120 (20.7)	0.80
Smoking status			
Never, n (%)	186 (59.8)	371 (64.3)	0.08
Past, n (%)	58 (18.6)	117 (20.3)	
Current, n (%)	67 (21.5)	89 (15.4)	
Walking			
>= 60 min / day, n (%)	167 (53.5)	273 (46.8)	0.06
Exercise			
>= 2 times /week, n (%)	107 (34.3)	233 (40.0)	0.10
Vegetable intake			
70-140 g / day, n (%)	153 (50.0)	279 (48.4)	0.62
140-280 g / day, n (%)	118 (38.6)	240 (41.6)	
>= 280 g / day, n (%)	35 (11.4)	58 (10.1)	
Fruit intake			
< 50 g /day, n (%)	163 (53.1)	266 (46.0)	0.13
50-100 g /day, n (%)	80 (26.1)	168 (29.1)	
>=100 g / day, n (%)	64 (20.8)	144 (24.9)	
Sleep time			
< 5 hours, n (%)	13 (4.2)	72 (12.4)	< 0.001
5-6 hours, n (%)	65 (21.0)	149 (25.7)	
6-7 hours, n (%)	95 (30.6)	198 (34.1)	
7-8 hours, n (%)	69 (22.3)	93 (16.0)	
8-9 hours, n (%)	44 (14.2)	46 (7.9)	
> 9 hours, n (%)	24 (7.7)	22 (3.8)	
Daytime sleepiness, n (%)	188 (34.9)	390 (44.8)	< 0.001
RLS/WED symptoms			
Non-LMR, n (%)	196 (68.5)	260 (47.7)	< 0.001
LMR, n (%)	67 (23.4)	232 (42.6)	
RLS/WED, n (%)	23 (8.0)	53 (9.7)	

BMI, body mass index; IQR, interquartile range; LMR, leg motor restlessness; RLS/WED, restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease.

Table 5. 不眠症状の有無によるダイオキシン類血中濃度の比較

	Non-insomnia	Insomnia	p value
N	315	584	
2,3,7,8-TCDD	1.3 (0.5-1.9)	1.4 (0.5-2.0)	0.02
1,2,3,7,8-PeCDD	6.2 (4.0-9.4)	7.3 (4.9-10.6)	0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.0 (1.0-2.9)	2.2 (1.0-3.2)	0.003
1,2,3,6,7,8-HxCDD	19.7 (12.9-33.7)	22.6 (13.9-39.2)	0.02
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2.6 (1.0-4.1)	3.0 (1.0-4.7)	0.07
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	28.7 (20.4-43.5)	32.7 (22.8-49.4)	0.001
OCDD	406.9 (262.4-630.4)	460.5 (289.9-699.4)	0.008
Total PCDDs	486.3 (318.0-722.7)	547.3 (352.7-806.0)	0.004
2,3,7,8-TCDF	1.3 (0.5-2.3)	1.4 (0.5-2.8)	0.04
1,2,3,7,8-PeCDF	0.5 (0.5-1.4)	0.5 (0.5-1.6)	0.06
2,3,4,7,8-PeCDF	22.4 (11.5-55.1)	30.0 (14.2-87.4)	0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	4.6 (2.6-9.6)	5.2 (2.9-13.9)	0.008
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4.3 (2.6-7.5)	4.9 (3.0-9.6)	0.006
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.65
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.14
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.0 (1.0-2.5)	1.0 (1.0-2.5)	0.38
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.55
OCDF	2.0 (2.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	0.50
Total PCDFs	41.9 (25.4-86.0)	52.2 (28.9-121.4)	0.001
3,4,4',5-TCB (#81)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	0.29
3,3',4,4'-TCB (#77)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-10.6)	0.03
3,3',4,4',5-PeCB (#126)	61.5 (33.7-103.6)	71.7 (41.0-121.5)	0.003
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	92.2 (51.1-175.1)	109.3 (63.0-194.2)	0.005
Total Non-ortho PCBs	180.8 (97.4-291.8)	204.6 (122.1-336.2)	0.001
Total	742.0 (488.3-1112.4)	879.4 (547.7-1318.6)	< 0.001
Total PCDDs-TEQ	11 (7-16)	12 (8-18)	0.001
Total PCDFs-TEQ	8 (4-19)	11 (5-29)	0.001
Total Non-ortho PCBs-TEQ	10 (5-15)	11 (6-18)	0.002
Total TEQ	31 (17-52)	38 (22-67)	< 0.001

CB, chlorinated biphenyl; CDD, chlorinated dibenzo-p-dioxins; CDF, chlorinated dibenzofurans; Hx, hexa; Hp, hepta; OCDD, octachlorodibenzo-p-dioxin; OCDF, octachlorodibenzofurans; PCB, polychlorinated biphenyl; PCDD, polychlorinated dibenzo-p-dioxin; PCDF, polychlorinated dibenzofuran; Pe, penta; TCB, tetrachlorobiphenyl; TCDD, tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TCDF, tetrachlorodibenzofuran; TEQ, toxic equivalent quantity.

Table 6. 入眠困難もしくは睡眠維持困難のいずれかの不眠症状の有無による背景因子の比較

	Non-DIMS	DIMS	p value
N	391	508	
Men, n (%)	211 (54.0)	205 (40.4)	< 0.001
Age, median (IQR)	64 (57-76)	68 (60-79)	< 0.001
BMI kg/m^2, median (IQR)	22.9 (21.0-25.0)	22.5 (20.4-25.1)	0.14
Habitual drinker, n (%)	89 (23.1)	98 (19.4)	0.21
Smoking status			
Never, n (%)	220 (57.0)	337 (67.1)	0.001
Past, n (%)	77 (19.9)	98 (19.5)	
Current, n (%)	89 (23.1)	67 (13.3)	
Walking			
>= 60 min / day, n (%)	204 (52.6)	236 (46.5)	0.08
Exercise			
>= 2 times /week, n (%)	138 (35.6)	202 (39.8)	0.21
Vegetable intake			
70-140 g / day, n (%)	192 (50.5)	240 (47.7)	0.34
140-280 g / day, n (%)	144 (37.9)	214 (42.5)	
>= 280 g / day, n (%)	44 (11.6)	49 (9.7)	
Fruit intake			
< 50 g /day, n (%)	210 (55.1)	219 (43.5)	0.002
50-100 g /day, n (%)	90 (23.6)	158 (31.3)	
>=100 g / day, n (%)	81 (21.3)	127 (25.2)	
Sleep time			
< 5 hours, n (%)	16 (4.2)	69 (13.7)	< 0.001
5-6 hours, n (%)	82 (21.3)	132 (26.1)	
6-7 hours, n (%)	122 (31.7)	171 (33.9)	
7-8 hours, n (%)	89 (23.1)	73 (14.5)	
8-9 hours, n (%)	52 (13.5)	38 (7.5)	
> 9 hours, n (%)	24 (6.2)	22 (4.4)	
Daytime sleepiness, n (%)	144 (36.8)	243 (47.8)	0.001
RLS/WED symptoms			
Non-LMR, n (%)	238 (66.1)	218 (46.3)	< 0.001
LMR, n (%)	92 (25.6)	207 (43.9)	
RLS/WED, n (%)	30 (8.3)	46 (9.8)	

BMI, body mass index; DIMS, difficulty initiating and/or maintaining sleep; IQR, interquartile range; LMR, leg motor restlessness; RLS/WED, restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease.

Table 7. 入眠困難もしくは睡眠維持困難のいずれかの不眠症状の有無によるダイオキシン類血中濃度の比較

	Non-DIMS	DIMS	p value
N	391	508	
2,3,7,8-TCDD	1.3 (0.5-1.9)	1.4 (0.5-2.0)	0.003
1,2,3,7,8-PeCDD	6.0 (3.8-9.3)	7.5 (5.0-10.8)	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.0 (1.0-2.9)	2.2 (1.0-3.2)	0.002
1,2,3,6,7,8-HxCDD	19.4 (12.7-32.2)	23.4 (14.7-41.7)	< 0.001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2.6 (1.0-4.1)	3.0 (1.0-4.8)	0.04
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	29.4 (20.5-44.7)	32.6 (22.8-49.1)	0.01
OCDD	412.3 (266.9-647.9)	468.0 (289.9-700.4)	0.02
Total PCDDs	476.7 (320.6-740.6)	557.9 (355.8-805.6)	0.006
2,3,7,8-TCDF	1.3 (0.5-2.3)	1.5 (0.5-2.9)	0.02
1,2,3,7,8-PeCDF	0.5 (0.5-1.4)	0.5 (0.5-1.6)	0.15
2,3,4,7,8-PeCDF	21.9 (11.2-51.2)	33.2 (14.9-92.5)	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	4.4 (2.6-9.3)	5.8 (2.9-15.0)	< 0.001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4.2 (2.6-6.6)	5.5 (3.0-10.2)	< 0.001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.36
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.08
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.0 (1.0-2.5)	1.0 (1.0-2.6)	0.67
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.75
OCDF	2.0 (2.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	0.68
Total PCDFs	40.9 (25.4-80.1)	58.1 (30.2-130.3)	< 0.001
3,4,4',5-TCB (#81)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	0.50
3,3',4,4'-TCB (#77)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-10.4)	0.09
3,3',4,4',5-PeCB (#126)	59.9 (34.3-104.5)	73.8 (41.6-121.7)	0.001
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	90.3 (51.8-172.7)	112.4 (64.4-200.2)	< 0.001
Total Non-ortho PCBs	174.0 (100.2-293.1)	212.9 (125.9-339.8)	< 0.001
Total	741.2 (488.3-1153.6)	907.6 (551.2-1328.2)	< 0.001
Total PCDDs-TEQ	10 (7-16)	13 (8-19)	< 0.001
Total PCDFs-TEQ	8 (4-18)	12 (6-31)	< 0.001
Total Non-ortho PCBs-TEQ	10 (5-15)	11 (7-18)	< 0.001
Total TEQ	30 (17-51)	39 (23-71)	< 0.001

CB, chlorinated biphenyl; CDD, chlorinated dibenzo-p-dioxins; CDF, chlorinated dibenzofurans; DIMS, difficulty initiating and/or maintaining sleep; Hx, hexa; Hp, hepta; OCDD, octachlorodibenzo-p-dioxin; OCDF, octachlorodibenzofurans; PCB, polychlorinated biphenyl; PCDD, polychlorinated dibenzo-p-dioxin; PCDF, polychlorinated dibenzofuran; Pe, penta; TCB, tetrachlorobiphenyl; TCDD, tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TCDF, tetrachlorodibenzofuran; TEQ, toxic equivalent quantity.

Table 8. RLS/WED 関連症状による背景因子の比較

	Non-LMR	LMR	RLS/WED	P value
N	456	299	76	
Men, n (%)	224 (49.1)	132 (44.1)	34 (44.7)	0.38
Age, median (IQR)	64 (57-75)	69 (60-79)*	65 (58-77)	< 0.001
BMI kg/m^2, median (IQR)	22.5 (20.5-25.2)	23.0 (21.3-25.3)	22.5 (20.6-24.5)	0.06
Habitual drinker, n (%)	107 (23.6)	55 (18.6)	15 (19.7)	0.26
Smoking status				
Never, n (%)	279 (61.5)	194 (66.0)	47 (61.8)	0.76
Past, n (%)	93 (20.5)	52 (17.7)	14 (18.4)	
Current, n (%)	82 (18.1)	48 (16.3)	15 (19.7)	
Walking				
>= 60 min / day, n (%)	231 (50.8)	137 (46.0)	44 (57.9)	0.14
Exercise				
>= 2 times /week, n (%)	165 (36.3)	117 (39.1)	36 (47.4)	0.18
Vegetable intake				
70-140 g / day, n (%)	229 (50.7)	149 (50.2)	29 (39.2)	0.39
140-280 g / day, n (%)	178 (39.4)	118 (39.7)	34 (45.9)	
>= 280 g / day, n (%)	45 (10.0)	30 (10.1)	11 (14.9)	
Fruit intake				
< 50 g /day, n (%)	235 (51.8)	138 (46.6)	27 (36.0)	0.11
50-100 g /day, n (%)	117 (25.8)	88 (29.7)	27 (36.0)	
>=100 g / day, n (%)	102 (22.5)	70 (23.6)	21 (28.0)	
Sleep time				
< 5 hours, n (%)	30 (6.6)	42 (14.1)	8 (10.7)	0.002
5-6 hours, n (%)	95 (20.9)	83 (27.9)	19 (25.3)	
6-7 hours, n (%)	168 (36.9)	86 (29.0)	24 (32.0)	
7-8 hours, n (%)	91 (20.0)	43 (14.5)	17 (22.7)	
8-9 hours, n (%)	43 (9.5)	34 (11.4)	5 (6.7)	
> 9 hours, n (%)	28 (6.2)	9 (3.0)	2 (2.7)	
Insomnia symptoms, n (%)	260 (57.0)	232 (77.6)	53 (69.7)	< 0.001
DIS, n (%)	114 (25.0)	109 (36.5)	26 (34.2)	0.002
DMS, n (%)	169 (37.1)	171 (57.2)	35 (46.1)	< 0.001
DIS and/or DMS, n (%)	218 (47.8)	207 (69.2)	46 (60.5)	< 0.001
WE, n (%)	112 (24.6)	125 (41.8)	28 (36.8)	< 0.001
Daytime sleepiness, n (%)	166 (36.4)	162 (54.2)	36 (47.4)	< 0.001

* *vs.* non-LMR $p < 0.001$. BMI, body mass index; DIS, difficulty initiating sleep; DMS, difficulty maintaining sleep; IQR, interquartile range; LMR, leg motor restlessness; RLS/WED, restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease; WE, wake up too early.

Table 9. RLS/WED 関連症状によるダイオキシン類血中濃度の比較

	Non-LMR	LMR	RLS/WED	p value
N	456	299	76	
2,3,7,8-TCDD	1.3 (0.5-1.9)	1.4 (0.5-2.1) **	1.2 (0.5-2.0)	0.005
1,2,3,7,8-PeCDD	6.4 (4.2-9.4)	7.7 (5.0-11.2) **	6.1 (4.2-9.7)	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.0 (1.0-2.9)	2.3 (1.0-3.3) **	1.0 (1.0-2.9)	0.004
1,2,3,6,7,8-HxCDD	18.8 (12.5-32.5)	24.4 (14.1-40.2) **	22.3 (13.6-38.3)	0.001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2.6 (1.0-4.1)	3.2 (1.0-4.8)	2.7 (1.0-4.6)	0.08
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	30.1 (20.8-44.4)	34.4 (23.2-51.6) **	31.3 (20.6-44.9)	0.01
OCDD	414.5 (277.0-642.5)	482.1 (311.2-716.9) *	391.3 (246.1-595.0)	0.01
Total PCDDs	479.7 (329.8-734.8)	568.5 (365.9-835.6) **	455.4 (317.8-705.8)	0.004
2,3,7,8-TCDF	1.3 (0.5-2.5)	1.5 (0.5-2.7)	1.4 (0.5-2.6)	0.35
1,2,3,7,8-PeCDF	0.5 (0.5-1.5)	0.5 (0.5-1.6)	0.5 (0.5-1.5)	0.26
2,3,4,7,8-PeCDF	22.5 (12.1-59.6)	29.0 (15.0-85.2) *	29.3 (10.6-82.2)	0.02
1,2,3,4,7,8-HxCDF	4.4 (2.6-9.9)	5.6 (3.0-14.0) *	4.7 (2.4-14.2)	0.02
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4.3 (2.7-7.2)	5.3 (3.0-10.0) **	4.4 (2.4-8.4)	0.004
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.55
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.37
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.0 (1.0-2.5)	1.0 (1.0-2.7)	1.0 (1.0-2.3)	0.16
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.89
OCDF	2.0 (2.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	0.89
Total PCDFs	43.6 (26.5-89.5)	51.6 (30.5-119.6) **	47.0 (23.2-118.1)	0.01
3,4,4',5-TCB (#81)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	0.86
3,3',4,4'-TCB (#77)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-10.1)	5.0 (5.0-6.3)	0.99
3,3',4,4',5-PeCB (#126)	64.0 (37.1-110.2)	73.7 (40.6-129.2)	60.4 (37.9-101.5)	0.05
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	94.0 (54.1-170.9)	110.8 (64.1-198.1)	103.3 (52.9-195.2)	0.03
Total Non-ortho PCBs	181.0 (106.7-302.1)	221.9 (121.2-341.2) *	184.2 (111.5-312.0)	0.02
Total	775.0 (505.0-1184.8)	947.3 (571.0-1390.0) **	740.0 (483.4-1165.1)	0.001
Total PCDDs-TEQ	11 (7-16)	13 (9-19) **	11 (7-17)	< 0.001
Total PCDFs-TEQ	8 (5-20)	10 (6-28) **	10 (4-28)	0.01
Total Non-ortho PCBs-TEQ	10 (5-17)	12 (6-19) *	10 (6-16)	0.02
Total TEQ	31 (18-54)	39 (23-69) **	32 (19-59)	0.003

* vs. non-LMR $p < 0.05$, ** vs. non-LMR $p < 0.01$. CB, chlorinated biphenyl; CDD, chlorinated dibenzo-p-dioxins; CDF, chlorinated dibenzofurans; Hx, hexa; Hp, hepta; LMR, leg motor restlessness; OCDD, octachlorodibenzo-p-dioxin; OCDF, octachlorodibenzofurans; PCB, polychlorinated biphenyl; PCDD, polychlorinated dibenzo-p-dioxin; PCDF, polychlorinated dibenzofuran; Pe, penta; RLS/WED, restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease; TCB, tetrachlorobiphenyl; TCDD, tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TCDF, tetrachlorodibenzofuran; TEQ, toxic equivalent quantity.

Table 10. Logistic 回帰分析による DIMS 対するダイオキシン類総 TEQ 四分位範囲と RLS/WED 関連症状のオッズ比

	Unadjusted		Adjusted*	
	p value	Odds ratio (95% CI)	p value	Odds ratio (95% CI)
Total TEQ				
Q1: < 20 pg-TEQ/g lipid		1		1
Q2: 20-35 pg-TEQ/g lipid	< 0.001	1.94 (1.34-2.83)	0.004	1.89 (1.23-2.89)
Q3: 35-62 pg-TEQ/g lipid	0.02	1.79 (1.23-2.60)	0.04	1.62 (1.02-2.57)
Q4: ≥ 62 pg-TEQ/g lipid	< 0.001	2.74 (1.87-4.02)	0.006	2.09 (1.24-3.53)
RLS/WED related symptoms				
Non-LMR		1		1
LMR	< 0.001	2.46 (1.81-3.34)	< 0.001	2.35 (1.71-3.24)
RLS/WED	0.04	1.67 (1.02-2.75)	0.04	1.74 (1.04-2.91)

*年齢，性別，BMI，習慣性飲酒，及び喫煙状況で調整した．ダイオキシン類血中濃度の総 TEQ は Q1，Q2，Q3 及び Q4 の四分位に分割した．DIMS, difficulty initiating and/or maintaining sleep; LMR, leg motor restlessness; RLS/WED, restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease; TEQ, toxic equivalent quantity.

分担研究報告書

油症における末梢血リンパ球亜集団に関する検討

研究分担者　　辻　　博　北九州若杉病院 西日本総合医学研究所　所長

研究要旨　2018 年度福岡県油症一斉検診受診者 216 例について末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中 PCB 濃度との関連について検討した。血中 PCB 濃度と T 細胞を示す CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に負の相関を認めた。油症患者では対照者に比較し CD3 陽性細胞の比率および絶対数の低下を認めたが、B 細胞を示す CD20 陽性細胞の比率および絶対数は油症患者と対照者の間に差をみなかった。油症患者において T 細胞の低下が認められ、T 細胞の低下に PCB の慢性的影響が示唆された。

A．研究目的

1968 年 4 月頃よりポリ塩化ビフェニル（PCB）混入ライスオイル摂取により北部九州を中心に発生した油症では、原因油の分析から油症の原因物質としてポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）の毒性影響が大きいと考えられる[1)2)]。PCDF は、狭義のダイオキシンであるポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン（PCDD）およびコプラナーPCB とともにダイオキシン類と総称され、これらの物質の毒性は細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体（Ah 受容体）を介すると考えられているが、その機構の詳細は未だ不明である[3)]。油症発生以来 50 年が経過し種々の症状は軽快しているが、重症例においては体内の PCB 濃度が今なお高く血中 PCB の組成には未だに特徴的なパターンが認められ、慢性中毒に移行していると推定される[4)5)6)]。2001 年度より福岡県油症一斉検診においてダイオキシン類の測定が開始され、油症患者では未だに血中 PCDF 濃度が高値であり、PCDF の体内残留が推測される[7)]。

近年、PCB、ダイオキシン類が内分泌撹乱物質として正常なホルモン作用を撹乱し、生殖機能の阻害、悪性腫瘍の発生、免疫機能の低下等を引き起こす可能性が指摘されている[8)9)]。油症における免疫機能影響については、1996 年度福岡県油症一斉検診において血中 PCB 濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認め油症患者における免疫機能の障害が推測された[10)]。そして、1997 年度の福岡県油症一斉検診において免疫グロブリン IgA、IgG、IgMのいずれか１分画以上の上昇を 40.0%に、自己抗体では抗核抗体を 45.6%と高率に認め、油症において液性免疫の障害を高頻度に認めることが報告されている[11)]。

今回我々は、2018 年度福岡県油症一斉検診において細胞性免疫機能検査として末梢血リンパ球亜集団を測定し、油症における細胞性免疫に対する慢性的影響について検討した。

B．研究方法

2018 年度福岡県油症一斉検診における 15 歳以上の受診者 218 例中、細胞性免疫検査にアンケートにて同意が得られた 216 例を対象者とした。

白血球数、末梢血液像は半導体レーザを使用したフローサイトメトリー法により多項目自動血球分析装置 XE-2100（シスメックス（株））にて測定した。リンパ球亜集

団の測定は抗ヒトマウスモノクローナル抗体を用いフローサイトメトリー法により、T 細胞を示す CD3 陽性細胞を CD3（Leu-4）FITC（日本ベクトン・ディッキンソン(株)）を用いて、B 細胞を示す CD20 陽性細胞を B1-FITC（ベックマン・コールター(株)）を用いて BD FACSCanto Ⅱ フローサイトメーター(BD Biosciences)にて測定した. リンパ球亜集団は、総リンパ球に対する比率および絶対数で表した。

PCB の測定は福岡県保健環境研究所、福岡市保健環境研究所、北九州市環境科学研究所および北九州生活科学センターで行なった。血中 PCB 濃度は 2018 年度福岡県油症一斉検診において測定した 216 例の測定値を用い、CD3 陽性細胞および CD20 陽性細胞との関連について検討した。

結果は平均±標準偏差（mean±S.D.）で表し、平均値の比較についてはｔ検定で行なった。

C．研究結果

2018 年度福岡県油症一斉検診における 15 歳以上の受診者で細胞性免疫検査に同意が得られた 216 例の内訳は女性 122 例、男性 94 例で、平均年齢は 64.1±13.5（15－91）歳であり、油症患者 166 例、油症患者（同居家族）24 例、未認定患者 17 例、観察者 1 例、初回受診者 8 例であった。血中 PCB 濃度と年齢の間に有意の正の相関（r=0.5693, P＜0.001）を認めた。

2018 年度福岡県油症一斉検診の受診者 216 例について血中 PCB 濃度と末梢血リンパ球亜集団の関連について検討した。血中 PCB 濃度と CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に弱いながらも有意の負の相関（r=-0.1727, P＜0.05）を認めた。血中 PCB 濃度と CD3 陽性細胞絶対数の間に相関をみなかった。血中 PCB 濃度と CD20 陽性細胞の比率あるいは CD20 陽性細胞絶対数の間に相関をみなかった。

油症患者 166 例について未認定患者 17 例を対照者として、両群間の CD3 陽性細胞および CD20 陽性細胞について検討を行なった（表 1）。油症患者の平均血中 PCB 濃度は 1.05±0.91ppb、対照者の平均血中 PCB 濃度は 0.34±0.28ppb であった。CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率は対照者 73.6±6.8％に対し油症患者では 66.7±9.8％と有意の低下を認めた（P＜0.005）。CD3 陽性細胞絶対数は対照者 1326.2±232.0/μl に対し油症患者では 1184.8±399.0/μl と有意の低下を認めた（P＜0.05）。CD20 陽性細胞の比率は対照者 11.0±4.3％に対し油症患者では 10.1±4.8％と差をみなかった。CD20 陽性細胞絶対数は対照者 205.5±101.5/μl に対し油症患者では 181.2±109.4/μl と低下傾向を認めたが、差をみなかった。

D．考察

油症における免疫機能への影響については血中 PCB 濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認めることが報告されている。油症発症 28 年後の 1996 年の甲状腺機能検査において、甲状腺ホルモンは血中 PCB 濃度 3.0 ppb 以上の PCB 高濃度群と 3.0 ppb 未満の PCB 低濃度群の間に差がみられなかったが、抗サイログロブリン抗体を高濃度群の 41 例中 8 例（19.5％）と低濃度群の 40 例中 1 例(2.5％)に比べ高頻度に認めた[10]。そして、1997 年度福岡県油症一斉検診において免疫機能検査として免疫グロブリンおよび自己抗体を測定し、油症患者において免疫グロブリン IgA、IgG、IgM のいずれか 1 分画以上の上昇を 40.0%に、自己抗体についてはリウマチ因子を 8.9%に、抗核抗体を 45.6%と高率に認め、液性免疫を中心とする免疫機能に対する慢性的影響が示唆された[11]。さらに、2007 年度福岡県油症一斉検診において、血中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran(PeCDF)濃度と免疫グロブリン IgA およびリウマチ因子

との間に正の相関を、抗核抗体を血中2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ高濃度群に高頻度に認め、油症における免疫グロブリンIgAおよびリウマチ因子の上昇、抗核抗体の出現に 2,3,4,7,8-PeCDF が関与している可能性が考えられ、液性免疫に対する 2,3,4,7,8-PeCDF の慢性的影響が示唆された[12]。そして、油症におけるリンパ球亜集団への影響については2008年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者156 例について末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中 PCB 濃度および血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度との関連について報告されている[13]。血中 PCB 濃度と末梢血リンパ球、helper/inducer T 細胞を示す CD4 陽性細胞、suppressor/cytotoxic T 細胞を示す CD8 陽性細胞および B 細胞を示す CD20 陽性細胞の間に相関はみられなかったが、血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度と末梢血リンパ球数、CD4陽性細胞の間に相関が認められ油症患者の末梢血リンパ球、CD4陽性細胞の増加に 2,3,4,7,8-PeCDF の関与が示唆された。また、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者において低値の患者に比べ末梢血リンパ球、CD4陽性細胞の増加を認めた。

今回の検討では、2018 年度福岡県油症一斉検診の受診者216例について血中PCB濃度と末梢血リンパ球亜集団の関連について検討し、血中PCB濃度とT細胞を示すCD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に負の相関を認めた。そして、油症患者166例について未認定患者17例を対照者としてCD3陽性細胞およびCD20陽性細胞を検討し、CD3陽性細胞の総リンパ球に対する比率および絶対数は対照者に比較し油症患者において低下を認めたが、CD20陽性細胞の比率および絶対数は対照者および油症患者に差をみなかった。血中PCB濃度と CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に負の相関を認め、CD3陽性細胞の総リンパ球に対する比率および絶対数は対照者に比較し油症患者において低下を認めることより油症における T 細胞の低下にPCBの慢性的影響が考えられる。

油症発生50年後の2018年度福岡県油症一斉検診受診者においてリンパ球亜集団を検討し、油症患者において対照者に比べT細胞を示すCD3陽性細胞の低下を認め、血中PCB濃度とCD3陽性細胞の比率の間に弱いながらも負の相関を認めることより油症患者における CD3 陽性細胞の低下にPCBの関与が示唆された。油症におけるリンパ球亜集団に対する慢性的影響の機序は不明であるが、油症の原因物質として毒性影響が大きいと考えられるPCDFの影響についての検討が必要と思われる。

E．結論

油症発生以来50年が経過しているが、2018 年度福岡県油症一斉検診受診者 216例のリンパ球亜集団を検討し油症患者においてT細胞を示すCD3陽性細胞の低下を認めた。血中PCB濃度とCD3陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に負の相関を認めることより油症患者における T 細胞の低下にPCBの慢性的影響が考えられた。

F．参考文献

1. Masuda Y, Yoshimura H : Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance : A Review. Amer J Ind Med 5 : 31-44, 1984.
2. Oishi S, Morita M, Fukuda H : Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 43 : 13-22, 1978.
3. Gonzalez FJ, Liu SY, Yano M : Regulation of cytochrome P450 genes : molecular mechanism. Pharmacogenetics 3 : 51-57, 1993.

4. 飯田隆男，芥野岑男，高田智，中村周三，高橋克巳，増田義人：ヒトの血液中におけるポリ塩化ビフェニルおよびポリ塩化クアテルフェニルについて．福岡医誌 72：185－191，1981.
5. 増田義人，山口早苗，黒木広明，原口浩一：最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニール異性体. 福岡医誌 76：150-152，1985.
6. 増田義人，原口浩一，古野純典：油症患者における PCB 異性体の 30 年にわたる特異な残留.福岡医誌 94:136-143，2003.
7. 飯田隆男，戸高尊，平川博仙，飛石和大，松枝隆彦，堀就英，中川礼子，古江増隆：油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査（2001 年）．福岡医誌 94：126－135，2003.
8. Rier SE,Martin DC,Bowman RE,Dmowski WP and Becker JL：Endometriosis in rhesus monkeys (Macaca mulatta) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.Fundam.Appl.Toxicol.21:433-441，1993.
9. Ohtake F，Takeyama K，Matsumoto T，Kitagawa H，Yamamoto Y，Nohara K，Tohyama C,Krust A,Mimura J,Chambon P，Yanagisawa J，Fujii-Kuriyama Y，Kato S：Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. Nature 423：545-550，2003.
10. 辻 博，佐藤薫，下野淳哉，東晃一，橋口衛，藤島正敏：油症患者における甲状腺機能:油症発生28年後の検討. 福岡医誌 88：231-235，1997.
11. 辻 博，平橋高明，緒方久修，藤島正敏：油症患者における免疫機能の検討. 福岡医誌 90：147-149，1999.
12. 辻 博：油症患者における免疫機能の検討. 熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究 平成 19 年度総括・分担研究報告書 37-39，2008.
13. 辻 博：油症における末梢血リンパ球亜集団の検討.福岡医誌 100:131-135，2009.

G．研究発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

表１　油症患者および対照者におけるリンパ球亜集団

		Controls	Yusho
No.		17	166
CD3 陽性細胞	(%)	73.6±6.8	66.7±9.8[a]
	(/μl)	1,326.2±232.0	1,184.8±399.0[b]
CD20 陽性細胞	(%)	11.0±4.3	10.1±4.8
	(/μl)	205.5±101.5	181.2±109.4

[a]P＜0.005 vs. Controls,　[b]P＜0.05 vs. Controls.

