令和元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

令和元年度　　総括・分担研究報告書

研究代表者　古江 増隆

令和 2（2020）年 3 月

令和元年度　　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

令和元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　（国立保健医療科学院 医療・福祉サービス研究部　部長）

石井　祐次　（九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野　准教授）

上松　聖典　（長崎大学病院眼科　講師）

小野塚大介　（国立循環器病センター 疫学研究推進室　室長）

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）

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）

月森　清巳　（福岡市立こども病院　副院長　周産期センター長）

辻　学　（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）

辻　博　（北九州若杉病院 西日本総合医学研究所　所長）

津嶋　秀俊　（九州大学病院整形外科　助教）

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　（九州大学病態機能内科　併任講師）

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）

濵田　直樹　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教）

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）

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　准教授）
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　（公益財団法人北九州生活科学センター　参事）
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）
川上　義仁　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　テクニカルスタッフ）
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）
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　研究員）
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　企画情報管理課　課長）
田中　義人　（福岡県保健環境研究所　保健科学部長）
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）
飛石　和大　（福岡県保健環境研究所　生活化学科　専門研究員）
中村　優子　（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）
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）
福士　純一　（九州医療センター　整形外科リウマチ科　科長）
広瀬　勇気　（公益財団法人北九州生活科学センター　検査員）
堀　就英　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　生活化学課　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）
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）

（五十音順）

目　　次

I. 令和元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. 令和元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……11
研究分担者　香月　進
研究協力者　高尾　佳子，高橋　浩司，田中　義人

02. 油症検診受診者の血液中 PCDF 等(ダイオキシン類)濃度実態調査……19
研究分担者　香月　進
研究協力者　堀　就英，平川　博仙，飛石　和大，新谷　依子，佐藤　環，
宮脇　崇，平川　周作，酒谷　圭一，片宗　千春，戸髙　尊，
広瀬　勇気

03. 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……29
研究分担者　二宮　利治
研究協力者　吉田　大悟

04. 油症患者の血液中ダイオキシン類分析におけるナローボアカラムの検討……33
研究分担者　戸高　尊
研究協力者　広瀬　勇気，上原口　奈美，梶原　淳睦，千々和　勝己，池田　光政

05. 2,4,6-三塩素置換 PCB 異性体 PCB155 のヒト肝チトクロム P450 分子種による代謝…39
研究分担者　古賀　信幸
研究協力者　太田　千穂

06. 母親の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と子供の症状の関係に関する研究……45
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

07. 油症認定患者追跡調査……52
研究分担者　小野塚　大輔

08. 油症患者における歯肉色素沈着と残存歯に関する検討……54
研究分担者　川崎　五郎
研究協力者　吉冨　泉

09. 油症曝露による継世代健康影響に関する研究
- 油症 2 世の口腔内色素沈着に影響する因子の検討 -……56
研究分担者　月森　清巳
研究協力者　加藤　聖子，諸隈　誠一

10. 油症における末梢血 CD4 陽性 T 細胞亜集団に関する検討……61
研究分担者　辻　博

11. オートファジーによる酸化ストレスの制御機構……67
研究分担者　辻　学

12. 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……74
研究分担者　園田　康平

13. 油症検診受診者における落屑症候群……76
研究分担者　上松　聖典
研究協力者　北岡　隆

14. カネミ油症患者における中枢神経障害に関する文献的研究……78
研究代表者　山下　謙一郎

15. 油症患者におけるダイオキシン類の運動器機能への影響……80
研究分担者　津嶋　秀俊
研究協力者　福士　純一

16. 長崎県油症認定患者における皮膚感覚異常の検討……84
研究分担者　室田　浩之
研究協力者　神尾　芳幸

17. Myelin proteins を用いたベンゾピレン投与ラットでの生薬の効果検討…… 89
研究分担者　申　敏哲
研究協力者　吉村　惠

18. ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルにおけるSP-Dの役割……94
研究分担者　濱田　直樹
研究協力者　鈴木　邦裕, 柳原　豊史

19. ドラッグデリバリーシステムと腸粘膜内アミノアセチル酸濃度の研究……102
研究分担者　鳥巣　剛弘

20. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析：
脳の性分化と生殖腺の発達に対する芳香族炭化水素受容体の寄与……107
研究分担者　石井　祐次

21. 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:
脂質代謝との関連性の検討……125
研究分担者　石井　祐次

III.　研究成果の刊行に関する一覧表……144

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、分析を行っている。

【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。厚生労働省・各自治体と連係関係を構築し、死因調査を開始した。その結果、追跡対象者1,664名のうち、2017年12月31日時点で生存の確認ができた患者が922名、死亡の確認ができた患者が640名、生死不明の者が102名であった。

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。今年度のダイオキシン類の測定法に関する研究は、油症患者の血液中ダイオキシン類分析においてナローボアカラムが使用出来ないかを検討したところ、感度では従来法と変わりがなかったが、測定時間が20分短縮出来ることが明らかとなった。

臨床的追跡調査・疫学研究

①全国油症一斉検診の受診者について血液中のPCDF等（ダイオキシン類）の濃度を継続的に測定した。2018年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度測定を行った認定患者195名と未認定者125名について結果集計を行った。認定患者全体（195名）の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は69 pg/g-fat となり、2,3,7,8-TeCDD毒性等価係数（WHO-2006）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48 pg TEQ/g-fatであった。これに対して、未認定者（125名）の2,3,4,7,8-PeCDF平均濃度は13 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は24 pg TEQ/g-fatであった。②2015年に福岡県久山町の環境調査を受診した住民495人のうち、心機能障害マーカである血清NT-proBNPを測定した455人において、血中2,3,4,7,8-PentaCDF濃度と血清NT-proBNPの関係を横断的に検討した。その結果、2,3,4,7,8-PentaCDF濃度と血清NT-proBNPとの間に明らかな関連は認められなかった。③令和元年度油症患者の眼症状の追跡調査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。④油症認定患者の水晶体落屑物質の有無を判定し、落屑症候群と血中の PCB 濃度との関連を調査した。油症検診受診者の 4.3%で落屑症候群が認めたが、血中 PCB 濃度は低値であり、血中 PCB が落屑症候群に関与する可能性は低いと考えられた。
⑤PCB、PCDF、dioxin、myelopathy、encephalopathy をキーワードとして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。⑥油症患者におけるダイオキシン類の運動器機能における影響を調査した。男性患者において、ファンクショナルリーチテストおよび握力が total ＴＥＱと負の相関にあることが明らかとなった。⑦平成 31 年度の油症検診において油症患者における口腔粘膜色素沈着を検討した結果では、上顎前歯部においては残存歯数と歯肉色素沈着の程度との間に相関性が認められた。⑧油症発生後に油症患者より出生した児（油症 2 世）の口腔内色素沈着に影響する因子について検討し、１）色素沈着が重症化するにつれて、男性と喫煙者の割合が増えること、２）母児血中 PeCDF 濃度との関連では、重症化するにつれて母親血中 PeCDF 濃度が高い値を示すこと、３）口腔内色素沈着の重症度は喫煙と母親血中 PeCDF 濃度と有意な相関を示すことが分かった。⑨福岡県油症一斉検診受診者について末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の細胞内サイトカインを測定した。血中 PCB 濃度と Th0 細胞および Th2 細胞との間に正の相関を認めた。⑩油症患者の皮膚感覚異常について触覚、温痛覚をそれぞれ Von frey フィラメントと温熱計を用いて評価し、触覚については油症患者で健常コントロールと比較して鈍くなっている傾向にあった。⑪母親のダイオキシン類濃度と子供の症状の関係に着眼して分析したところ、母親の濃度と子供の測定項目のうち骨関連のマーカーの「MMP-3」が関係の強い項目として見つかった。しかし、偶然の可能性も考えられた。

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検討した。その結果、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の有意な上昇がみられ、その閾値上昇はケイヒの投与により有意に抑制された。②肺サーファクタント蛋白(SP-D)は油症肺傷害に対して保護な役割を有することが考得られた ③糖尿病治療薬メトホルミンは、油症のみならず IL-1β が病態形成に関わる炎症性疾患の治療に有用である可能性が示唆された。④活性酸素を抑える 5-アミノサリチル酸ならびに代謝産物のアセチル 5-アミノサリチル酸の濃度を盲腸と直腸粘膜内で測定した。⑤PCB 異性体の生体内での代謝を検証している。今年度は、ヒト肝 Ms およびこれまでに PCB 代謝に関与することが報告されている 4 種類のヒトチトクロム P450 (CYP)、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6 および CYP3A4、を用いて、PCB155 の代謝を調べた。⑥Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)母体曝露による出生時の性未成熟の機構の解明では、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、AHR が欠損すると思春期特異的な testosterone の減少、およびその後の持続的な精子数の減少が引き起こされた。⑦ダイオキシン類曝露によって誘導される SelenBP1 は酸化ストレス軽減に寄与している可能性が示唆された。

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

Ⅰ.班長が担当する研究

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薬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。

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．油症患者の死因に関する研究

油症認定患者の生存情報および死亡情報をアップデートし、死亡リスクの再評価を行うことを目的として、油症認定患者を対象とした 50 年間の追跡調査を実施した。その結果、追跡対象者 1,664 名のうち、2017 年 12 月 31 日時点で生存の確認ができた患者が 922 名(55.4%)、死亡の確認ができた患者が 640 名(38.5%)、生死不明の者が 102 名(6.1%)であった。なお、追跡調査はさらに継続中である。

６．油症患者の血液中ダイオキシン類分析におけるナローボアカラムの検討

近年、世界各地でヘリウムガスの需要が高まり、日本への供給が制限されている。ヘリウムガスをキャリアーガスとして用いる測定では、その対策として極力消費量を抑える、もしくは代替ガスへの変更などの対策が必要になっている。高分解能質量分析装置によるダイオキシン類の分析に関しては、代替ガスによる分析は不可能とされる。今回、昨年検討した分析カラムよりも内径の細いナローボアカラムを用いて分析条件を確立した上で、ダイオキシン類異性体の分離および S/N 比の改善に関して検討を行った。その結果、感度面における大きな改善は見られなかったが、分析時間が 40 分程度となり、測定時間が 20 分短縮可能となった。今後もヘリウムガスの供給が制限された場合、本法はヘリウムガスの消費を抑制できるので非常時の対策として有効であると考えられた。

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

2018 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 616 名で、50 歳以上が全体の 90%を占めていた。自覚症状では全身倦怠感の訴えが最も多く、他覚所見では肝・胆・脾エコーの有所見率が高かった。

２）油症患者血液中の PCDF 類実態調査

全国油症一斉検診の受診者について血液中の PCDF 等（ダイオキシン類）の濃度を継続的に測定している。2018 年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度測定を行った認定患者 195 名と未認定者 125 名について結果集計を行った。油症認定患者 195 名の内訳は、油症検診結果に基づく認定者（検診認定者）が 171 名、同居家族の条件による認定者（同居認定者）が 24 名であった。認定患者全体（195 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 69 pg/g-fat となり、2,3,7,8-TeCDD 毒性等価係数（WHO-2006）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 48 pg TEQ/g-fat であった。このうち同居認定者（24 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 18 pg/g-fat であり、Total TEQ の平均濃度は 28 pg TEQ/g-fat であった。これに対して、未認定者（125 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF 平均濃度は 13 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 24 pg TEQ/g-fat であった。2018 年度に実施した血液中ダイオキシン類濃度の分析精度管理の解析を行った。その結果、当所を含む国内 6 機関の定量値は概ね一致しており、各機関で血液中ダイオキシン類の濃度測定が適切に実施されていることが分かった。