分担研究報告書

長崎県油症認定患者におけるセマフォリン 7A(Sema7A)の検討

研究分担者　室田　浩之　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 教授
研究協力者　神尾　芳幸　九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教

研究要旨
平成 29 年度は油症患者における血清セマフォリン 3A(Sema3A)の変化を検討した。その結果、油症認定患者では Sema3A が高値であることが判明した。Sema3A は神経系への影響のみならず、免疫調節機構への関与も報告されており、油症患者へ何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。平成 30 年度はサイトカイン産生と T 細胞の制御に関わり、アレルギー性疾患に寄与するとされるセマフォリン 7A(Sema7A)について解析し認定患者(N=31)と健常人(N=31)で比較、検討した。その結果、油症患者と健常人とに統計上の有意差を認めなかった(p=0.833)。Sema7A と PCB、PCQ、PCDF を比較したところ、PCB のみ Sema7A と有意な相関を認めた。

A. 研究目的

油症発生から 50 年が経過し、皮膚症状、眼症状を呈する患者は減少傾向にあるが、依然として油症患者血中には高濃度のダイオキシンが残留している。油症の原因であるカネミオイルには Polychlorinated biphenyls (PCB), Polychlorinated quarterphenyls (PCQ) 及び Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) を含む dioxin 類が混在している事がわかっている[1]。

セマフォリンは神経軸索ガイダンスなど生体内で様々な情報伝達を担うタンパク質である。構造の違いにより Sema1 から Sema8 まで 8 種類のサブファミリーに分かれており、Sema7A は神経軸索ガイダンスのほかに単核球の活性化など免疫セマフォリンとしてもはたらく。Sema7A は活性化した T 細胞より多量に放出される。

平成 29 年度の研究で Sema3A は油症患者において有意に高値であったことから、ほかの免疫セマフォリンも Sema3A と同様に油症患者で変動している可能性を考えた。

そこで、我々は、油症患者血清中の Sema7A 濃度について検討を行った。

B. 研究方法

①対象: 2005 年から 2009 年に施行された長崎県油症検診受診者のうち、同意を得られ、かつ PCB、PCQ、PCDF の測定を行った油症認定患者 31 名および年齢を合わせた健常人 31 名を対象とした。検診時に採血を行い、凍結保存し Sema7A 測定用サンプルとした。

②Sema7A の測定:ヒト Sema7AELISA キット (LifeSpan BioSciences 社製)を用いてサンプル血清中の Sema7A を測定した。

③Sema7A と各種ダイオキシン濃度との相関: 油症患者データベースを元に、②で算出した値と同一患者の血清採取時の PCB、PCQ、PCDF 濃度との相関を検討した。

④統計処理:油症認定患者と健常人における Sema7A 値の比較には

Mann-Whitneyの U 検定を、油症認定患者におけるダイオキシン濃度と Sema7A 値の相関には Spearman の順位相関係数の検定を用いた。$p<0.05$ を統計学的有意とした。

C. 研究結果

長崎県の油症認定患者（Pt）31 名、および健常人（CON）31 名の平均年齢はそれぞれ 72.0±8.6 歳、および 67.9±11 歳で有意差は認めなかった。それぞれの群における血清中 Sema7A の比較を図 1 に示す。油症患者と健常人とに有意な差は認めなかった(P=0.83)。また、認定患者における Sema7A と各種ダイオキシン濃度との spearman 順位相関係数をみたところ、PCB と有意（P=0.024）に相関していた（図 2)。PCDF と PCQ とは有意な相関を認めなかった。

D. 考察

Sema7A はほかのセマフォリンファミリーと異なり、GPI アンカー型の分子である。Sema7A はリンパ球や好酸球、骨髄細胞、骨細胞、神経、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など多くの細胞に発現している[1]。免疫のエフェクターフェーズで T 細胞がマクロファージと相互作用する際に、T 細胞に発現する Sema7A がα1β1 インテグリンを介してマクロファージを活性化し、TNFαなどの炎症性サイトカインの産生を促す[2]。さらに、Sema7A はアレルギー性疾患の病態に関与している可能性が示唆されている[3]。平成 29 年度の研究で Sema3A が油症患者で有意に高値となっていたことから、同じ免疫セマフォリンの一つである Sema7A でも同様に油症患者で変動がある可能性を推測した。しかし、油症患者と健常者において血清 Sema7A の変動に差を認めなかった。油症認定患者と健常者との比較では Sema7A の変動の差に有意差はなかったが、油症患者において Sema7A と血中 PCB 濃度には有意な正の相関関係を認めており、PCB が Sema7A の産生に何らかの影響を与えている可能性が示唆される。

E. 結論

セマフォリンファミリーとダイオキシン、油症患者の免疫応答との関連については、これまでに詳細な報告はなく、今回の結果が油症患者の免疫応答における病態解明の発展の一助となることを期待する。

謝辞

これまでの油症研究にお力添え頂いた関係者の皆様、快く血液をご提供下さった油症患者の皆様に深謝致します。

参考文献

1. Holmes et al., 2002; Sato and Takahashi, 1998; Mine et al., 2000; Esnault et al., 2014
2. 高松　漂太、熊ノ郷　淳, 生化学　第 83 巻　第 12 号, 1103-1109, 2011
3. N.Mizutani et al, Europian Journal of Pharmacology 764 2015, 149-156

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1

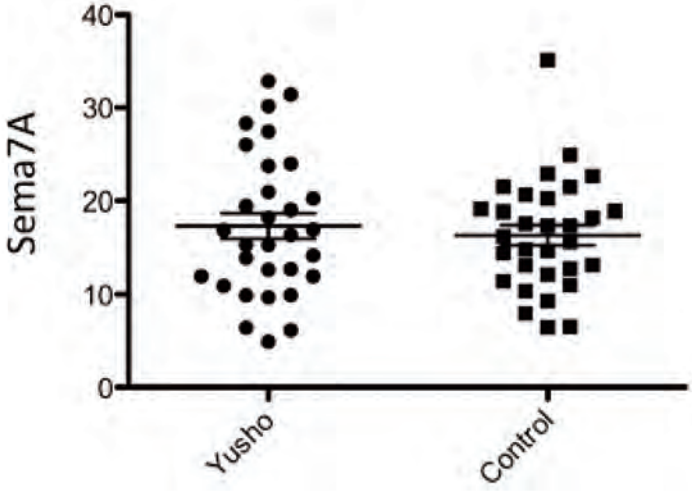
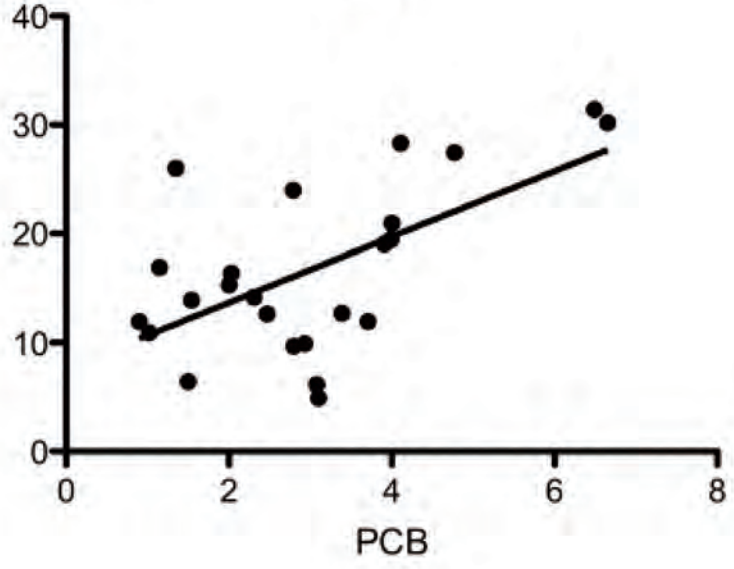


図2



分担研究報告書

油症認定患者における soluble IL-13 の検討

研究分担者（平成30年5月～平成31年3月）
室田　浩之　　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 教授
研究分担者（平成30年4月）
竹中　基　　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 准教授
研究協力者（平成30年4月～12月）
富村　沙織　　長崎大学病院皮膚科・アレルギー科　講師

研究要旨　以前の検討にて、油症患者において、血清 IL-33 値や IL-35 値が優位に高値であることを確認した。これらのサイトカインは Treg 細胞を活性化、あるいは維持するサイトカインであり、油症認定患者では T 細胞系の免疫が活性化している可能性がある。今回、主に Th2 細胞から分泌される血清 IL-13 について、正常人との比較を行った。その結果、血清中 IL-13 値は油症患者 419.3±338.7(pg/ml, mean±SD)、健常人 366.6±66.07(pg/ml, mean±SD)であり、2 群間に有意な差を認めなかった(p=0.3864)。

A. 研究目的

1968年カネミ油症事件発生後50年以上経過し、初期に認められた激しい症状は消退傾向にあるが、現在でも痤瘡様皮疹などの皮膚症状、咳嗽や喀痰過多などの呼吸器症状、しびれや頭重などの神経症状、全身倦怠感などの全身症状など多彩な症状が残存している。油症の原因であるカネミオイルには Polychlorinated biphenyls (PCB), Polychlorinated quarterphenyls (PCQ) 及び Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) を含む dioxin 類が混在していることがわかっている [1]。しかし、これらのダイオキシン類は自己代謝が進まず、また代謝経路が不明であることから治療薬の開発が遅れ、油症患者では依然として高濃度のダイオキシン類が検出されている。

以前に行った油症患者血清サイトカインの検討において、IL-33 や IL-35 等が長崎地区油症認定患者で有意に上昇していた [2]。これらは制御性 T 細胞の活性化等に関与しており、油症認定患者では T 細胞系の免疫が活性化している可能性が示唆されている。Il-13 は主に Th2 細胞から産生され、肥満細胞、マクロファージ等を主な標的細胞として、免疫系に関して重要な役割を担っている事が知られている。油症患者でも血清 IL-13 値が変動しているかどうかを解析する事は油症患者の諸症状の原因解明に役立つと考える。今回我々は血清中の IL-13 値を測定し、正常人との比較検討を行った。

B. 研究方法

①対象：2005 年から 2008 年に施行された長崎県油症検診受診者のうち、同意を得られかつ PCB, PCQ, PCDF の測定を行った油症認定患者 31 名および年齢をあわせた健常人 31 名を対象とした。検診時に採血を行い凍結保存し sIL-13 測定用サンプルとした。

②sIL-13 の測定；ヒト IL13 アッセイキット（IBL 社製）を用いてサンプル血清中の IL-13 値を測定した。

③検査値との相関；油症患者データーベ

ースを元に血清採取時の PCB, PCQ, PCDF と血清 IL-13 値との相関を検討した。

④統計的処理：測定した血清 IL-13 値の統計的処理に Mann-Whitney の U 検定、Spearman の順位相関係数の検定を使用した。

（倫理面への配慮）

本研究は人を対象とする「医学系研究に関する倫理指針」に則り、長崎大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得て行った。データの解析は個人情報が特定されないよう、連結不可能な匿名化データとして解析を行った。

C. 研究結果

検討した油症患者におけるダイオキシン濃度は PCB 2.89 ± 1.21 ppb、PCQ 0.39 ± 0.43 ppb、PCDF 277.6 ± 150.6 pg/g lipids であった。油症患者血清を用いて、IL-13 の検討を行った。長崎県の油症患者 31 名、および健常人 31 名の平均年齢は各々71.7 ± 6.36 歳および 71.4 ± 6.28 歳で有意差はなかった。血清中 IL-13 値はそれぞれ油症患者 419.3±338.7(pg/ml, mean±SD)、健常人 366.6±66.07(pg/ml, mean±SD)であり、2 群間に有意な差は認められなかった (p=0.3864)（図 1）。つづいて、油症認定患者血清中の Il-13 値と PCB, PCQ, PCDF 値に関し検討を行ったが相関は認められなかった。

D. 考察

IL-13 は主に Th2 細胞から産生され、肥満細胞、マクロファージ等を主な標的細胞として、寄生虫の排除などに重要な役割を担っている事が知られている。当大学で以前行った検討では、血清 IL-33 値や IL-35 値等がコントロールと比較し長崎地区油症患者において有意に上昇していた。また、Ah 受容体（arylhydrocarbon receptor, 芳香族炭化水素受容体）はダイオキシン類を認識し、発生, 生殖機能, 免疫機能の障害や, 癌化などの毒性の発現に関与することが知られており、Ah 受容体はリガンドに依存して活性化する転写因子として機能し, ダイオキシンなどの毒性に関与することが知られている。ピーナッツアレルギーモデルマウスにおいて、ダイオキシン類が Ah 受容体に影響を与え、その結果 IL-5、IL-13 や IFN-γ 産生が抑制されていたとする報告がある [3]。よって、我々は油症患者血清 IL-13 も変動している可能性を疑った。しかし、残念ながら今回の検討では、油症認定患者と健常人の血清 IL-13 値は有意差を認めなかった。

油症患者は現在でもダイオキシン類の血中濃度が高く、様々な症状を有しているのが現状である。残念ながら、今回の検討では有意な結果が得られなかった。しかし、これまでの結果と合わせて油症患者における T 細胞のサイトカインネットワーク動態を解明すること、また油症患者の諸症状の原因解明に役立つと考える。今後も更なる検討で油症患者におけるサイトカイン動態等の解明を行い、油症患者の QOL 向上に繋がるよう役立てていきたい。

謝辞

PCB, PCQ, PCDF のデータを提供して頂いた長崎県環境保健研究センターならびに福岡県保健環境研究所の方々にこの場をかりて御礼申し上げます。

E. 参考文献

1. Aoki Y: Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters -what we have learned from Yusho disease. *Environ Res* 2001, 86(1):2-11.
2. Kuwatsuka Y, Shimizu K, Akiyama Y, Koike Y, Ogawa F, Furue M, Utani A: Yusho patients show increased serum IL-17, IL-23, IL-1beta, and TNF alpha levels more than 40 years after

accidental polychlorinated biphenyl poisoning. *J Immunotoxicol* 2014, 11(3): 246-249.

3. V.J.Schulz, M. van Roest, M.B.M van Duursen et al.: Aryl hydrocarbon receptor activation affects the dendritic cell phenotype and function during allergic sensutuzation. *Immunobiology*, 2013, 218(2013): 1055- 1062.

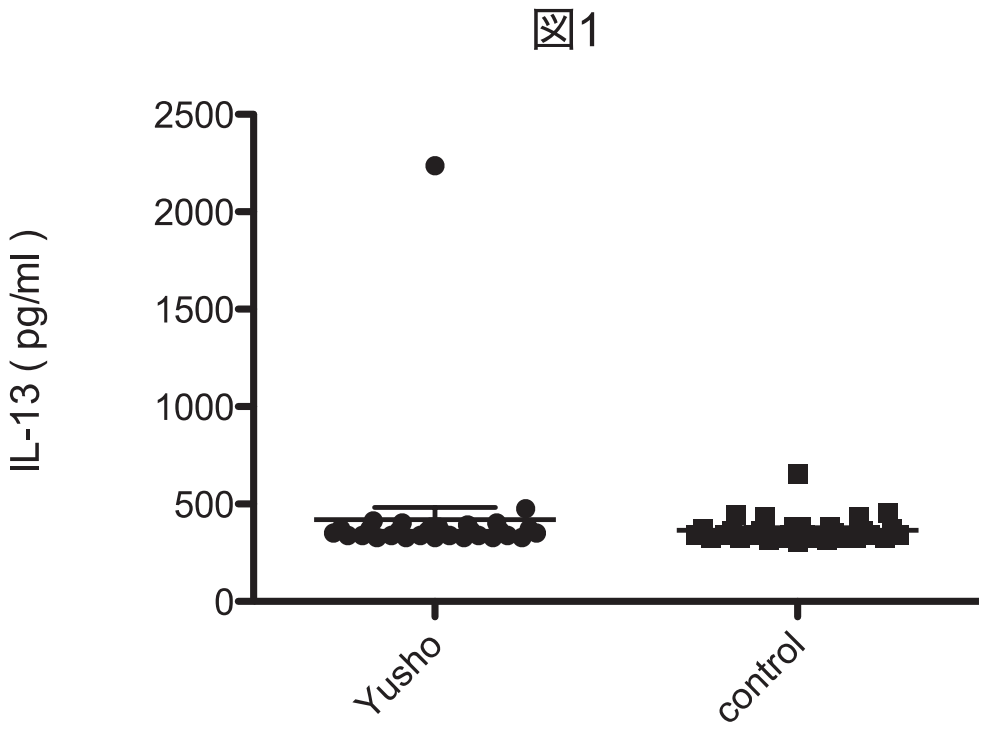
F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1　油症認定患者、健常人血清における血清IL-13値の比較



分担研究報告書

カネミ油症患者における末梢神経障害に関する文献的研究

研究分担者　　山下 謙一郎　九州大学神経生理学　助教

研究要旨　カネミ油症患者に生じる末梢神経障害の報告は近年減少している。PCB、PCDF、dioxinによる中毒症状の発生減少とともに末梢神経障害が評価されていない可能性も考えられた。

A．研究目的

カネミ油症患者では四肢異常感覚を多く認め、発症後長期間経過した後でも症状が残存していることが多い。九大神経内科では平成20年度に文献的検討を行い、PCB/dioxinによる中毒症状の中で、末梢神経障害の頻度は少ないことを報告した。

今年度の研究では、最近の研究によるカネミ油症患者末梢神経障害の特徴を抽出するためPCB(polychlorinated biphenyl)、PCDF(polychlorinated dibenzofuran)とdioxinにおける末梢神経障害を10年ぶりに文献的に検索した。

B．研究方法

Pubmedにて PCB、PCDF、dioxin、neuropathy をキーワードとして検索を実施した。2009 年以降のヒト対象の研究の発表年、著者、中毒経路、末梢神経障害に関しての要点を検証した。

（倫理面への配慮）
個人情報は原則的に検証の対象としていないが、個人のプライバシーが侵害されないように配慮した。

C．研究結果

1.PCB、PCDF、dioxin、neuropathy をキーワードとした文献検索
2009年以降でPCBとneuropathyで文献はなく、PCDF と neuropathy でも文献なし。Dioxin と neuropathy で 6 文献[1)-6)]、polychlorinated biphenyl とneuropathyで1文献[7)]が抽出され、全てヒトが暴露されることによって生じた末梢神経障害に関する報告であった。このうち台湾からの報告では中枢神経症状とともに末梢神経障害を認めていたが1984年以降の発症症例は認められなかった。

D．考察

PCB、PCDF、dioxin、neuropathy をキーワードとした文献の中でヒトを対象とした報告は平成20年度の報告と同様少なかった。

Dioxinとintoxicationを検索した場合は17件、PCBとintoxicationの検索では8 件の文献が検索されることを考えると、臨床症状としての末梢神経障害が検討項目として挙げられていない可能性も考えられた。末梢神経障害の出現は暴露時の濃度が重要な要因であることが判明してお

り、カネミ油症のように慢性的に混入物を摂取した場合は末梢神経障害の出現率が高いと考えられた。

E．結論

PCB、PCDF、dioxinによるneuropathyの報告は2009年以降日本からのものはなく、世界的にも減少傾向であった。

また合併症状としてのneuropathyの報告も少ないことが判明した。

F．研究発表

なし

G．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

なし

３．その他

特記事項なし

1)
Little AA et al., Clinical description of toxic neuropathies. Handb Clin Neurol. 2015;131:253-96.

2)
Safe TM et al., Prenatal low dosage dioxin (TCDD) exposure impairs cochlear function resulting in auditory neuropathy. Hear Res. 2016 Jan;331:7-12.

3)
Institute of Medicine (US) Committee to Review the Health Effects in Vietnam Veterans of Exposure to Herbicides. Washington (DC): National Academies Press (US); 1996

4)
Institute of Medicine (US) Committee to Review the Health Effects in Vietnam Veterans of Exposure to Herbicides (Third Biennial Update). Washington (DC): National Academies Press (US); 2001.

5)
Yi SW et al., Agent Orange exposure and prevalence of self-reported diseases in Korean Vietnam veterans. J Prev Med Public Health. 2013 46 :213-25.

6)
Disease associated with exposure to certain herbicide agents: peripheral neuropathy.
Department of Veterans Affairs.
Fed Regist. 2013 Sep 6 ; 78(173):54763-6.

7)
Liu CH et al., Occupational neurotoxic diseases in taiwan.
Saf Health Work. 2012 3 :257-67.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握と
その治療法の開発等に関する研究
平成 30 年度　分担研究報告書

地域住民における血中ダイオキシン類濃度と疾病および疾病マーカーの関係の検討

研究分担者 二宮 利治
（九州大学大学院医学研究院 衛生・公衆衛生学分野・教授）
研究協力者 吉田 大悟
（九州大学大学院医学研究院 衛生・公衆衛生学分野・助教）

研究要旨　ダイオキシン類は細胞に酸化ストレスを与えるため、様々な病態を引き起こすと考えられている。平成 30 年度は、平成 27 年度に地域一般住民を対象に実施した断面調査の成績を用いて、血中ダイオキシン類濃度と酸化ストレスや高血糖、不健康な生活習慣により上昇すると考えられている糖化反応最終生成物(Advanced Glycation Endproducts: AGEs)との関連について検討した。AGEs 蓄積量は AGE Reader を用いて AGEs 皮膚蛍光（Advanced Glycation Endproducts Auto Fluorescence：AGEs-AF）値を測定し評価した。血中ダイオキシン類濃度を測定した地域住民 495 人のうち 489 人が AF を測定し、その集団における AF の平均値は 2.20（標準偏差 0.46）であった。血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の上昇に伴い、AGEs-AF の粗平均値は有意に上昇した(傾向性 P 値<0.0001)。しかし性別、年齢、BMI、収縮期血圧、中性脂肪、HbA1c、eGFR、喫煙習慣、飲酒習慣、運動習慣を調整した検討では、その有意な関連は消失した（傾向性 P 値=0.07)。地域一般住民における血中ダイオキシン類濃度と糖化反応最終生成物（AGEs）の蓄積との間に明らかな関連は認められなかった。

A．研究目的

ダイオキシン類は、ポリ塩化ジベンゾパラジオキシン（PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF)、ダイオキシン様ポリ塩化ビフェニル（DL-PCB)の総称である。主に物が燃焼するときに生成されるため、自然界に環境汚染物質として拡散し、食物連鎖のなかで微量ながらも人体を汚染している。

ダイオキシン類は、ダイオキシン受容体に結合することにより細胞に強い酸化ストレスを与える。そのため、様々な病態を引き起こすと考えられているが、地域住民におけるダイオキシン類による人体影響の実態は未だつかめていない。

近年、身体の老化と関連していると報告されている糖化反応最終生成物（Advanced Glycation Endproducts: AGEs）が注目されている。

本年度は平成 27 年度に地域一般住民489人を対象に実施した断面調査の成績を用いて、地域住民のおける血中ダイオキシン類濃度と AGEs 蓄積量の関連について検討する。

B. 研究方法

本研究では、平成 27 年 10 月 23 日から 11 月 29 日に本研究に同意の得られた福岡県久山町の地域住民 495 人（平均年齢 62 歳）を対象に断面調査を実施し、血中ダイオキシン類濃度測定のための採血と心血管病や悪性疾患、生活習慣病などの有病率調査および様々な疾病マーカー測定を行った。

断面調査では調査票を用いて自覚症状、既往歴、現病歴、生活歴等の調査を行い、内科、眼科、皮膚科の医師の診察により身体所見を検査した。さらに、胸部Ｘ線写真、心電図、腹部エコー、骨密度測定、皮膚 AGEs 検査を実施した。採血では血中ダイオキシン類濃度に加え、血液生化学検査および免疫学的検査、ホルモン学的検査を行った。

血中ダイオキシン類濃度の測定は北九州生活科学センターに依頼した。ダイオキシン類濃度はポリ塩化ジベンゾダイオキシン（PCDD）7 種，ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)10 種，ノンオルソ PCB 4 種の 21 異性体について測定した。

真空採血管を用い血液を 30 ml 採取し、ダイオキシン類濃度測定まで冷蔵保存した。血液 5g を凍結乾燥した後、内標準を添加し高速溶媒抽出器（ASE）でダイオキシン類を抽出した。さらに，硫酸処理した後，硝酸銀シリカゲルカラムおよび活性炭カラムを直結して精製した。続いて、ダイオキシン画分を濃縮し，溶媒除去大量試料注入装置（SCLV）を装着した高分解能 GC/MS を用いて測定した。

ダイオキシン類の毒性等価量（TEQ）の計算には WHO が 2005 年に発表した毒性等価係数（TEF：WHO-05）を用いて計算し、検出限界以下の異性体は検出限界値の 1/2 をその濃度として計算した。

AGEs 蓄積量は AGE Reader を用いて AGEs 皮膚蛍光（Advanced Glycation Endproducts Auto Fluorescence : AGEs-AF）値を測定し評価した。AGE Reader は皮膚組織へ沈着した AGEs が紫外線照射により特有の自己蛍光を発する性質を利用した非侵襲的な検査方法である。測定部位は前腕部であり座位で 1 回測定した値を解析に使用した。

血中ダイオキシン濃度を 3 分位したのち AF との関連を検討した。解析には共分散分析とロジスティック回帰分析を用い、性、年齢、BMI、収縮期血圧、中性脂肪、HbA1c、eGFR、運動習慣、飲酒習慣、喫煙習慣を交絡因子として調整した。

（倫理面の配慮）

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針」に基づき研究計画書を作成し、九州大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。また研究対象者から書面にて研究参加への同意を取得した上で実施された。研究者は、対象者の個人情報の漏洩を防ぐ上で細心の注意を払い、その管理に責任を負う。

C. 研究結果

本研究対象者におけるAGEs-AF値の分布を図1に示す。地域一般住民489人のAGEs-AFの粗平均値は2.20（標準偏差0.46）であった。男性のAGEs-AF値の粗平均値は2.32、女性は2.13であり男性でよりAGEs-AF値が高かった（p値<0.0001）。さらに、調査参加者の年齢階級別にAGEs-AFの平均値を検討したところ、AGEs-AF粗平均値は、年齢階級が上がるとともに直線的に上昇した（傾向性P値<0.0001）（図2）。

表1に研究対象者における血中2,3,4,7,8-PentaCDF濃度レベル別の臨床背景を示す。2,3,4,7,8-PentaCDFの濃度が上昇するとともに喫煙習慣がある者の頻度は減少していた。

次に血中2,3,4,7,8-PentaCDF濃度別にAGEs-AF値の平均値を比較した（表2）。血中2,3,4,7,8-PentaCDFの濃度が上昇するとともにAGEs-AFの粗平均値は有意に上昇した（傾向性P値<0.0001）。しかし性・年齢調整によりこの有意差は消失した（傾向性P値=0.09）。さらにBMI、収縮期血圧、中性脂肪、HbA1c、eGFR、運動習慣、飲酒習慣、喫煙習慣を調整した検討でも、血中2,3,4,7,8-PentaCDF濃度とAGEs-AF値の間に有意な関連は認められなかった（傾向性P値=0.07）。

D. 考察

福岡県久山町の地域住民489人におけるAGEs-AFの粗平均値は2.20であり、年齢階級の上昇に伴い、AGEs-AFの平均値は上昇していた。これは日本人を対象とした先行研究における結果と同様であり、AGEsは加齢とともに蓄積していくとの報告に矛盾しないものであった。

本研究では、AGEs-AF値の粗平均値は、血中2,3,4,7,8-PentaCDF濃度の上昇に伴い有意に増加した。しかしながら、2,3,4,7,8-PentaCDF濃度とAGEs-AF値はともに加齢に伴い上昇することから、性・年齢調整後にその有な関係は消失した。

AGEsは年齢と独立して酸化ストレス、高血糖、腎機能低下、喫煙や飲酒、運動不足などの不健康な生活習慣によって上昇することが報告されている。本研究では、これらの危険因子を用いて多変量調整して検討した結果、血中2,3,4,7,8-PentaCDF濃度とAGEs-AF値との間に明らかな関連を認めなかった。地域住民におけるダイオキシン類濃度は著しく低値であり、皮膚AGEsの蓄積への直接的な影響は少ないことが考えられる。

E. 結論

地域一般住民における血中ダイオキシン類濃度と糖化反応最終生成物（AGEs）の蓄積との間に明らかな関連は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hatabe Y, Shibata M, Ohara T, Oishi E, Yoshida D, Honda T, Hata J, Kanba S, Kitazono T, Ninomiya T. Decline in handgrip strength from midlife to late-life is associated with dementia in a Japanese community: the Hisayama Study. ***J Epidemiol***. 2018 (in press)

2) Ohara T, Hata J, Tanaka M, Honda T, Yamakage H, Yoshida D, Inoue T, Hirakawa Y, Kusakabe T, Shibata M, Teraoka T, Kitazono T, Kanba S, Satoh-Asahara N, Ninomiya T. Serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2 as a biomarker for incident dementia: the Hisayama Study. ***Ann Neurol***. 2018 (in press)

3) Mukai N, Hata J, Hirakawa Y, Ohara T, Yoshida D, Nakamura U, Kitazono T, Ninomiya T. Trends in the prevalence of type 2 diabetes and prediabetes in a Japanese community, 1988-2012: the Hisayama Study. ***Diabetol Int*** 2018 (in press)

4) Honda T, Kishimoto H, Mukai N, Hata J, Yoshida D, Hirakawa Y, Shibata M, Ohara T, Kumagai S, Ninomiya T. Objectively measured sedentary time and diabetes mellitus in a general Japanese population: the Hisayama Study. ***J Diabetes Investig*** (in press)

5) Honda T, Yoshida D, Hata J, Hirakawa Y, Ishida Y, Shibata M, Sakata S, Kitazono T, Ninomiya T. Development and validation of modified risk prediction models for cardiovascular disease and its subtypes: the Hisayama Study. ***Atherosclerosis.*** 2018;279:38-44.

6) Tanaka M, Honda T, Yamakage H, Hata J, Yoshida D, Hirakawa Y, Shibata M, Inoue T, Kusakabe T, Satoh-Asahara N, Ninomiya T. A potential novel pathological implication of serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cell 2 in insulin resistance in a general Japanese population: the Hisayama study. ***Diabetes Res Clin Pract.*** 2018;146:225-232.

7) Yubi T, Hata J, Ohara T, Mukai N, Hirakawa Y, Yoshida D, Gotoh S, Hirabayashi N, Furuta Y, Ago T, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Prevalence of and risk factors for cerebral

microbleeds in a general Japanese elderly community. ***Neurol Clin Pract***. 2018;8:223-231.

8) Fujiwara K, Yasuda M, Hata J, Oshima Y, Hashimoto S, Yoshitomi T, Kiyohara Y, Ishibashi T, Ninomiya T, Sonoda KH. Prevalence and risk Factors for polypoidal choroidal vasculopathy in a general Japanese population: the Hisayama Study. ***Semin Ophthalmol***. 2018;33:813-819.

9) Ohara T, Honda T, Hata J, Yoshida D, Mukai N, Hirakawa Y, Shibata M, Kishimoto H, Kitazono T, Kanba S, Ninomiya T. Association between daily sleep duration and risk of dementia and mortality in a Japanese community. ***J Am Geriatr Soc***. 2018;66:1911-1918.

10) Shibata M, Ohara T, Yoshida D, Hata J, Mukai N, Kawano H, Kanba S, Kitazono T, Ninomiya T. Association between the ratio of serum arachidonic acid to eicosapentaenoic acid and the presence of depressive symptoms in a general Japanese population: the Hisayama Study. ***J Affect Disord***. 2018;237:73-79.

11) Furuta Y, Hata J, Mukai N, Hirakawa Y, Ago T, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Secular trends in the incidence, risk factors, and prognosis of transient ischemic attack in Japan: the Hisayama Study. ***Atherosclerosis***. 2018;273:84-90.

12) Takae K, Hata J, Ohara T, Yoshida D, Shibata M, Mukai N, Hirakawa Y, Kishimoto H, Tsuruya K, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Albuminuria increases the risks for both Alzheimer disease and vascular dementia in community-dwelling Japanese elderly: the Hisayama Study. ***J Am Heart Assoc***. 2018;7:pii: e006693.

13) Iida M, Ikeda F, Hata J, Hirakawa Y, Ohara T, Mukai N, Yoshida D, Yonemoto K, Esaki M, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Development and validation of a risk assessment tool for gastric cancer in a general Japanese population. ***Gastric Cancer***. 2018;21:383-390.

2. 学会発表　なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得　なし
2. 実用新案登録　なし
3. その他　なし

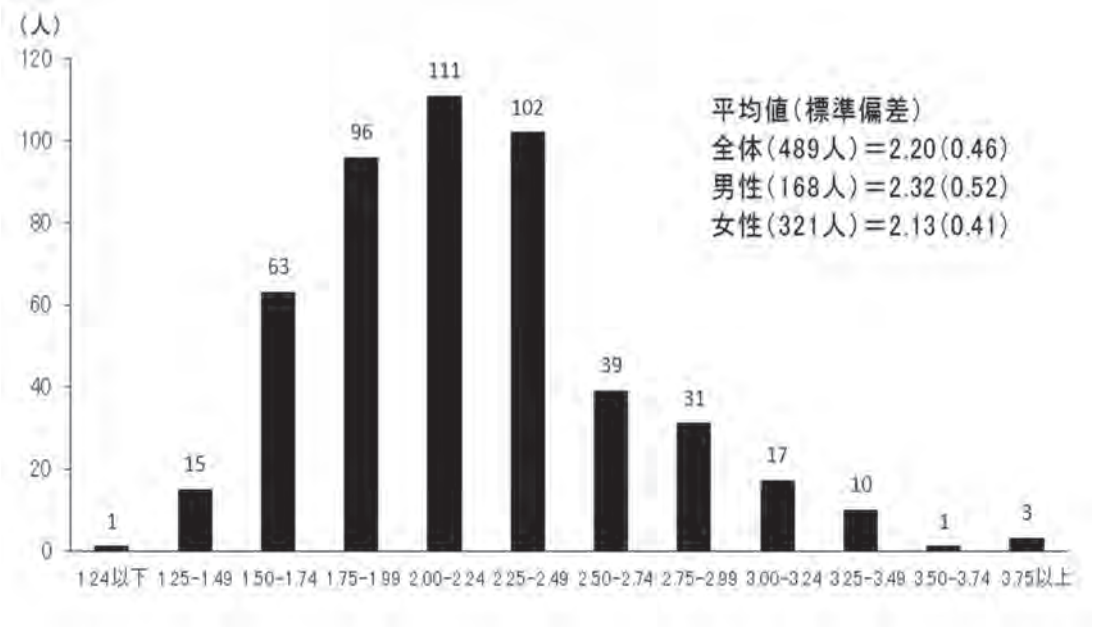


図１．　AGEs-AF 値の分布，久山町男女 489 人

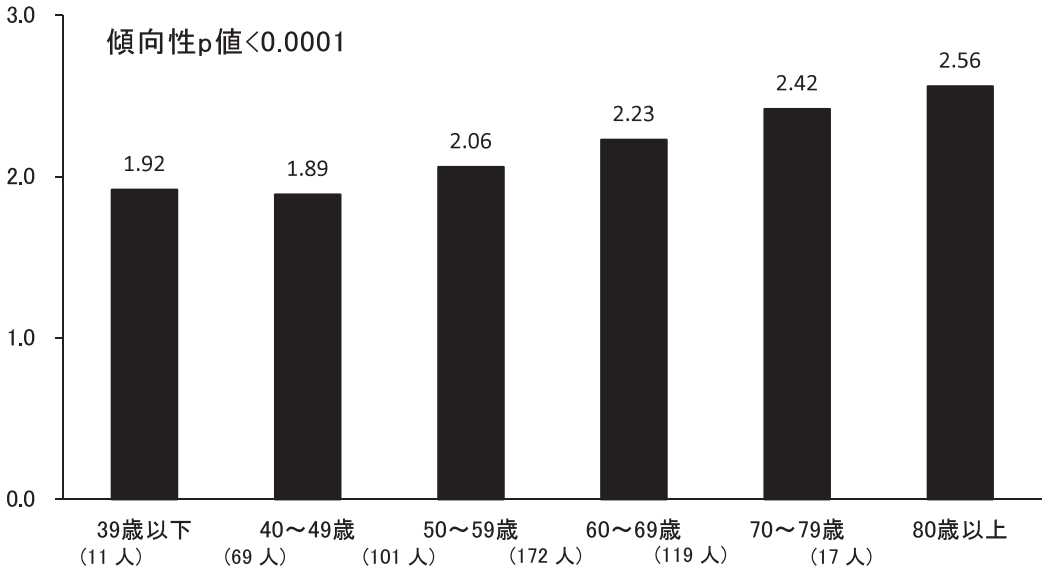


図 2．年齢階級別の AGEs-AF 値の分布，久山町男女 495 人

表 1. 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度別の対象者の臨床背景因子、久山町男女 489 人、性年齢調整

臨床背景因子	2,3,4,7,8-PeCDF (pg/g lipid)			傾向性 p 値
	Q1 (0.9-7.9) n=161	Q2 (8.0-13.0) n=161	Q3 (13.1-170.7) n=167	
収縮期血圧 (mmHg)	133	129	133	0.96
拡張期血圧 (mmHg)	75	75	74	0.46
BMI (kg/m^2)	22.8	22.7	23.0	0.65
中性脂肪 (mg/dL)	108	110	113	0.66
HbA1c (%)	5.6	5.7	5.7	0.21
eGFR ($ml/分/1.73m^2$)	74	73	76	0.27
運動習慣 (%)	53.9	58.5	63.9	0.16
喫煙習慣 (%)	14.4	5.4	4.7	0.005
飲酒習慣 (%)	45.8	51.4	47.5	0.86

性・年齢調整後の平均値または%を示す。

表 2. 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度別にみた AGEs-AF 平均値の比較、久山町男女 489 人

	2,3,4,7,8-PeCDF (pg/g lipid)			傾向性 p 値
	Q1 (0.9-7.9) n=161	Q2 (8.0-12.9) n=161	Q3 (13.0-170.7) n=167	
粗	2.03	2.21	2.34	<0.0001
性・年齢調整	2.15	2.20	2.25	0.09
多変量調整[1]	2.15	2.19	2.25	0.07

2,3,4,7,8-PeCDF は、定量下限値(1.0 pg/g lipid)未満の場合は0.9を代入した。
[1]性、年齢、BMI、収縮期血圧、中性脂肪、HbA1c、eGFR、運動習慣、飲酒習慣、喫煙習慣を調整した。

分担研究報告書

油症患者における患者ごとの 2,3,4,7,8-PeCDF 半減期の変化に関する研究

研究分担者　赤羽　学　奈良県立医科大学　公衆衛生学講座　准教授
研究協力者　松本　伸哉 奈良県立医科大学　公衆衛生学講座　博士研究員
今村　知明 奈良県立医科大学　公衆衛生学講座　教授
神奈川芳行 奈良県立医科大学　公衆衛生学講座　非常勤講師

研究要旨　我々のグループは、ダイオキシン類の排出速度が変化し、排出が遅くなってきていることを報告してきた。しかしながら、直接的には患者全体として排出が遅くなってきていることしか示すことができていなかった。個々の患者において半減期が伸びていることを示すことを目的とした。2001 年～2016 年を前後半に分割し、前半で示した半減期と後半で示した半減期の比較を実施した。個々の患者から得られた半減期は、体重の変動の影響や、摂取の影響により誤差を含む。このため、分布のばらつきがみられたが、全体的には、半減期が伸びている傾向がみられた。

A．研究目的

ダイオキシン類は一度体内に取り込まれると非常にゆっくりと排出される。排出速度は半減期として評価される。ダイオキシン類の半減期は、初期の研究においては 7 年から 10 年程度と報告された。我々のグループは、ダイオキシン類がほとんど排出されていない、つまり半減期が無限大の患者がいることを報告した[1]。その後、半減期の長さは患者の症状と関係があることを報告した[2]。本研究は、各患者の半減期が変化することで、排出速度がどの程度に低下しているかを明らかにすることを目的とした。

B．研究方法

B．1．解析方法

油症研究においては、2001 年からダイオキシン類の血中濃度を測定している。本研究では次の 2 つの検討を行った。

１つ目として、これまでに血中濃度測定が行われた最大の期間である 2001 年～2016 年を１つの期間とし、この期間において各患者の半減期（濃度の変化率）を求め、分布を検討した。

２つ目として、2001 年～2007（前半）年と 2008 年～2016 年（後半）に２分割し、各患者のそれぞれの半減期（濃度の変化率）を求め、各患者における変化を検討した。

半減期の計算方法は 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数を従属変数とし、測定年度を独立変数として、患者ごとに線形回帰を行った。傾きの逆数の負が半減期となる。油症の主要な発生原因物質と考えられている 2,3,4,7,8-PeCDF は、油症患者では一般人よりもかなり濃度が高い。一般人の上限と考えられる濃度 20pg/g lipid を基準に濃度帯別に評価を行った。

B．２．対象患者

１つ目の検討である 2001 年～2016 年を一つの期間とした分析では、期間内に 3 回以上測定した患者 743 名を対象とした。

２つ目の検討の 2001 年～2007（前半）年と 2008 年～2016 年（後半）に分割し

た分析では、期間内に2回以上測定し、期間の幅が4年以上ある患者（前半289名、後半605名）を対象とした。

C．研究結果

C．１．全体を一つの期間とした分析

図１に全体を一つの期間とした場合の、濃度別の半減期の分布を示す。500pg/g lipid以上の患者において、濃度が減少していない患者が多く存在した。200-500pg/g lipidの患者もほとんど濃度が減少していない患者が多く存在した。100-200pg/g lipidの患者においては、分布が若干減少側にシフトしていた。50-100pg/g lipidの患者においては、半減期が13年から20年の範囲で正規分布からの偏りがみられた。20-50pg/g lipidの患者では、増加と減少が同数程度存在した。20pg/g lipid未満の患者では、増加と減少が同数程度存在した。半減期が7年から10年程度を示す患者が若干存在した。200-500、100-200、50-100pg/g lipidの患者では、やや濃度が低下する患者のほうが多いが、増減が拮抗するレベルを中心に分布していた。一般人に近い20-50pg/g lipidや20pg/g lipid未満の患者では、減少している患者だけではなく、増加もほぼ同数存在した。摂取の影響による増加が考えられる。

C．２．二つの期間とした分析

図２に2001年～2007年（前半）において2回以上測定した患者の半減期の分布を示す。500pg/g lipid以上の患者では、若干減少側が多かった。200-500pg/g lipidの患者では減少側が少し多かった。100-200pg/g lipidの患者では、ほとんど減少しない患者と、半減期10～13.3年の患者が多かった。50-100pg/g lipidの患者は、半減期20～40年の患者と8年から10年の患者が多かった。濃度が変化しない値を中心に広がっていた。20pg/g lipid未満の患者では、濃度が変化しない値を中心に広がっていた。50～100pg/g lipidと100～200pg/g lipidの範囲の患者において、半減期が無限大に近い患者と、7年～10年程度の半減期を示す患者の２グループがみられた。

図３に2008年～2016年（後半）において2回以上測定した患者の半減期の分布を示す。500pg/g lipid以上の患者では、濃度がほとんど変化しないあたいを中心に広がっていた。200-500pg/g lipidの患者では、若干減少するほうに偏っていた。100-200pg/g lipidの患者では、半減期が10～13.3年の患者が少し多く分布していた。50-100pg/g lipidの患者では、若干減少に偏っていた。20-50pg/g lipidでは、ほとんど変化しない値を中心で分布していた。20pg/g未満の患者では、濃度がほとんど変化しない値を中心に分布していた。多くの患者は、無限の半減期を中心に正規分布のような両側に存在した。100～200pg/g lipidの範囲では、７～10年を示す患者が少し存在した。前半において二峰性を示していた50～200pg/g lipidの患者が後半においては、半減期が無限大に近くになっていた。

表１に、各患者が前半と後半での半減期の分布を示す。前半と後半で同じ半減期を示しているならば、対角線上に表れる。対角線と比べて、左下にいる患者のほうが人数は多かった。対角線より下にいる患者は、半減期が伸びている。

D．考察

濃度から半減期を求める場合には、摂取や体重変動の影響を受ける[3]。しかし、環境中の濃度は減少している。低濃度の患者は、摂取の影響により濃度が上昇するが、高濃度の患者では、摂取の影響により濃度が上昇する可能性はない。体重変動の影響は正にも負にも表れるため、その影響は濃度の変化率（半減期の逆数）においても正にも負

にも表れる。どちらかに一方にバイアスを受けることはない。分布が広がりを持っていることを前提として評価を行う必要がある。表 1 で左下側に全体的な中心が存在しており、半減期が伸びていることが示すことができた。

我々は半減期が伸びていることを報告してきた。しかしながら、各患者において、半減期が伸びているかは示すことはできていなかった。本研究において、各患者の半減期が伸びて、ほとんど排出されない半減期が無限大となっている患者が多いことが明らかになった。

E. 参考文献

1) 今村知明、小池創一、松本伸哉、神奈川芳行、赤羽学：油症の各患者の血中 PECDF 濃度の半減期のバリエーションに関する研究：食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究：平成 20 年度総括・分担研究報告書：2009 年 3 月
2) 油症患者の血中 2,3,4,7,8-PECDF の半減期と症状の関係に関する研究：食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究：平成 21 年度総括・分担研究報告書
3) カネミ油症患者のダイオキシン類の体内負荷量変化率の変化に関する研究：平成 24 年度総括・分担研究報告書

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

松本伸哉、神奈川芳行、赤羽学、今村知明　油症患者における患者ごとの 2,3,4,7,8-PeCDF 半減期の変化　第 77 回日本公衆衛生学会総会　2018 年 10 月 24-26 日　ビックパレットふくしま（奈良県）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図１　2001 年～2016 年で 3 回以上測定した患者の半減期の分布

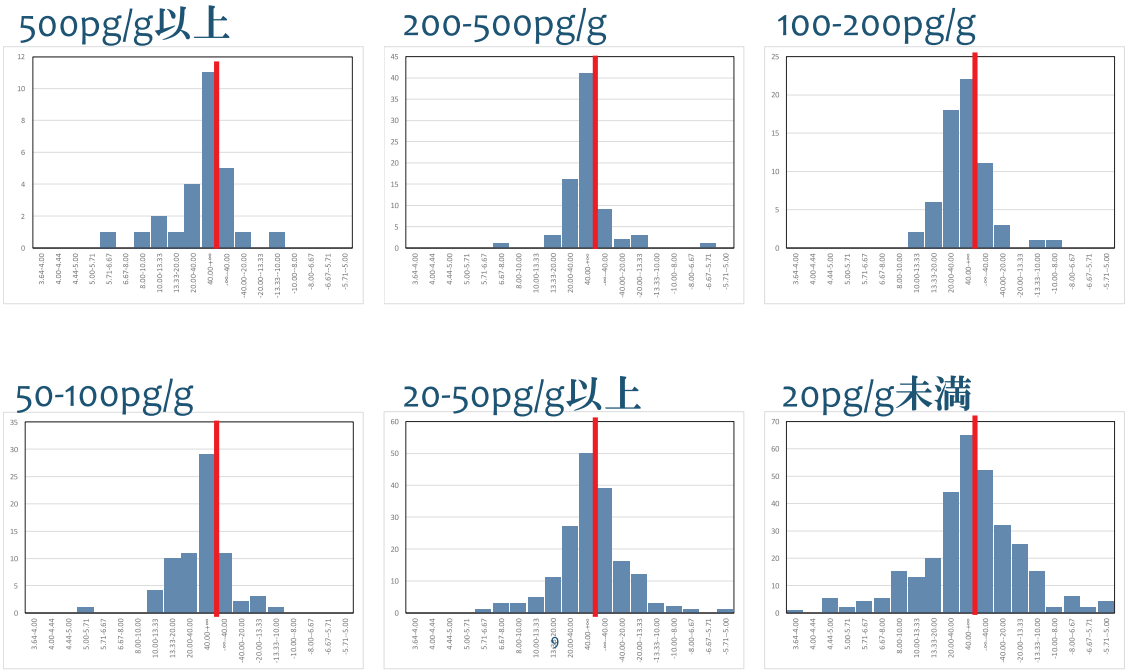


図２　2001 年～2007 年で２回以上測定した患者の半減期の分布

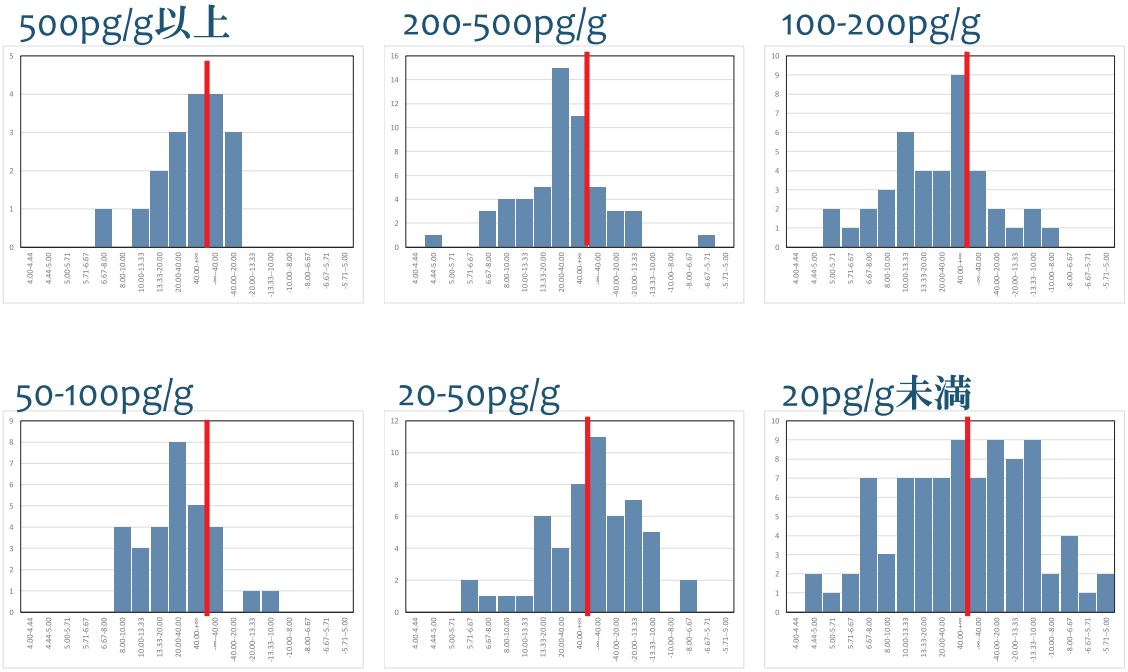


図３　2008 年～2016 年で 2 回以上測定した患者の半減期の分布

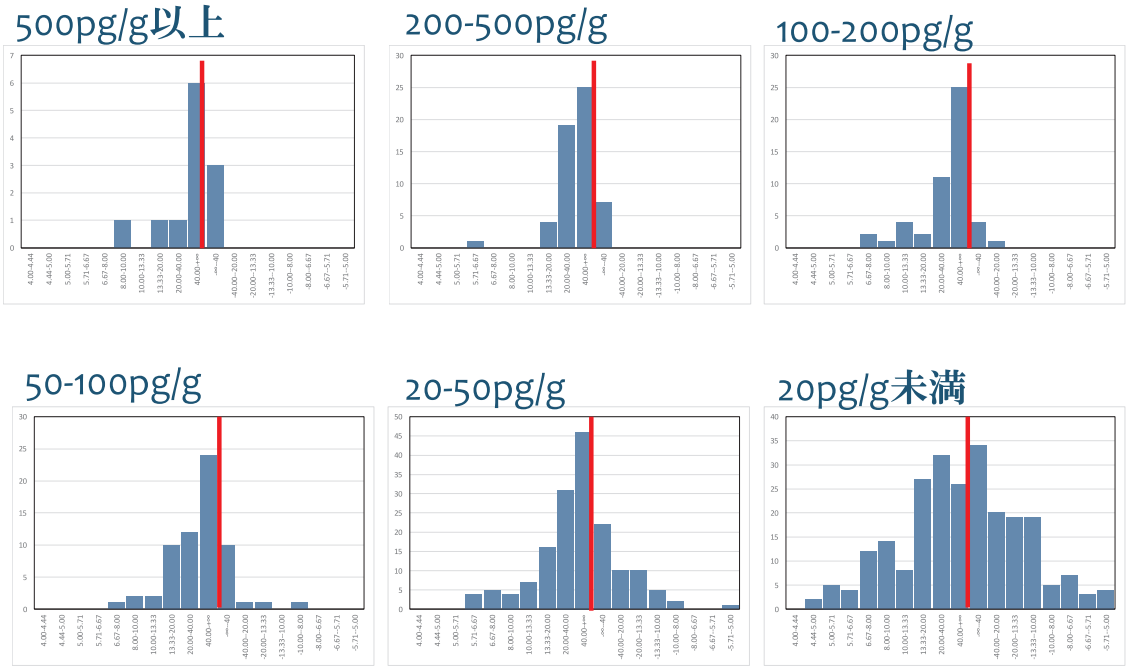


表１　各患者が前半と後半での半減期の分布

後半(2008～2016)の半減期

前半(2001～2007)の半減期	--10	-10.00--13.33	-20.00--13.33	-40.00--20.00	-∞--40.00	40.00-+∞	20.00-40.00	13.33-20.00	10.00-13.33	8.00-10.00	6.67-8.00	5.71-6.67	5.00-5.71	後半対象外	総計
-6.67--5.71														1	1
-10.00--8.00														1	1
-13.33--10.00								1						2	3
-20.00--13.33						1	1			1				2	5
-40.00--20.00							1							7	8
-∞--40					1	3	2	3						8	17
40.00-+∞	1			1	4	5	4	3						11	29
20.00-40.00						9	9							12	30
13.33-20.00					1	2	1	4			1			6	15
10.00-13.33	1					4	2	1						5	13
8.00-10.00					2	3	2	2	1					2	12
6.67-8.00						1	1							3	5
5.71-6.67														1	1
5.00-5.71						1									1
5年未満						2		1	1						4
総計				1	8	31	23	15	2	1	1			61	145

分担研究報告書

油症曝露による継世代健康影響に関する研究
- 油症 2 世における皮膚・粘膜症状とダイオキシン類曝露状況との関連-

研究分担者　月森　清巳　福岡市立こども病院 院長補佐　周産期センター長
研究協力者　加藤　聖子　九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学　教授
研究協力者　諸隈　誠一　九州大学大学院医学研究院統合基礎看護学　教授

研究要旨　油症発生後に油症患者より出生した児（油症 2 世）の皮膚・粘膜症状とダイオキシン類曝露状況との関連について検討した。対象は油症 2 世 170 例とし、油症検診票データをもとに皮膚・粘膜症状の有症割合について検討した。ついで、皮膚・粘膜症状と油症 2 世およびその母親の血中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzo furan（PeCDF）濃度との関連について解析した。油症 2 世の皮膚・粘膜症状としては、口腔内色素沈着の有所見率（58.3%）が最も高かった。油症 2 世およびその母親の血中 PeCDF 濃度の平均値は、各々9.6、103.5 pg/g lipid であった。皮膚・粘膜症状と血中 PeCDF 濃度との関連を検討すると、油症 2 世の血中 PeCDF 濃度は、症状がある群と症状がない群との間には有意な差はなかった。一方、かつての皮膚色素沈着、口腔内の色素沈着を認める油症 2 世では、母親の血中 PeCDF 濃度は症状がない群と比較して有意に高かった。これらの成績から、油症 2 世では、母親からのダイオキシン類の移行は少ないが、胎児期における高濃度のダイオキシン類曝露が皮膚・粘膜の色素沈着に影響を及ぼすことが示唆された。

A．研究目的

油症の多くの症状のうち、ざ瘡様皮疹、皮膚・爪・口腔内の色素沈着などの皮膚症状や粘膜症状は、油症発生当時は他の症状と比較しても際立ったもので、油症の診断において非常に重要な所見であった [1)]。なかでも、妊娠中に油症に罹患した女性から出生した児では手掌、足底を除く全身に、びまん性に色素沈着が認められ、「黒い赤ちゃん」として社会的にも大きな関心を集めた。しかしながら、油症発生後に油症患者より出生した児（油症 2 世）における皮膚・粘膜症状の現在の状況については明らかにされていない。

本研究では、油症検診で得られたデータをもとに、油症 2 世における皮膚症状や眼瞼・口腔内の粘膜症状の有症割合について検討した。ついで、これら皮膚・粘膜症状とダイオキシン類曝露状況との関連について検討した。

B．研究方法

１．対象：油症 2 世 170 例を対象とした。

２．方法：

①皮膚・粘膜症状の評価 : 油症検診で得られた皮膚科、歯科、眼科の検診票データを追跡調査班の協力を得て、収集、電子データ化し、項目別に集計した。問診項目においては、ありを、他覚所見においては、＋、＋＋、＋＋＋を所見ありとし、全体に占める所見ありの割合を有所見率として集計した。また、皮膚科所見の黒色面皰、ざ瘡様皮疹、瘢痕化、色素沈着および歯科所見の色素沈着の項目については、いずれかの

部位に所見が認められれば、所見ありとして集計した。さらに、複数回検診を受診した場合には、いずれかの検診で所見が認められれば、所見ありとして集計した。
②ダイオキシン類曝露状況の解析：油症検診で測定した油症 2 世の血中ダイオキシン類濃度のなかで、血中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzo furan（PeCDF）濃度をダイオキシン類曝露の指標として用いた。血中ダイオキシン類濃度は、1 度しか分析していない場合はその濃度を、複数回測定している場合には最初に測定した濃度を用いて解析した。また、油症 2 世の胎児期におけるダイオキシン類曝露の指標として、母親の血中 PeCDF 濃度を用いた。母親の血中ダイオキシン類濃度は、油症 2 世の血中濃度測定時期と同じ時期あるいは最も近い時期に測定したものを用いて解析した。

①②で得られた結果をもとに油症 2 世における皮膚・粘膜症状を認める群と症状がない群にわけ、両者の血中 PeCDF 濃度および母親の血中 PeCDF 濃度をそれぞれ比較検討した。統計学的解析には、Student t-検定、Mann-Whitney U-検定を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究については、福岡市立こども病院倫理委員会(承認番号 112) および九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会(承認番号 29-326)の承認を得た後、実施した。

C．研究結果

１．油症 2 世の臨床像：

油症 2 世の臨床像を表 1 に示す。油症検診受診時の年齢の平均値±標準偏差（範囲）は、34.3±11.2 才（5-48 才）であった。油症曝露状況では、油症認定患者は 35 例（20.6%）で、母親曝露（両親曝露を含む）が 100 例（58.8%）であった。油症発生から出生までの期間の平均値±標準偏差（範囲）は、9.6±10.0 年（0-41 年）であった。血中 PeCDF 濃度を測定した時の年齢の平均値±標準偏差（範囲）は、油症 2 世が 30.5±10.7 才（5-47 才）で、その母親は 58.2±11.6 才（32-87 才）であった。油症 2 世と母親の血中 PeCDF 濃度測定時期は、同じ年の検診での測定が 107 例（62.9%）、1 年違いが 41 例（24.1%）、2 年違いが 18 例（10.6%）、3 年違いが 3 例（1.8%）、4 年違いが 1 例（0.6%）であった。

２．ダイオキシン類曝露量：

油症 2 世およびその母親の血中 PeCDF 濃度の平均値±標準偏差（範囲）は、各々 9.6±8.4（1.4-57.7）pg/g lipid、103.5±177.0（1.5-851.3）pg/g lipid であった（表 1）。血中 PeCDF 濃度が 50 pg/g lipid 以上であったものは、油症 2 世が 3 例（1.8%）で、その母親は 67 例（39.4%）であった。油症 2 世の血中 PeCDF 濃度とその母親の血中 PeCDF 濃度との間には有意な相関（r^2=0.011、p=0.1740）は認めなかった（図 1）。

３．皮膚・粘膜症状とダイオキシン類曝露量との関連：

油症 2 世における皮膚症状と母児血中 PeCDF 濃度との関連を表 2 に示す。問診項目では、かつてのざ瘡様皮疹は油症 2 世の 38.2%が訴えており、次いで、最近の化膿傾向が 26.5%、最近の粉瘤再発傾向が 22.9%、かつての色素沈着が 19.8%の順であった。他覚所見は、ざ瘡様皮疹の有所見率が最も高く（25.3%）、黒色面皰と色素沈着の有所見率は 10%以下であった。皮膚症状と血中 PeCDF 濃度との関連を検討すると、最近の粉瘤再発傾向を認める油症 2 世の血中 PeCDF 濃度（平均値±標準偏差；7.1±3.4 pg/g lipid）は、症状がない群（10.3±9.3 pg/g lipid）と比較して有意に（p=0.0344）低い値を示すが、正常健常人（17 pg/g lipid）[2]と同じレベルであった。

かつての色素沈着を認めた油症2世では、油症 2 世の血中 PeCDF 濃度（10.7±10.0 pg/g lipid）は症状がない群（9.2±8.0 pg/g lipid）と比較して有意な差はなかったが、母親の血中 PeCDF 濃度（164.4±227.8 pg/g lipid）は症状がない群（90.3±161.4 pg/g lipid）と比較して有意に（p=0.0319）高かった。

油症 2 世における歯科症状と母児血中 PeCDF 濃度との関連を表3に示す。歯痛、歯肉出血など何らかの歯科症状は油症 2 世の 43.9%が訴えていた。口腔所見は、歯肉炎（42.9%）、辺縁性歯周炎（27.6%）が高く、歯牙萌出異常と歯牙形成不全は10%未満であった。口腔内色素沈着の有所見率は高く、油症2世の 58.3%であった。歯科症状と血中 PeCDF 濃度との関連を検討すると、歯牙萌出異常を認める 2 世の血中 PeCDF 濃度（17.6±9.5 pg/g lipid）は、症状がない群（9.0±7.3 pg/g lipid）と比較して有意に（p=0.0159）高い値を示すが、正常健常人 [2]と同じレベルで、また有症状率は 2.6%と低かった。口腔内の色素沈着や歯牙着色を認めた油症2世では、油症 2 世の血中 PeCDF 濃度（各々9.9±8.5、9.9±7.1 pg/g lipid）は症状がない群（各々8.4±5.5、9.2±7.5 pg/g lipid）と比較して有意な差はなかったが、母親の血中 PeCDF 濃度（各々136.8±221.8、180.3±200.3 pg/g lipid）は症状がない群（各々65.2±93.9、98.6±179.7 pg/g lipid）と比較して有意に（各々p=0.0155、p=0.0081）高かった。

油症 2 世における眼科症状と母児血中 PeCDF 濃度との関連を表 4 に示す。眼脂過多は油症 2 世の 25.4%が訴えていたが、他覚所見はすべて 5%未満であった。眼科症状と血中 PeCDF 濃度との関連を検討すると、油症 2 世および母親の血中 PeCDF 濃度は、眼科症状がある群と症状がない群との間には有意な差はなかった。

D．考察

今回、油症2世における皮膚・粘膜症状の有症割合について油症検診で得られたデータをもとに検討した。自覚症状で最も訴えが多かったのは、かつてのざ瘡様皮疹（38.2%）であった。他覚所見では、口腔内色素沈着の有所見率（58.3%）が最も高く、ついで歯肉炎（42.9%）、辺縁性歯周炎（27.6%）、ざ瘡様皮疹（25.3%）であったが、それ以外の所見の多くは 10%未満であった。赤羽ら [3]は、平成 20 年度に実施した油症患者実態調査と一般成人を対象として平成 22 年に実施した対照群調査結果を比較し、油症発生後出生群（油症2世）では、皮膚・粘膜症状のなかで、色素沈着と眼脂過多の有症割合が高かったことを報告している。これらの成績から、油症2世では、少なくとも皮膚・粘膜の色素沈着をきたす割合が高いことが示唆された。

油症2世における皮膚・粘膜症状と血中 PeCDF 濃度との関連を検討すると、油症2世の血中 PeCDF 濃度は、症状がある群と症状がない群との間には有意な差はなかった。一方、かつての皮膚色素沈着、口腔内の色素沈着や歯牙着色を認める油症 2 世では、母親の血中 PeCDF 濃度は症状がない群と比較して有意に高いことが明らかになった。油症2世の血中 PeCDF 濃度の平均値（9.6 pg/g lipid）は、正常健常人の値（17 pg/g lipid）[2]とほぼ同じレベルであったが、その母親の血中 PeCDF 濃度の平均値（103.5 pg/g lipid）は、健常人の約 6 倍と高値であった。これらの成績から、油症 2 世では、母親からのダイオキシン類の移行は少ないが、胎児期に高濃度のダイオキシン類に曝露されており、この胎児期におけるダイオキシン類曝露量が色素沈着の発生に影響を及ぼすことが推察された。

ダイオキシン曝露と色素沈着との関連については、正常ヒトメラノサイトを用い

た in vitro の実験では、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo dioxine（TCDD）曝露によりメラノサイトの活性化、メラニン色素の産生亢進を生じ、色素沈着をきたすこと、この機序にはダイオキシン受容体（AhR; aryl hydrocarbon receptor）の活性化が関与することが報告されている[4]。また、AhR の活性化により microphthalmia-associated transcription factor（MITF)の発現が増強され、メラノサイトの活性化、メラニン色素の産生亢進をきたすことが報告されている[5,6]。このように、ダイオキシン類曝露により色素沈着をきたすことが明らかになってきている。今回の検討では、油症 2 世の皮膚・粘膜症状として色素沈着以外に歯肉炎、辺縁性歯周炎、ざ瘡様皮疹、眼脂過多が多く認められたが、血中 PeCDF 濃度との関連はなく、これらの症状が油症に関連するものかどうか今後の検討が必要であると考えられた。

E．結論

油症 2 世における皮膚・粘膜症状としては、口腔内色素沈着の有所見率（58.3%）が最も高かった。油症 2 世では、母親からのダイオキシン類の移行は少ないが、胎児期における高濃度のダイオキシン類曝露が皮膚・粘膜の色素沈着に影響を及ぼすことが示唆された。

F．研究発表

１．論文発表

1) Mitoma C, Uchi H, Tsukimori K, Todaka T, Kajiwara J, Shimose T, Akahane M, Imamura T, Furue M. Current state of yusho and prospects for therapeutic strategies. Environ Sci Pollut Res Int. 25(17):16472-16480, 2018.

２．学会発表

なし

G．知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

なし

３．その他

なし

H．参考文献

1) Mitoma C, et al. Yusho and its latest findings-A review in studies conducted by the Yusho Group. Environ Int. 82:41-48, 2015.
2) Todaka T, et al. Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-ortho and mono-ortho polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. Chemosphere. 66(10):1983-1989, 2007.
3) 赤羽学ほか. 対照群健康実態調査との比較における油症患者の世代別傾向に関する研究. 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究. 平成 27 年度分担研究報告書. 37-45, 2016.
4) Luecke S, et al. The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. Pigment Cell Melanoma Res. 23(6):828-833, 2010.
5) Nakamura M, et al. Tobacco smoke-induced skin pigmentation is mediated by the aryl hydrocarbon receptor. Exp Dermatol. 22(8):556-558, 2013.
6) Abbas S, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Contributes to Benzanthrone- Induced Hyperpigmentation via Modulation of Melanogenic Signaling Pathways. Chem Res Toxicol. 30(2):625-634, 2017.