このほか、油症患者におけるチトクローム P450（CYP）依存的な PCB 異性体の代謝能の調査及び生成される水酸化 PCB を予測するため、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。その結果、PCB の骨格構造における水酸化標的部位を解析することにより、生成される水酸化 PCB とその代謝経路に関与する CYP 分子種を推定することができた。また、油症患者血液中の 2,2’,3,4,4’,5’,6-heptachlorobiphenyl（PCB183）鏡像異性体（キラル体）を分析し、そのキラル選択的蓄積性を評価した。現在、2019 年度に行われた全国油症一斉検診の受診者のうち 228 名について血液中ダイオキシン類濃度測定を行っている。

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

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。

２）長崎県検診を受診した患者における落屑症候群

今回の長崎県油症検診受診者の落屑症候群の有病率は 4.3%であった。落屑症候群のある症例の血中 PCB 濃度は低値であった。

３．油症患者における歯肉色素沈着と残存歯に関する検討

油症患者において口腔粘膜色素沈着は現在でも多くみられる症状のひとつである。今回、平成 31 年度の長崎県油症検診において、特に上下顎前歯部について口腔粘膜色素沈着および残存歯数について重点的に精査し解析を行った。残存歯数に関しては上顎が平均 4 歯、下顎が平均５歯で、比較的残存歯が多かった。歯肉色素沈着に関しては、上顎では色素沈着がみられた者が 61 名でみられなかった者が 88 名であった。下顎では色素沈着のみられた者が 84 名で、みられなかった者が

65 名であった。今回の結果では、上顎前歯部においては残存歯数と歯肉色素沈着の程度との間に相関性が認められた。今後さらに症例数を増やし他の因子との相関についても検討する必要があると思われた。

４．油症患者におけるダイオキシン類の運動器機能への影響

油症患者におけるダイオキシン類の運動器機能における影響を調査した。ファンクショナルリーチテスト、歩行速度、握力、足趾把持力を計測し、ダイオキシン類の被曝指標である total ＴＥＱとの関連性を評価した。特に、男性患者において、ファンクショナルリーチテストおよび握力が total ＴＥＱと負の相関にあることが明らかとなった

５．油症における末梢血 CD4 陽性 T 細胞亜集団に関する検討

2019 年度福岡県油症一斉検診受診者 220 例について末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の細胞内サイトカインを測定し、血中 PCB 濃度との関連について検討した。血中 PCB 濃度と Th0 細胞および Th2 細胞との間に正の相関を認めたが、Th1 細胞との間に相関をみなかった。Th0 細胞および Th2 細胞は PCB 高濃度群では PCB 低濃度群に比べ上昇を認めた。Th1 細胞は両群間に差をみなかった。油症において Th0 細胞および Th2 細胞に対する PCB の慢性的影響が示唆された。

６．長崎県油症認定患者における皮膚感覚異常の検討

Dioxin 類化合物による神経障害は感覚障害が主で、末梢神経障害によるものと考えられている。油症の発生から 50 年経過しているが感覚異常のある油症患者が多くいる。今後の治療介入戦略を探索する目的に、2019 年度は油症患者の皮膚感覚異常について触覚、温痛覚をそれぞれ Von frey フィラメントと温熱計を用いて評価した。その結果、触覚については油症患者で健常コントロールと比較して鈍くなっている傾向にあった。

７．カネミ油症患者における中枢神経障害に関する文献的研究

カネミ油症患者に生じる中枢神経障害の報告は近年減少している。
文献を考察したところ、PCB、PCDF、dioxin による中毒症状の発生減少とともに中枢神経障害そのものが評価されていない可能性も考えられた。

８．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

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。2019 年度は、2015 年に福岡県久山町の環境調査を受診した住民 495 人のうち、心機能障害マーカである血清 NT-proBNP を測定した 455 人において、血中 2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP の関係を横断的に検討した。その結果、2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP との間に明らかな関連は認められなかった。

９．油症曝露による継世代健康影響に関する研究

<u>油症曝露による継世代健康影響に関する研究 - 油症 2 世の口腔内色素沈着に影響する因子の検討-</u>

油症発生後に油症患者より出生した児（油症 2 世）の口腔内色素沈着に影響する因子について検討した。対象は油症 2 世 144 例とし、油症検診で得られた歯科検診票データをもとに、口腔内色素沈着所見をー/±、＋、＋＋、＋＋＋の 4 群に分類し、臨床的特徴（年齢、性別、油症認定状況、油症曝露状況、油症発生から出生までの期間、喫煙状況）や母児血中 2,3,4,7,8- pentachlorodibenzo furan（PeCDF）濃度との関連について検討した。その結果、１）臨床的な特徴としては、色素沈着が重症化するにつれて、男

性と喫煙者の割合が増えてくること、２）母児血中 PeCDF 濃度との関連では、重症化するにつれて母親血中 PeCDF 濃度が高い値を示すこと、３）重回帰分析では、口腔内色素沈着の重症度は喫煙（偏回帰係数 0.6431, $p<0.0001$)と母親血中 PeCDF 濃度（偏回帰係数 0.0003, $p=0.0027$)と有意な相関を示すことが分かった。これらの成績から、油症２世の口腔内色素沈着に影響する因子として、母親の血中 PeCDF 濃度および喫煙があげられる。しかしながら母親の血中 PeCDF 濃度の偏回帰係数は極めて低いので、色素沈着に影響するのかどうかさらなる評価が求められる。今後次世代研究をすすめていくうえには、コホート研究が必要であると考える。

母親の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と子供の症状の関係に関する研究

母親が摂取したダイオキシン類は、胎盤や母乳を通して、子供に移行するが、子供は摂取したとしても成長期に体重が増加するため成長後の濃度は一般人と同等のレベルまで低下すると考えられる。そこで本研究では、母親のダイオキシン類濃度と子供の症状の関係に着眼して分析を行った。母親の濃度と子供の測定項目のうち骨関連のマーカーの「MMP-3」が関係の強い項目として見つかった。しかし、同系統の他項目と比較して突出していることから、偶然の可能性も考えられた。

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 SP-D の役割

肺サーファクタント蛋白(SP-D)ノックアウトマウスに Benzo[a]pyrene(BaP)を経気道的に投与すると、細気管支領域で PAS 陽性細胞の著明な増加が観察され、BaP による気道傷害が野生型マウスに比して増悪しており、油症肺傷害における SP-D の保護的役割が考察された

２．Myelin proteins を用いたベンゾピレン投与ラットでの生薬の効果検討

ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を、感覚刺激による定量的閾値評価法、酸化ストレス・抗酸化力の測定法、Western blot 法を用いて検討した。酸化ストレス度に関しては、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で有意な酸化ストレス状態の改善が見られた。また、Western blot 法を用いた myelin basic protein (MBP)、cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1)、myelin-associated glycoprotein (MAG) の発現検討では、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒの投与群で MAG の発現低下の抑制、CYP1A1 の発現増加の抑制がみられた。しかし、MBP の発現に関しては群間有意な差はみられなかった。本研究の結果から、ベンゾピレン投与はその毒性が触・圧覚を伝える Aβ線維に作用し、脱髄を起こすことで、感覚異常等を発生させた可能性が示唆された。また、その作用は抗酸化作用と AHR 活性化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が改善される可能性が示唆された。

３． オートファジーによる酸化ストレスの制御機構

これまでの研究で、糖尿病の治療薬であるメトホルミンは、表皮細胞における芳香族炭化水素受容体を活性化し、さらにオートファジーを誘導することが明らかとなった。そこで、今回は、表皮細胞における酸化ストレスによる炎症をメトホルミンがどのような機序で制御するかについて研究を行なった。その結果、メトホルミンは炎症性サイトカインである IL-17A・TNF-αによる酸化ストレスによって誘導されるインフラマソームの活性化を抑制し、最終的に IL-1βの産生を抑制することで、炎症を抑制する働きがあることが明らかとなった。メトホルミンは、油症のみならず IL-1βが病態形成に関わる炎症性疾患の治療に有用である可

能性が示唆された。

４．2,4,6-三塩素置換PCB異性体PCB155のヒト肝チトクロムP450分子種による代謝

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、ヒト肝ミクロゾーム(Ms)およびヒトチトクロムP450 (CYP)分子種による代謝を調べた。まず、ヒト肝Ms では、ラットやモルモットと同様に、代謝物M1(3-OH体)が1 種類生成され、その生成活性は0.292 nmol/hr/mg protein であった。次に、4 種類のヒトCYP 分子種（１A2、2A6、2B6、3A4）での検討結果、CYP2B6 のみがM1 を生成し、その活性は0.702 pmol/hr/pmol であった。以上の結果から、PCB155 は、ヒト肝Ms によっても容易に3-OH 体へと代謝されること、また、今回検討したヒトCYP のうち、CYP2B6 のみが、3-OH 体への強い代謝活性を有していること、が明らかになった。

５.2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析：脳の性分化と生殖腺の発達に対する芳香族炭化水素受容体の寄与

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。2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)による出生児の性未成熟の機構解析を目指して、芳香族炭化水素受容体(AHR)欠損ラットで検討を行った。その結果、TCDD 母体暴露していない AHR 欠損雄ラットでは、脳の性分化が起こる周産期において、AHR 欠損により脳下垂体の LHβの mRNA 発現の低下、さらに、それを起点とした性ステロイド合成系タンパク質、および、性ステロイドである testosterone の低下およびその傾向を示すことが明らかになった。このことから、AHR が脳下垂体 LHβ 遺伝子のエンハンサー配列である xenobiotic responsive element (XRE) 配列に直接結合し、転写を制御している可能性が考えられた。そこで、LHβ 遺伝子に対して AHR が AHR 依存的にLHβ の転写に有意な影響があるのか否かを検証するため、抗 AHR 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) にて解析を行った。その結果、WT と AHR ヘテロ欠損雄胎児間で AHR の LHβ の XRE 配列への結合能に有意な差は見られなかった。次に、GD18 において脳下垂体の LH 産生細胞への分化に関与する因子、GATA2, Pitx1 および Prop1 の発現の有意な低下を認めた。AHR は胎児期の脳下垂体に作用し LH 産生細胞への分化に重要な役割を示す可能性が浮上した。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。AHR 欠損により、思春期の血中 testosterone の減少が明らかになった。さらに、この結果に付随して、AHR 欠損により、精子数の減少も明らかとなった。すなわち、AHR は精巣の性ホルモン分泌や機能維持に関与する可能性が示唆された。出生２日目 (PND2)の雄では、AHR 欠損により著しく血中 testosterone 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 週齢および 8 週齢では、AHR 欠損雄ラットで、testosterone 濃度が野生型ラットに比べ著しく低かった。しかし、13 週齢および 20 週齢では、野生型と遜色ないレベルであった。AHR 欠損により、生殖器官に形態学的な影響がおよぶか否かを検討するため、精子形成が始まる思春期である 8 週齢雄ラットの精巣ならびに精巣上体管を HE 染色により、

観察した。野生型と比較して、欠損型は精巣上体管内の精子数の減少傾向が観察され、AHR 欠損による精子数減少が想定された。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 testosterone の減少、およびその後の持続的な精子数の減少が引き起こされたことから、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。

６．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：脂質代謝との関連性の検討

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予備的に行った。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。昨年度までの検討において SelenBP1-KO マウスの腎臓では、脂肪酸の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することが示唆された。また、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。本年度の検討により、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (Ppara)の発現レベルの有意な低下が示唆された。これは、先に行ったマイクロアレイの結果を支持した。一方、Ppar-beta (Pparb)および Ppar-gamma (Pparg)の発現レベルには影響がなかった。また、昨年度までの検討から 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-alpha (Rxra)の発現の低下が示唆されている。従って、Ppara および Rxra の発現低下を通じた Cyp4a の低下が示唆された。一方、cyclooxygenase 1 (Cox1), Cox2 および 3 種の lipoxygenase レベルは変動しなかった。これに符合して、ロイコトリエン類の増加が推定された。より精度をあげるために、例数を増やしてメタボロミクス解析を行った結果も、それを支持した。また、抗酸化酵素の発現解析を行ったところ、superoxide dismutase 1 (Sod1)および Sod2 の発現が有意に低下していた。これらのことから、SelenBP1 は酸化ストレス軽減に寄与している可能性が示唆された。

７.ドラッグデリバリーシステムと腸粘膜内アミノアセチル酸濃度の研究

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、消化器症状として下痢や過敏性腸炎症状が報告されてきた。ダイオキシン類の生体への毒性には活性酸素が中心的な役割を果たすと考えられている。5-アミノサリチル酸は活性酸素の産生抑制や活性酸素による細胞傷害の抑制に働くことが知られている。今回、ドラッグデリバリーシステムの相違による盲腸と直腸粘膜内での 5-アミノサリチル酸ならびに代謝産物のアセチル 5-アミ

ノサリチル酸の濃度の違いを明らかにした。

D．結論

以上、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、疫学・臨床医学・基礎医学の観点から多面的に明らかになりつつある。これらの結果を踏まえて、将来的に、油症の症状を緩和する新しい治療薬の発見・開発につなげたいと考えている。

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　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　　企画情報管理課　課長
田中　義人　福岡県保健環境研究所　　保健科学部長

研究要旨　2018 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 616 名で、50 歳以上が全体の 90%を占めていた。自覚症状では全身倦怠感の訴えが最も多く、他覚所見では肝・胆・脾エコーの有所見率が高かった。

A．研究目的

カネミ油症事件発生から 50 年以上が経過した現在も継続して油症検診が行われており、様々な症状の訴えがある。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、検診情報の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

2018 年 7 月から 11 月に実施された全国油症一斉検診（以下、油症検診）の検診票を、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）の協力を得て収集及び電子データ化し、項目別に集計した。集計の際の所見区分は表 1 に示す。

（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 2 に示す。2018 年度は、616 名が受診した。受診者区分別では、認定者が 490 名、未認定者は 126 名だった。年齢階級別では、60～69 歳が一番多く、次いで 70～79 歳で、50 歳以上が全体の 90%を占めた。

表 3 と表 4 に内科の集計結果を示す。自覚症状は、全身倦怠感（72.8%）、関節痛（69.6%）、しびれ感（64.3%）の順で多かった。他覚所見は、肝・胆・脾エコー（77.2%）が高く、次いで心電図（28.7%）だった。

表 5 に皮膚科の集計結果を示す。問診では、かつてのざ瘡様皮疹（42.4%）、かつての色素沈着（26.1%）の訴えが多かった。他覚所見は、黒色面皰（15.4%）が高く、その他の項目は 10%未満だった。

表 6 に眼科の集計結果を示す。眼脂過多は 13.2%が訴えていたが、他覚所見は 5%未満だった。

表 7 に歯科の集計結果を示す。口腔所見は、辺縁性歯周炎（24.4%）、歯肉炎（15.0%）の順で高く、その他の項目は 10%未満だった。色素沈着は、歯肉の色素沈着が 19.7%で、その他の項目は 10%未満だった。

D．結論

2018 年度の油症検診受診者数は 616 名で、50 歳以上が 90%を占めていた。有所見率は、自覚症状では全身倦怠感が最も高く、

他覚所見では肝･胆･脾エコーが高かった。

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　所見区分

検診票	項目	所見有
内科検診	自覚症状	＋、ǂ
	他覚所見	正常、純、－ 以外
皮膚科	問診	有
	他覚所見[*1]	＋、ǂ、ǂǂ
眼科	主訴	＋、ǂ、ǂǂ
	他覚所見	＋、ǂ、ǂǂ
歯科	主訴	有
	口腔所見	有
	色素沈着所見[*2]	＋、ǂ、ǂǂ

*1 いずれかの部位に所見が認められれば、所見有とした。

*2 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た。

表2　2018年度検診受診者内訳

受診者区分及び年齢階級	総数		男性		女性	
	n	%	n	%	n	%
総数	616	100.0	302	100.0	314	100.0
0 - 29 歳	12	1.9	5	1.7	7	2.2
30 - 39 歳	10	1.6	5	1.7	5	1.6
40 - 49 歳	41	6.7	22	7.3	19	6.1
50 - 59 歳	126	20.5	59	19.5	67	21.3
60 - 69 歳	182	29.5	84	27.8	98	31.2
70 - 79 歳	147	23.9	76	25.2	71	22.6
80 歳以上	98	15.9	51	16.9	47	15.0
認定	490	100.0	244	100.0	246	100.0
0 - 29 歳	0	0.0	0	0.0	0	0.0
30 - 39 歳	0	0.0	0	0.0	0	0.0
40 - 49 歳	17	3.5	13	5.3	4	1.6
50 - 59 歳	105	21.4	48	19.7	57	23.2
60 - 69 歳	160	32.7	76	31.1	84	34.1
70 - 79 歳	123	25.1	64	26.2	59	24.0
80 歳以上	85	17.3	43	17.6	42	17.1
未認定	126	100.0	58	100.0	68	100.0
0 - 29 歳	12	9.5	5	8.6	7	10.3
30 - 39 歳	10	7.9	5	8.6	5	7.4
40 - 49 歳	24	19.0	9	15.5	15	22.1
50 - 59 歳	21	16.7	11	19.0	10	14.7
60 - 69 歳	22	17.5	8	13.8	14	20.6
70 - 79 歳	24	19.0	12	20.7	12	17.6
80 歳以上	13	10.3	8	13.8	5	7.4

表3　2018年度内科検診の自覚症状集計結果

項目	所見	総数						認定						未認定					
		総数		男性		女性		総数		男性		女性		総数		男性		女性	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
全身	計	607	100.0	297	100.0	310	100.0	483	100.0	240	100.0	243	100.0	124	100.0	57	100.0	67	100.0
倦怠感	無	165	27.2	90	30.3	75	24.2	126	26.1	66	27.5	60	24.7	39	31.5	24	42.1	15	22.4
	有	442	72.8	207	69.7	235	75.8	357	73.9	174	72.5	183	75.3	85	68.5	33	57.9	52	77.6
頭重・	計	607	100.0	297	100.0	310	100.0	483	100.0	240	100.0	243	100.0	124	100.0	57	100.0	67	100.0
頭痛	無	266	43.8	165	55.6	101	32.6	217	44.9	135	56.3	82	33.7	49	39.5	30	52.6	19	28.4
	有	341	56.2	132	44.4	209	67.4	266	55.1	105	43.8	161	66.3	75	60.5	27	47.4	48	71.6
咳嗽	計	607	100.0	297	100.0	310	100.0	483	100.0	240	100.0	243	100.0	124	100.0	57	100.0	67	100.0
	無	286	47.1	131	44.1	155	50.0	221	45.8	100	41.7	121	49.8	65	52.4	31	54.4	34	50.7
	有	321	52.9	166	55.9	155	50.0	262	54.2	140	58.3	122	50.2	59	47.6	26	45.6	33	49.3
喀痰	計	607	100.0	297	100.0	310	100.0	483	100.0	240	100.0	243	100.0	124	100.0	57	100.0	67	100.0
	無	332	54.7	148	49.8	184	59.4	261	54.0	116	48.3	145	59.7	71	57.3	32	56.1	39	58.2
	有	275	45.3	149	50.2	126	40.6	222	46.0	124	51.7	98	40.3	53	42.7	25	43.9	28	41.8
腹痛	計	607	100.0	297	100.0	310	100.0	483	100.0	240	100.0	243	100.0	124	100.0	57	100.0	67	100.0
	無	370	61.0	186	62.6	184	59.4	292	60.5	147	61.3	145	59.7	78	62.9	39	68.4	39	58.2
	有	237	39.0	111	37.4	126	40.6	191	39.5	93	38.8	98	40.3	46	37.1	18	31.6	28	41.8
下痢	計	607	100.0	297	100.0	310	100.0	483	100.0	240	100.0	243	100.0	124	100.0	57	100.0	67	100.0
	無	351	57.8	157	52.9	194	62.6	279	57.8	128	53.3	151	62.1	72	58.1	29	50.9	43	64.2
	有	256	42.2	140	47.1	116	37.4	204	42.2	112	46.7	92	37.9	52	41.9	28	49.1	24	35.8
便秘	計	607	100.0	297	100.0	310	100.0	483	100.0	240	100.0	243	100.0	124	100.0	57	100.0	67	100.0
	無	320	52.7	176	59.3	144	46.5	255	52.8	144	60.0	111	45.7	65	52.4	32	56.1	33	49.3
	有	287	47.3	121	40.7	166	53.5	228	47.2	96	40.0	132	54.3	59	47.6	25	43.9	34	50.7
しびれ	計	607	100.0	297	100.0	310	100.0	483	100.0	240	100.0	243	100.0	124	100.0	57	100.0	67	100.0
感	無	217	35.7	114	38.4	103	33.2	166	34.4	91	37.9	75	30.9	51	41.1	23	40.4	28	41.8
	有	390	64.3	183	61.6	207	66.8	317	65.6	149	62.1	168	69.1	73	58.9	34	59.6	39	58.2
関節痛	計	605	100.0	296	100.0	309	100.0	481	100.0	239	100.0	242	100.0	124	100.0	57	100.0	67	100.0
	無	184	30.4	98	33.1	86	27.8	130	27.0	69	28.9	61	25.2	54	43.5	29	50.9	25	37.3
	有	421	69.6	198	66.9	223	72.2	351	73.0	170	71.1	181	74.8	70	56.5	28	49.1	42	62.7
月経	計	157	100.0	・	・	157	100.0	116	100.0	・	・	116	100.0	41	100.0	・	・	41	100.0
異常	無	137	87.3	・	・	137	87.3	108	93.1	・	・	108	93.1	29	70.7	・	・	29	70.7
	有	20	12.7	・	・	20	12.7	8	6.9	・	・	8	6.9	12	29.3	・	・	12	29.3
その他	計	99	100.0	33	100.0	66	100.0	74	100.0	26	100.0	48	100.0	25	100.0	7	100.0	18	100.0
	無	62	62.6	21	63.6	41	62.1	45	60.8	17	65.4	28	58.3	17	68.0	4	57.1	13	72.2
	有	37	37.4	12	36.4	25	37.9	29	39.2	9	34.6	20	41.7	8	32.0	3	42.9	5	27.8