表 1 油症 2 世の臨床像

項目	値*
油症検診時年齢（才）	34.3±11.2 (5-48)
性別	
男性	79(46.5%)
女性	91(53.5%)
油症曝露状況	
油症認定患者数	35 (20.6%)
母親曝露	100(58.8%)
油症発生から出生までの期間（年）	9.6±10.0(0-41)
血中PeCDF濃度測定時年齢（才）	
油症2世	30.5±10.7 (5-47)
母親	58.2±11.6 (32-87)
血中PeCDF濃度(pg/g lipid)	
油症2世	9.6±8.4 (1.4-57.7)
母親	103.5±177.0 (1.5-851.3)
血中PeCDF濃度分布（＞50pg/g lipid）	
油症2世	3(1.8%)
母親	67(39.4%)

*; データはmean±SD(range) あるいは n(%)で示す

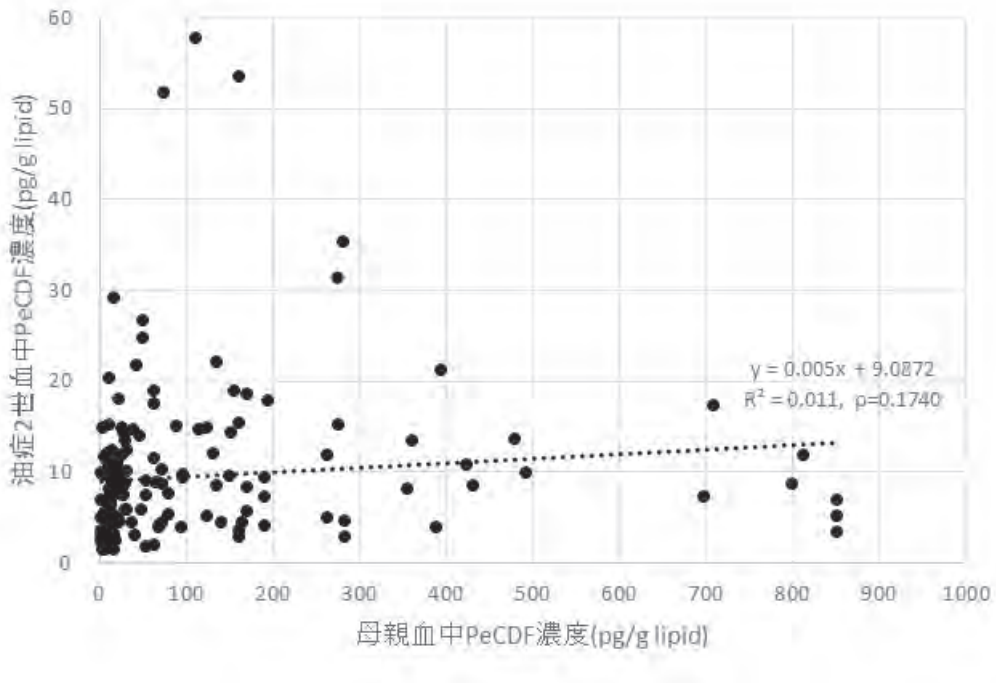


図 1 油症 2 世の血中 PeCDF 濃度とその母親の血中 PeCDF 濃度との相関

表 2 油症 2 世における皮膚症状と母児血中 PeCDF 濃度との関連

2世の皮膚科検診項目と症状		2世有症状率 %(n/N)	2世血中PeCDF値(pg/g lipid) Mean±SD(range)			母血中PeCDF値(pg/g lipid) Mean±SD(range)		
			あり	なし	p値*	あり	なし	p値*
問診	最近の化膿傾向	26.5%(45/170)	9.1±6.1 (2.2–31.5)	9.8±9.1 (1.4–57.7)	0.6251	80.7±139.7 (9.6–697.9)	111.6±188.4 (1.5–851.3)	0.3166
	最近の粉りゅう再発傾向	22.9%(39/170)	**7.1±3.4 (2.2–15.1)**	**10.3±9.3 (1.4–57.7)**	**0.0344**	71.3±129.9 (6.1–697.9)	113.1±188.1 (1.5–851.3)	0.1964
	かつてのざ瘡様皮疹	38.2%(65/170)	9.1±7.2 (2.2–53.5)	9.9±9.1 (1.4–57.7)	0.5777	80.4±134.9 (1.5–697.9)	117.7±197.9 (1.5–851.3)	0.1826
	かつての色素沈着	19.8%(33/167)	10.7±10.0 (2.9–53.5)	9.2±8.0 (1.4–57.7)	0.3524	**164.4±227.8 (9.6–799.5)**	**90.3±161.4 (1.5–851.3)**	**0.0319**
他覚所見	黒色面皰 (いずれかの部位)	10.0%(17/170)	10.6±7.3 (2.2–31.5)	9.5±8.5 (1.4–57.7)	0.6187	51.0±72.6 (5.7–273.6)	109.3±184.2 (1.5–851.3)	0.1987
	ざ瘡様皮疹 (いずれかの部位)	25.3%(43/170)	9.5±8.9 (2.2–53.5)	9.6±8.3 (1.4–57.7)	0.9040	107.3±159.4 (3.2–697.9)	102.2±183.1 (1.5–851.3)	0.8692
	瘢痕化 (いずれかの部位)	12.9%(22/170)	9.5±5.6 (3.2–26.6)	9.6±8.8 (1.4–57.7)	0.9474	92.1±157.7 (9.6–492.3)	105.2±180.1 (1.5–851.3)	0.7483
	色素沈着 (いずれかの部位)	5.3%(9/170)	9.5±5.1 (2.3–18.9)	9.6±8.6 (1.4–57.7)	0.9764	192.4±266.6 (3.2–697.9)	98.5±170.5 (1.5–851.3)	0.1217

*; 統計学的解析にはStudent-t検定を用いた。
赤字；有症状群の方が有意に高値、青字；有症状群の方が有意に低値

表 3 油症 2 世における歯科症状と母児血中 PeCDF 濃度との関連

2世の歯科検診項目と症状		2世有症状率 %(n/N)	2世血中PeCDF値(pg/g lipid) Mean±SD(range)			母血中PeCDF値(pg/g lipid) Mean±SD(range)		
			あり	なし	p値*	あり	なし	p値*
主訴	歯痛・歯肉出血・排膿・歯肉腫脹・歯牙挺出感・色素沈着	43.9%(69/157)	8.6±5.1 (1.4–26.6)	9.8±8.8 (1.7–53.5)	0.3186	105.3±186.4 (1.5–851.3)	107.1±180.6 (1.5–851.3)	0.9514
口腔所見	歯肉炎	42.9%(67/156)	8.4±6.1 (1.5–31.5)	9.9±8.2 (1.4–53.5)	0.2210	85.2±141.9 (1.5–851.3)	123.3±207.9 (1.5–851.3)	0.1990
	辺縁性歯周炎	27.6%(43/156)	9.6±5.3 (2.9–26.2)	9.2±8.1 (1.4–53.5)	0.7698	108.7±156.2 (9.6–697.9)	106.3±192.8 (1.5–851.3)	0.9420
	歯牙萌出異常	2.6%(4/156)	**17.6±9.5 (9.9–31.5)**	**9.0±7.3 (1.4–53.5)**	**0.0159**	206.1±223.2 (12.5–492.3)	104.3±181.9 (1.5–851.3)	0.2195
	歯牙着色	10.3%(16/156)	9.9±7.1 (3.2–31.5)	9.2±7.5 (1.4–53.5)	0.5958	**180.3±200.3 (10.1–687.9)**	**98.6±179.7 (1.5–851.3)**	**0.0081**
	歯牙形成不全	3.8%(6/156)	11.8±4.8 (5.8–18.6)	9.2±7.5 (1.4–53.5)	0.0900	135.6±183.0 (16.7–492.3)	105.8±183.5 (1.5–851.3)	0.1784
	咬合異常	15.4%(24/156)	8.3±6.8 (1.4–31.5)	9.4±7.5 (1.5–53.5)	0.5011	80.0±120.5 (5.1–492.3)	111.9±192.1 (1.5–851.3)	0.4342
色素沈着	歯肉・頬粘膜・口蓋粘膜・口唇粘膜	58.3%(91/156)	9.9±8.5 (1.5–53.5)	8.4±5.5 (1.4–31.5)	0.1962	**136.8±221.8 (1.5–851.3)**	**65.2±93.9 (1.5–479.9)**	**0.0155**

*; 統計学的解析にはStudent' t-test、Mann-Whitney検定を用いた。
赤字；有症状群の方が有意に高値

表 4 油症 2 世における眼科症状と母児血中 PeCDF 濃度との関連

2世の眼科検診項目と症状		2世有症状率 %(n/N)	2世血中PeCDF値(pg/g lipid) Mean±SD(range)			母血中PeCDF値(pg/g lipid) Mean±SD(range)		
			あり	なし	p値*	あり	なし	p値*
主訴	眼脂過多	25.4%(43/169)	9.1±6.2 (1.5–31.5)	9.4±8.0 (1.4–53.5)	0.8468	99.1±178.7 (4.4–799.5)	104.9±177.8 (1.5–851.3)	0.8528
他覚所見	眼瞼浮腫	1.8%(3/168)	12.2±8.3 (5.1–21.3)	9.3±7.6 (1.4–53.5)	0.3350	179.1±194.2 (18.4–395.0)	102.6±177.9 (1.5–851.3)	0.2241
	眼瞼結膜色素沈着	4.2%(7/168)	12.5±8.9 (4.9–31.5)	9.2±7.5 (1.4–53.5)	0.1474	161.3±180.8 (12.1–479.9)	101.5±177.9 (1.5–851.3)	0.1542
	瞼板腺嚢胞形成	4.2%(7/168)	11.2±9.6 (4.0–31.5)	9.3±7.5 (1.4–53.5)	0.6481	120.4±163.0 (9.0–423.3)	103.3±179.0 (1.5–851.3)	0.7239
	瞼板腺ﾁｰｽﾞ様分泌物圧出	0.6%(1/168)	31.5	9.2±7.4 (1.4–53.5)	NA	273.6	103.0±177.9 (1.5–851.3)	NA

*; 統計学的解析にはMann-Whitney検定を用いた。

分担研究報告書

ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルにおける肺サーファクタント蛋白に関する検討

研究分担者　中西　洋一　九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　教授
研究協力者　鈴木　邦裕　九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教
濱田　直樹　九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教
柳原　豊史　九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野

研究要旨　ヒトClub細胞株NCI-H441細胞に対してBenzo[a]pyrene(BaP)を投与すると、Apoptosisが誘導され、ヒトリコンビナントSP-Dの投与により抑制された。油症肺傷害においてSP-Dが保護的役割を担っていることが考察された。

A．研究目的

油症の主な原因物質と考えられるPCDFsをげっ歯類に経気道的に投与すると、電子顕微鏡にてClub細胞の壊死が認められると報告されている[1)]。油症患者における肺病変の主座はClub細胞を中心とした細気管支領域と考えられおり、Club細胞は肺においてArylhydrocarbon receptor(AhR)を発現している数少ない細胞のひとつであるため、ダイオキシン類のAhRを介しCYP1Alの経路を通じた細胞傷害作用から推測される病態生理とも合致する[2)3)]。これまで我々は、ダイオキシン類による肺傷害のメカニズムを解明するためにAhR-CYP1Alを介した油症動物実験モデルの作成を目指してきた。現在のところ、マウスの肺に経気管的にAhR作動性物質であるBenzo[a]pyren(BaP)を投与することにより[4)]、気道分泌物の増加を示すモデルを作成している。我々が着目しているClub細胞は、肺サーファクタント蛋白などの肺の恒常性を維持する因子を産生している。肺サーファクタント蛋白は肺胞構造の維持のみならず肺の初期免疫に関わっており、細菌感染防御や免疫細胞の調節など、肺疾患において重要な役割を担っている。今回、我々は、ダイオキシン類による気道上皮傷害(Club 細胞傷害)における肺サーファクタント蛋白(SP-D)に役割に着目してin vitroでの研究を行った。

B．研究方法

Club細胞株:HCI-H441細胞をRoswell Park Memorial Institute(RPMI)培地(10% ウシ胎児血清、1% ストレプトマイシン/ペニシリン)を用いて、24well プレート(観察用)および、6well プレート(フローサイトメトリー用)に培養した。DMSOで溶解したBaPの濃度を0～50mMに設定し、細胞傷害誘導の試適濃度を決定した。細胞傷害としてアポトーシスが誘導されることを確認した。次に、BaPにより誘導されるNHI-H441細胞のアポトーシスに対するヒトリコンビナントSP-D の抑制効果を検討した。ギムザ染色を行い形態の観察を行い、さらに培養細胞を、Trypsin－EDTAを用いて回収し、FBS入り培地で中和したのち、4℃1500rpmで遠沈・洗浄後、Annexin V-PI染色を行い、フローサイトメトリー法を用いてアポトーシスに対する解析を行った。

C.研究結果

HCI-H441細胞を24wellプレートに培養し、BaPを投与24時間後に観察し、細胞傷害を確認した。Aneexin V－PIによる染色を行い、アポトーシスを確認し、BaPの試適濃度を12.5mMに設定した。次に、リコンビナントSP-Dを同時投与することによる効果について検討した。NCI-H441細胞にBaP12.5mMを投与し、同時にリコンビナントSP-Dを1.0μg/ml1の濃度で投与した。24時間後にギムザ染色を行ったところ、BaPの投与により培養Club細胞株の傷害が認められ(図1B)、SP-Dの投与で傷害は軽減された(図1D)、また、SP-D投与単独群における細胞毒性は肉眼では確認されなかった(図1B)。更にAnnexin V-PI染色を行い、フローサイトメトリー法を用いてアポトーシスに対する解析を行った。図2Aに示すように、X軸にFITC-AnnexinV、Y軸をPIとした。アポトーシス細胞は4分割図の右下に検出されるように設定した。24時間後の代表的なdot-plotを図2Bに示す。各群n=3で解析を行うと、24時間後(図3A)、36時間後(図3B)ともに有意差をもって、抑制結果が得られた。更に、SP-D 0、0.5、1.0、2.0μg/mlの濃度で投与し、濃度依存性の抑制効果の有無を観察したが、有意な増強効果は認めなかった(図4)。

D.考察

肺サーファクタントプロテインは界面活性剤として、肺の表面張力を低下させ、肺胞が構造を保持するのに役にたっている。肺サーファクタントプロテインにはSP-A、SP-B、SP-C、SP-Dの4種類があり、そのうち、SP-AとSP-Dは水溶性であり、SP－B、SP-Cは疎水性である。実臨床では、肺が傷害を受けた際のバイオマーカーとして活用されている。びまん性肺疾患、間質性肺炎では、血清のSP-D値がSP-A値よりもより病態を反映するという報告がある[5]。この報告では血清SP-D値が上昇した患者群では気管支肺胞洗浄液のSP-D濃度が低下しており、間質性肺炎の組織破壊に伴い、SP-Dが血中へ漏出していることが考察されている。油症患者においては、平成25年に我々が報告した通り、SP-Dの血中濃度上昇と咳嗽、喀痰といった呼吸器症状に相関を認めた[6]。SP-Dの血中濃度変化が油症による直接的な影響というよりも、呼吸器疾患の合併を反映している可能性はあるが、SP-Dが何らかの病態生理に関与している可能性が考察される。今回の実験で、ダイオキシン類のAhRを介しCYP1A1の経路を通じたClub細胞傷害作用を、AhR作動性物質であるBenzo[a]pyren(BaP)を用いることによりin vitroで再現した。さらに、過去の動物実験より我々が着目している肺サーファクタント蛋白(SP-D)の投与により、傷害の抑制効果が認められた。今回の研究結果は、現象論を認めているに過ぎないが、この実験系を用いて分子レベルでの解析を現在検討中である。具体的にはドメイン欠損したSP-Dを強制発現させたClub細胞のcell lineを用いた実験系などを計画している。また、我々が報告したAhR-CYP1A1を介した油症動物実験モデルをSP-Dノックアウトマウス[7]で作成する動物実験計画書を準備し、本学の動物実験倫理委員会に申請予定である。

E.結論

in vitroでクラブ細胞株に対するBaPの傷害性をリコンビナントSP-Dが抑制した。

F.研究発表

第54回日本肺サーファクタント・界面

医学会学術研究会
平成 30 年（2018 年）10 月 27 日
Role of pulmonary surfactant protein in mouse lung injury model with dioxins
Kunihiro Suzuki, Toyoshi Yanagihara, Naoki Hamada, Eiji Harada, KoichiroMatsumoto, Yoichi Nakanishi

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

H. 参考文献
1)中西洋一、他、(1985). 油症における呼吸器系ならびに免疫系の障害一経過ならびに発症機序について.福岡医誌. 1985;76:196-203
2)Podechard N, et al. Interleukin-8 Induction by the environmental Contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. Toxicol Lett. 2008;177(2):130-7
3) Wong PS, et al. Aryl hydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells
and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010;42(2):210-7.
4) N’Diaye M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. J Biol Chem. 2006:281(29): 19906-15.
5) Nishikiori et al. Distinct compartmentalization of SP-A and SP-D in the vasculature and lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. BMC Pulmonary Medicine 2014, 14:196
6) 中西洋一、他、(2014). 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究「油症患者における血中 Surfactant protein に関する検討」、平成 25 年度分担者報告書
7) Knudsen L et al. Truncated recombinant human SP-D attenuates emphysema and type II cell changes in SP-D deficient mice. Respir Res 8: 70

図 1

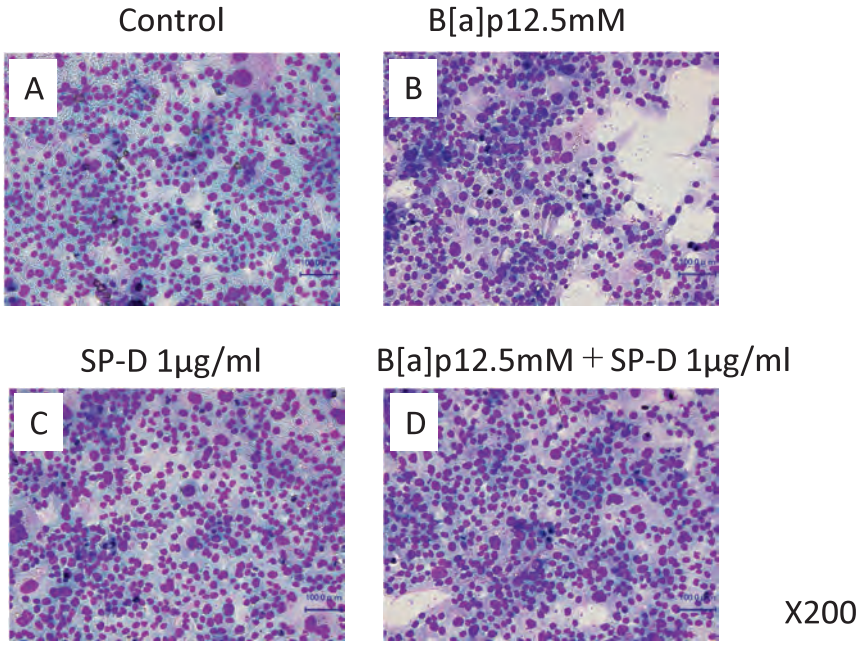

Control
B[a]p12.5mM
A
B
SP-D 1μg/ml
B[a]p12.5mM＋SP-D 1μg/ml
C
D
X200

図2

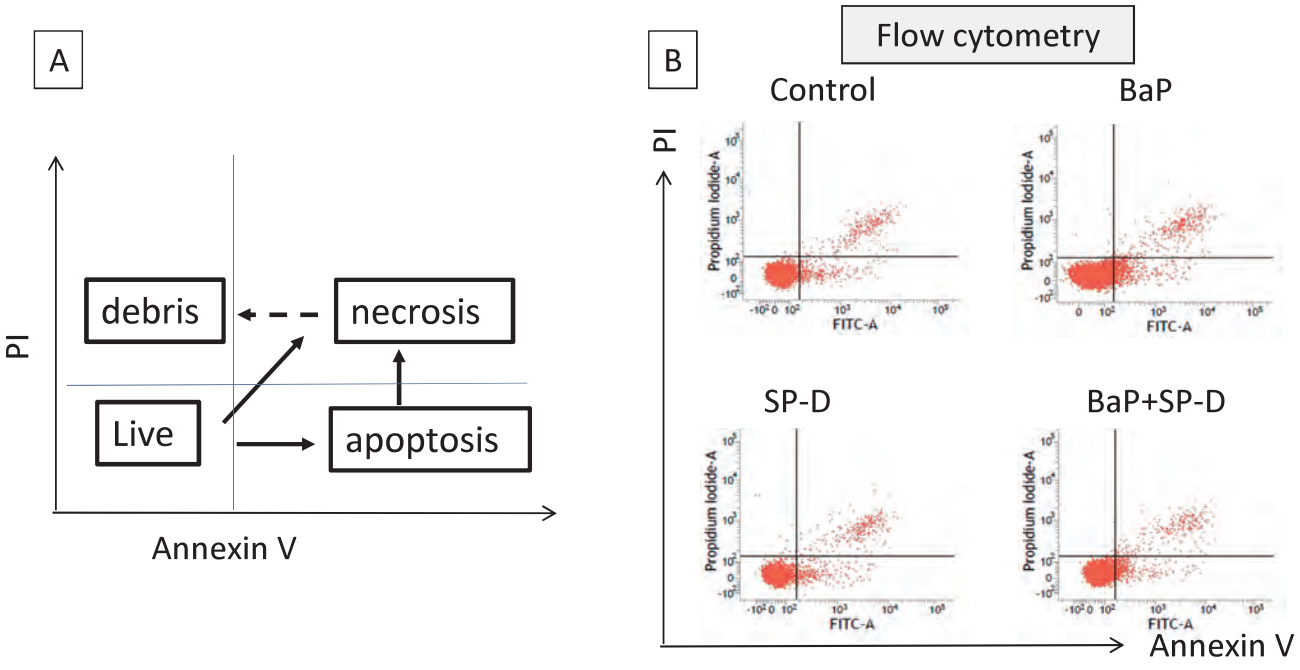

A
PI
debris
necrosis
Live
apoptosis
Annexin V
B
Flow cytometry
Control
BaP
SP-D
BaP+SP-D
PI
Propidium Iodide-A
FITC-A
Annexin V

図3

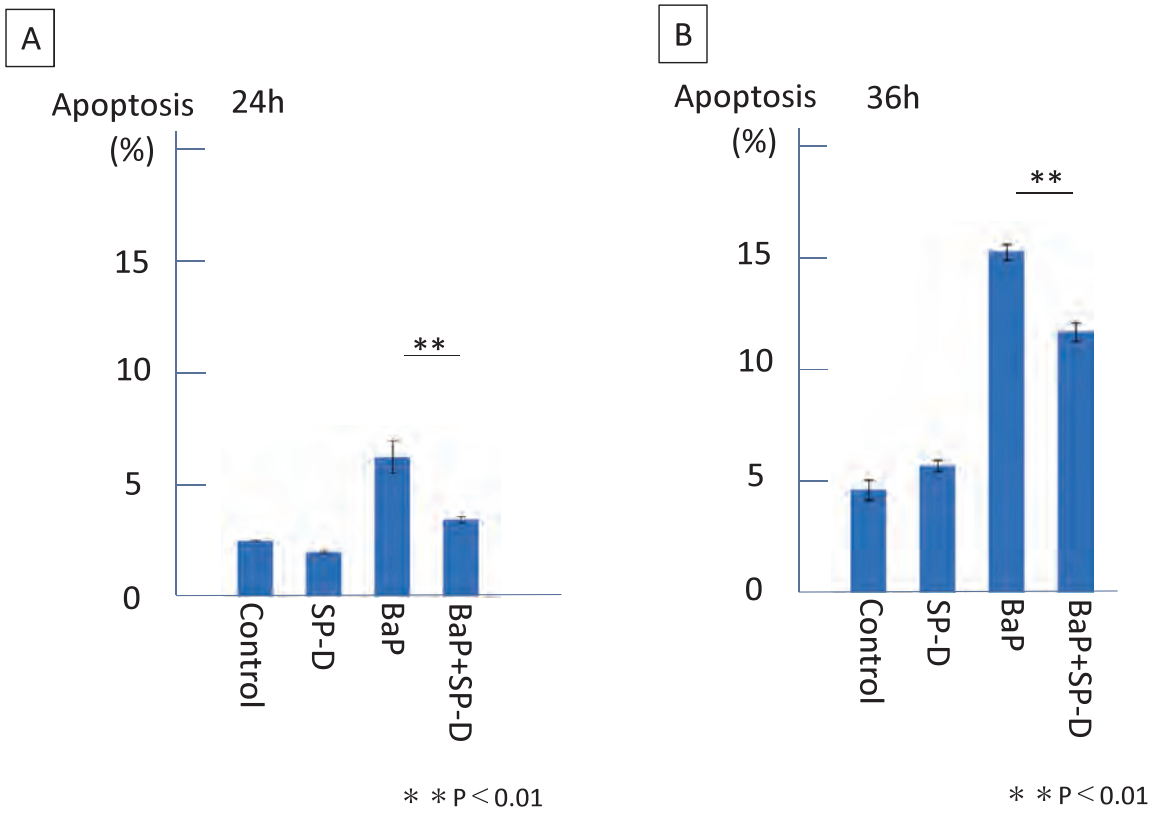
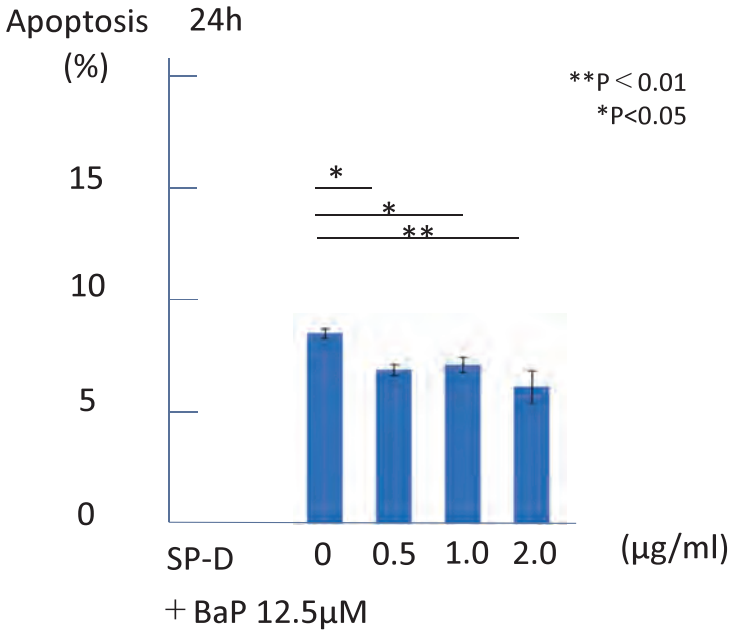

A
Apoptosis 24h
(%)
15
10
5
0
**
Control
SP-D
BaP
BaP+SP-D
＊＊P＜0.01
B
Apoptosis 36h
(%)
15
10
5
0
**
Control
SP-D
BaP
BaP+SP-D
＊＊P＜0.01

図4


Apoptosis 24h
(%)
15
10
5
0
*
*
**
**P＜0.01
*P<0.05
SP-D 0 0.5 1.0 2.0 (μg/ml)
＋BaP 12.5μM

分担研究報告書

ベンゾピレン投与ラットに対する感覚評価を用いたケイヒの効果検討

研究分担者　申　敏哲　　熊本保健科学大学、リハビリテーション学科　準教授
研究協力者　吉村　惠　　医療法人社団温故会 直方中村病院　　病院長

研究要旨　ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を 3 種類の感覚刺激による定量的閾値評価と酸化ストレス･抗酸化力の測定方法を用いて検討した。その結果、5Hz、250Hz の電気刺激周波数において、各群有意な閾値の変化はみられなかった。2000Hz の電気刺激周波数ではベンゾピレン投与群で感覚閾値上昇がみられたが、その閾値上昇はケイヒの投与により抑制傾向にあった。また、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で抗酸化力の上昇傾向がみられた。本研究の結果から、ケイヒ等がダイオキシン類化合物による複合中毒でみられる感覚異常の症状改善に寄与する可能性が示唆された。

A．研究目的

ダイオキシン類化合物による複合中毒であるカネミ油症事件発生からおおよそ 50 年の時間が経過しているが、現在までも頭痛などの神経症状、倦怠感などの全身症状、痤瘡様皮疹などの皮膚症状などの後遺症が報告されている[1]。 特に、多くの患者で末梢の感覚鈍麻やしびれ感、自律神経失調症等の末梢神経障害および中枢神経障害が報告されているが、その発生機序については未だ明らかにされていない[2-4]。近年、ダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを用いた動物実験で、ベンゾピレン投与は Aβ 神経線維の伝導速度低下に影響を与える可能性が示唆された。Aβ線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感と関係が有ると報告されている[5]。ダイオキシン類の毒性の大半は、芳香族炭化水素受容体 (arylhydrocarbon receptor、以下 AHR)を介して発揮されるが、様々な植物成分や生薬がこの AHR 活性を抑制させることが報告されている。特に、生薬の中でケイヒの主成分であるシンナムアルデヒドが AHR 活性を阻害するとともに、抗酸化ストレス作用を発揮することが Uchi ら[6] によって明らかになった。しかし、ベンゾピレン投与による感覚異常に対する生薬の効果はまだ明らかになっていない。そこで本実験では、生薬の中で AHR 活性を阻害することが出来ると報告されたケイヒをベンゾピレン投与ラットに投与し、3 種類の正弦波電気刺激 (5Hz、250Hz、2000Hz)の感覚刺激による定量的閾値評価と酸化ストレス･抗酸化力の測定方法を用いて、ベンゾピレン投与ラットの感覚異常に対するケイヒの効果を検証した。

B．研究方法

5 週齢の Wistar 系雄性ラット(九動㈱、熊本)を用い、ベンゾピレン投与群、ベンゾピレン+1mg/kg ケイヒ投与群、ベンゾピレン+5mg/kg ケイヒ投与群に分けた。ベンゾピレン投与は 30mg/kg ベンゾピレンを、経口投与器を用いてそれぞれ一回 200μℓ を胃に直接投与した。ベンゾピレン投与 1 日後から、ベンゾピレン投与群には蒸留水を、ケイヒ投与群では 1mg/kg と 5mg/kg のケイヒをそれぞれ経口投与器を用いて 500μℓ ずつ、1ヶ月間胃に直接投与した。時間的経過による感覚の変化は小動物用電気刺激装置 (STG2000 バイオリサーチセンター)を用いて電気刺激による感覚閾値

を測定した。ラットは拘束装置に入れ、一定時間放置し、ラットが環境に慣れた頃合いをみて開始した。周波数 5Hz、250Hz、2000Hz の正弦波電機刺激を覚醒下のラット右後肢足底部に与え、刺激を与えてからラットの逃避反応が観察された時点までの時間を計測し、p-clamp ソフトウエア（Axon Instrument 社製）で、刺激時間から刺激強度（μA）を換算した。最終日の行動実験実施後、直ちに 3 種混合麻酔薬を用いてラットを麻酔し、心臓から採血を行った。血液試料は遠心分離し、取り出した血清を用いて、72 時間以内に酸化ストレスと抗酸化力の測定を行った。測定機器はフリーラジカル解析装置 FREE CARRIO DUO（WISMERLL 杜）を用いた。

（倫理面への配慮）

動物の飼育および実験に関しては、熊本保健科学大学動物倫理委員会の許可(登録番号、動 18－10)を得て行った。全身麻酔下でラットの心臓から採血を行い、その後過量の 3 種混合麻酔薬を腹腔内に追加投与して死に至らしめるため痛みなどの侵襲は殆ど無い。

C．研究結果

ベンゾピレンの経口投与後、電気刺激による感覚閾値の経時的変化を小動物用電気刺激装置で測定した。その結果、5Hz の電気刺激周波数による感覚閾値では、ベンゾピレン投与群で、投与前 0 週目 78.17±8.22μA、1 週目 81.12±5.97μA、2 週目 76.43±10.3μA、3 週目 77.84±7.33μA、4 週目 75.94±12.11μA であり、ベンゾピレン投与 4 週間後にわずかな感覚閾値の低下がみられたが、有意差は認められなかった。ベンゾピレン＋1mg/kg ケイヒ投与群およびベンゾピレン＋5mg/kg ケイヒ投与群では、投与前 0 週目でそれぞれ 80.96±8.12μA、78.95±11.24μA、4 週目では 81.64±13.78μA、75.39±10.31μA であり、ベンゾピレン投与群と有意な差はみられなかった（Fig.1A)。250Hz の電気刺激周波数による感覚閾値では、ベンゾピレン投与群で、投与前 0 週目 98.21±9.847μA、1 週目 100.54±10.56μA、2 週目 97.33±11.78μA、3 週目 103.69±17.46μA、4 週目 97.84±13.71μA であり、ベンゾピレン投与 4 週間後でも感覚閾値の有意な変化はみられなかった。1mg/kg と 5mg/kg のケイヒを投与した群では、それぞれ投与前 0 週目で 98.63±11.56μA、101.16±10.12μA、4 週目では 102.14±12.45μA、100.52±12.47μA であり、ベンゾピレンのみの投与群と有意な差はみられなかった（Fig.1B)。2000Hz の電気刺激周波数による感覚閾値では，ベンゾピレン投与群で、投与前 0 週目 430.35±27.56μA、1 週目 455.45±30.95μA、2 週目 475.67±37.42μA、3 週目 467.84±31.97μA、4 週目 471.78±33.45μA であり、ベンゾピレン投与 4 週間後感覚閾値の上昇がみられた。ベンゾピレン投与後 1mg/kg 又は 5mg/kg のケイヒを投与した群では、それぞれ投与前 0 週目で 429.89±35.08μA、433.11±36.41μA、4 週目では 457.23±37.75μA、450.69±32.42μA であり、ベンゾピレン投与群に対して感覚閾値の上昇が抑制された（Fig.1C)。

酸化ストレスの変化について検討した結果では、ベンゾピレン投与群に対し、1mg/kg 又は 5mg/kg ケイヒ投与群で、酸化ストレスの若干抑制がみられたが、有意差は認められなかった（Fig.2A)。抗酸化力に関しては、ベンゾピレン投与群に対し、1mg/kg と 5mg/kg ケイヒ投与群で抗酸化力の上昇傾向がみられたが、有意差は認められなかった（Fig.2B)。

D．考察

カネミ油症事件は PCB、PCDF、dioxin 等の dioxin 類化合物の複合中毒であり、末梢神経障害と考えられる感覚神経障害

等が多く報告されている。発症時には自覚的感覚異常の患者が 39.1%であったが、30年経過した近年では、患者の 59.4 %に感覚異常の増加が報告されている[7-8]。

今回の実験では、ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を検討する為に電気刺激による感覚閾値の評価を実施した。その結果、5Hz と 250Hz の電気刺激を用いた感覚閾値ではベンゾピレン投与ラット群及びベンゾピレン+ケイヒ投与ラット群共に有意な変化はみられなかった。しかし、2000Hz の電気刺激を用いた感覚閾値では、ベンゾピレン投与ラット群で感覚閾値の上昇がみられたが、ケイヒ投与ラット群ではその感覚閾値上昇の抑制傾向がみられた。近年、我々はベンゾピレン投与ラットを用いた実験で、ベンゾピレンがＡβ神経線維の伝導速度を低下させることを報告している[5]。古谷ら[4]によるとカネミ油症患者では、感覚鈍麻や神経のしびれ感などの末梢神経障害および中枢神経障害が多いと報告している。末梢神経の障害による感覚異常の場合、感覚神経の伝導速度の遅延を認めることが多い[9]。植田ら[10]は、5Hz の刺激によりＣ線維、250Hz の刺激によりＡδ線維、2000Hz の刺激によりＡβ線維を選択的に刺激することが出来ると報告しており、現在臨床でもニューロメーターとして使用している。Koga ら[11]はラットの DRG を用いた実験で、2000Hz での刺激ではＡβ線維、5Hz の刺激では 主にＣ線維を選択的に刺激することが出来ると報告している。しかし、250Hz の刺激ではＡδ線維とＡβ線維の両方を活性化させるが、痛みを伴う感覚が同時に生じる場合は、触覚は知覚されないとしている。これらのことから、本研究での 2000Hz の電気刺激による閾値上昇は Ａβ線維に起因する感覚異常である可能性が考えられる。

本研究の結果、2000Hz の電気刺激で上昇したベンゾピレン群の感覚閾値はケイヒを一緒に投与した群で閾値の上昇抑制傾向がみられた。ダイオキシン類の毒性は、AHR を介して起こることと、様々な植物成分や生薬がこの AHR 活性を抑制することが報告されている。 特に、桂枝茯苓丸の生薬の一つである、ケイヒ、その主成分であるシンナムアルデヒドが AHR 活性を阻害するとともに、抗酸化ストレス作用も持つことが明らかになっている[6]。本研究の結果でも、統計的に有意差はみられなかったが、ケイヒ投与群で酸化ストレスの若干の抑制と抗酸化力の上昇傾向がみられ、また、ベンゾピレン群の感覚閾値上昇がケイヒの投与により閾値上昇抑制傾向がみられたことから、ベンゾピレによる感覚異常はケイヒの抗酸化作用と AHR 活性の阻害作用により改善された可能性が考えられる。

これらの結果から、ベンゾピレン投与は触・圧覚を伝えるＡβ線維に作用し、感覚異常等を発生させる可能性が示唆された。また、その作用は抗酸化作用と AHR 活性の阻害作用があるケイヒの投与により抑制されることで感覚異常を改善されることが出来る可能性が示唆された。

Ｅ．結論

本研究の結果から、抗酸化作用と AHR 活性の阻害作用持つケイヒ等がダイオキシン類化合物による複合中毒でみられる感覚異常の症状改善に寄与する可能性が示唆された。しかし、更なる研究を通して、最も効果的な濃度の検討と慢性中毒モデルでの効果検討が必要である。

引用文献

1) Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters-what we have learned from Yusho disease. Environ Res. 86(1):2-11, 2001.