表4　2018年度内科検診の他覚所見集計結果

項目	所見	総数						認定						未認定					
		総数		男性		女性		総数		男性		女性		総数		男性		女性	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
栄養	計	580	100.0	287	100.0	293	100.0	459	100.0	231	100.0	228	100.0	121	100.0	56	100.0	65	100.0
	無	428	73.8	206	71.8	222	75.8	351	76.5	172	74.5	179	78.5	77	63.6	34	60.7	43	66.2
	有	152	26.2	81	28.2	71	24.2	108	23.5	59	25.5	49	21.5	44	36.4	22	39.3	22	33.8
心音	計	589	100.0	289	100.0	300	100.0	467	100.0	233	100.0	234	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
	無	573	97.3	280	96.9	293	97.7	453	97.0	224	96.1	229	97.9	120	98.4	56	100.0	64	97.0
	有	16	2.7	9	3.1	7	2.3	14	3.0	9	3.9	5	2.1	2	1.6	0	0.0	2	3.0
呼吸音	計	589	100.0	289	100.0	300	100.0	467	100.0	233	100.0	234	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
	無	576	97.8	279	96.5	297	99.0	455	97.4	224	96.1	231	98.7	121	99.2	55	98.2	66	100.0
	有	13	2.2	10	3.5	3	1.0	12	2.6	9	3.9	3	1.3	1	0.8	1	1.8	0	0.0
肝腫	計	588	100.0	289	100.0	299	100.0	466	100.0	233	100.0	233	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
	無	578	98.3	283	97.9	295	98.7	457	98.1	227	97.4	230	98.7	121	99.2	56	100.0	65	98.5
	有	10	1.7	6	2.1	4	1.3	9	1.9	6	2.6	3	1.3	1	0.8	0	0.0	1	1.5
脾腫	計	588	100.0	289	100.0	299	100.0	466	100.0	233	100.0	233	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
	無	588	100.0	289	100.0	299	100.0	466	100.0	233	100.0	233	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
	有	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
浮腫	計	589	100.0	289	100.0	300	100.0	467	100.0	233	100.0	234	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
	無	560	95.1	280	96.9	280	93.3	444	95.1	225	96.6	219	93.6	116	95.1	55	98.2	61	92.4
	有	29	4.9	9	3.1	20	6.7	23	4.9	8	3.4	15	6.4	6	4.9	1	1.8	5	7.6
リンパ節	計	588	100.0	288	100.0	300	100.0	466	100.0	232	100.0	234	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
腫大	無	586	99.7	286	99.3	300	100.0	465	99.8	231	99.6	234	100.0	121	99.2	55	98.2	66	100.0
	有	2	0.3	2	0.7	0	0.0	1	0.2	1	0.4	0	0.0	1	0.8	1	1.8	0	0.0
四肢けん	計	589	100.0	289	100.0	300	100.0	467	100.0	233	100.0	234	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
反射	無	485	82.3	232	80.3	253	84.3	387	82.9	191	82.0	196	83.8	98	80.3	41	73.2	57	86.4
	有	104	17.7	57	19.7	47	15.7	80	17.1	42	18.0	38	16.2	24	19.7	15	26.8	9	13.6
感覚障害	計	589	100.0	289	100.0	300	100.0	467	100.0	233	100.0	234	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
	無	498	84.6	246	85.1	252	84.0	396	84.8	200	85.8	196	83.8	102	83.6	46	82.1	56	84.8
	有	91	15.4	43	14.9	48	16.0	71	15.2	33	14.2	38	16.2	20	16.4	10	17.9	10	15.2
胸部レ線	計	561	100.0	279	100.0	282	100.0	460	100.0	234	100.0	226	100.0	101	100.0	45	100.0	56	100.0
	無	426	75.9	213	76.3	213	75.5	343	74.6	178	76.1	165	73.0	83	82.2	35	77.8	48	85.7
	有	135	24.1	66	23.7	69	24.5	117	25.4	56	23.9	61	27.0	18	17.8	10	22.2	8	14.3
心電図	計	579	100.0	288	100.0	291	100.0	468	100.0	237	100.0	231	100.0	111	100.0	51	100.0	60	100.0
	無	413	71.3	191	66.3	222	76.3	334	71.4	157	66.2	177	76.6	79	71.2	34	66.7	45	75.0
	有	166	28.7	97	33.7	69	23.7	134	28.6	80	33.8	54	23.4	32	28.8	17	33.3	15	25.0
肝・胆・	計	219	100.0	116	100.0	103	100.0	151	100.0	82	100.0	69	100.0	68	100.0	34	100.0	34	100.0
脾エコー	無	50	22.8	23	19.8	27	26.2	31	20.5	14	17.1	17	24.6	19	27.9	9	26.5	10	29.4
	有	169	77.2	93	80.2	76	73.8	120	79.5	68	82.9	52	75.4	49	72.1	25	73.5	24	70.6

表5　2018年度皮膚科検診集計結果

項目	所見	総数						認定						未認定					
		総数		男性		女性		総数		男性		女性		総数		男性		女性	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
問診																			
最近の	計	590	100.0	290	100.0	300	100.0	468	100.0	234	100.0	234	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
化膿傾向	無	507	85.9	246	84.8	261	87.0	397	84.8	194	82.9	203	86.8	110	90.2	52	92.9	58	87.9
	有	83	14.1	44	15.2	39	13.0	71	15.2	40	17.1	31	13.2	12	9.8	4	7.1	8	12.1
最近の	計	590	100.0	290	100.0	300	100.0	468	100.0	234	100.0	234	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
粉りゅう	無	519	88.0	253	87.2	266	88.7	411	87.8	203	86.8	208	88.9	108	88.5	50	89.3	58	87.9
再発傾向	有	71	12.0	37	12.8	34	11.3	57	12.2	31	13.2	26	11.1	14	11.5	6	10.7	8	12.1
かつての	計	590	100.0	290	100.0	300	100.0	468	100.0	234	100.0	234	100.0	122	100.0	56	100.0	66	100.0
ざ瘡様	無	340	57.6	163	56.2	177	59.0	271	57.9	130	55.6	141	60.3	69	56.6	33	58.9	36	54.5
皮疹	有	250	42.4	127	43.8	123	41.0	197	42.1	104	44.4	93	39.7	53	43.4	23	41.1	30	45.5
かつての	計	589	100.0	290	100.0	299	100.0	468	100.0	234	100.0	234	100.0	121	100.0	56	100.0	65	100.0
色素沈着	無	435	73.9	223	76.9	212	70.9	338	72.2	176	75.2	162	69.2	97	80.2	47	83.9	50	76.9
	有	154	26.1	67	23.1	87	29.1	130	27.8	58	24.8	72	30.8	24	19.8	9	16.1	15	23.1
他覚所見																			
黒色面皰	計	591	100.0	291	100.0	300	100.0	468	100.0	234	100.0	234	100.0	123	100.0	57	100.0	66	100.0
	無	500	84.6	240	82.5	260	86.7	393	84.0	193	82.5	200	85.5	107	87.0	47	82.5	60	90.9
	有	91	15.4	51	17.5	40	13.3	75	16.0	41	17.5	34	14.5	16	13.0	10	17.5	6	9.1
ざ瘡様	計	591	100.0	291	100.0	300	100.0	468	100.0	234	100.0	234	100.0	123	100.0	57	100.0	66	100.0
皮疹	無	562	95.1	278	95.5	284	94.7	444	94.9	224	95.7	220	94.0	118	95.9	54	94.7	64	97.0
	有	29	4.9	13	4.5	16	5.3	24	5.1	10	4.3	14	6.0	5	4.1	3	5.3	2	3.0
瘢痕化	計	591	100.0	291	100.0	300	100.0	468	100.0	234	100.0	234	100.0	123	100.0	57	100.0	66	100.0
	無	535	90.5	263	90.4	272	90.7	419	89.5	211	90.2	208	88.9	116	94.3	52	91.2	64	97.0
	有	56	9.5	28	9.6	28	9.3	49	10.5	23	9.8	26	11.1	7	5.7	5	8.8	2	3.0
色素沈着	計	591	100.0	291	100.0	300	100.0	468	100.0	234	100.0	234	100.0	123	100.0	57	100.0	66	100.0
	無	542	91.7	273	93.8	269	89.7	431	92.1	222	94.9	209	89.3	111	90.2	51	89.5	60	90.9
	有	49	8.3	18	6.2	31	10.3	37	7.9	12	5.1	25	10.7	12	9.8	6	10.5	6	9.1
爪変形	計	590	100.0	291	100.0	299	100.0	468	100.0	234	100.0	234	100.0	122	100.0	57	100.0	65	100.0
	無	579	98.1	284	97.6	295	98.7	457	97.6	227	97.0	230	98.3	122	100.0	57	100.0	65	100.0
	有	11	1.9	7	2.4	4	1.3	11	2.4	7	3.0	4	1.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0

表6　2018年度眼科検診集計結果

項目	所見	総数						認定						未認定					
		総数		男性		女性		総数		男性		女性		総数		男性		女性	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
主訴																			
眼脂過多	計	582	100.0	288	100.0	294	100.0	461	100.0	233	100.0	228	100.0	121	100.0	55	100.0	66	100.0
	無	505	86.8	248	86.1	257	87.4	398	86.3	197	84.5	201	88.2	107	88.4	51	92.7	56	84.8
	有	77	13.2	40	13.9	37	12.6	63	13.7	36	15.5	27	11.8	14	11.6	4	7.3	10	15.2
他覚所見																			
眼瞼浮腫	計	582	100.0	288	100.0	294	100.0	461	100.0	233	100.0	228	100.0	121	100.0	55	100.0	66	100.0
	無	562	96.6	273	94.8	289	98.3	441	95.7	218	93.6	223	97.8	121	100.0	55	100.0	66	100.0
	有	20	3.4	15	5.2	5	1.7	20	4.3	15	6.4	5	2.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
眼瞼結膜	計	582	100.0	288	100.0	294	100.0	461	100.0	233	100.0	228	100.0	121	100.0	55	100.0	66	100.0
色素沈着	無	570	97.9	281	97.6	289	98.3	449	97.4	226	97.0	223	97.8	121	100.0	55	100.0	66	100.0
	有	12	2.1	7	2.4	5	1.7	12	2.6	7	3.0	5	2.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
瞼板腺	計	582	100.0	288	100.0	294	100.0	461	100.0	233	100.0	228	100.0	121	100.0	55	100.0	66	100.0
嚢胞形成	無	566	97.3	280	97.2	286	97.3	445	96.5	225	96.6	220	96.5	121	100.0	55	100.0	66	100.0
	有	16	2.7	8	2.8	8	2.7	16	3.5	8	3.4	8	3.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
瞼板腺	計	581	100.0	288	100.0	293	100.0	460	100.0	233	100.0	227	100.0	121	100.0	55	100.0	66	100.0
チーズ様	無	577	99.3	286	99.3	291	99.3	456	99.1	231	99.1	225	99.1	121	100.0	55	100.0	66	100.0
分泌物圧出	有	4	0.7	2	0.7	2	0.7	4	0.9	2	0.9	2	0.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0

表7　2018年度歯科検診集計結果

項目	所見	総数						認定						未認定					
		総数		男性		女性		総数		男性		女性		総数		男性		女性	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
主訴	計	360	100.0	191	100.0	169	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
	無	304	84.4	169	88.5	135	79.9	221	81.9	128	86.5	93	76.2	83	92.2	41	95.3	42	89.4
	有	56	15.6	22	11.5	34	20.1	49	18.1	20	13.5	29	23.8	7	7.8	2	4.7	5	10.6
口腔所見																			
歯肉炎	計	360	100.0	191	100.0	169	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
	無	306	85.0	160	83.8	146	86.4	224	83.0	122	82.4	102	83.6	82	91.1	38	88.4	44	93.6
	有	54	15.0	31	16.2	23	13.6	46	17.0	26	17.6	20	16.4	8	8.9	5	11.6	3	6.4
辺縁性	計	360	100.0	191	100.0	169	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
歯周炎	無	272	75.6	134	70.2	138	81.7	195	72.2	97	65.5	98	80.3	77	85.6	37	86.0	40	85.1
	有	88	24.4	57	29.8	31	18.3	75	27.8	51	34.5	24	19.7	13	14.4	6	14.0	7	14.9
歯牙萌出	計	360	100.0	191	100.0	169	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
異常	無	358	99.4	190	99.5	168	99.4	270	100.0	148	100.0	122	100.0	88	97.8	42	97.7	46	97.9
	有	2	0.6	1	0.5	1	0.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	2.2	1	2.3	1	2.1
歯牙着色	計	360	100.0	191	100.0	169	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
	無	355	98.6	191	100.0	164	97.0	266	98.5	148	100.0	118	96.7	89	98.9	43	100.0	46	97.9
	有	5	1.4	0	0.0	5	3.0	4	1.5	0	0.0	4	3.3	1	1.1	0	0.0	1	2.1
歯牙	計	360	100.0	191	100.0	169	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
形成不全	無	356	98.9	189	99.0	167	98.8	268	99.3	146	98.6	122	100.0	88	97.8	43	100.0	45	95.7
	有	4	1.1	2	1.0	2	1.2	2	0.7	2	1.4	0	0.0	2	2.2	0	0.0	2	4.3
咬合異常	計	359	100.0	190	100.0	169	100.0	269	100.0	147	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
	無	340	94.7	184	96.8	156	92.3	260	96.7	144	98.0	116	95.1	80	88.9	40	93.0	40	85.1
	有	19	5.3	6	3.2	13	7.7	9	3.3	3	2.0	6	4.9	10	11.1	3	7.0	7	14.9
その他	計	358	100.0	190	100.0	168	100.0	268	100.0	147	100.0	121	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
	無	349	97.5	184	96.8	165	98.2	259	96.6	141	95.9	118	97.5	90	100.0	43	100.0	47	100.0
	有	9	2.5	6	3.2	3	1.8	9	3.4	6	4.1	3	2.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
色素沈着所見																			
歯肉	計	360	100.0	191	100.0	169	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
	無	289	80.3	154	80.6	135	79.9	217	80.4	117	79.1	100	82.0	72	80.0	37	86.0	35	74.5
	有	71	19.7	37	19.4	34	20.1	53	19.6	31	20.9	22	18.0	18	20.0	6	14.0	12	25.5
頬粘膜	計	360	100.0	191	100.0	169	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
	無	327	90.8	166	86.9	161	95.3	240	88.9	125	84.5	115	94.3	87	96.7	41	95.3	46	97.9
	有	33	9.2	25	13.1	8	4.7	30	11.1	23	15.5	7	5.7	3	3.3	2	4.7	1	2.1
口蓋粘膜	計	360	100.0	191	100.0	169	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
	無	354	98.3	188	98.4	166	98.2	265	98.1	145	98.0	120	98.4	89	98.9	43	100.0	46	97.9
	有	6	1.7	3	1.6	3	1.8	5	1.9	3	2.0	2	1.6	1	1.1	0	0.0	1	2.1
口唇粘膜	計	360	100.0	191	100.0	169	100.0	270	100.0	148	100.0	122	100.0	90	100.0	43	100.0	47	100.0
	無	343	95.3	183	95.8	160	94.7	259	95.9	143	96.6	116	95.1	84	93.3	40	93.0	44	93.6
	有	17	4.7	8	4.2	9	5.3	11	4.1	5	3.4	6	4.9	6	6.7	3	7.0	3	6.4