2)黒岩義五郎, 他： 油症患者における神経学的所見. 福岡医誌 60:462-463, 1969.
3)岩下 宏, 他： 慢性油症患者における頭痛, 四肢異常感と血中 PCB. 福岡医誌 68：139-144, 1977.
4)古谷博和, 他： 36 年以上経過した油症患者における神経症候. 福岡医誌 96：152-156, 2005.
5)申 敏哲, 他： ベンゾピレンの末梢神経および脊髄感覚系シナプス伝達に及ぼす作用に関する研究. Fukuoka Acta Med, 108(3), 27-34, 2017.
6)Uchi H, et al: Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. J Dermatol Sci. 85(1):36-43, 2017.
7)Michalek JE, et al: Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation Ranch Hand. Neurotoxicol. 22(4):479-90, 2001.
8)Thömke F, et al : Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans. Acta Neurol. Scand. 106(3):155-158, 2002.
9)産井良之, 他：日本内科学会雑誌. 97(8)：1771-1777, 2008.
10)植田 弘師, 他： ニューロメーターを用いた新しい知覚線維選択的侵害受容評価法. 日本薬理学雑誌 131, 367-371, 2008.
11)Koga K, et al. Selective Activation of Primary Afferent Fibers Evaluated by Sine-Wave Electrical Stimulation. Mol. Pain 1：13, 2005.

F．研究発表

１．論文発表
無し

２．学会発表
無し

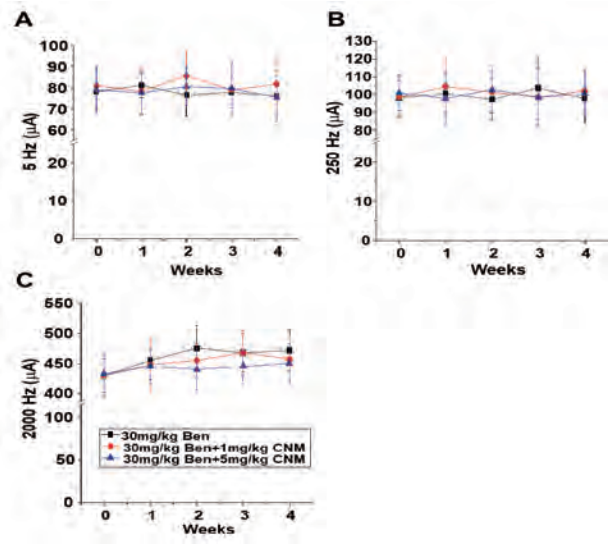
G．知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得
無し

２．実用新案登録
無し

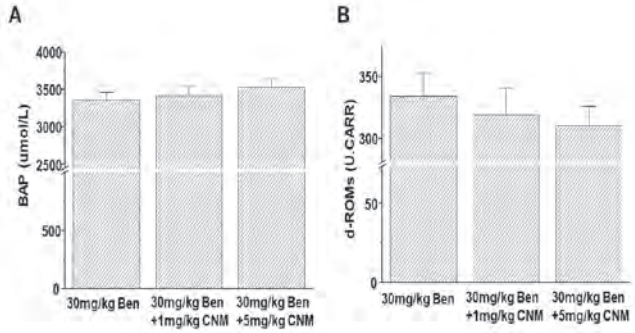
３．その他
無し

Fig 1. ベンゾピレ又はベンゾピレ＋ケイヒ投与がラットの各電気刺激周波数による感覚閾値の経時的変化に及ぼす影響



A, 5 Hz 電気刺激周波数. B, 250 Hz 電気刺激周波数. C, 2000 Hz 電気刺激周波数. Ben, ベンゾピレン. CNM, ケイヒ. Mean ±S.D. n=5

Fig 2. ベンゾピレ又はベンゾピレ＋ケイヒ投与がラットの抗酸化力と酸化ストレスに及ぼす影響



A, 抗酸化力. B, 酸化ストレス. Ben, ベンゾピレン. CNM, ケイヒ. Mean±S.E. n=5.

分担研究報告書

ダイオキシン類で亢進する細胞接着とオートファジーに関する研究

研究分担者　鳥巣 剛弘 九州大学病態機能内科 助教

研究要旨　ダイオキシン類が生体に様々な影響を及ぼすことが知られているが、どのようなメカニズムで生体に影響するかはまだ不明な点が多い。ダイオキシン類は Ah 受容体のリガンドとして働き細胞接着に影響がある。Ah 受容体から Src や FAK の活性化を引き起こすことがメカニズムとして知られている。今回我々はオートファジーが細胞接着班を取り込み Src や FAK の分解に働くことを示した。その結果オートファジー不全状態であると細胞接着班の分解が抑制され細胞接着が亢進することを示した。今後類似する両者の関連を明らかにしたい。

A 研究目的

ダイオキシン類による中毒である油症が発生し 50 年経過した。ダイオキシン類の生体への重大な影響は今なお重大な課題である。ダイオキシン類は細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体(Ah 受容体)を介すると考えられている。しかし Ah 受容体は内因性のリガンドがいまだ不明であり、またどのような分子機構がかかわるか詳細は知られていない。Ah 受容体は様々な臓器に広く存在し、ダイオキシン類が Ah 受容体に結合することで細胞質にある Ah 受容体が核内へ移行し様々な転写産物が作られ、その過程で酸化ストレスが生じ、たんぱく質や DNA に障害を与えると考えられている。一方、ダイオキシン類により細胞運動が増加することが報告されている。メカニズムとして Ah 受容体に結合するとインテグリンの発現量が増加し Src や FAK のリン酸化が亢進することが報告された[1)]。一方オートファジーは様々な不要となった小器官やタンパクを分解する機構であるが細胞接着との関連も示唆されている。そこでオートファジーがこれらのメカニズムにかかわるかを検討した[2)]。

B. 研究方法

材料として野生型マウス胎児芽細胞と Atg5 欠損マウス胎児芽細胞を用いた。免疫染色は LSM700 レーザー顕微鏡で観察した。タンパク量やリン酸化をウエスタンブロットにより定量した。RhoA の機能は G－LISA を用いた。細胞接着能は接着アッセイで行った。

C. 研究結果

細胞外マトリクスとしてコラーゲンはインテグリンのリガンドであり最も重要な細胞外マトリクスとして知られている。FITC ラベルしたコラーゲンを細胞 dish に塗布し細胞を接着する際の取り込みと、オートファゴソームのマーカーとして LC3 を細胞免疫染色し局在を評価した。LC3 でラベル下オートファゴソームに取り込まれていた。Atg5KO 細胞や Atg7KO 細胞では野生型に比べ細胞内に取り込まれたコラーゲン量が増加していた。このことはオートファジーを阻害するクロロキンでも同様の結果であった。また Atg5KO 細胞や Atg7KO 細胞に十分コラーゲンを取り込ませたのち時間経過をもって観察するとコントロールに比べコラーゲンの分解が抑制されていることが示された。

細胞接着班のマーカーとして FAK や Paxillin、オートファゴソームのマーカーとして LC3 を細胞免疫染色した。FAK や Paxillin もオートファゴソーム内に取り込まれていた。その結果、細胞接着班は Atg5KO 細胞では細胞辺縁に増加し活性化していた。メカニズムとして FAK の活性化を 397 部位でのチロシンリン酸化を評価したところ Atg5 欠損細胞では低下し、さらに FAK で抑制される RhoA の亢進がみられた。細胞機能として細胞接着を再接着アッセイで評価したところ Atg5KO 細胞では細胞接着が亢進し、上記の分子メカニズムは細胞機能として意義のあるものと考えられた。

D. 考察

本研究からダイオキシン類は Ah 受容体を介して FAK や Paxillin が活性化し細胞接着を亢進させるが、オートファジー欠損では同様に細胞接着班の分解が抑制されており FAK や Paxillin が亢進し細胞接着が亢進することが示された。ダイオキシン類は体内に取り込まれたのちどのように排泄されるか知られていない。オートファジーは細胞内にある不要な小器官やミスフォールドしたタンパクを分解する機構として知られる。ダイオキシン類は活性酸素が増加することが病因として知られているがまたオートファジー不全では活性酸素が増加することも知られている。今後ダイオキシン類とオートファジーについて関連を検討する必要があるのかもしれない。

E. 結論

ダイオキシン類の受容体と知られる Ah 受容体のシグナルとオートファジー欠損により影響がある細胞接着の分子機構に類似性がみられた。

参考文献

1) Tomkiewicz C1, Herry L, Bui LC, Métayer C, Bourdeloux M, Barouki R, Coumoul X. The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. Oncogene. 2013 Apr 4;32(14):1811-20. doi: 10.1038/onc.2012.197.

2) Kawano S, Torisu T, Esaki M, Torisu K, Matsuno Y, Kitazono T. Autophagy promotes degradation of internalized collagen and regulates distribution of focal adhesions to suppress cell adhesion. Biol Open. 2017 Nov 15;6(11):1644-1653.

分担研究報告書

オートファジーによる酸化ストレスの調節機構に関する研究

研究分担者　　辻　学　九州大学病院 講師

研究要旨　これまでの研究で、ダイオキシン類の受容体である芳香族炭化水素受容体(Aryl Hydrocarbon Receptor: 以下、AHR)が酸化ストレスを調節する因子であることを報告してきた。今回、酸化ストレスを調節機構として重要とされるオートファジーの活性化についてAHRが関与するかを検討した。AHRを刺激するリガンドでヒト表皮細胞を刺激したところ、オートファジーが誘導されることが明らかとなった。現在は、AHRを介して誘導されたオートファジーが酸化ストレスをどのように調節するかを検討している。

A．研究目的

これまでの研究で、ダイオキシン類の受容体である芳香族炭化水素受容体(Aryl Hydrocarbon Receptor: 以下、AHR)が酸化ストレスを調節する因子であることを報告してきた。今回、酸化ストレスを調節機構として重要とされるオートファジーの活性化について AHR が関与するかを検討した。オートファジーは細胞の炎症・代謝・老化・癌化などに幅広く関与する機構であることから、オートファジーを制御する機構は幅広い疾患の治療法の確立に有用と考えられている。そこで、これまでの研究成果に基づき、オートファジーを誘導し、かつAHRを刺激するリガンドであるメトホルミンを用いてヒト表皮細胞を刺激し、AHRの刺激がオートファジーの誘導にどのような変化をきたすかを検討した。

B．研究方法

ヒト表皮細胞を培養し、メトホルミンで刺激を行なった。オートファジーの活性化を示すAMPKのリン酸化、LC3Bの発現の増加についてウエスタンブロット・蛍光免疫染色で解析を行った。

（倫理面への配慮）

当該研究は培養細胞を用いた in vitro の実験系であり、倫理面の問題は特に考えられない。

C．研究結果

ヒト表皮細胞に対してメトホルミンを用いて、刺激を行なった。メトホルミンはAHRの活性化し、AHRの核内移行を誘導した(図 A)。さらに、メトホルミンは AMPKのリン酸化(図B)、LC3Bの発現の増加（図C）を来たし、オートファジーを誘導する可能性が示唆された。

図の説明

図 A：ヒト表皮細胞をメトホルミン 10mMで3時間刺激し、抗AHR抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。二次抗体にはArexa 568（赤色）を用いた。ControlではAHRは細胞質に位置するのに対して、メトホルミンによる刺激を行った方では AHR は核に位置していた。

図 B：ヒト表皮細胞をメトホルミン0.01-25mMで3時間刺激し、抗pAMPK抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。メトホルミンの用量依存性にAMPKのリン酸化が誘導された。

図C：ヒト表皮細胞をメトホルミン10 mMで6時間刺激し、抗LC3B抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。二次抗体にはFITC（緑色）を用いた。メトホルミンで刺激を行った方では、LC3B の発現が多く見

られた。赤色は核染色である。

D．考察

皮膚におけるオートファジーの役割には不明な点が多い。今回の研究で、AHR がオートファジーを制御する受容体である可能性が示唆された。これまでの研究成果で、AHR は、AHR の下流にある Ovo-like 1(OVOL1)、Ovo-like 2(OVOL2)遺伝子を介して細胞の分化・増殖や酸化ストレスによる炎症反応をコントロールすることが明らかになっている。今後は、OVOL1-OVOL2 が AHR の刺激によるオートファジーの誘導に関与していないか、検討していく予定である。

E．結論

AHR はオートファジーが誘導するための重要な受容体である可能性があり、今後は、AHR の刺激によって誘導されるオートファジーのメカニズムと最終的にどのようにして酸化ストレスを調節するのかをさらに明らかにしたい。

F．研究発表

１．論文発表

Upregulation of FLG, LOR, and IVL Expression by Rhodiola crenulata Root Extract via Aryl Hydrocarbon Receptor: Differential Involvement of OVOL1.
Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G, Murai M, Yan X, Furue M.

Glyteer, Soybean Tar, Impairs IL-4/Stat6 Signaling in Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells: The Basis of Its Therapeutic Effect on Atopic Dermatitis.
Takemura M, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Furue M, Tsuji G.
Int J Mol Sci. 2018 Apr 12;19(4). pii: E1169. doi: 10.3390/ijms19041169.

The role of the OVOL1-OVOL2 axis in normal and diseased human skin.
Tsuji G, Ito T, Chiba T, Mitoma C, Nakahara T, Uchi H, Furue M.
J Dermatol Sci. 2018 Jun;90(3):227-231.

２．学会発表

DNP-MRI 撮像解析によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚深部の酸化ストレス評価
江藤 比奈子(九州大学先端医療イノベーションセンター), 辻 学, 千葉 貴人, 古江 増隆, 兵藤 文紀
日本薬学会年会要旨集 (0918-9823)138年会2号 Page264(2018.03)

アトピー性皮膚炎の皮膚バリア機能障害における芳香族炭化水素受容体とOvo-like 1遺伝子の役割
日本皮膚科学会雑誌 (0021-499X)128巻5号 Page1253(2018.05)

G．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

１．特許取得

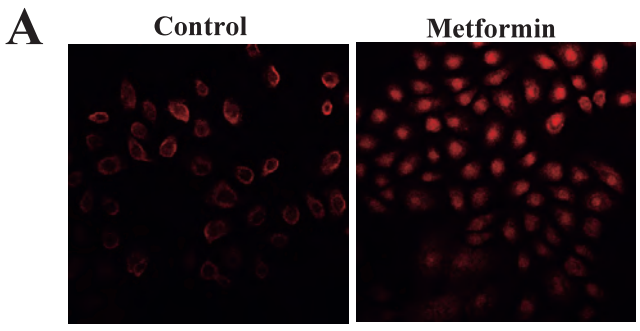
なし

２．実用新案登録

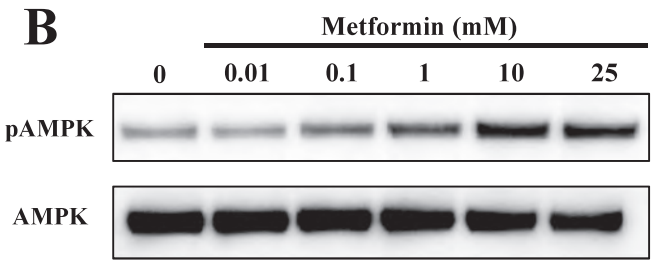
なし

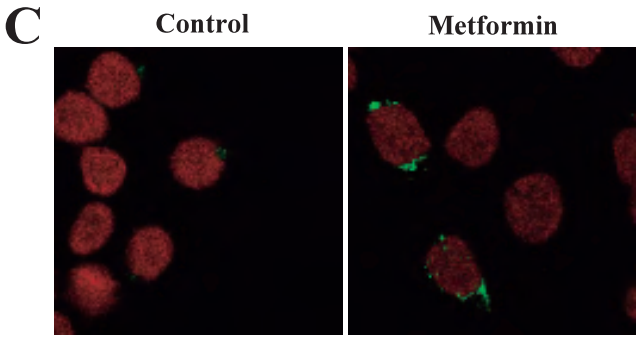
３．その他

なし



Red: AHR





Green: LC3B

分担研究報告書

2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有するPCB異性体の動物肝ミクロゾームによる代謝

研究分担者　古賀 信幸　　中村学園大学栄養科学部 教授
研究協力者　太田 千穂　　中村学園大学栄養科学部 講師

本年度は、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体の 1 つである 2,2',4,4',6,6'-hexachlorobiphenyl (PCB155)につき、ラットおよびモルモット肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べた。まず、ラット肝では phenobarbital (PB)および dexamethazone 前処理でのみ、代謝物 M1 が生成され、代謝活性はそれぞれ 1.256 および 0.105 nmol/hr/mg protein であった。モルモット肝では、M1 は PB 前処理でのみ検出され、その活性は 0.030 nmol/hr/mg protein と低かった。次に、GC-MS の結果、M1 はそのメチル化体が分子量 388 [M^+]であることから、一水酸化体であると推定された。なお、水酸化の位置は、構造的に *meta* 位(3 位)しかないこと、およびフラグメントイオン 345 [M^+-43]が比較的多かったことから、3 位と考えられた。以上の結果から、①PCB155 は、PCB182 や PCB188 と同様に、代謝され易いこと、②M1 の生成活性は、モルモットに比べ、ラットで著しく高いこと、③M1 の生成には PB 誘導性の CYP2B 酵素が関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

PCB異性体のうち、2,4,5-三塩素置換ベンゼンあるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有するものは、ヒト血液中や肝臓中で高濃度検出されている。また、Todakaらの報告によると、油症患者および健常者のいずれでも、2,2',4,4',5,5'-hexaCB (PCB153)、2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB (PCB180)および2,2',3,4,4',5'-hexaCB (PCB138)が最も多く、しかも油症患者で健常者の1.6～2.2倍多いという。

一方、当研究室ではこれまでに、PCB182（2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンと2,4,6-三塩素置換ベンゼンから成るPCB異性体）の代謝を、ラットおよびモルモット肝ミクロゾーム(Ms)を用いて調べ、その結果、いずれの動物肝Msも代謝物M1（3'-OH体）を生成すること、さらに、phenobarbital (PB)前処理ラットでは、他の七塩素化ビフェニル（PCB187、PCB183、PCB180）に比べ、10～50倍もの高い活性で代謝されることも明らかにした。さらに、PCB188（2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有するPCB異性体）についても検討し、その結果、PCB182と同様に比較的容易に3'-OH体へと代謝されることを明らかにしている。このように、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有するPCB異性体はなぜ体内残留性が低いのかという理由の1つは代謝されやすさにあると思われる。本研究では、この点をさらに確かめるため、2,2',4,4',6,6'-hexachlorobiphenyl (PCB155)を用い、ラットおよびモルモット肝Msによる代謝を調べた（Fig. 1）。

B. 研究方法

① PCB155 合成：Ullmann らの方法で行った。すなわち、*N*,*N*-dimethylformamide 50 mL に 2,4,6-trichloroiodobenzene (0.6 g)を溶解し、活性化銅 14 g を入れて 185℃で加熱還流を 4 時間行った。さらに活性化銅を同量追加し、さらに 4 時間加熱を続けた。放冷後、反応液に蒸留水を加え chloroform で抽出し、シリカゲル 60 カラムおよび分取用 HPLC で精製した。HPLC の分析条件は以下の通りである。分析機器、高速液体クロマトグラフ LC-10AT（島津製）；カラム、Inertsil ODS-HL カラム（10 × 250 mm i.d.、5 μm、GL

Sciences 製）; 移動相、acetonitrile ; 流速、4 mL/min ; 検出波長、254 nm。② ラットおよびモルモット肝 Ms の調製：Wistar 系雄性ラット（体重約 220g）および Hartley 系モルモット（体重約 280g）を各 12 匹用いた。肝 Ms は、未処理、PB 前処理（80 mg/kg 体重 ×3 日間）、3-methylcholanthrene (MC)前処理（20 mg/kg 体重 ×3 日間）あるいは dexamethazone (DEX)前処理（100 mg/kg 体重 ×3 日間）した動物から、常法により調製した。③ 動物肝 Ms による PCB155 代謝：40 μM PCB155 を NADPH 生成系(0.33 mM NADP、5 mM G-6-P、G-6-PD 1.0 unit)、6 mM $MgCl_2$、動物肝 Ms (1 mg protein)および 100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)とともに合計 1.0 mL として、37℃で 60 min インキュベート後、反応液に chloroform-methanol (2:1) 1 mL と n-hexane 3 mL を加えボルテックスで振とう抽出した。抽出は 2 回行い、有機層を合わせて濃縮後、diazomethane でメチル化し、一部を GC-MS に付した。GC-MS の測定条件は次の通りである。分析機器、GCMS-QP2010（島津製）; カラム、DB-1 フューズドキャピラリーカラム（30 m × 0.25 mm i.d.、0.25 μm フィルム厚、J&W Scientific 製）; キャリアーガス、He (1 mL/min); カラム温度、70℃ (1.5min) - 20℃/min - 230℃ (0.5min) - 4℃/min - 280℃ (5min); 注入口温度、250℃; 検出器温度、230℃。

（倫理面への配慮）

「中村学園大学における動物実験のための指針」に従い、ラットの屠殺に際しては、苦痛をできるだけ軽減するため、セボフルランで麻酔後、頸動脈からの脱血により死亡させた。

C. 研究結果

ラット肝 Ms により生成された代謝物の化学構造：PCB155 を、NADPH 存在下、好気的に動物肝 Ms とともに、37℃、60 min 反応させた。Fig. 2 には、PB 前処理ラット肝 Ms により生成された PCB155 代謝物（メチル化体）の GC-MS による分析結果を示す。PCB155（保持時間 11.87min）に続き、代謝物ピークが保持時間 13.38min に検出された。また、M1 のメチル化体は, 分子量 388 であり、PCB155 の分子量より m/z 30 大きかったことから、一水酸化体（メチル化体）であることが明らかになった。

次に、M1 のマススペクトルを見たところ、Table 1 のように、フラグメントイオン m/z 348 [M^+-43] に加え、m/z 373 [M^+-15]が比較的多く検出された。この結果は、PCB182 の 3'-OH 体（メチル化体）のマススペクトルとよく似ていた。さらに、水酸化の位置は、構造的に *meta* 位(3 位)しかないことを考慮すると、M1 は 3-OH 体と推定された。

ラットおよびモルモット肝MsによるPCB155代謝活性の比較：SIM法により得られたマスクロマトグラムより、M1の定量を試みた（Table 2）。なお、定量はPCB155 の検量線を用いて行った。まず、ラット肝ではPBおよびDEX前処理Msでのみ、代謝物M1が生成されたが、未処理およびMC前処理Msでは代謝物は全く生成されなかった。M1の生成活性はPBおよびDEX前処理Msで、それぞれ1.256 および0.105 nmol/hr/mg proteinであった。一方、モルモット肝では、M1はPB前処理Msで最も多く検出されたが、その生成活性はラットに比べ、0.030 nmol/hr/mg proteinと低いものであった。なお、M1は未処理およびDEX前処理Msにおいて生成されたが極微量のため定量には至らなかった。

D. 考察

これまでに Goto らおよび Kato らは、PCB155 をラットの経口投与したところ、ラット糞中に主代謝物として、3-OH 体が排泄されることを報告している。また、Ariyoshi らはイヌ肝 Ms による代謝を調べ、主代謝物の 3-OH 体以外に、4 位の塩素が NIH 転位した代謝物（例えば、4-OH 体、塩素が1個脱離した OH 体、3,4-diOH 体、など）を報告している。

今回、PCB155 代謝をラットおよびモルモット肝 Ms を用いて調べたところ、①PCB155 は、

PCB182 や PCB188 と同程度に、代謝され易く、1 種類の代謝物（3-OH 体）に変換されること、②3-OH 体の生成には PB 誘導性の CYP2B 酵素の関与していること、③CYP2B 酵素の PCB155 代謝活性は、モルモットに比べ、ラットで著しく高いこと、を明らかにした(Fig. 3)。しかしながら、2,4,5-三塩素置換ベンゼンをもつ PCB 異性体に比べ、2,4,6-三塩素置換ベンゼンでは、なぜこのように代謝され易くなるのかという点は不明のままである。

E. 結論

PCB155は、PB前処理ラット肝Msで、容易に一水酸化体（3-OH体）へと代謝された。一方、モルモット肝Ms（PB前処理）では、ラットの数10分の１しか、3-OH体は生成されなかった。以上のことから、PCB155代謝には大きな種差があること、また、PCB155代謝にはCYP2B酵素が大きく関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 太田千穂，山本健太，徳富美沙紀，加藤善久，古賀信幸，3,7,3’,4’-Tetramethoxyflavone (FTM)のラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝. 中村学園研究紀要, **50**, in press (2019).

2) 山本健太，太田千穂，徳富美沙紀，古賀信幸，「柑橘果皮成分 3,5,7,8,3’,4’-Hexamethoxyflavone のラット肝ミクロゾームによる代謝. 中村学園研究紀要, **50**, in press (2019).

2. 学会発表

1) 山本健太, 徳富美沙紀、太田千穂, 古賀信幸, ATM のヒト肝ミクロゾームによる代謝. 第 72 回日本栄養・食糧学会年会 (岡山コンベンションセンター、岡山県立大学) 平成 30 年 5 月 11～13 日

2) C. Ohta, K. Yamamoto, Y. Fujii, K. Haraguchi, O. Kimura, T. Endo, Y. Kato, N. Koga, In vitro metabolism of 2,2’,3,4’,5, 6,6’-heptachlorobiphenyl (CB188) by rat liver microsomes. Dioxin 2018 (Krakow, Poland) 平成 30 年 8 月 26 日～9 月 1 日

3) K. Haraguchi, Y. Fujii, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, Y. Kato, Human exposure to brominated phenoxy phenols: seaweeds as source of hydroxylated and methoxylated PBDEs in Asia-Pacific. Dioxin 2018 (Krakow, Poland) 平成 30 年 8 月 26 日～9 月 1 日

4) Y. Kato, S. Tamaki, K. Haraguchi, Y. Fujii, O. Kimura, C. Ohta, T. Endo, N. Koga, M. Degawa, Comparative study on Kanechlor-500-mediated decrease in serum thyroxine level between C57BL/6 and its transthyretin-deficient mice. Dioxin 2018 (Krakow, Poland) 平成 30 年 8 月 26 日～9 月 1 日

5) Y. Fujii, K. Haraguchi, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, K. H. Harada, A. Koizumi, Edible fish is a source of human dietary exposure; perfluorinated alkyl acids in Pacific cods from North Pacific Ocean. Dioxin 2018 (Krakow, Poland) 平成 30 年 8 月 26 日～9 月 1 日

6) 山本健太, 徳富美沙紀, 太田千穂, 木村治, 遠藤哲也, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 古賀信幸, 5,7,4’-Trimethoxyflavanone の動物肝ミクロゾームによる代謝. 日本栄養・食糧学会九州沖縄支部大会（宮崎大・農）平成 30 年 10 月 20, 21 日

7) 太田千穂, 山本健太, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村 治, 遠藤哲也, 古賀信幸, ラット肝酵素による PCB188 の水酸化代謝. 日本薬学会第 139 回年会（幕張メッセ、千葉）平成 31 年 3 月 20～23 日

8) 安藤順平, 永田 滋, 津田侑人, 藤井由希子, 加藤善久, 木村 治, 遠藤哲也, 太田千穂, 古賀信幸, 原口浩一, 北太平洋海域諸国における食用魚類を通じた有機フッ素

化合物の摂取量評価. 日本薬学会第 139 回年会（幕張メッセ、千葉）平成 31 年 3 月 20～23 日

9) 木村 治, 太田千穂, 古賀信幸, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 遠藤哲也, Caco-2 細胞におけるロスバスタチンの膜透過に及ぼす 5,7-ジメトキシフラボンの影響. 日本薬学会第 139 回年会（幕張メッセ、千葉）平成 31 年 3 月 20～23 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

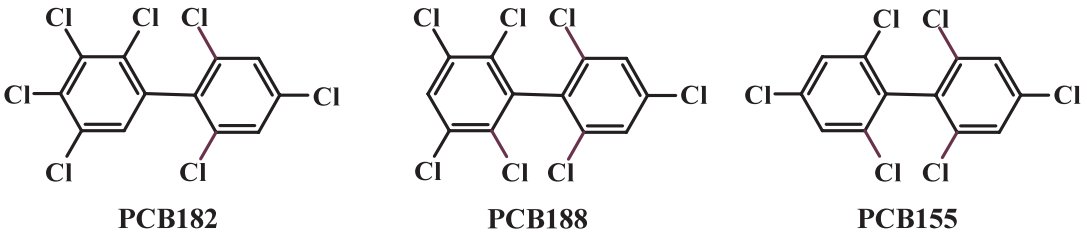
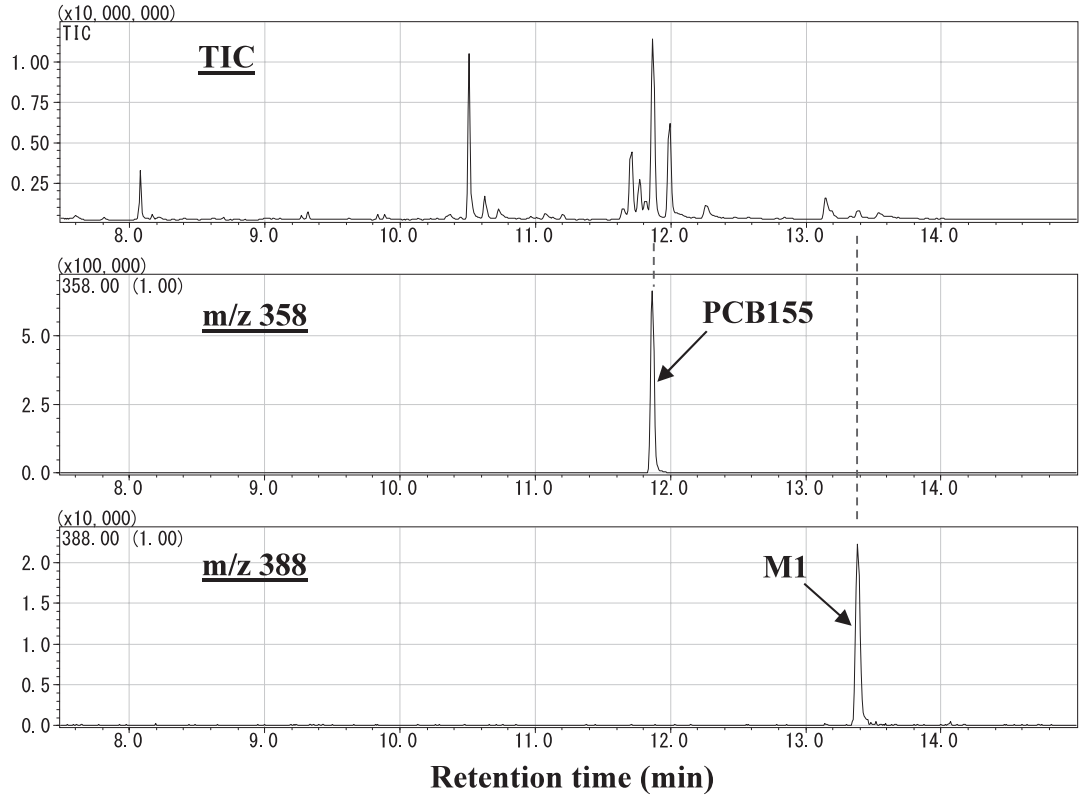


Fig. 1　Chemical structures of PCB182, PCB188 and PCB155

(A) Mass chromatograms



(B) Mass spectra of PCB155 and M1

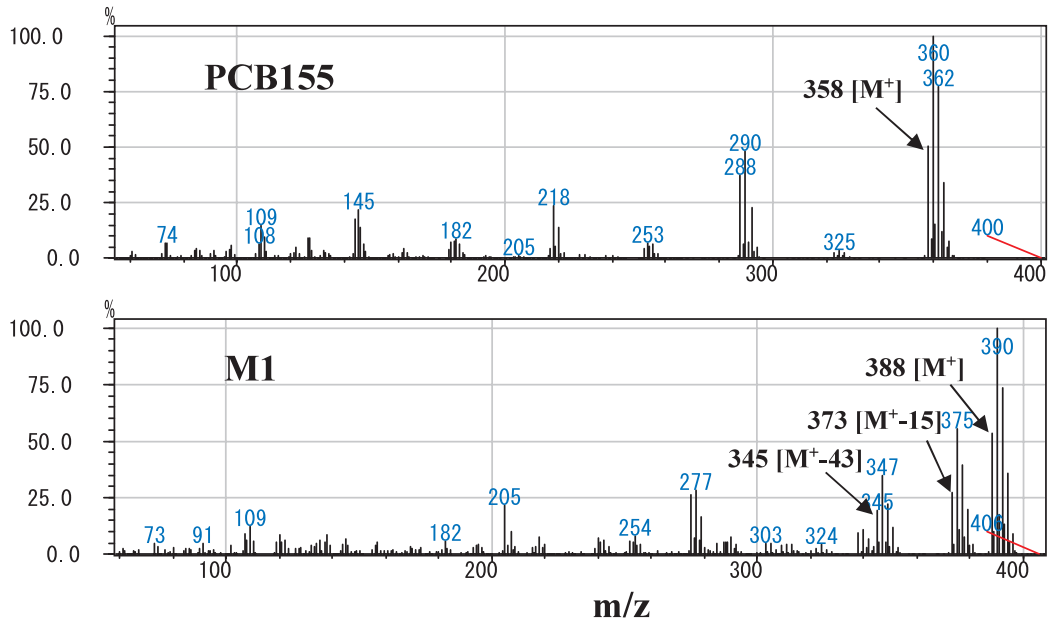


Fig. 2 GC-MS analysis of the methylated derivative of a PCB155 metabolite formed by liver microsomes of PB-treated rats
(A) Mass chromatograms (B) Mass spectra of PCB155 and M1

Table 1　Mass spectral data and retention times of PCB155 and the methylated derivative of its metabolite M1

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min) in GC-MS
		$[M^+]$	$[M^+-15]$	$[M^+-35]$	$[M^+-43]$	$[M^+-50]$	$[M^+-70]$	
PCB155	358	100	-	5	-	-	74	11.87
M1	388	100	52	-	36	-	-	13.38

-, not detected.