分担研究報告書

油症検診受診者の血液中 PCDF 等（ダイオキシン類）濃度実態調査

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	堀　就英	福岡県保健環境研究所	生活化学課　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
	飛石　和大	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　研究員
	佐藤　環	福岡県保健環境研究所	生活化学課　主任技師
	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
	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
	戸髙　尊	公益財団法人北九州生活科学センター	室長
	広瀬　勇気	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員

研究要旨

全国油症一斉検診の受診者について血液中の PCDF 等（ダイオキシン類）の濃度を継続的に測定している。2018 年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度測定を行った認定患者 195 名と未認定者 125 名について結果集計を行った。油症認定患者 195 名の内訳は、油症検診結果に基づく認定者（検診認定者）が 171 名、同居家族の条件による認定者（同居認定者）が 24 名であった。認定患者全体（195 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 69 pg/g-fat となり、2,3,7,8-TeCDD 毒性等価係数（WHO-2006）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 48 pg TEQ/g-fat であった。このうち同居認定者（24 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 18 pg/g-fat であり、Total TEQ の平均濃度は 28 pg TEQ/g-fat であった。これに対して、未認定者（125 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF 平均濃度は 13 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 24 pg TEQ/g-fat であった。

2018 年度に実施した血液中ダイオキシン類濃度の分析精度管理の解析を行った。その結果、当所を含む国内 6 機関の定量値は概ね一致しており、各機関で血液中ダイオキシン類の濃度測定が適切に実施されていることが分かった。

このほか、油症患者におけるチトクローム P450（CYP）依存的な PCB 異性体の代謝能の調査及び生成される水酸化 PCB を予測するため、*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。その結果、PCB の骨格構造における水酸化標的部位を解析することにより、生成される水酸化 PCB とその代謝経路に関与する CYP 分子種を推定することができた。また、油症患者血液中の 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl（PCB183）鏡像異性体（キラル体）を分析し、そのキラル選択的蓄積性を評価した。

現在、2019 年度に行われた全国油症一斉検診の受診者のうち 228 名について血液中ダイオキシン類濃度測定を行っている。

A．研究目的

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 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、2018 年度現在の認定患者数は 2,334 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、2001 年度は福岡県の受診者中の希望者、2002～2006 年度の 5 年間は全国の受診者における希望者、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。測定結果は患者認定における指標値として用いられ、患者の血液中ダイオキシン類濃度の解明、血液中濃度の経年推移や対外排泄速度等の解析に寄与している。

本年度は以下の 3 項目について検討した。

（１）2018 年度全国油症一斉検診の受診者のうち血液中ダイオキシン類濃度の測定を行った 320 名について結果集計を行った。2013 年度から検診が始まった同居認定者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度を検診認定者及び未認定者と比較し、現状の把握を行った。

（２）国内で血液中ダイオキシン類・PCB 測定を行っている分析機関に共通の血液試料を配布し、各機関の定量結果を統計手法で比較する精度管理を行った。

（３）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、*in silico* 解析によるドッキングシミュレーションを用いてヒト CYP 分子種に依存する PCB 代謝特性について検討した。さらに血液中の 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (PCB183) の鏡像異性体 (キラル体) の選択的蓄積性を評価した。

B．研究方法

１．血液中ダイオキシン類の測定

血液中ダイオキシン類の測定は、2001 年度に開発した高感度分析法で行った。油症一斉検診で要求される条件（分析期間、処理件数、分析感度）に対応するために、必要に応じて抽出法や機器分析法に改良を加えて現在に至っている。定量結果の信頼性を確保するため、血液試料 22 件につきブランク試験 1 件、内部精度管理試料としてヒト血清 1 件を加えた計 24 件を「1 バッチ」として前処理を実施し、試験操作が適切に実施されたことを確認した。

2018 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 195 名及び未認定者 125 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に採取され、測定まで 4℃以下で冷蔵保存した。

ダイオキシン類各異性体濃度の 2,3,7,8-TCDD 毒性等量 (TEQ) への換算には、2005 年に WHO が策定した毒性等価係数 (WHO-2006) を用いた。各受診者の区分（認定または未

認定）は 2018 年の検診受診時のものを用いた。

２．血液中ダイオキシン類濃度分析の精度管理

各分析機関に 2 種類の血液試料（Sample 1 及び 2）を配付し、各機関で通常行っている分析法でダイオキシン類（毒性等価係数が設定されている 29 異性体）を測定するように依頼した。各機関からの報告値は全血重量及び脂肪重量あたりのダイオキシン類異性体別濃度と毒性等量（TEQ）であった。TEQ の算出には毒性等価係数（WHO-2006）を用い、定量下限未満となった異性体濃度は定量下限の 1/2 値に置き換えて解析した。各機関間の比較には CV 値および Z スコアを用いた。

３．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 CYP 分子種依存的な PCB 代謝経路の予測を行った。

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 30-7 及び-8 号、2018 年 11 月 5 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．内部精度管理

各測定バッチ（24 件）のブランク試験結果の取扱いは、厚労省が策定した「血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」に準じて行った。全測定を通じて定量精度に著しい影響を与えるような操作ブランクの出現は認められなかった。

血液試料と並行分析したヒト血清試料についてダイオキシン類異性体の定量値を各バッチ間で比較したところ、CV 値は 10%程度であり再現性は良好であった。

１－２．外部精度管理

6 機関（A～F）の血液中ダイオキシン類濃度の測定結果（全血重量あたり）を表 1 に示した。血液中の各同族体 PCDDs、PCDFs、non-*ortho* PCBs、mono-*ortho* PCB 及び Total TEQ の平均値は、Sample 1 が 0.0052、0.0026、0.0019、0.00023、0.010 pg-TEQ/g、Sample 2 が 0.0073、0.015、0.0045、0.00083、0.028 pg-TEQ/g であり、CV 値はそれぞれ Sample 1 が 8.6～20.6 %、Sample 2 が 12.2～20.2 %であった。結果として各分析機関の測定値は概ね一致し、ばらつきは少なく良好であった。一方、濃度を抽出脂肪重量あたりに換算すると、脂肪抽出量のばらつきが上乗せされ、全血重量当たりで表示した場合と比べて CV 値は高くなった（表 2）。し

かしZスコアによる評価では、脂肪重量あたりの濃度であってもSample 1、2ともにZ=±2を超えた機関はなく、良好な結果であった。

２．2018年度油症一斉検診受診者の血液中ダイオキシン類濃度

2018年度の血液中ダイオキシン類測定対象者は320名（内訳：認定患者195名及び未認定者125名）であり、2017年度の283名に比べて37名増加していた。2007年度以降、ダイオキシン類測定対象者数は初回受診者と認定患者で過去3年以内に測定歴の無い受診者とされており、4年周期で多くなる傾向がある。2018年度はそのピークに当たり測定件数が増大したものである。また、未認定者は2017年度と比べて10名減少した。これは2012年12月に油症診断基準に同居家族条項が追加され、一部の未認定者が同居家族条件による認定を受けたことが要因と考えられる。

表3に2018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、ならびに2004年度に福岡県内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。

認定患者全体（195名）の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は69 pg/g-fatとなり、2,3,7,8-TeCDD毒性等価係数(WHO-2006)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48 pg TEQ/g-fatであった。このうち検診認定者(171名)の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は77 pg/g-fatとなり、Total TEQの平均濃度は51 pg TEQ/g-fatであった。一方、同居認定者（24名）の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は18 pg/g-fatであり、Total TEQの平均濃度は28 pg TEQ/g-fatであった。未認定者125名の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は13 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は24 pg TEQ/g-fatであった。

2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度を対照群の一般住民と比較すると、検診認定者の平均濃度は一般住民に対して4.5倍高く、同居認定者や未認定者は一般住民とほぼ同等の濃度であった。

表4に2,3,4,7,8-PeCDF濃度の度数分布を示した。同居認定者と未認定者は検診認定者と比べて低濃度域に分布しているが、油症診断基準で「高い濃度」に区分される50 pg/g-fatを超える受診者が同居認定者で1名、未認定者で3名認められた。

３．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

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、得られたドッキングポーズからPCB異性体の骨格構造における水酸化標的部位を調査した。その結果、ヒトの血中で主要に検出され、油症患者の血液においても報告されている4-OH-CB107、4-OH-CB146、4-OH-CB187について、親化合物として予測されるPCB異性体からの生成経路に関与するCYP分子種を推定することができた（図1)。

高分解能GC/MSを用いて2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (PCB183)の鏡像異性体(キラル体)を分析した。その結果、標準試薬中では右旋性(PCB183(+))のものと左旋性のもの(PCB183(-))が1:1のラセミの状態で存在するのに対し、血液中ではPCB183(+)の方が存在割合が大きかった（図2)。このことか

ら、人体において PCB183(+)の方が PCB183(-)よりも蓄積されやすいと考えられた。

D．結論

少量(約5グラム)の血液から2,3,4,7,8-PeCDF を含むダイオキシン類を定量する分析技術と体制を維持し，継続して測定を行ってきた。測定データの信頼性を確保するためにブランク試験、内部精度管理を実施し、国内の分析機関と共通の血液試料を分析する精度管理を行った。

2018年度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。検診認定者における2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 77 pg/g-fat 、Total TEQの平均濃度は51 pg TEQ/g-fat であった。同居認定者における2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は18 pg/g-fatであり、Total TEQ の平均濃度は 28 pg TEQ/g-fat であった。未認定者 125 名の2,3,4,7,8-PeCDF 平均濃度は13 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は24 pg TEQ/g-fatであった。多くの同居認定者及び未認定者の血液中ダイオキシン類濃度は一般人と同等のレベルであったが、油症診断基準で「高い濃度」に該当する受診者も少数認められた。2001 年度から 17 年間継続している血液中ダイオキシン類濃度測定の累計数は約5700件となった。2018年度の測定結果はすでに油症診断データベースへ追加登録されており、臨床症状との関連性解析などに今後活用される。

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、*in silico* 解析を用いたPCBとCYPのドッキングシミュレーションによるPCB代謝能を調査し、血中で検出される主要な水酸化PCB異性体の生成に関与するCYP分子種を推定することができた。油症患者血液中の2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (PCB183) 鏡像異性体(キラル体)を分析した結果、人体において PCB183(+)の方がPCB183(-)よりも蓄積されやすいことが示唆された。

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）堀就英、安武大輔、平川博仙、戸高尊、広瀬勇気、新谷依子、梶原淳睦、香月進、三苫千景、古江増隆, 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と傾向(2001～2017年度)、福岡医学雑誌、2019. 110(2). 61-66.