Table 2 Metabolism of PCB155 by liver microsomes of untreated, PB-treated, MC-treated and DEX-treated rats and guinea pigs

Animal	Treatment	M1 formed (nmol/hr/mg protein)
Rat	Untreated	N.D.
	PB-treated	1.256 ± 0.134
	MC-treated	N.D.
	DEX-treated	0.105 ± 0.047
Guinea pig	Untreated	B.D.
	PB-treated	0.030 ± 0.052
	MC-treated	N.D.
	DEX-treated	B.D.

N.D., not detected.　B.D., below detection limit.
Each value represents the mean ± S.D. of four animals.

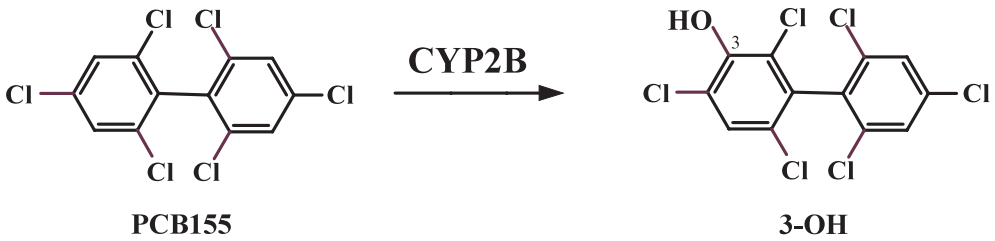


Fig. 3　Postulated metabolic pathway of PCB155 in rat and guinea pig liver

分担研究報告書

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析：芳香族炭化水素受容体欠損ラットでの検討

研究分担者　　石井　祐次　九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野　准教授

研究要旨

妊娠ラットへの 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) の低用量曝露は、出生児に性未成熟を惹起する。我々はこれまでに、本障害が出生前後の性ホルモン合成抑制に起因することを突き止めてきた。さらに最近、芳香族炭化水素受容体(AHR)欠損ラットを用いた解析から、上位制御因子の黄体形成ホルモン (LH)の調節に AHR が関与する事実も突き止めつつある。本年度の研究では、発達過程における精巣と性ホルモン合成への AHR の関与を、AHR 欠損ラットを用いて明らかにすることを目的とした。まず、AHR 欠損により脳の性分化の時期である周産期の脳下垂体における LHβの mRNA 発現が低下、精巣の性ステロイド合成系タンパク質である、steroidogenic acute regulatory protein (StAR)ならびに cytochrome P450 17 (CYP17)が減少傾向を示すことを確認した。このことから、AHR は周産期に脳下垂体-精巣系を制御し、性ステロイド合成に関与することで、脳の性分化に重要な働きを果たす可能性が示唆された。次いで、AHR の生殖腺への影響を検証すべく、成長後の精子形成や生殖器官の成熟に重要なテストステロンの血中濃度への AHR 欠損の影響を調べた。その結果、出生 2 日目 (PND2)の雄では、AHR 欠損により著しく血中テストステロン濃度が低いものの、4 週齢では、野生型と同レベルになっていた。一方、思春期に当たる 6 週齢では、AHR 欠損雄ラットで、テストステロン濃度が野生型ラットに比べ著しく低かった。これに合致して、精巣での CYP17 タンパク質発現レベルが有意に低下していた。そこで、テストステロンの合成、分泌を担うライディッヒ細胞に着目し、AHR 欠損により、形態学的な変化が現れるか否かを 8 週齢を用いて検討したが、ライディッヒ細胞に明らかな形態学的変化は見られなかった。一方、第 8 週、11 週、20 週において、AHR 欠損では精巣中の精子数が著しく少なかった。以上の結果から、1) AHR は周産期に脳下垂体-精巣系を制御し、性ステロイド合成に関与することで、脳の性分化に重要な働きを果たすこと、ならびに 2) 思春期特異的なテストステロンの減少とこれに伴う精子数の減少から、AHR には思春期における重要な働きがあることが強く示唆された。

A．研究目的

妊娠期のダイオキシン曝露による性未成熟等の出生児発育障害は、低用量で発現し、影響が長期間持続するため問題である(1)。当教室では、最強毒性ダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 1 μg/kg、経口) の妊娠ラットへの曝露により、出生前後の限定された時期に脳下垂体 luteinizing hormone (LH) が低下し、これを起点として成長後の性未成熟が固着することを報告している(2, 3)。更に、別の脳下垂体ホルモンである 成長ホルモンの発現も TCDD 母体暴露により胎児期に減少させ、これと付随して低体重や低体長が生じることも見出している (4, 5)。多くのダイオキシン毒性発現には、aryl

hydrocarbon receptor (AHR) 活性化が重要であるが (6)、周産期における胎児/新生児脳下垂体の LH 合成、精巣での性ホルモン合成については、未解明な点が多い。また、発達過程、思春期における精巣と性ホルモン合成への AHR の関与については、分かっていない。

芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AHR) は、細胞質に存在するリガンド活性化型の転写因子である。リガンドと結合することで活性化され核内に移行する。核内に移行した AHR は、AHR nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成し、xenobiotic responsive element (XRE) に結合して、標的遺伝子の転写制御を行う (7)。 AHR は全身の組織に発現し、この転写制御を介して、薬物代謝経路及び毒性発現経路を仲介する。

これまで行われた AHR 欠損動物を用いた研究から、AHR は脳 (8) 、肝臓 (9) 、腸 (10) 、生殖腺 (11) 、様々な組織において重要な役割を果すと考えられている。その中でも、生殖腺は生殖機能の発達に重要であり、生殖機能は動物種の繁殖、生存にとって必要不可欠であるため、その機構の解明は非常に重要である。AHR 欠損が生殖腺に与える影響として、雌の卵巣の矮小化、性周期の異常、卵胞発達の異常、排卵数の低下など、卵巣への様々な影響が見られている (12) 。その機構として、AHR 欠損によりアロマターゼの転写が抑制されることが考えられている (13)。一方、雄では、AHR が、老齢期での精子機能の老化に寄与することが示唆されているが (11)、発達過程における AHR の機能に関しては、まだ報告されていない。

当研究室では、AHR 欠損 (KO) ラットを作成し、ダイオキシンによる肝毒性発現における AHR の関与について研究を行っている (14)。また、同ラットを用いて、ダイオキシン非投与条件下においても、AHR 欠損による影響が解析されている。その中で、成熟期における精巣の機能低下や形態学的異常、さらに交尾行動における異常が確認された (平成 27 年度分担研究報告)。また、胎児期において、脳下垂体ホルモンである LHβ および、性ステロイド合成の律速過程の中心的役割を担う StAR (steroidogenic acute-regulatory protein) の mRNA 発現が AHR 欠損により、胎生 20 日 (gestational day 20, GD20)において低下することが確認されたことから (15)、AHR には胎児期の性ステロイド合成を介して性成熟および生殖機能に重要な役割があることが示唆された。これまでの当研究室の研究成果から、AHR 欠損ラットでは上述のように雄の生殖機能の低下が顕著であることが示唆されている。しかし、その機構には未だ不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、周産期の雄の脳下垂体、生殖腺に着目し、AHR の脳の性分化への影響を考察するとともに、思春期の生殖腺の発達への寄与と作用機構の解明を目指して検討を行った。

B．研究方法

1. 動物実験

AHR-KO ラットは、XTN™ TAL nuclease ベクターを用いて作出した (14)。遺伝子型の判別は、出生児の尾あるいは耳小片よりゲノム DNA を抽出し、AhR 遺伝子をコードするプライマーを用いた PCR によって行った。

1-1. 児の AHR 遺伝子型間での比較

雌雄の AHR-Het ラットを一晩交配し、翌朝膣内に精子が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。妊娠 18 日目の胎児より組織および血液を採取した。また、出生後の成熟に対する影響を調べるため、母ラットを自然に出産させたのち、生後 21 目において離乳させた。遺伝子型を判別したのち、継続飼育を行い、4 週齢、6 週齢、8 週齢、11 週齢および 20 週齢にて実験に供した。また、生後 2 日目 (PND2)

にて試験に供する際は、サンプル採取と同時に組織から DNA を抽出し、遺伝子型を判別した。

2. リアルタイム RT-PCR 法

組織より total RNA を抽出したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (16)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、ターゲット mRNA の threshold cycle (Ct) 値を β-actin mRNA の Ct 値で補正した。

3. Enzyme immunoassay (EIA)

血清 テストステロン濃度は、市販のキットを用いて、添付説明書に従って測定した。血清は、滅菌水にて 5 倍希釈したのちに測定に用いた。

4. 精巣断面観察

8 週齢の雄ラットから定法 に従って、4% パラホルムアルデヒドで固定を行い、O.C.T. Compound に包埋し、凍結ブロックとした。これをクライオスタットにより厚さ 14 μm で薄切し、ヘマトキシリン-エオシン染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認のもとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。動物実験承認番号：A30-106。遺伝子組換え実験は、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」第 10 条第 2 項の規定に基づき、委員会の承認を得て行った (承認番号: 26-4)。

C. 研究結果

雌雄の AHR-Het ラットの交配によって得た 妊娠ラットを用いて、AHR 欠損が周産期の児に与える影響を調べたところ、新生児である PND2 において、AHR-KO 雄児では野生型 (WT) 雄児に比べ脳下垂体の LHβ mRNA レベルが有意に低下していた。これまで検討していた GD20 よりも早い時期の GD18 では、脳下垂体の LHβ mRNA は減少傾向はあるものの有意ではなかった (Fig. 1)。これと符合して、LH の下流で働く精巣の性ホルモン合成の律速タンパク質である StAR の mRNA 発現も、AHR-KO 雄児では WT 雄児に比べ減少傾向を示した (Figs. 2 and 3)。また、CYP17 は、PND2 において減少傾向を示した (Figs. 2 and 3)。これらのことに合致して、血中テストステロン濃度は、PND2 において著しく低下していた (Fig. 4)。続いて、成長後の性ホルモンレベルへの AHR-KO の影響を調べた。4 週齢においては、血中テストステロン濃度は、AHR-KO 雄と WT 雄間で差が認められなくなった。しかし、思春期に当たる 6 週齢においては、血中テストステロン濃度は、AHR-KO 雄で著しく低かった。このことと合致して、6 週齢においては、CYP17 のタンパク質発現レベルが有意に低かった (Fig. 5)。そこで、テストステロンの合成、分泌を担うライディッヒ細胞に着目し、AHR 欠損により、形態学的な変化が現れるか否かを 8 週齢で検討したが、ライディッヒ細胞に明らかな形態学的変化は見られなかった (Fig. 6)。また、体重、精巣重量、精巣上体の重量にも差は認められなかった (Fig. 7)。一方、8 週齢、11 週齢、20 週齢において、AHR-KO では精巣中の精子数が著しく少なかった (Fig. 8)。

D. 考察

本研究では、発達過程における精巣と性ホルモン合成への AHR の関与を、AHR-KO ラットを用いて明らかにするこ

とを目的とし、脳の性分化の時期である周産期の脳下垂体における LHβの mRNA 発現が低下、精巣の性ステロイド合成系タンパク質である、StAR ならびに CYP17 の mRNA レベルが減少傾向を示すことを確認した (Figs. 1-3)。当研究室では、妊娠ラットへの TCDD の低用量曝露は、出生児に性未成熟を惹起することを見出し、本障害が出生前後の性ホルモン合成抑制に起因することを突き止めてきた (2, 3)。さらに最近、AHR-KO ラットを用いた解析から、上位制御因子の LH の調節に AHR が関与することが示唆された (15)。この先行研究は、GD20 で実施されていた。本研究では、ダイオキシンを処理しない条件下、AHR 自身のもつ働きを明らかにするために、これまで検討していた GD20 よりも早い時期の GD18、および周産期である出生後の PND2 での検討を行った。CYP17 mRNA レベルは、PND2 において減少傾向を示した (Figs. 2 and 3)。また、血中テストステロン濃度は、PND2 において著しく低下していた (Fig. 4)。これらのことは、脳の性分化の時期である周産期において AHR が重要な働きを有することを強く示唆した。

AHR 欠損により周産期に低下したテストステロンは、生後 4 週齢においては、WT 雄との間で差が認められなくなった。しかし、思春期に当たる 6 週齢においては、血中テストステロン濃度は、AHR-KO 雄で著しく低かった (Fig. 5)。このことは、8 週齢においてライディッヒ細胞に形態学的な変化は与えなかったものの (Fig. 6)、8 週齢、11 週齢、および 20 週齢において精子数に著しい差を与えた (Fig. 8)。これまで、老齢期での精子機能の老化に AHR が寄与することが、AHR-KO マウスを用いて示唆されているが (11)、発達過程における AHR の機能に関して、精子数に及ぼす影響を示す報告はされていない。本研究では、AHR-KO 動物で、思春期における精子数が減少することを初めて明らかにした。当研究室の先行研究では、成熟期における精巣の機能低下や形態学的異常が確認されている (平成 27 年度分担研究報告)。さらに交尾行動における異常についても報告している (15)。しかし、本研究では、AHR-KO ラットで思春期初期の 6 週齢で、CYP17 の発現抑制と血中テストステロンレベルの低下があること、および 8 週齢においてライディッヒ細胞の形態学的異常を伴わない精子数の減少が起こっていることを見出しており、これらは特筆すべき点である。

以上の結果から、1) AHR は周産期に脳下垂体-精巣系を制御し、性ステロイド合成に関与することで、脳の性分化に重要な働きを果たすこと、ならびに 2) 思春期に特異的なテストステロンの減少とこれに伴う精子数の減少から、AHR には思春期における重要な働きがあることが強く示唆された。

E. 結論

AHR は、ダイオキシンの存在しない条件下において、周産期の雄児脳下垂体での LH 産生に欠くことが出来ない働きを有することが支持された。AHR の欠損は、思春期のテストステロン合成を低下させ、精巣に明確な形態学的損傷を与えずに精子数を減少させる。AHR は、TCDD により活性化され、その次世代毒性に関与するが、そのような影響が現れるのは、AHR が構成的条件下に、性成熟において重要な役割を担っているためだと考えられる。当研究室の先行研究で観察された影響は、ダイオキシンが、AHR の働きを撹乱させることを示唆しているのであろう。

F. 研究発表

1. 第 45 回日本毒性学会学術年会 (大阪、2018 年 7 月 17 -20 日)

2. フォーラム 2018: 衛生薬学・環境トキシコロジー (佐世保、2018 年 9 月 9 -10 日) (4 演題)
3. 日本薬学会第 139 年会 (幕張、2019 年 3 月 21 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

1) Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. *Crit Rev Toxicol*, **23**: 283-335 (1993).
2) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y, Yamada H. *Endocrinology*, **147**: 927-936 (2006).
3) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T, Yamada H. *J Pharmacol Exp Ther*, **329**: 1091-1099 (2009).
4) Hattori Y, Takeda T, Taura J, Ishii Y, Yamada H. *Endocrine*, **47**: 572-580 (2014).
5) Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Yamada H. *Toxicol Appl Pharmacol*, **281**: 48-57 (2014).
6) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol,* **140**: 173-179 (1996).
7) Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. *Biochim Biophys Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
8) Latchney SE, Hein AM, O'Banion MK, DiCicco-Bloom E, Opanashuk LA. *J Neurochem*, **125**: 430-445 (2013).
9) Harrill JA., Hukkanen RR., Lawson M., Martin G., Gilger B., Soldatow V., Lecluyse EL., Budinsky RA., Rowlands JC., Thomas RS. *Toxicol Appl Pharmacol,* **272**: 503-518 (2013)
10) Ikuta T, Kurosumi M, Yatsuoka T, Nishimura Y. *Exp Cell Res*, **343**: 126-134 (2016).
11) Baba T., Shima Y., Owaki A., Mimura J., Oshima M., Fujii-Kuriyama Y., Morohashi K. *Sex Dev,* **2**: 1-11 (2008)
12) Barnett KR, Tomic D, Gupta RK, Miller KP, Meachum S, Paulose T, Flaws JA. *Biol Reprod*, **76**: 1062-1070 (2007).
13) Baba T, Mimura J, Nakamura N, Harada N, Yamamoto M, Morohashi K, Fujii-Kuriyama Y. *Mol Cell Biol*, **25**: 10040-10051 (2005).
14) Takeda T, Komiya Y, Koga T, Ishida T, Ishii Y, Kikuta Y, Nakaya M, Kurose H, Yokomizo T, Shimizu T, Uchi H, Furue M, Yamada H. *J Biol Chem,* **292**: 10586-10599 (2017).
15) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H, Ishii Y. *Biochem Pharmacol*, **154**: 213-221 (2018).
16) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H, Yamada H. *J Toxicol Sci*, **35**: 365-373 (2010).

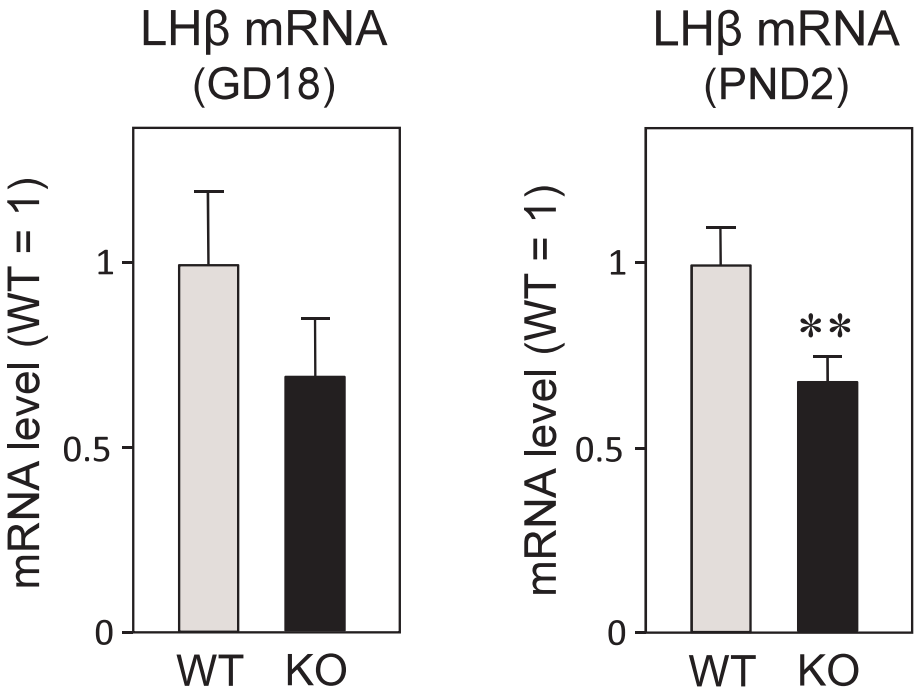


Fig. 1. Effect of AHR ablation on the pituitary expression of LHβ mRNA in GD18 male fetuses and PND2 male neonates. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 6-7 fetuses and 11-15 neonates. GD18: WT, n=6; KO, n=7. PND2: WT, n=11; KO, n=15. Significantly different from the control: $^{**}p<0.01$. The WT levels of mRNAs (% β-actin; mean ± S.E.M.) were as follows: LHβ (0.370 ± 0.074) in GD18 and LHβ (12.4 ± 1.1) in PND2.

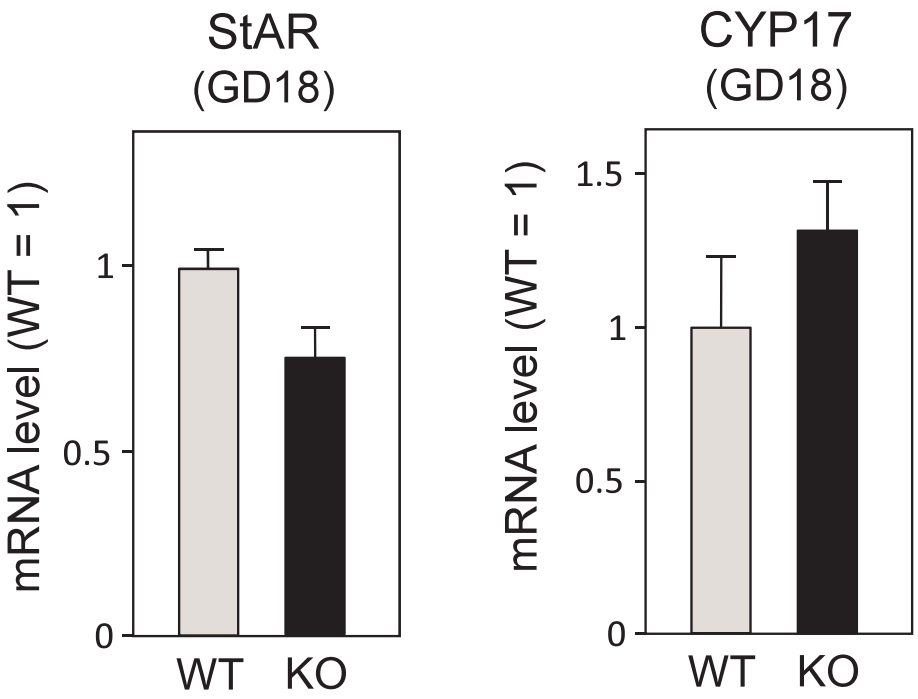


Fig. 2. Effect of AHR ablation on the testicular expression of StAR and CYP17 mRNA in GD18 male fetuses. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 5-7 fetuses: WT, n=5; KO, n=7. The WT levels of mRNAs (% β-actin; mean ± S.E.M.) were as follows: StAR (9.50 ± 0.40) and CYP17 (19.3 ± 4.5).

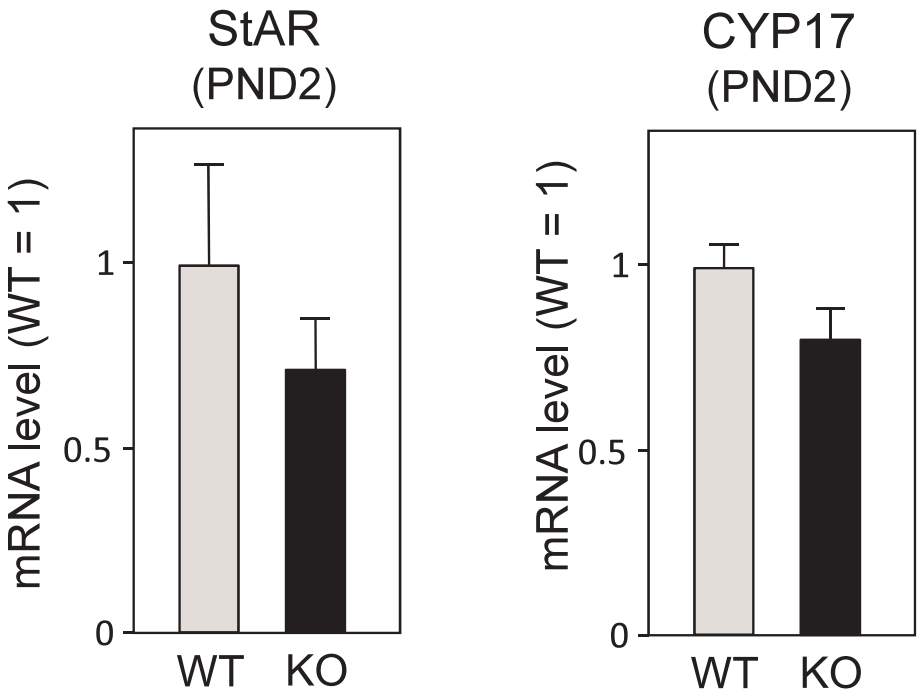


Fig. 3. Effect of AHR ablation on the testicular expression of StAR and CYP17 mRNA in PND2 male neonates. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 7-8 neonates: WT, n=7; KO, n=8. The WT levels of mRNAs (% β-actin; mean ± S.E.M.) were as follows: StAR (1.32 ± 0.41) and CYP17 (10.7 ± 0.7).

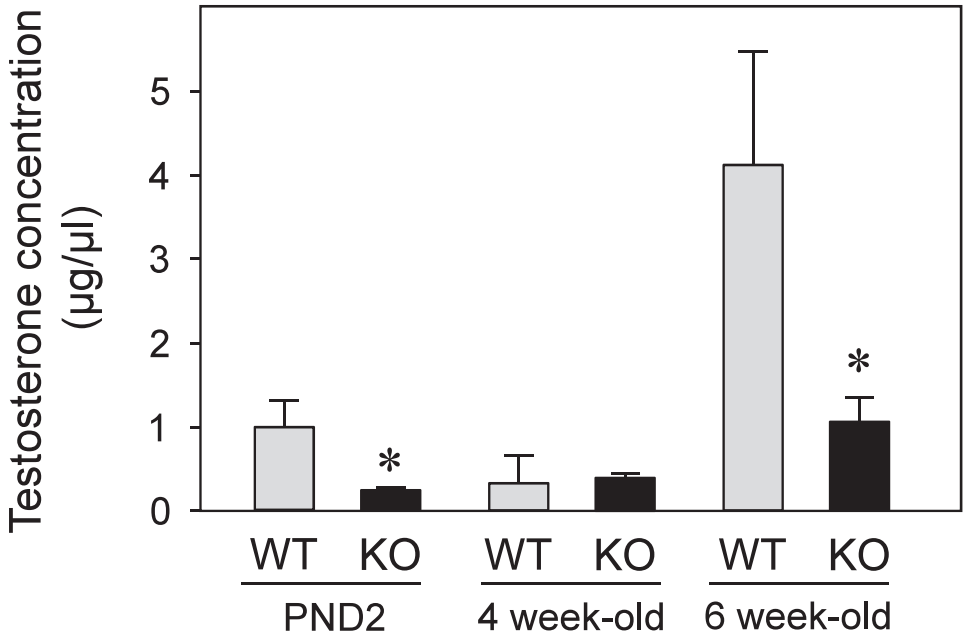


Fig. 4. Effect of AHR ablation on the serum concentration of testosterone in wild-type (WT) and AHR-KO (KO) male rats at PND2, 4 week- and 6 week-old. Each bar represents the means ±S.E.M. of 6-10 rats. PND2: WT, n=6; KO, n=7. 4 week-old: WT, n=6; KO, n=6. 6 week-old: WT, n=10; KO, n=8. Significantly different from the wild-type: *p<0.05.

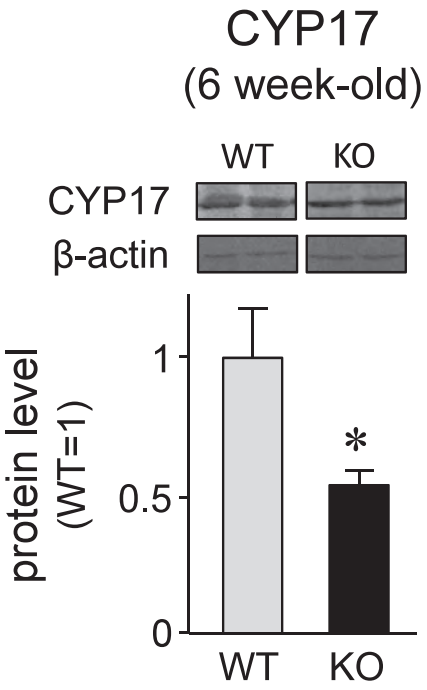


Fig. 5. Effect of AHR ablation on the testicular expression of CYP17 in 6 week-old male rats.
Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6-10 neonates which were born from 3-6 different dams. Significantly different from the wild-type: *p<0.05.

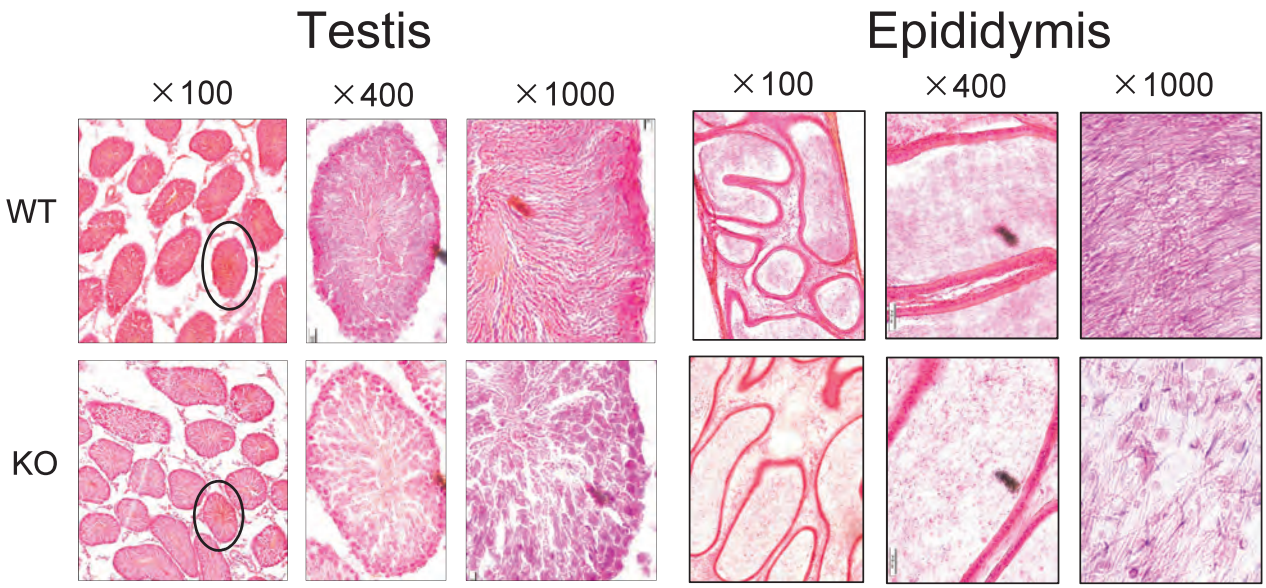


Fig. 6. Histopathological changes by knocking out the AHR in the testis (A) and epididymis (B) of male rats at 8 weeks old. The sections (14 μm) of testis and epididymis were stained by hematoxylin and eosin solutions.