２）酒谷圭一、安武大輔、高橋浩司、堀就英、梶原淳睦、香月進、中野武、三苫千景、古江増隆、油症一斉検診における血液試料中の 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl (PCB183) のキラル分析、福岡医学雑誌、2019. 110(2). 91-96.

３）Hirakawa, S, Miyawaki, T, Hori, T, Kajiwara, J, Katsuki, S, Hirano, M, Yoshinouchi, Y, Iwata, H, Mitoma, C, Furue, M, *In silico* prediction of the metabolism of PCB congeners by Cytochrome P450 isozymes in Yusho patients. Organohalogen Compounds, 2019. 81. 171-174.

４）Sakatani, K, Yasutake, D, Takahashi, K, Hori, T, Nakano, T, Mitoma, C,

Furue, M, Enantiomeric analysis of 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl in the blood of Yusho patients, Organohalogen Compounds, 2019. 81. 25-28.

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（2018 年度）、第 28 回環境化学討論会（さいたま市）、2019 年 6 月 12-14 日.

２）Hirakawa, S, Miyawaki, T, Hori, T, Kajiwara, J, Katsuki, S, Hirano, M, Yoshinouchi, Y, Iwata, H, Mitoma, C, Furue, M, *In silico* prediction of the metabolism of PCB congeners by Cytochrome P450 isozymes in Yusho patients. 39TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM HALOGENATED PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, Kyoto, Japan, 2019 August.

３）Sakatani, K, Yasutake, D, Takahashi, K, Hori, T, Nakano, T, Mitoma, C, Furue, M, Enantiomeric analysis of 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl in the blood of Yusho patients, Kyoto, Japan, 2019 August.

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　共通血液試料中のダイオキシン類測定結果（全血重量当たり、pg/g-whole）

		分析機関						平均値	CV%
		A	B	C	D	E	F		
Sample 1	Total PCDDs TEQ	0.0037	0.0061	0.0060	0.0044	0.0041	0.0047	0.0052	20.6
	Total PCDFs TEQ	0.0017	0.0024	0.0022	0.0028	0.0031	0.0039	0.0026	15.0
	Total non-*ortho* PCBs TEQ	0.0017	0.0019	0.0022	0.0019	0.0017	0.0026	0.0019	10.2
	Total mono-*ortho* PCBs TEQ	0.00022	0.00026	0.00023	0.00022	0.00021	0.00022	0.00023	8.6
	Total TEQ	0.0074	0.011	0.011	0.0093	0.0091	0.011	0.010	9.6
Sample 2	Total PCDDs TEQ	0.0059	0.0058	0.0094	0.0077	0.0076	0.0060	0.0073	20.2
	Total PCDFs TEQ	0.013	0.015	0.018	0.014	0.015	0.017	0.015	12.2
	Total non-*ortho* PCBs TEQ	0.0043	0.0050	0.0053	0.0041	0.0040	0.0043	0.0045	12.3
	Total mono-*ortho* PCBs TEQ	0.00080	0.00101	0.00080	0.00079	0.00074	0.00074	0.00083	12.6
	Total TEQ	0.024	0.027	0.034	0.027	0.027	0.028	0.028	12.5

表２　共通血液試料中のダイオキシン類測定結果（単位：pg/g-fat）

		分析機関						平均値	CV%
		A	B	C	D	E	F		
Sample 1	Total PCDDs TEQ	1.2	1.8	2.1	1.3	1.1	1.6	1.5	28.6
	Total PCDFs TEQ	0.57	0.72	0.77	0.85	0.82	1.4	0.75	14.6
	Total non-*ortho* PCBs TEQ	0.55	0.58	0.76	0.57	0.48	0.89	0.59	17.5
	Total mono-*ortho* PCBs TEQ	0.072	0.079	0.079	0.065	0.058	0.080	0.071	12.7
	Total TEQ	2.4	3.2	3.7	2.8	2.4	4.0	2.9	18.8
Sample 2	Total PCDDs TEQ	1.7	1.5	3.5	2.9	2.1	2.0	2.3	36.0
	Total PCDFs TEQ	3.7	3.7	6.7	5.4	3.9	5.3	4.7	28.8
	Total non-*ortho* PCBs TEQ	1.2	1.2	1.9	1.5	1.1	1.4	1.4	24.6
	Total mono-*ortho* PCBs TEQ	0.23	0.25	0.30	0.30	0.20	0.23	0.25	16.6
	Total TEQ	6.9	6.7	12	10	7.2	8.9	8.7	29.0

表３　2018 年度血液中ダイオキシン類濃度調査結果（2018 年、単位：pg/g-fat）

	2018年検診結果								一般住民			
	認定患者(N=195)				未認定者(N=125)				(2004年, N=127)			
Congeners	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
2,3,7,8-TCDD	1.3	0.94	ND	6.1	1.3	1.12	ND	6.3	1.9	0.84	ND	4.3
1,2,3,7,8-PeCDD	6.9	4.7	ND	40	5.4	4.3	ND	23	9.0	3.4	3.2	20
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.9	2.4	ND	13	3.2	2.9	ND	22	3.6	1.9	ND	13
1,2,3,6,7,8-HxCDD	30	25	ND	140	15	11	2.2	63	28	11	7.3	70
1,2,3,7,8,9-HxCDD	4.0	3.4	ND	19	4.8	4.6	ND	36	4.5	2.8	ND	16
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	41	35	2.8	270	50	59	6.6	440	78	55	18	470
OCDD	500	420	60	3300	530	780	53	6900	1200	640	180	7600
Total PCDDs	590	460	74	3600	610	850	73	7400	1300	1000	210	8200
2,3,7,8-TCDF	3.1	2.8	ND	27	2.9	7.4	ND	78	1.0	0.72	ND	4.5
1,2,3,7,8-PeCDF	1.4	0.9	ND	4.1	1.2	0.94	ND	6.2	0.67	0.55	ND	4.6
2,3,4,7,8-PeCDF	69	99	3.3	590	13	13	1.2	79	17	7.7	6.0	63
1,2,3,4,7,8-HxCDF	12	18	ND	120	3.3	3.3	ND	24	5.0	2.7	ND	20
1,2,3,6,7,8-HxCDF	6.6	6.6	ND	48	3.4	3.5	ND	27	5.7	2.6	ND	16
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.1	0.54	ND	5.0	1.2	0.64	ND	5.6	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	1.8	1.4	ND	9.3	1.6	1.2	ND	8.0	2.2	2.1	ND	14
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND				ND				ND			
OCDF	ND				ND				2.1	1.4	ND	18
Total PCDFs	99	120	12	730	30	22	10	150	37	14	15	86
344'5-TCB(81)	5.2	1.2	ND	15	5.3	1.7	5.0	17	5.6	2.3	ND	24
33'44'-TCB(77)	11	7.3	ND	41	10	5.8	5.0	27	8.4	4.8	ND	31
33'44'5-PenCB(126)	80	69	ND	380	70	89	5.0	567	110	80	17	520
33'44'55'-HxCB(169)	140	110	11	700	69	74	5.0	371	64	27	16	190
Total Non-*ortho* PCBs	230	160	30	900	160	160	20	940	190	110	59	740
Total	920	580	120	3800	800	950	110	7700	1600	1000	290	8500
PCDDs-TEQ	12	7.6	1.4	44	9.7	7.4	1.6	46	16	5.9	5.1	35
PCDFs-TEQ	23	32	1.5	190	5.1	4.6	0.85	27	6.6	2.5	2.3	14
Non-*ortho* PCBs-TEQ	12	8.9	0.82	49	9.1	11	0.65	67	13	8.6	2.6	58
Total TEQ	48	41	6.0	250	24	21	3.1	120	37	16	12	100

表４　血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度（脂肪重量当たり）の度数分布

2,3,4,7,8-PeCDF 濃度範囲（pg/g）			検診認定者	同居認定者	未認定者
以上		未満			
500	～	600	2	-	-
400	～	500	3	-	-
300	～	400	6	-	-
200	～	300	5	-	-
100	～	200	27	-	-
90	～	100	3	-	-
80	～	90	6	-	-
70	～	80	4	-	1
60	～	70	5	1	1
50	～	60	6	-	1
40	～	50	12	1	3
30	～	40	17	3	6
20	～	30	15	3	11
10	～	20	30	7	32
0	～	10	30	9	70
		人数計	171	24	125

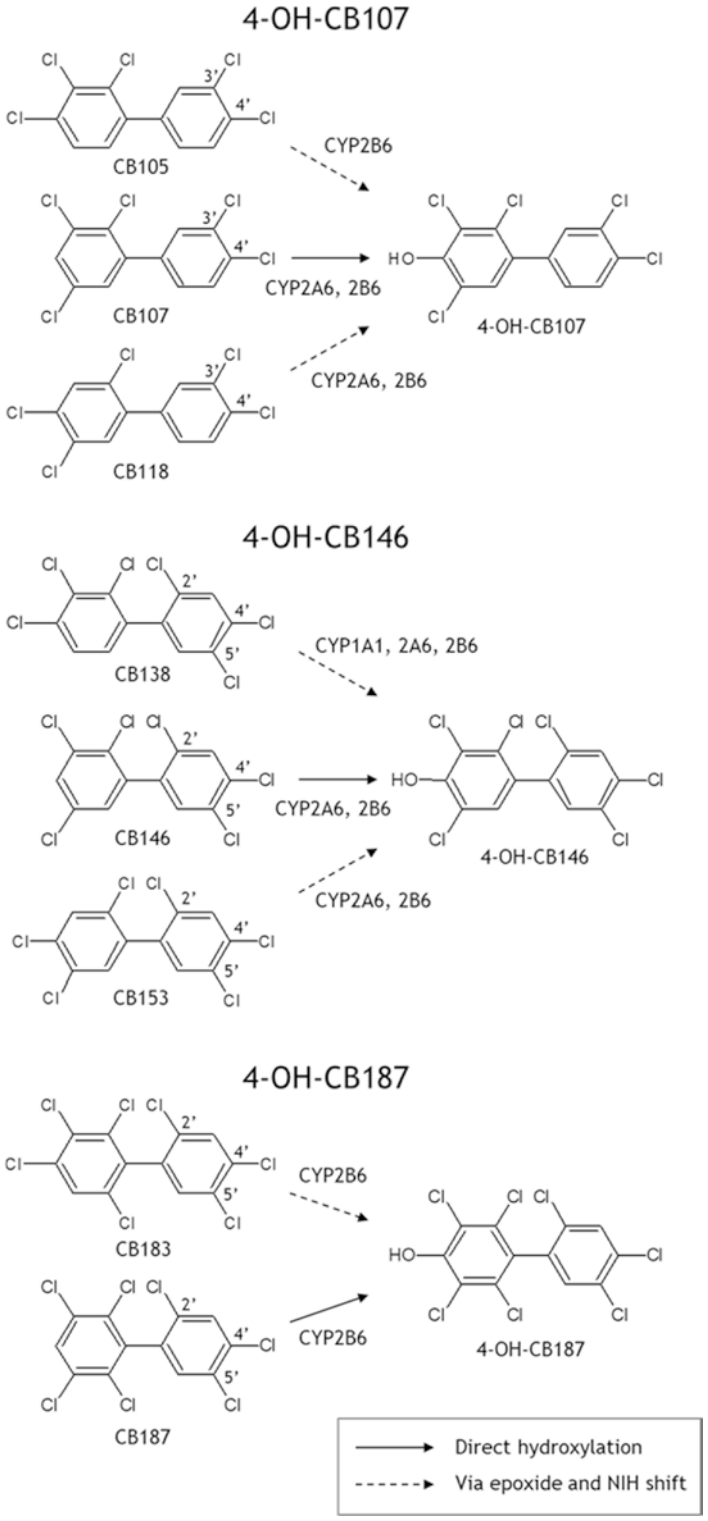


図１　4-OH-CB107、4-OH-CB146 及び 4-OHCB187 の予測生成経路

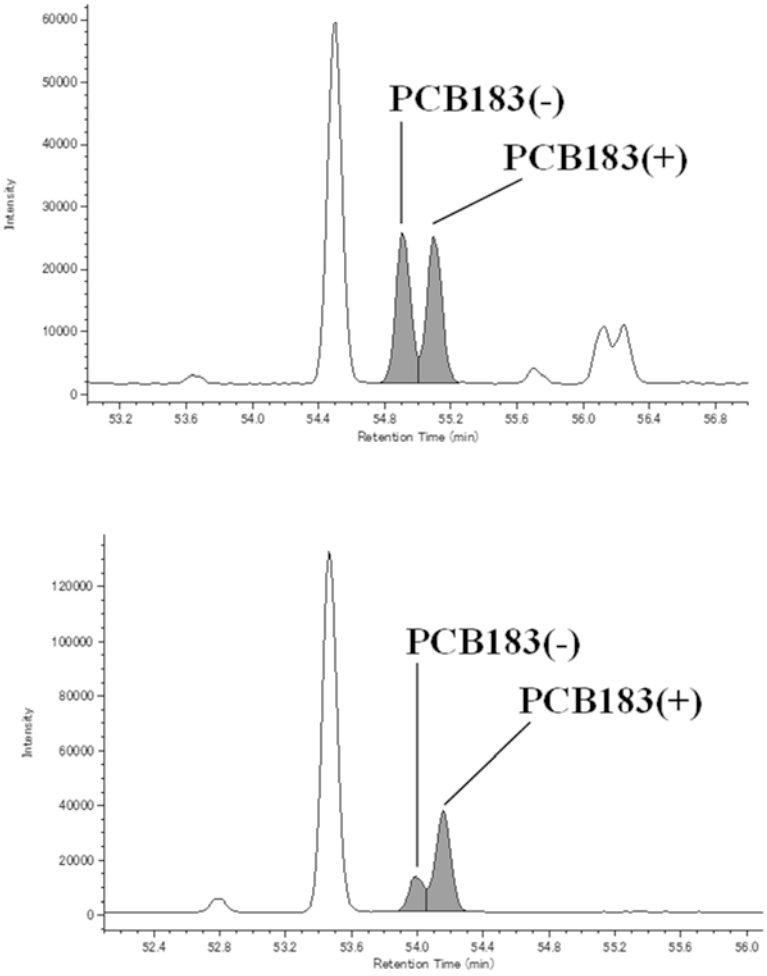


図２　標準試薬（上図）及び血液（下図）における 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl（PCB183）鏡像異性体（キラル体）のクロマトグラム

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
令和元年度　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）

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。2019 年度は、2015 年に福岡県久山町の環境調査を受診した住民 495 人のうち、心機能障害マーカである血清 NT-proBNP を測定した 455 人において、血中 2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP の関係を横断的に検討した。その結果、2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP との間に明らかな関連は認められなかった。

A. 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。

血清 NT-proBNP は、無症候性の心機能障害のマーカとして注目されているが、地域住民においてダイオキシン類と血清 NTproBNP 値との関係を検討した研究は少ない。そこで、本年度は 2015 年度に地域一般住民 495 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心機能障害マーカである血清 NT-proBNP の関連について検討した。

B. 研究方法

本研究では、2015 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臨床情報の収集を行った。

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。

血清 NT-proBNP の測定は、2012 年に健診時に採取した保存血清を用いて測定した。血清 NT-proBNP 濃度は、Elecsys proBNP Immunoassay を用いて測定した。血清 NT-proBNP≧400 pg/ml を無症候性心機能障害と定義した。

本研究では、2015 年に本ダイオキシン研究への参加者 495 人のうち、2012 年に血清 NT-proBNP を測定した 455 人において、血中 2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP の関係を横断的に検討した。幾何平均値の解析には共分散分析を、無症候性心機能障害を有するオッズ比（OR）の解析にはロジスティック回帰分析を用い、性、年齢を交絡因子として調整した。

（倫理面の配慮）

本研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に基づき研究計画書を作成し、九州大学医学研究院倫理委員会の承認を得て行われた。研究者は、対象者の個人情報の漏洩を防ぐうえで細心の注意を払い、その管理に責任を負っている。

C．研究結果

血清 2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度の上昇に伴い、血清 NT-proBNP の幾何平均値は有意に上昇したが、この関係は性年齢調整後に消失した（表 1）。さらに、無症候性心機能障害の OR を血清 2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度別に検討したが、血清 2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と無症候性心機能障害を有する OR の間に有意な関連を認められなかった（表 2）。

D．考察

本研究では、血清 2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP 値の間に有意な関連を認めなかった。12 のコホート研究の統合解析において、血清ダイオキシン類濃度の上昇に伴い虚血性心疾患による死亡のリスクが上昇するとの報告が見られるが、研究間でその結果は一致していない（Environ Health Perspect 2008,116:1443）。また、測定しているダイオキシン類やその測定法も統一されていない。本研究では、地域一般住民を対象としているため、血清 NT-proBNP 値を用いた無症候性の比較的軽度の心機能障害を評価項目にしたため、明らかな関係が認められなかったのかもしれない。

E．結論

地域高齢住民において、血清 2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP 値の間に有意な関連を認めなかった。

F．健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asada M, et al. ○Serum lipopolysaccharide -binding protein levels and the incidence of cardiovascular disease in a general Japanese population: the Hisayama Study. J Am Heart Assoc. 2019; 8: e013628.
2. Nagata T, et al. ○NT-proBNP and risk of dementia in a general Japanese elderly population: the Hisayama Study. J Am Heart Assoc. 2019; 8: e011652.
3. Hata J, et al. ○Association between serum beta-alanine and risk of dementia. Am J Epidemiol. 2019; 188: 1637-1645.
4. Ninomiya T, et al. ○Serum ethylamine lLevels as an indicator of l-theanine consumption and the risk of type 2 dDiabetes in a general Japanese population: the Hisayama Study. Diabetes Care. 2019; 42: 1234-1240.
5. Yoshida D, et al. ○Dairy consumption and risk of functional disability in an elderly Japanese population: the Hisayama Study. Am J Clin Nutr. 2019; 109: 1664-1671.
6. Inaishi J, et al. ○Association between genetic risk and development of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama Study. J Clin Endocrinol Metab. 2019; 104: 3213-3222.
7. Ohara T, et al. ○Serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2 as a biomarker for incident dementia: the Hisayama Study. Ann Neurol. 2019; 85: 47-58.

2. 学会発表

1. Nagata T, Ohara T, Hata J, Sakata S, Furuta Y, Yoshida D, Honda T, Hirakawa Y, Ide T, Kanba S, Kitazono T, Tsutsui H, Ninomiya T. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and risk of dementia in a general Japanese elderly population: the Hisayama Study. 第 83 回日本循環器学会学術集会, 横浜市, 2019.3

H. 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

表 1: 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度別にみた血清 NT-proBNP の幾何平均値

2,3,4,7,8-PeCDF (pg/g lipid)	対象者数	血清 NT-proBNP の幾何平均値(95%信頼区間)(pg/mL)	
		無調整	性年齢調整
第 1 分位 (≦8.5)	151	40.1(35.7-45.0)	49.2(43.4-55.7)
第 2 分位 (8.6-13.3)	152	43.8(39.0-49.1)	43.4(38.9-48.5)
第 3 分位 (≧13.4)	152	53.6(47.7-60.1)	44.0(38.9-49.8)
傾向性 p 値		<0.0001	0.27

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。

表 2: 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度別にみた血清 NT-proBNP≧400 pg/ml を有するオッズ比

2,3,4,7,8-PeCDF (pg/g lipid)	対象者数	頻度(%)	オッズ比 (95%信頼区間)	
			無調整	性・年齢調整
第 1 分位 (≦8.5)	151	0.7	1.00 (基準)	1.00 (基準)
第 2 分位 (8.6-13.3)	152	2.6	4.05 (0.45-36.70)	2.52 (0.25-25.11)
第 3 分位 (≧13.4)	152	0.7	0.99 (0.06-16.03)	0.30 (0.02-5.85)
傾向性 p 値			0.99	0.99

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。

分担研究報告書

油症患者の血液中ダイオキシン類分析におけるナローボアカラムの検討

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
梶原淳睦　　公益財団法人北九州生活科学センター　参事
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
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　近年、世界各地でヘリウムガスの需要が高まり、日本への供給が制限されています。ヘリウムガスをキャリアーガスとして用いる測定では、その対策として極力消費量を抑える、もしくは代替ガスへの変更などの対策が必要になってきています。高分解能質量分析装置によるダイオキシン類の分析に関しては、代替ガスによる分析は不可能です。今回、昨年検討した分析カラムよりも内径の細いナローボアカラムを用いて分析条件を確立した上で、ダイオキシン類異性体の分離および S/N 比の改善に関して検討を行った。その結果、感度面における大きな改善は見られなかったが、分析時間が 40 分程度となり、測定時間が 20 分短縮可能となった。今後もヘリウムガスの供給が制限された場合、本法はヘリウムガスの消費を抑制できるので非常時の対策として有効である。

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す。油症の発生から 50 年以上経過していますが、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ます。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ました。

昨年度、油症患者血液中ダイオキシン類の分析方法に関して、従来測定に使用していた分析カラムと固定相が異なるカラムを検討したことにより、すべてのダイオキシン類異性体でピーク強度が向上し、高い S/N 比が得られた[1)]。さらに高精度および高感度な分析を行うために、検討した分析カラムよりも内径の細いナローボアカラムを用いて分析条件を確立した上で、ダイオキシン類異性体の分離および S/N 比の改善に関して検討を行う。

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)。昨年度、Agilent Technologies の VF-5ms(5%フェニルメチ

ルカラム）を従来使用していた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 種類を製造依頼して、ダイオキシン類異性体の S/N の改善に関して検討を行った。今回、昨年検討した分析カラムより内径の細いサイズ(20m×0.10mm)で、膜厚 0.05、0.10 および 0.15μm の 3 種類を製造依頼した。

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 （SCLV, 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。

（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

油症患者の血液中ダイオキシン類の分析は、胃袋型インサートを備えた大量注入法と SCLV injection system を連結して行っています[2)]。 SCLV システムは圧力バランスによって制御され、適正な圧力バランスを維持することで、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、分析目的成分もロスなく分析カラムに導入することが可能です。今回、カラム内径や長さの変更に伴い、SCLV 作動時における圧力バランスの条件を再検討する必要性が生じた。今回使用するカラム接続時における真空状態からヘリウムガス流量を推定し、圧力バランスの確認を行いながら、SCLV 作動時における至適条件を確立した（図 2)。この条件下で膜厚 0.25μm のプレカラム(7m×0.25mm)を用いて、ダイオキシン類異性体の溶出パターンおよび S/N 比に及ぼす分析カラムの膜厚の影響を調べた。分析カラム(20 m×0.10 mm)として膜厚 0.05、0.10 および 0.15μm 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から算出した S/N 比を比較した。各異性体の S/N 比に関しては、膜厚が薄いカラムの方が、ピーク強度が高く、高い S/N 比が得られていた。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 S/N 比が低く、カラムブリードによるノイズの影響が顕著であった。今回検討した分析カラムの中で、膜厚 0.05μm 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。このカラム使用時に得られたダイオキシン類異性体の各 S/N 比の値を昨年検討した分析カラムの値と比較した結果、S/N 比に大きな差は認められなかった（図 3)。