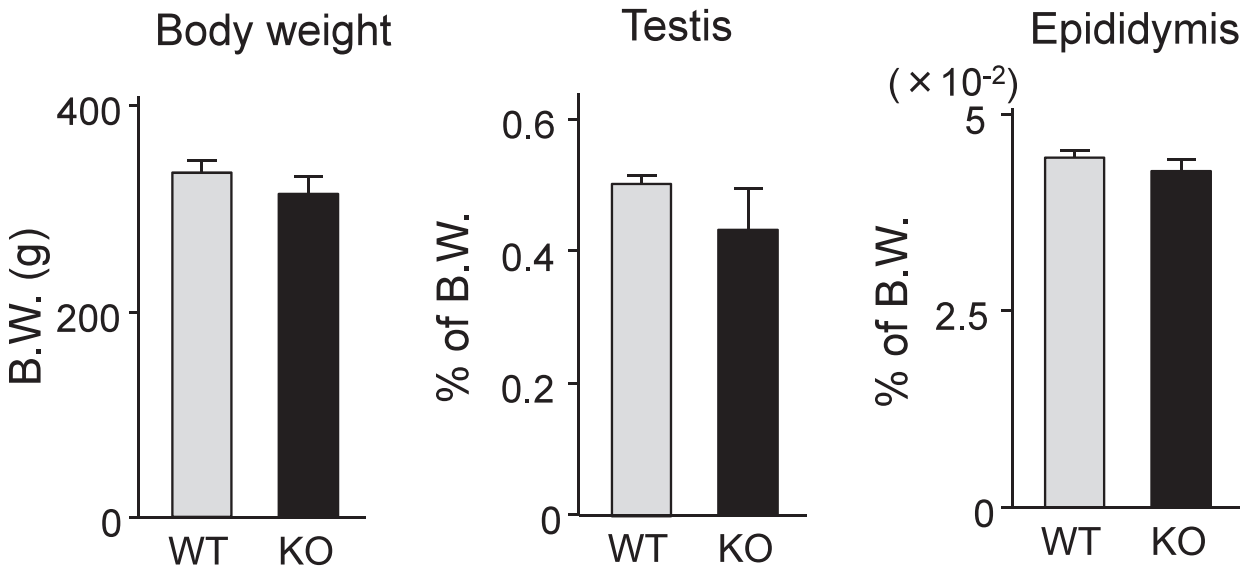


Fig. 7. Effect of AHR ablation on the body weight and the relative weight of testis and epididymis in wild-type (WT) and AHR-KO (KO) male rats at 8 week-old. B.W., body weight. Each bar represents the means ±S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the wild-type: *p<0.05.

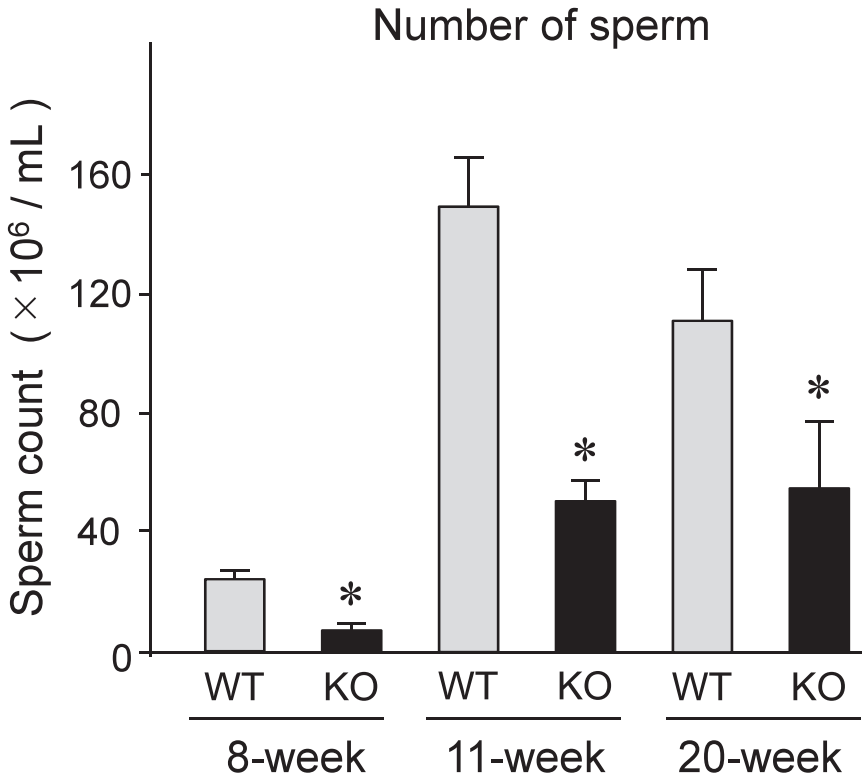


Fig. 8. Effect of AHR ablation on the number of sperms in wild-type (WT) and AHR-KO (KO) male rats at 8, 11 and 20 week-old. Each bar represents the means ± S.E.M. of 5-6 rats. 8 week-old: WT, n=5; KO, n=6. 11 week-old: WT, n=5; KO, n=5. 20 week-old: WT, n=5; KO, n=7. Significantly different from the wild-type: *p<0.05.

分担研究報告書

ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質 1 (SelenBP1)の腎臓における役割：SelenBP1 欠損マウスでの検討

研究分担者　石井　祐次　九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野　准教授
研究協力者　李　任時　九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野　助教
田中　嘉孝　九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野　教授
藤本　景子　九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野　助教

研究要旨

当教室ではこれまでに、ダイオキシンが肝臓のセレン結合性タンパク質 1 (SelenBP1)を誘導することを明らかにしてきた。また、SelenBP1 の遺伝子欠損マウスを作成して、ダイオキシン毒性発現、あるいは毒性軽減への寄与について検討を行って来たが、SelenBP1 と相同性の高いもう一つの分子種 SelenBP2 が発現しているため、その誘導の意義について理解することが難しかった。SelenBP2 の発現は腎臓において低いことが報告されているため、ダイオキシン誘導性 SelenBP1 の腎臓における役割を明らかにすることを目的として、ダイオキシン非投与条件下で、野生型の C57BL マウスと SelenBP1 欠損マウスの腎臓を用いたメタボロミクス解析を行った。その結果、脂質代謝関連因子の変動が確認され、SelenBP1 の脂質代謝への寄与が推定された。次に、DNA マイクロアレイ解析を行った。多数の遺伝子に発現変動が認められたが、その中で、変動が示唆された脂質代謝関連因子に着目し、更に、リアルタイム RT-PCR にて発現変動を解析した。SelenBP1-KO マウスの腎臓では、脂肪酸のωおよびω-1 水酸化に関与することが知られている cytochrome P450 4a (Cyp4a)サブファミリーのうち、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現が有意に低下した。ペルオキシゾームでの分岐脂肪酸の不飽和化を触媒する acyl-CoA oxidase3 (Acox3)の発現も有意に低下した。マイクロアレイでは変動が示唆されていたものの、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor-α (Ppara)および Ppar-γ coactivator-1β (Ppargc-1b)の発現レベルには影響がなかった。しかし、Ppara とヘテロオリゴマーを形成して遺伝子発現を促進させる retinoid-X-receptor-α (Rxra)の発現は低下していた。また、carnitine palmitoyltransferase 1a (Cpt1a)や Cyp2e1 についても検討したが、発現変動は確認されなかった。以上の結果から、1) メタボロミクス解析より、TCDD 誘導性の SelenBP1 は、脂質代謝に関連した機能を有する可能性が示唆された。 2) マイクロアレイ解析の結果もこれを支持し、脂質酸化酵素に発現低下が確認されたこと、これらの遺伝子の発現に関与する Rxra も低下したことから、SelenBP1 が脂質代謝を促進的に調節している可能性が示唆された。

A．研究目的

セレン結合性タンパク質 (SelenBP1)は、肝臓、腎臓、性腺などに多く発現するサイトゾルタンパク質の一つである (1)。SelenBP1 は、生体内においてセレンとの結合能を有し、セレンの生理的役割に関わるものと推定されている。これまでに、抗酸化的作用 (2)、増殖抑制作用 (3)、ゴルジ層板間のタンパク質構成因子 (4) 等の機能が報告されているものの、これらは、

いずれも決定的とは言い難く、その生理的機能は十分に理解されているとは言い難い。

当研究室では、ダイオキシン類の一種、3,3',4,4'5-pentachlorobiphenyl、および多環芳香族炭化水素、3-methylcholanthlene のラットへの曝露により肝臓における SelenBP1 タンパク質および mRNA 発現が顕著に誘導することをすでに報告している (5-7)。ダイオキシン類は、免疫抑制、肝障害、発がんプロモーション作用等、生体に対して非常に多彩な毒性を引き起こすが (8)、その大部分の毒性発現に関与すると考えられているのが芳香族炭化水素受容体 (AhR) である (9)。ダイオキシン類は、細胞内においてサイトゾルに局在している AhR に結合することで核内へと移行し、AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成する。この複合体が様々な遺伝子上流に存在するコンセンサス配列、xenobiotic responsive element (XRE) に結合することで、cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)に代表される遺伝子発現を変動させることが知られている (10)。ダイオキシン類により変動する遺伝子は実に数百種類にものぼるが、どの遺伝子変動がどの毒性発現に重要であるのかなど詳細に関しては未だ十分には明らかになっていない。

当研究室では、これまでにラットにおいて見出されている SelenBP1 遺伝子の誘導に注目し、ダイオキシンによる毒性との関連性を検証することを目指して研究を行って来た。マウスにおいては SelenBP1 とアミノ酸配列で約 97% の相同性を示す SelenBP2 (アセトアミノフェン結合性タンパク質) が存在することが知られているが、これは異なる遺伝子産物であり臓器分布等も多少異なる (11)。SelenBP2 は、アセトアミノフェン代謝物との結合を介して肝障害発現に関わると推定されているが (12)、SelenBP1 同様に肝臓に多く発現していること、および、その相同性の高さから SelenBP1 との機能的な関連性も示唆されている。当研究室では、ダイオキシンによる SelenBP1 の誘導機構を解析するため、ダイオキシン類に対して親和性の異なる AhR を有する二系統のマウス (C57BL/6J マウス：高親和性 AhR、および DBA/2J マウス：低親和性 AhR) を用いて比較検討することにより、SelenBP1 の誘導に対する AhR 依存性が検証されるとともに、SelenBP1 ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型の解析を行った (13)。これらの結果から、SelenBP1 には、卵巣におけるガンへの防御的な役割がある可能性が示された。また、SelenBP1 と SelenBP2 は、ダイオキシンによる誘導性に差があることが分かったが、SelenBP1-KO マウスの肝臓においては、依然として SelenBP2 が発現しており、SelenBP1-KO によるダイオキシン毒性の悪化や軽減作用を見出すことは出来ず、その誘導の意義について理解することが難しかった。

最近、当研究室では、絶食により肝臓及び腎臓において、SelenBP1 発現は影響を受けないが、SelenBP2 発現が著しく低下することを見だした (未発表データ)。SelenBP2 の発現は腎臓において低いことが報告されているため (14)、本研究では、ダイオキシン誘導性 SelenBP1 の腎臓における役割を明らかにすることを目的とした。ダイオキシンにより変動する他の因子を排除して検討するために、ダイオキシン非投与条件下で絶食を行い、野生型の C57BL マウスと SelenBP1 欠損マウスの腎臓を用いたメタボロミクス解析を行った。また、マイクロアレイ解析も行い、脂質代謝関連因子の変動について解析を行った。

B．研究方法

1. 動物実験

SelenBP1-KO マウスは、先行研究にお

いて作製したものを用いた (13)。このマウスにおいては、 SelenBP1 遺伝子の第 2 エクソンをネオマイシン耐性遺伝子カセットと置換することによって KO マウスを作製している。マウスの genotyping は、離乳後のマウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、置換したネオマイシン耐性遺伝子、および SelenBP1 遺伝子を含むプライマーを用いて PCR を行い、アガロース電気泳動によるバンド検出にて行った。解析には、雌雄のホモ KO マウスの交配により得たホモ KO 雄マウスを用いた。また、日本クレアより、野生型 C57BL/6J を 7 週齢にて購入し、KO マウスと同一条件で一週間馴化させたのち、20 時間の絶食後に腎臓を摘出し解析に供した。

2. メタボローム解析

既報 (15) に準じて、採取した組織を MeOH:CH_3CN:H_2O (2:2:1, v/v)で抽出して、下記の構成からなる Waters 社製 UPLC-TOF/MS を用いてメタボローム解析を行った。ACQUITY UPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) -electrospray ionization (ESI) 検出器を装着した Waters LCT Premier™ Mass Spectrometer (Waters Corp., Manchester, UK)(positive モード)を使用し、カラムには ACQUITY UPLC BEH-C18 column (50 mm 4.6 mm i.d., 1.7 mm; Waters Corporation, Milford, MA, USA)を用いた。C57BL/6J 及び SelenBP1-KO それぞれの 8 週齢雄マウス 6 匹で行った。

3. DNA マイクロアレイ解析

マウスの腎臓組織はただちに RNAlater RNA stabilization Reagent (QIAGEN) 浸漬させ、RNeasy Mini Kit (QINGEN) を用いて total RNA を抽出した。抽出後の RNA 溶液は，1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)および 2.5 倍量の 99.5%エタノールを加えて混和し、氷上に 1 時間放置した。4˚C，1500 rpm にて 10 分間遠心分離し、上清を除去した後、70%エタノールを加えて、4˚C、1,500 rpm にて 10 分間遠心分離を行った。得られたペレットを total RNA として滅菌水で溶解し、NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定した。その後、Experion (BioRad Laboratories)による total RNA の電気泳動を行い、28s および 18s リボソーム RNA のバンド強度比ならびに RNA quality indicator (RQI) 値をもとに RNA の品質チュックを行った。なお、判定基準は 28s/18s≥1.5 および RQI≥9.5 とした。

マイクロアレイ解析は、セルイノベータ社にて受託解析を行った。

全てのデータは、Bioconductor ソフトウェアの pre-process Core パッケージを用いて標識化を行った後，Linear Models for Microarray Analysis (limma) による有意差検定を行った。C57BL/6J 及び SelenBP1-KO それぞれの 8 週齢雄マウス 3 匹ずつを用い、有意水準 $p<0.05$ とし、有意な変動を示した遺伝子を抽出してヒートマップを作成した。

4. リアルタイム RT-PCR 法

組織より total RNA を抽出したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (16)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、ターゲット mRNA の threshold cycle (Ct) 値を β-actin mRNA の Ct 値で補正した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認のもとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。動物実験承認番号：A30-103。

遺伝子組換え実験は、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」第 10 条第 2 項の規定に基づき、委員会の承認を得て行った (承認番号: 25-103)。

C. 研究結果

ダイオキシン非投与条件下で、8 週齢の野生型の C57BL マウスと SelenBP1 欠損マウスを 20 時間絶食させ、各群 6 匹ずつの腎臓を用いたメタボロミクス解析を UPLC-TOF/MS を用いて行った。主成分分析を行った結果 (Fig. 1A)、SelenBP1-KO により野生型とは腎臓のメタボロームに明確な違いがあると考えられた。メタボロームの違いは、S-plot によっても見て取れる (Fig. 1B)。そこで、相関係数 0.8 以上、-0.8 以下のものを有意な変動があるものと考えた。これらの中から、脂質代謝に関連する成分を Table 1 に示す。Leukotriene F4、5-hydroxyeicosatetraenoate (5-HETE)、ceramide phosphate や 7-dehydrodesmosterol などの脂質代謝関連因子の変動が確認され、SelenBP1 の脂質代謝への寄与が推定された。次に、DNA マイクロアレイ解析を行った。その時のヒートマップを示す (Fig. 2)。2689 遺伝子の発現変動 (1464 遺伝子に増加、1225 遺伝子に減少)が認められた。多数の遺伝子に発現変動が認められたが、その中で、変動が示唆された脂質代謝関連因子を Table 2 に示す。これらに着目し、更に、リアルタイム RT-PCR にて発現変動を解析した。SelenBP1-KO マウスの腎臓では、脂肪酸のωおよびω-1 水酸化に関与することが知られている cytochrome P450 4a (Cyp4a)サブファミリー (17)のうち、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現が有意に低下した (Fig. 3)。マイクロアレイでは変動が示唆されていたものの、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor-α (Ppara) (18) および Ppar-γ coactivator-1β (Ppargc-1b)(19) の発現レベルには影響がなかった (Fig. 4)。しかし、Ppara とヘテロオリゴマーを形成して遺伝子発現を促進させる retinoid-X-receptor-α (Rxra)(20, 21)の発現は低下していた (Fig. 5)。ペルオキシゾームでの分岐脂肪酸の不飽和化を触媒する acyl-CoA oxidase3 (Acox3)(22)の発現も有意に低下した (Fig. 5)。また、carnitine palmitoyltransferase 1a (Cpt1a)や Cyp2e1 についても検討したが、発現変動は確認されなかった (Fig. 6)。

D. 考察

本研究では、ダイオキシン誘導性 SelenBP1 の本来の役割を明らかにすることを目的とし、まず、腎臓のメタボローム解析を行った。腎臓には、もう一つの分子種 SelenBP2 の発現は低く (14)、当研究室の先行研究で絶食によってその mRNA レベルが著しく低下することが示唆されていることから、ダイオキシンを投与しない条件下で 8 週齢の雄 SelenBP1-KO マウスと対照の C57BL/6J マウスに 20 時間絶食を行ってから比較検討した。ダイオキシン類の毒性の一つとして、脂質代謝異常が知られていることから (23-25)、ダイオキシンにより著しく誘導される SelenBP1 が脂質代謝に関連したタンパク質である可能性は十分考えられる。メタボロミクスの結果は、それを支持し、leukotriene F4、5-HETE、ceramide phosphate や 7-dehydrodesmosterol などの増加を認め、脂質の構成成分であるグリセリンの低下も示唆された (Table 1)。また、増加の示唆された leukotriene F4 や 5-HETE はアラキドン酸代謝物であり、脂肪酸代謝が影響を受け炎症性物質が生成する可能性も示された。

また、DNA マイクロアレイ解析の結果、多くの変動が見られたため (Fig. 2)、メタボロミクスの結果を踏まえて、まず、脂質代謝に関連する因子に着目した (Table 2)。SelenBP1-KO マウスの腎臓では、Cyp4a12a

および Cyp4a12b の発現が低下していた (Fig. 3)。これらの酵素は、アラキドン酸の代謝に関わると、いずれもωおよびω-1 水酸化により、20-HETE および 19-HETE を生成することが知られている(17)。一方、メタボロミクスでも増加が示唆された 5-HETE は、5-lipoxygenase により生成するものである (26)。これは、さらに酸化されて炎症の原因物質にもなり得るため、SelenBP1 に、炎症を抑える働きがある可能性を示しているのかもしれない。メタボロミクスでの結果は定性的なものであるため、5-HETE、19-HETE、20-HETE など、各々の HETE また、アラキドン酸代謝物を定量する必要があろう。また、Ppara および Ppargc-1b の発現レベルには影響がなかった (Fig. 4)が、Rxra の発現は低下していた (Fig. 5)。Rxra は、Ppar だけでなく、Lxr、Pxr、Rar、Car など多くの核内受容体とヘテロオリゴマーを形成し、転写調節に関与している (20, 21)。本研究では、脂質代謝への影響を中心に検討したが、SelenBP1 が Rxra の発現レベルにも影響するのであれば、これら Ppar 以外の受容体が関わる遺伝子発現の調節にも変動を及ぼす可能性があり、これらについても今後検討する必要があろう。ペルオキシゾームの酵素でメチル分岐を持つ pristanoyl-CoA の不飽和化を触媒する Acox3 (22)の発現も有意に低下した (Fig. 5)。分岐脂肪酸は、Val、Leu、Ile のような分岐アミノ酸に由来すると考えられる (27)。ペルオキシソームのβ酸化に関連する酵素は、Ppara の制御下にあるものが多いため、この結果は Rxra の発現低下と符合する。本研究のマイクロアレイでの解析結果から抽出したものには、有意な変動を示さないものも多かった。本研究では有意水準を $P<0.05$ としたが、変動自体は大きいものばかりではなかった。そのため、リアルタイム RT-PCR により検証することが重要と考えられた。

本研究では、ダイオキシン誘導性の SelenBP1 の元々の役割を明らかにするために、ダイオキシンを処理しない条件下、また、相同性の高い分子種 SelenBP2 の影響がほとんどない条件下で検討を行った。メタボロミクスとマイクロアレイの結果から、SelenBP1 は、その欠損が致命的な影響を及ぼすことはないものの、少なくとも脂質代謝に関係する可能性が示唆された。欠損により脂肪酸の代謝抑制による代謝スイッチングを生じて炎症性の代謝物を増加させる可能性も示唆された。SelenBP1 と脂質代謝の接点は、本研究を基に考えると、Rxra 発現への影響によるものと推定される。最近の他グループが作製した SelenBP1-KO マウスを用いた研究により、前立腺がんに対して SelenBP1 が抑制的に働くことが示唆されている (28)。また、グルコース代謝に影響することも示唆され (29)、HeLa 細胞では、SelenBP1 欠損により酸化的ストレスが亢進することも報告されている (30)。本研究の成果とこれらの情報を総合すると、SelenBP1 のダイオキシンによる誘導は、その毒性発現に寄与するとは考えにくく、この点は、当研究室の先行研究の結果 (13)を支持する。今後、SelenBP1 欠損がどのような機構で Rxra 発現を低下させたのかを明らかにすべく、本研究の条件下での酸化的ストレスの変動状況についても検討を行うことが必要であろう。

E. 結論

以上の結果から、1) メタボロミクス解析より、TCDD 誘導性の SelenBP1 は、脂質代謝に関連した機能を有する可能性が示唆された。2) マイクロアレイ解析の結果もこれを支持し、脂質酸化酵素 Cyp4a12a、Cyp4a12b および Acox3 に発現低下が確認されたこと、これらの遺伝子の発現に関与する Rxra も低下したことから、SelenBP1 が脂肪酸酸化を促進的に調節している可

能性が示唆された。

F. 研究発表

なし

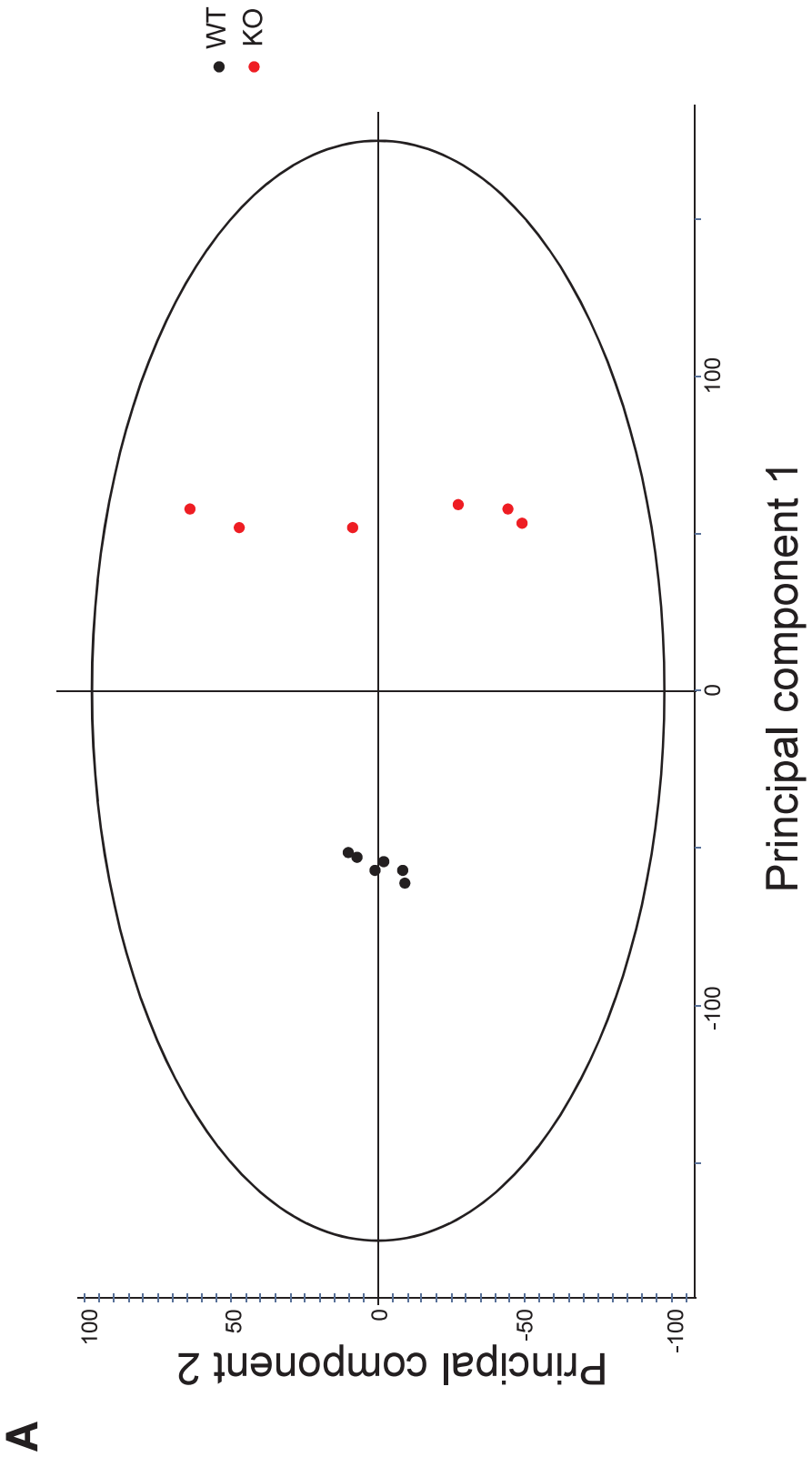
G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

1) Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG, Medina D. *Carcinogenesis*, **10**: 541-546 (1989).
2) Jamba L, Nehru B, Bansal MP. *Mol Cell Biochem*, **177**: 169-175 (1997).
3) Pohl NM, Tong C, Fang W, Bi X, Li T, Yang W. *PLoS One*, **4**: e7774 (2009).
4) Porat A, Sagiv Y, Elazar Z. *J Biol Chem*, **275**: 14457-14465 (2000).
5) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Chemosphere*, **32**: 509-515 (1996).
6) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Toxicol Lett*, **87**: 1-9 (1996).
7) Ishida T, Ishii Y, Tasaki K, Ariyoshi N, Oguri K. *Fukuoka Acta Medica*, **88**: 135-143 (1997).
8) Poland A, Knutson JC. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **26**: 371-399 (1982).
9) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
10) Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. *Biochim Biophys Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
11) Bartolone JB, Sparks K, Cohen SD, Khairallah EA, *Biochem Pharmacol*, **36**: 1193-1196 (1987).
12) Pumford NR, Martin BM, Hinson JA, *Biochem Biophys Res Commun*, **182**: 1348–1355 (1992).
13) Tsujimoto S, Ishida T, Takeda T, Ishii Y, Onomura Y, Tsukimori K, Takechi S, Yamaguchi T, Uchi H, Suzuki SO, Yamamoto M, Himeno M, Furue M, Yamada H. *Biochim Biophys Acta*, **1830**: 3616-3624 (2013).
14) Lanfear J, Fleming J, Walker M, Harrison P. *Carcinogenesis,* **14:** 335-340 (1993).
15) Ivanisevic J, Zhu ZJ, Plate L, Tautenhahn R, Chen S, O'Brien PJ, Johnson CH, Marletta MA, Patti GJ, Siuzdak G. *Anal Chem,* **85**: 6876–6884 (2013).
16) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H, Yamada H. *J Toxicol Sci*, **35**: 365-373 (2010).
17) Muller DN, Schmidt C, Barbosa-Sicard E, Wellner M, Gross V, Hercule H, Markovic M, Honeck H, Luft FC, Schunck WH. *Biochem J,* **403**:109-118 (2007).
18) Abbott BD. *Reprod Toxicol*, **27**: 246-257 (2009).
19) Piccinin E, Peres C, Bellafante E, Ducheix S, Pinto C, Villani G, Moschetta A. *Hepatology*, **67**: 884-898 (2018).
20) Chambon P. *FASEB J*, **10**: 940-954 (1996).
21) Leid M, Kastner P, Chambon P. *Trends Biochem Sci*, **17**: 427-433 (1992).
22) Westin MA, Hunt MC, Alexson SE. *J Biol Chem*, **282**: 26707-26716 (2007).
23) Hatsumura M, Ishida T, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H. *Fukuoka Acta Medica*, **86:** 135-143 (1995).
24) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K. *Chem Res Toxicol*, **12**: 1158-1165 (1999).
25) Takeda T, Komiya Y, Koga T, Ishida T, Ishii Y, Kikuta Y, Nakaya M, Kurose H, Yokomizo T, Shimizu T, Uchi H, Furue M, Yamada H. *J Biol Chem,* **292**: 10586-10599 (2017).
26) Powell WS, Rokach J. *Biochim Biophys Acta*, **1851**: 340-355 (2015).
27) 植田伸夫. *油化学*, 20: 663-669 (1971)
28) Ansong E, Ying Q, Ekoue DN, Deaton R,

Hall AR, Kajdacsy-Balla A, Yang W, Gann PH, Diamond AM. *PLoS One*, **10**: e0127295 (2015).
29) Ying Q, Ansong E, Diamond AM, Lu Z, Yang W, Bie X. *PLoS One*, **10**: e0126285 (2015).
30) Zhao C, Zeng H, Wu RT, Cheng WH. PLoS One, **11**: e0158650 (2016).


A
WT
KO
Principal component 2
100
50
0
-50
-100
Principal component 1
100
0
-100

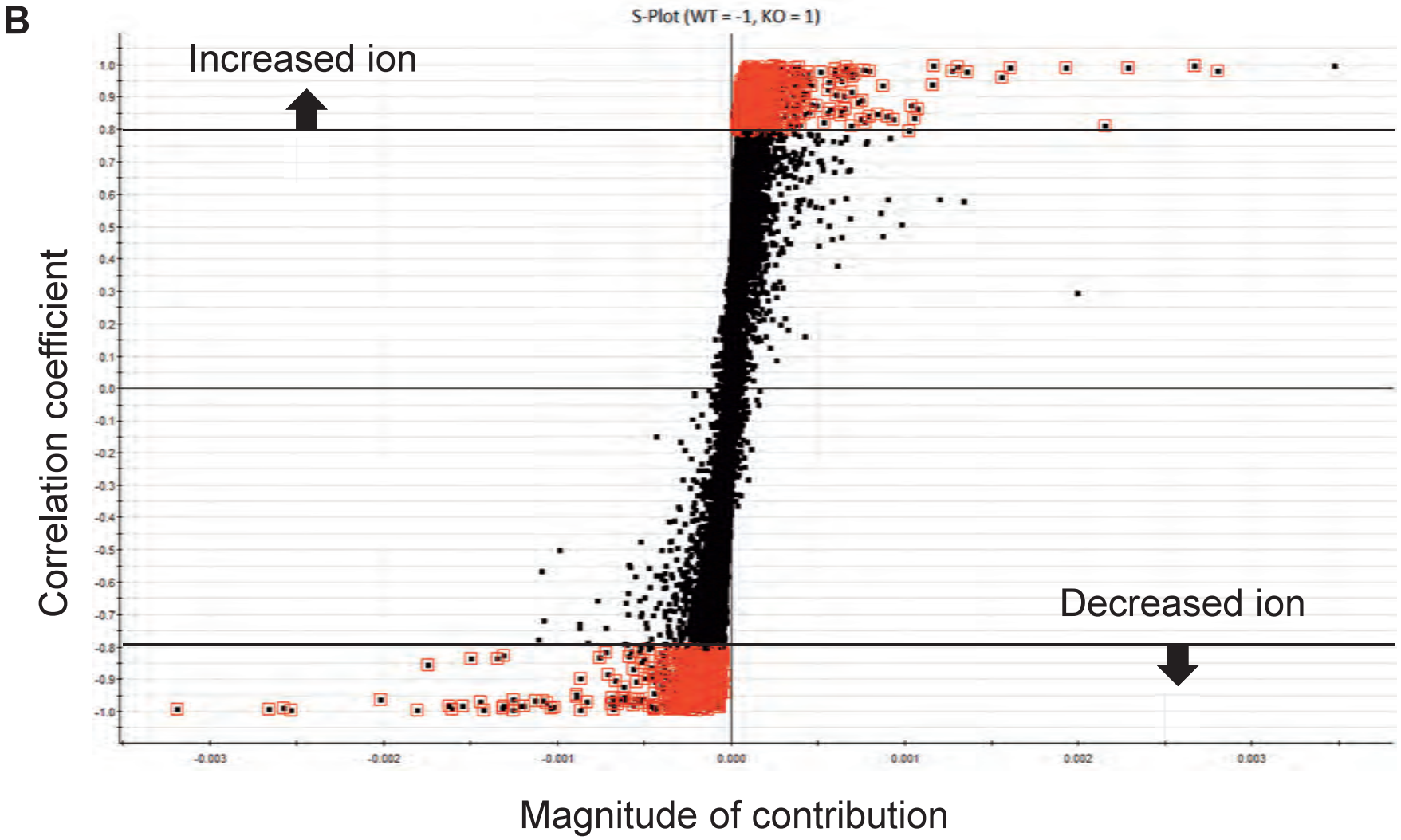


Fig. 1. Principal component analysis (PCA) regarding the effect of SelenBP1 deletion on the kidney metabolome: the data from positive ion mode analysis. A, SelenBP1 deletion effect on the profile of kidney metabolome. Each dot is a different animal (N = 6 mice/group). Wild-type and SelenBP1-KO are shown in black and red, respectively. B, Fragment ions in LC-TOF-MS analysis that exhibit an alteration by SelenBP1 deletion in the kidney of male mice (8-week old). Each dot shows a single ion with a particular mass (m/z). The criteria for selecting ions which were significantly changed by SelenBP1 deletion was set either at more than 0.8 or less than -0.8 of the correlation coefficient (Red dots).

平成30年度厚生労働行政推進調査事業費補助金

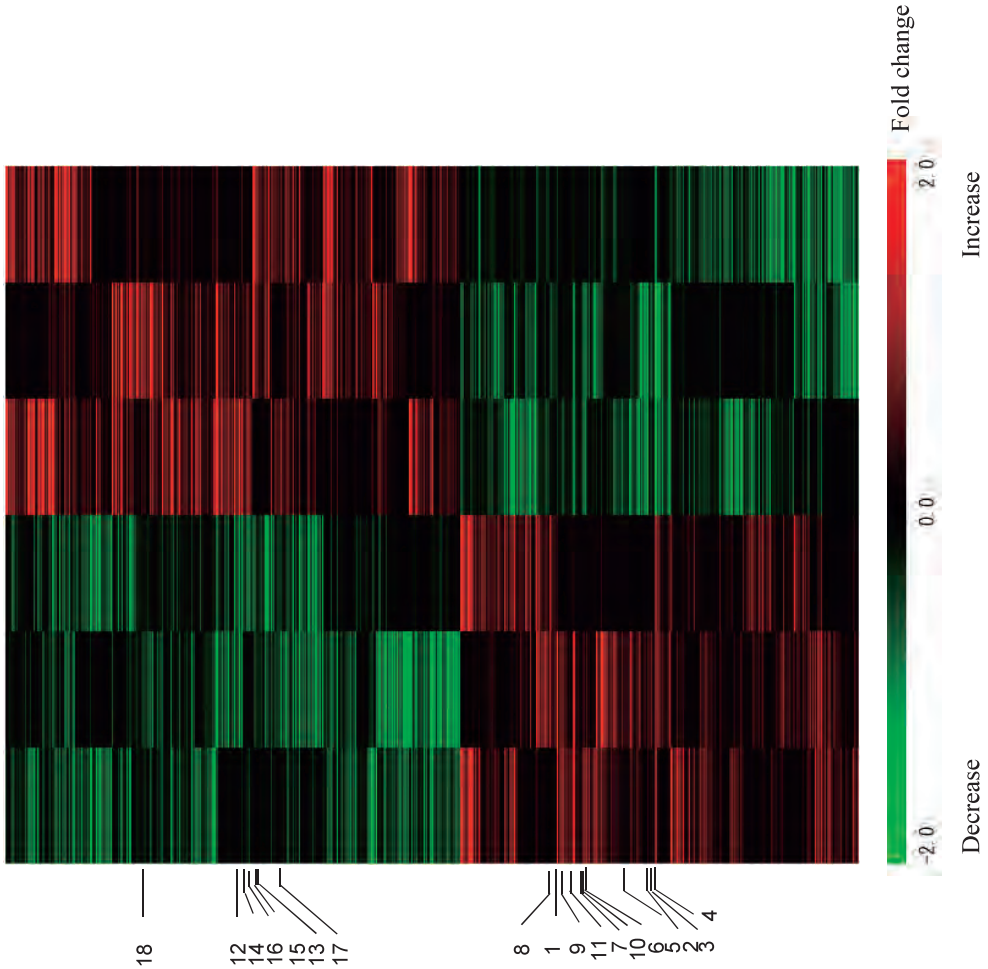


Fig. 2 A heatmap of renal mRNAs which were significantly altered in male adult mice (8 weeks) by SelenBP1 deletion.
Genes the expression of which was significantly increased and decreased by SelenBP1 deletion are shown by red and green, respectively. For the magnitude of the alteration, see color gradation shown beneath the figure. Each lane is the mRNA prepared from male mice at 8 weeks. 18 genes indicated by arrows and numbers correspond to Table 2.

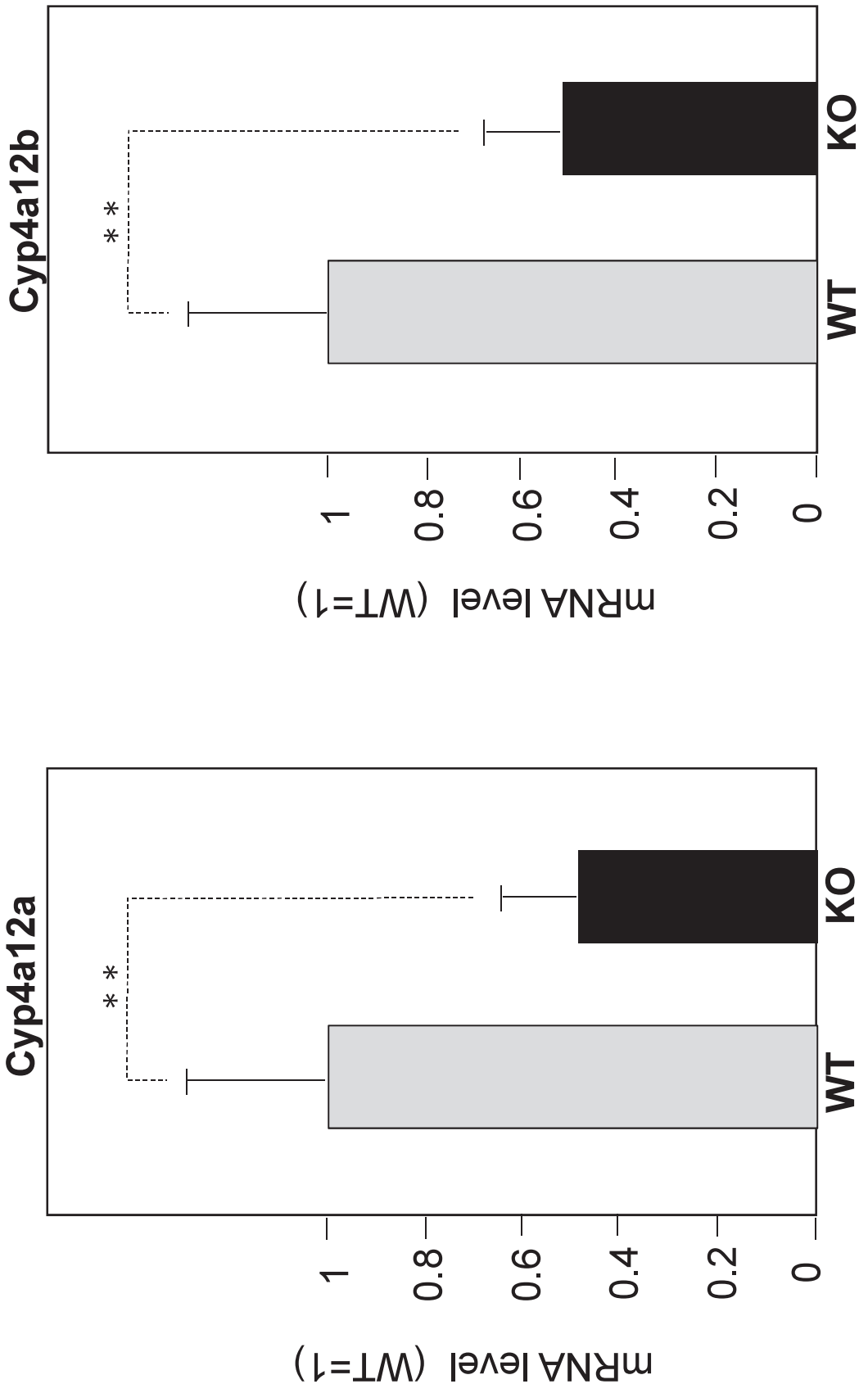


Fig. 3. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Cyp4a12a and Cyp4a12b mRNA in 8-week old male mice. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. $^{**}p<0.01$. β-actin was used as an internal control.

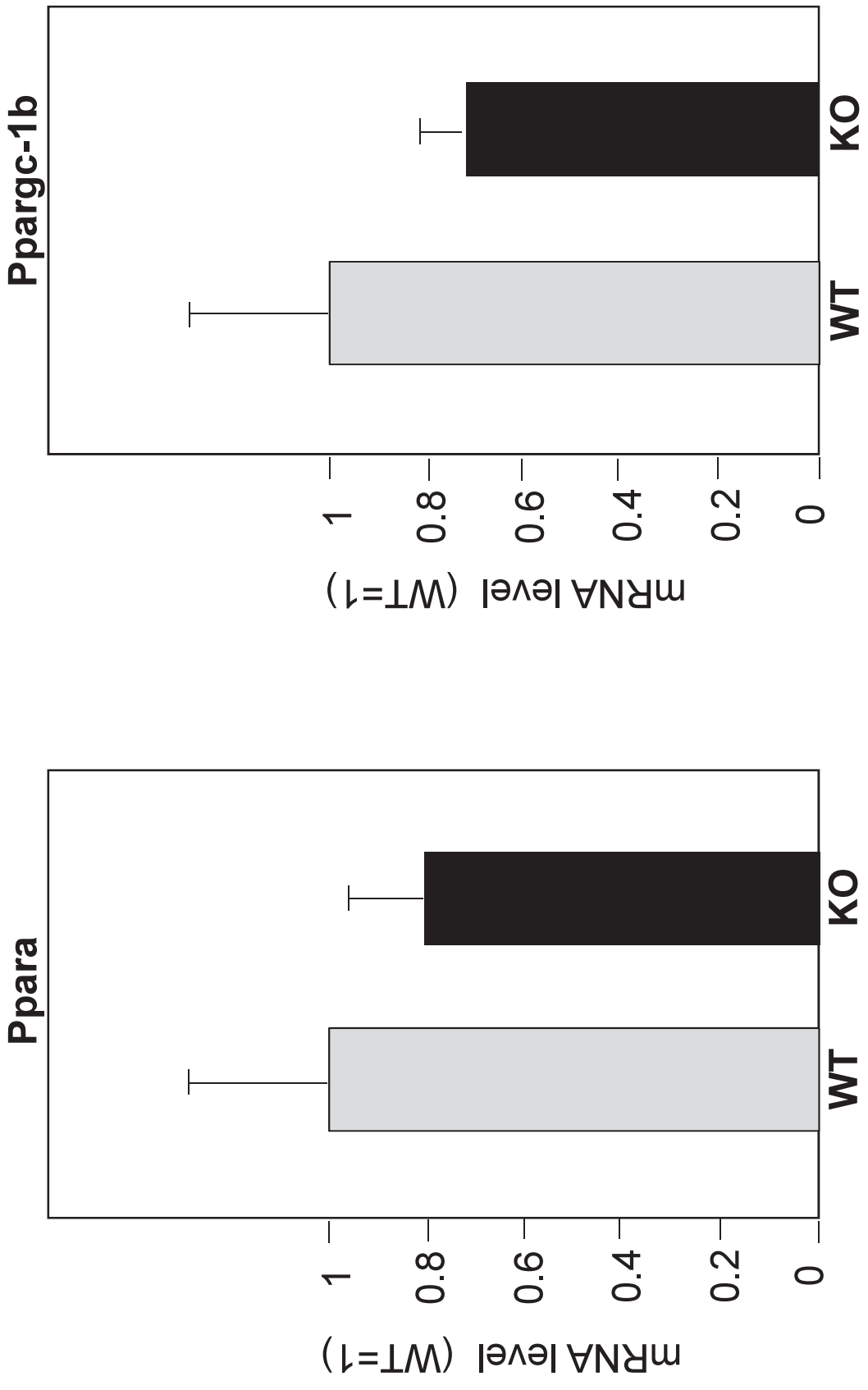


Fig. 4. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Ppara and Ppargc-1b mRNA in 8-week old male mice. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. β-actin was used as an internal control.

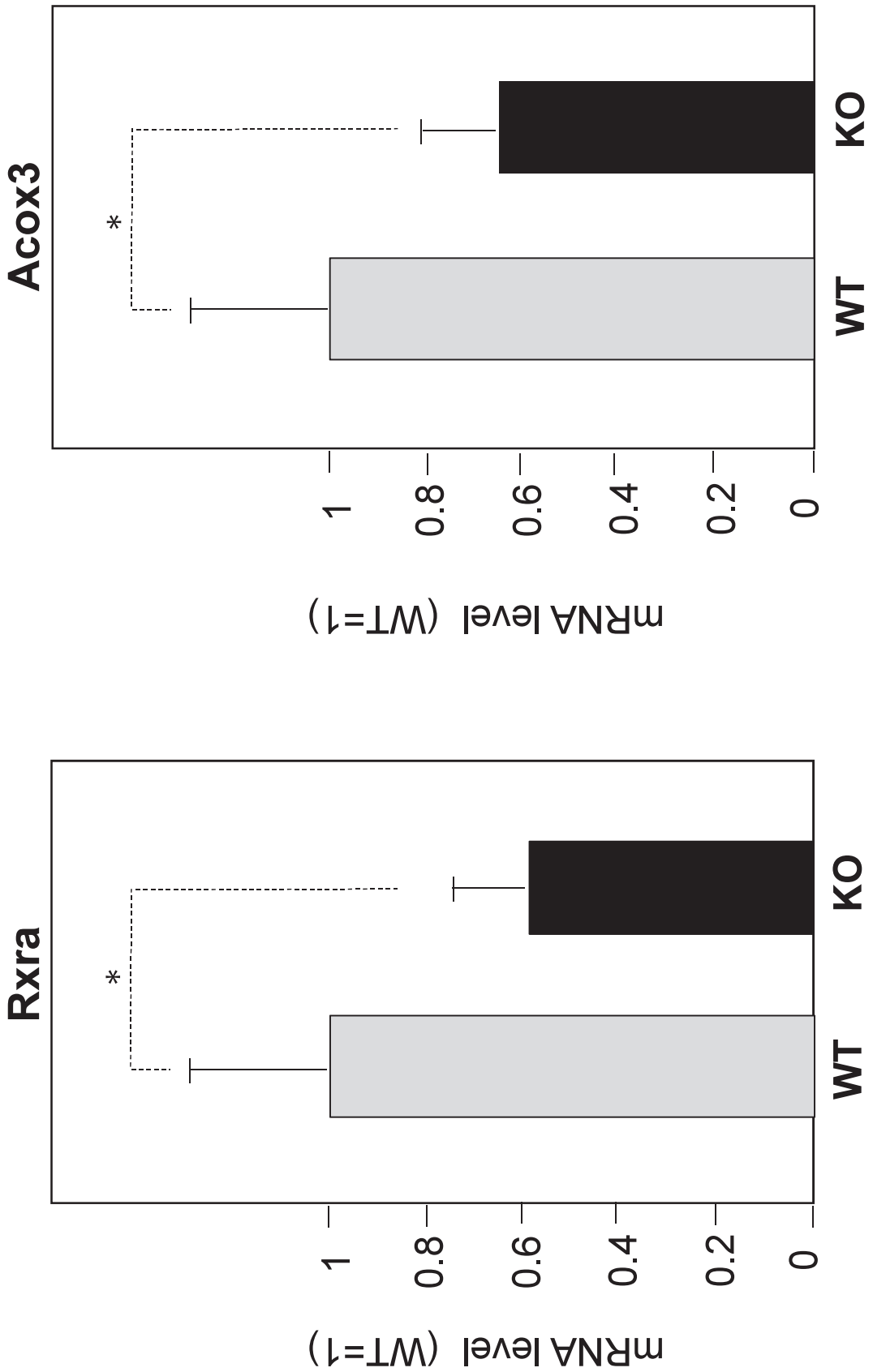


Fig. 5. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Rxra and Acox3 mRNA in 8-week old male mice. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. *p<0.05. β-actin was used as an internal control.

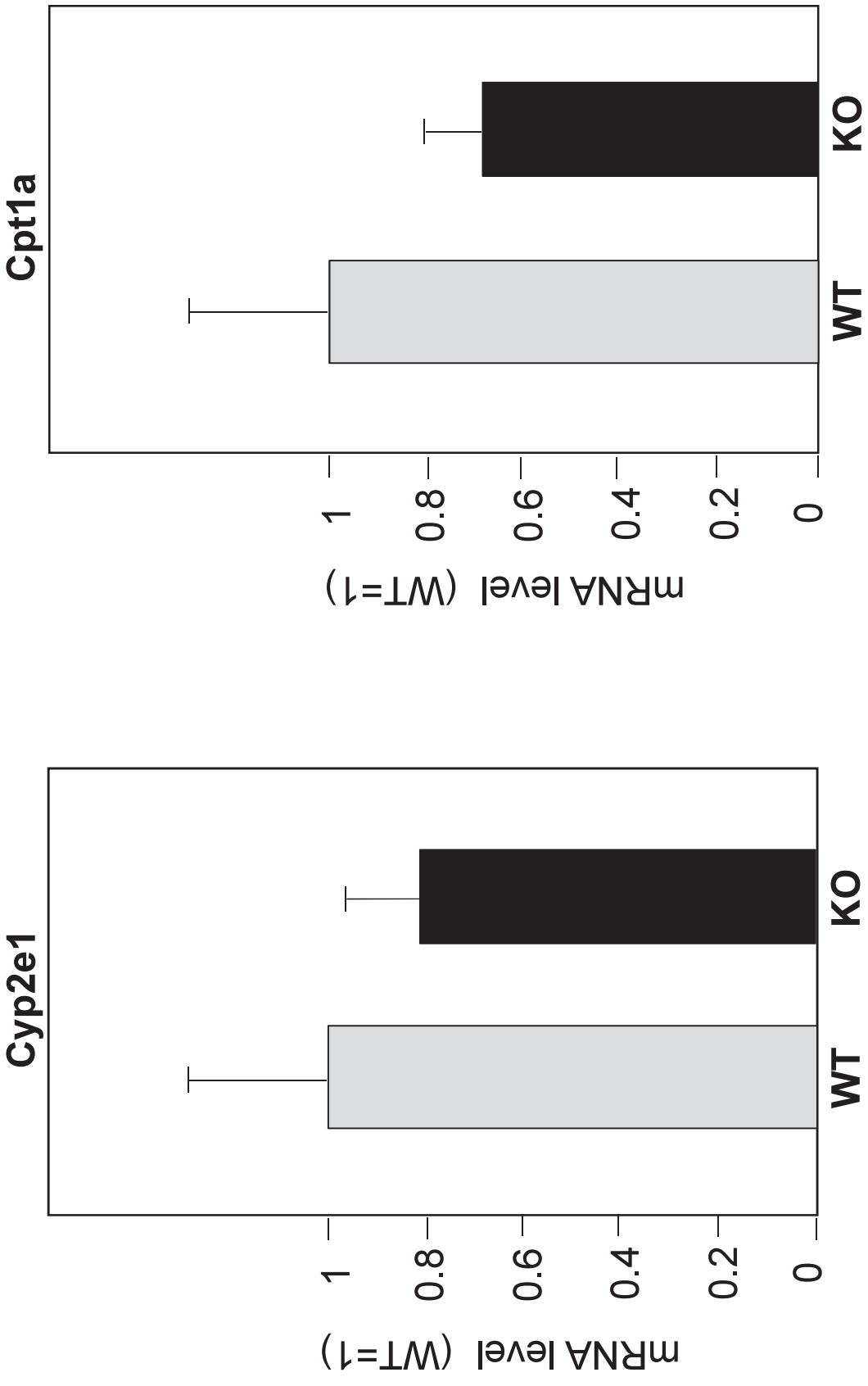


Fig. 6. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Cyp2e1 and Cpt1a mRNA in 8-week old male mice. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. β-actin was used as an internal control.

Table 1. Suggested components related to lipid metabolism the levels of which were altered in the kidney of male SelenBP1-KO mice by metabolomics analysis.

	Representative components altered in mice	
sample	increased	decreased
SelenBP1(-) vs Control	dihydrolipoic acid	glycerol
	leukotriene F4	
	24,25-dihydrolanosterol	
	7-dehydrodesmosterol	
	stearic acid	
	5-hydroxyeicosatetraenoate (5-HETE)	
	14-demethyllanosterol	
	6-phosphogluconate	

Table 2. Suggested genes related to lipid/glucose metabolism significantly altered with ablation of SelenBP1 by DNA microarray analysis

	Name	Gene ID	Compare ratio	p-value
1	Rxra (retinoid X receptor alpha)	20181	0.8725	0.0261
2	Acox3 (acyl-Coenzyme A oxidase 3)	80911	0.68757	0.0017164
3	Cyp4a12a (cytochrome P450, family 4)	277753	0.68427	0.0041714
4	Cyp4a12b (cytochrome P450, family 4)	13118	0.672077	0.0028868
5	Ppara (peroxisome proliferator activated receptor alpha)	19013	0.7916100	0.0297249
6	Ppargc1b (peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta)	170826	0.8364149	0.0484654
7	Cpt1a (carnitine palmitoyltransferase 1a)	12894	0.8344791	0.0194162
8	Cyp2e1 (cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1)	13106	0.882645	0.0488087
9	Gaa (ghicosidase alpha acid)	14387	0.870268	0.0426002
10	Aldh1 (aldehyde dehydrogenase family memberL1)	11668	0.830848	0.0110502
11	Ugdh (UDP-glucose dehydrogenase)	22235	0.867748	0.0207933
12	Col1a1 (collagen, type I, alpha 1)	12842	1.414523	0.0218683
13	Smad7 (SMAD family member 7)	17131	1.22185	0.0440784
14	Tgfbi (transforming growth factor, beta induced)	21803	1.35631	0.0209684
15	Lpcat2 (lysophosphosphatidylcholine acyltransferase2)	270084	1.23989	0.0422784
16	Dkk2 (dickkopf homolog2)	56811	1.33725	0.0048169
17	Bpifa1 (BPI fold containing family A member1)	18843	1.18980	0.0452636
18	Fabp6 (fatty acid binding protein 6)	16204	2.235640	0.0420044

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍：著者氏名，論文タイトル名，書籍全体の編集者名，書籍名，出版社名，出版地，出版年，ページ
なし

雑誌：発表者氏名，論文タイトル名，発表誌名，巻号，ページ，出版年，
太田千穂，山本健太，德富美沙紀，加藤善久，古賀信幸, 3,7,3’,4’-Tetramethoxy-flavone (FTM)のラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝．中村学園研究紀要, **50**, in press. 山本健太，太田千穂，德富美沙紀，古賀信幸，「柑橘果皮成分 3,5,7,8,3’,4’-Hexa-methoxyflavoneのラット肝ミクロゾームによる代謝．中村学園研究紀要, **50**, in press. Sakatani, K., Takahashi, K., Takenaka, S., Kajiwara, J., Katsuki, S., Mitoma, C., Furu,e M. Ionic liquid extraction for the determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in soil and sediment. Organohalogen Compounds. 2018. 80. In press. Hatabe Y, Shibata M, Ohara T, Oishi E, Yoshida D, Honda T, Hata J, Kanba S, Kitazono T, Ninomiya T. Decline in handgrip strength from midlife to late-life is associated with dementia in a Japanese community: the Hisayama Study. ***J Epidemiol***. 2018 (in press) Ohara T, Hata J, Tanaka M, Honda T, Yamakage H, Yoshida D, Inoue T, Hirakawa Y, Kusakabe T, Shibata M, Teraoka T, Kitazono T, Kanba S, Satoh-Asahara N, Ninomiya T. Serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2 as a biomarker for incident dementia: the Hisayama Study. ***Ann Neurol***. 2018 (in press) Mukai N, Hata J, Hirakawa Y, Ohara T, Yoshida D, Nakamura U, Kitazono T, Ninomiya T. Trends in the prevalence of type 2 diabetes and prediabetes in a Japanese community, 1988-2012: the Hisayama Study. ***Diabetol Int*** 2018 (in press) Honda T, Kishimoto H, Mukai N, Hata J, Yoshida D, Hirakawa Y, Shibata M, Ohara T, Kumagai S, Ninomiya T. Objectively measured sedentary time and diabetes mellitus in a general Japanese population: the Hisayama Study. ***J Diabetes Investig*** (in press) Akahane M, Matsumoto S, Kanagawa Y, Mitoma C, Uchi H, Yoshimura T, Furue M, Imamura T. Long-Term Health Effects of PCBs and Related Compounds: A Comparative Analysis of Patients Suffering from Yusho and the General Population. Arch Environ Contam Toxicol. 2018 Feb;74(2):203-217. Furue M, Uchi H, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Tanaka Y, Ito T, Tsuji G. Implications of tryptophan photoproduct FICZ in oxidative stress and terminal differentiation of keratinocytes. G Ital Dermatol Venereol. 2018 Jul 20. doi: 10.23736/S0392-0488.18.06132-1. [Epub ahead of print] Furue M, Fuyuno Y, Mitoma C, Uchi H, Tsuji G. Therapeutic Agents with AHR Inhibiting and NRF2 Activating Activity for Managing Chloracne. Antioxidants (Basel). 2018 Jul 13;7(7). pii: E90.

Furue M, Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G. Antioxidative Phytochemicals Accelerate Epidermal Terminal Differentiation via the AHR-OVOL1 Pathway: Implications for Atopic Dermatitis. Acta Derm Venereol. 2018 Nov 5;98(10):918-923.

Fuyuno Y, Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, Tanaka Y, Mitoma C, Furue M. Perillaldehyde Inhibits AHR Signaling and Activates NRF2 Antioxidant Pathway in Human Keratinocytes. Oxid Med Cell Longev. 2018 Feb 14;2018:9524657.

Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G, Murai M, Yan X, Furue M. Upregulation of FLG, LOR, and IVL Expression by Rhodiola crenulata Root Extract via Aryl Hydrocarbon Receptor: Differential Involvement of OVOL1. Int J Mol Sci. 2018 Jun 4;19(6). pii: E1654.

Hirakawa S, Miyawaki T, Hori T, Kajiwara J, Katsuki S, Hirano M, Yoshinouchi Y, Iwata H, Mitoma C, Furue M. Accumulation properties of polychlorinated biphenyl congeners in Yusho patients and prediction of their cytochrome P450-dependent metabolism by in silico analysis. Environ Sci Pollut Res Int. 2018 Jun;25(17):16455-16463.

Kiyomatsu-Oda M, Uchi H, Morino-Koga S, Furue M. Protective role of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), an endogenous ligand for arylhydrocarbon receptor, in chronic mite-induced dermatitis. J Dermatol Sci. 2018 Jun;90(3):284-294.

Kondo H, Tanio K, Nagaura Y, Nagayoshi M, Mitoma C, Furue M, Maeda T. Sleep disorders among Yusho patients highly intoxicated with dioxin-related compounds: A 140-case series. Environ Res. 2018 Oct;166:261-268.

Mitamura Y, Murai M, Mitoma C, Furue M. NRF2 Activation Inhibits Both TGF-β1- and IL-13-Mediated Periostin Expression in Fibroblasts: Benefit of Cinnamaldehyde for Antifibrotic Treatment. Oxid Med Cell Longev. 2018 Aug 7;2018:2475047.

Mitoma C, Uchi H, Tsukimori K, Todaka T, Kajiwara J, Shimose T, Akahane M, Imamura T, Furue M. Current state of yusho and prospects for therapeutic strategies. Environ Sci Pollut Res Int. 2018 Jun;25(17):16472-16480.

Miyawaki T, Sugihara M, Hirakawa S, Hori T, Kajiwara J, Katsuki S, Mitoma C, Furue M. Compound-specific isotopic and congener-specific analyses of polychlorinated biphenyl in the heat medium and rice oil of the Yusho incident. Environ Sci Pollut Res Int. 2018 Jun;25(17):16464-16471.

Murai M, Yamamura K, Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G, Furue M, Mitoma C. Tryptophan photo-product FICZ upregulates AHR/MEK/ERK-mediated MMP1 expression: Implications in anti-fibrotic phototherapy. J Dermatol Sci. 2018 Jul;91(1):97-103.

Murai M, Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Kawakami Y, Furue M, Mitoma C. An endogenous tryptophan photo-product, FICZ, is potentially involved in photo-aging by reducing TGF-β-regulated collagen homeostasis. J Dermatol Sci. 2018 Jan;89(1):19-26.

Takemura M, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Furue M, Tsuji G. Glyteer, Soybean Tar, Impairs IL-4/Stat6 Signaling in Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells: The Basis of Its Therapeutic Effect on Atopic Dermatitis. Int J Mol Sci. 2018 Apr 12;19(4). pii: E1169.

Yukiko Hattori*, Tomoki Takeda*, Arisa Nakamura, Kyoko Nishida, Yuko Shioji, Haruki Fukumitsu, Hideyuki Yamada, Yuji Ishii, The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. *Equally contributed to this work. Biochemical Pharmacology, 154: 213-221 (2018).

Honda T, Yoshida D, Hata J, Hirakawa Y, Ishida Y, Shibata M, Sakata S, Kitazono T, Ninomiya T. Development and validation of modified risk prediction models for cardiovascular disease and its subtypes: the Hisayama Study. ***Atherosclerosis.*** 2018;279:38-44.

Tanaka M, Honda T, Yamakage H, Hata J, Yoshida D, Hirakawa Y, Shibata M, Inoue T, Kusakabe T, Satoh-Asahara N, Ninomiya T. A potential novel pathological implication of serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cell 2 in insulin resistance in a general Japanese population: the Hisayama study. ***Diabetes Res Clin Pract***. 2018;146:225-232.

Yubi T, Hata J, Ohara T, Mukai N, Hirakawa Y, Yoshida D, Gotoh S, Hirabayashi N, Furuta Y, Ago T, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Prevalence of and risk factors for cerebral microbleeds in a general Japanese elderly community. ***Neurol Clin Pract***. 2018;8:223-231.

Fujiwara K, Yasuda M, Hata J, Oshima Y, Hashimoto S, Yoshitomi T, Kiyohara Y, Ishibashi T, Ninomiya T, Sonoda KH. Prevalence and risk Factors for polypoidal choroidal vasculopathy in a general Japanese population: the Hisayama Study. ***Semin Ophthalmol***. 2018;33:813-819.

Ohara T, Honda T, Hata J, Yoshida D, Mukai N, Hirakawa Y, Shibata M, Kishimoto H, Kitazono T, Kanba S, Ninomiya T. Association between daily sleep duration and risk of dementia and mortality in a Japanese community. ***J Am Geriatr Soc***. 2018;66:1911-1918.

Shibata M, Ohara T, Yoshida D, Hata J, Mukai N, Kawano H, Kanba S, Kitazono T, Ninomiya T. Association between the ratio of serum arachidonic acid to eicosapentaenoic acid and the presence of depressive symptoms in a general Japanese population: the Hisayama Study. ***J Affect Disord***. 2018;237:73-79.

Furuta Y, Hata J, Mukai N, Hirakawa Y, Ago T, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Secular trends in the incidence, risk factors, and prognosis of transient ischemic attack in Japan: the Hisayama Study. ***Atherosclerosis***. 2018;273:84-90.

Takae K, Hata J, Ohara T, Yoshida D, Shibata M, Mukai N, Hirakawa Y, Kishimoto H, Tsuruya K, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Albuminuria increases the risks for both Alzheimer disease and vascular dementia in community-dwelling Japanese elderly: the Hisayama Study. ***J Am Heart Assoc***. 2018;7:pii: e006693.

Iida M, Ikeda F, Hata J, Hirakawa Y, Ohara T, Mukai N, Yoshida D, Yonemoto K, Esaki M, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Development and validation of a risk assessment tool for gastric cancer in a general Japanese population. ***Gastric Cancer.*** 2018;21:383-390.

Tsuji G, Ito T, Chiba T, Mitoma C, Nakahara T, Uchi H, Furue M. The role of the OVOL1-OVOL2 axis in normal and diseased human skin. J Dermatol Sci. 2018 Jun;90(3):227-231.