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、昨年度、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 の改善に関して検討を行った。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(7 m×0.25 mm)および分析カラムとして膜厚 0.20μm(30 m×0.15 mm)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。今回、昨年検討した分析カラムよりも内径の細いナローボアカラムを用いて分析条件を確立した上で、ダイオキシン類異性体の分離およびS/N比の改善に関して検討を行った。その結果、感度面における大きな改善は見られなかったが、分析時間が40分程度となり、測定時間が20分短縮可能となった。

近年、ヘリウムガスは世界的な需給の逼迫により、日本への供給が制限されています。ヘリウムガスをキャリアーガスとして用いる測定では、その対策として極力消費量を抑える、もしくは代替ガスへの変更などの対策が必要になってきています。高分解能質量分析装置によるダイオキシン類の分析は、超高真空の条件下で測定を行う必要があるので、キャリアーガスとして水素ガスを用いることはできません。一方窒素ガスは安全性の高いガスでありますが、キャリアーガスとして用いた場合、ダイオキシン類異性体の検出感度が低下し、異性体の分離も良好でないため、これら代替ガスによるダイオキシン類の分析は不可能です。

今後もヘリウムガスの供給が制限された場合、今回行ったナローボアカラムを用いた血液中ダイオキシン類の分析法は測定時間を短縮でき、ヘリウムガスの消費を抑制できるので非常時の対策として有効である。

E．研究発表

１．論文発表

1) Todaka T, Hirose Y, Kamiharaguchi N, Kajiwara J, Chijiwa K,Ikeda M, Takao Y, Mitoma C,Furue M. Comparison of the concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in the blood of Yusho patients measured in 2004 with those measured in 2014. Fukuoka Igaku Zasshi, 2019 May; 110(2): 73.

２．学会発表

1) 広瀬勇気,戸高尊,上原口奈美,千々和勝己, 池田光政, 三苫千景, 古江増隆:血液中ダイオキシン類分析におけるナローボアカラムの検討、第 28 回環境化学討論会(埼玉)、2019 年 6 月 12-14 日。
2) Todaka T, Hirose Y, Kamiharaguchi N, Kajiwara J, Chijiwa K, Ikeda M, Takao Y, Mitoma C , Furue M : The changes in the concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in the blood of Yusho patients from 2004 to 2014, Dioxin 2019 KYOTO, August 25-30, 2019.

F．知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

1) 広瀬勇気、戸高尊、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.
2) Todaka T, *et al.* Development of a Newly Large-Volume Injection System for Dioxin Determinations in Blood of Yusho Patients. Fukuoka Acta Medica 2013; 104(4).

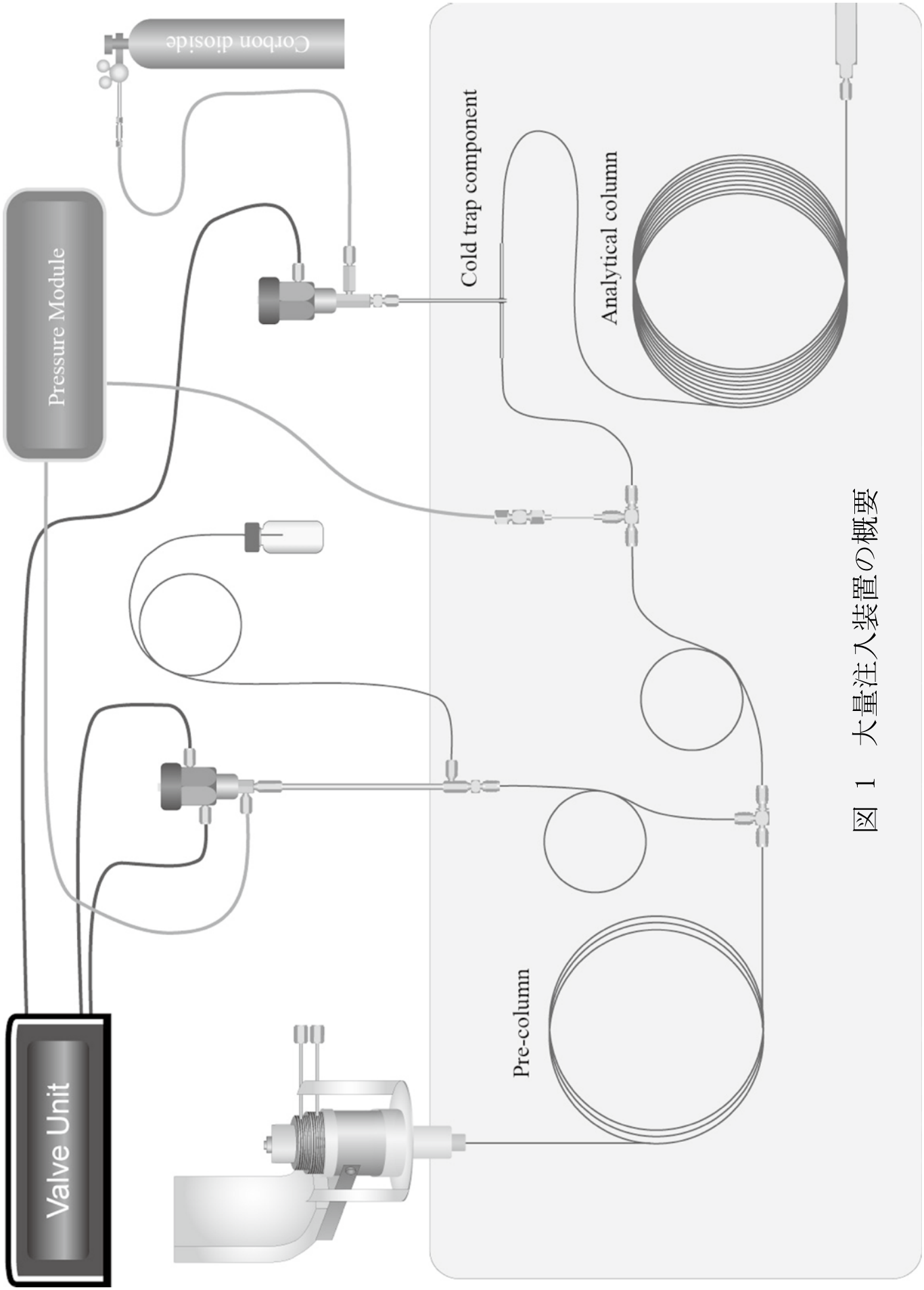


図 1　大量注入装置の概要

図2　ガスクロマトグラフィーの測定条件

Pre-column	VF-5ms (7m×0.25mm I.D., 0.25μm, Agilent Technologies)				
Analytical column	VF-5ms (20m×0.10mm I.D., 0.05μm, Agilent Technologies)				
		Rate (℃/min)	Temperature (℃)	Hold (min)	Total (min)
Oven temperature					
			160	3.75	3.75
	1st	40	300	11.00	18.25
	2nd	100	200	0.50	19.75
	3rd	3	260	0.50	40.25
		Rate (kPa/min)	Pressure (kPa)	Hold (min)	Total (min)
Inlet pressure					
			469	3.75	3.75
	1st	440	689	14.00	18.25
	2nd	678	350	1.00	19.75
	3rd	2.4	398	0.50	40.25
		Rate (kPa/min)	Pressure (kPa)	Hold (min)	Total (min)
Auxiliary pressre #1					
			460	3.75	3.75
	1st	424	672	14.00	18.25
	2nd	694	325	1.00	19.75
	3rd	2.4	373	0.50	40.25
		Rate (kPa/min)	Pressure (kPa)	Hold (min)	Total (min)
Auxiliary pressre #2					
			411	18.75	18.75
	1st	141	270	0.50	20.25
	2nd	2.4	318	0.00	40.25
	3rd	1.0	318	0.00	40.25

図3　ダイオキシン類標準液１０fg注入時における各異性体のS/N比

内径	0.15mm	0.10mm	0.10mm	0.10mm
長さ	30m	20m	20m	20m
膜厚	0.20μm	0.05μm	0.10μm	0.15μm
2,3,7,8-TetraCDD	27.9	28.8	19.6	23.8
1,2,3,7,8-PentaCDD	18.9	19.2	12.2	7.7
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	8.9	6.1	5.9	2.7
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	9.7	6.7	6.8	3.2
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	9.3	5.5	5.7	2.5
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	19.0	10.1	8.3	5.9
OctaCDD	7.6	7.9	4.1	2.7
2,3,7,8-TetraCDF	26.1	31.5	21.3	19.7
1,2,3,7,8-PentaCDF	35.9	26.1	19.9	13.8
2,3,4,7,8-PentaCDF	35.7	22.6	18.3	12.6
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	13.8	10.0	11.7	7.9
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	13.9	10.3	11.4	8.2
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	12.1	9.7	10.6	6.9
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	8.6	5.7	6.7	3.6
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	19.7	16.3	8.2	6.2
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	13.0	7.8	4.2	3.0
OctaCDF	8.8	4.4	2.8	2.8
344'5-TetraCB(#81)	45.0	58.6	24.9	33.7
33'4'4'-TetraCB(#77)	48.6	59.6	25.1	34.9
33'44'5-PentaCB(#126)	48.9	54.3	38.2	27.7
33'44'55'-HexaCB(#169)	67.9	39.8	29.7	46.7

標準液（250fg)を3回注入し平均値を算出
CDD ： chlorinated dibenzo-*p*-dioxin.
CDF ： chlorinated dibenzofuran.
CB ： chlorinated biphenyl.

分 担 研 究 報 告 書

2,4,6-三塩素置換PCB異性体PCB155のヒト肝チトクロムP450分子種による代謝

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 准教授

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、ヒト肝ミクロゾーム(Ms)およびヒトチトクロム P450 (CYP)分子種による代謝を調べた。まず、ヒト肝 Ms では、ラットやモルモットと同様に、代謝物 M1(3-OH 体)が 1 種類生成され、その生成活性は 0.292 nmol/hr/mg protein であった。次に、4 種類のヒト CYP 分子種（1A2、2A6、2B6、3A4）での検討結果、CYP2B6 のみが M1 を生成し、その活性は 0.702 pmol/hr/pmol であった。以上の結果から、① PCB155 は、ヒト肝 Ms によっても容易に 3-OH 体へと代謝されること、また、② 今回検討したヒト CYP のうち、CYP2B6 のみが、3-OH 体への強い代謝活性を有していること、が明らかになった。

A. 研究目的

PCB異性体のうち、2,4,5-三塩素置換ベンゼン（以下245型とする）あるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有するもの、すなわち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)などは高残留性PCBとして知られており、ヒト血液中や肝臓中において高濃度で検出されている。

当研究室ではこれまでに、2,4,6-三塩素置換ベンゼン(以下246型とする)を有するPCB182の代謝を、ラットとモルモット肝ミクロゾーム(Ms)を用いて調べ、①両動物ともに代謝物3'-OH体を生成すること、さらに、②phenobarbital (PB)前処理ラット肝Msが、245型のPCB187、PCB183およびPCB180に比べ、10～50倍もの高い代謝活性を示すことを明らかにした。さらに、246型のPCB188の代謝を調べ、PCB182と同様に、容易に3'-OH体へと代謝されることを明らかにした。実際、246型のPCB異性体は6～7塩素化PCBであるにもかかわらず、ヒト組織でほとんど検出されていない。この理由として、非常に代謝されやすいからであろうと考えられる。昨年度はさらに、246 型 の 2,2',4,4',6,6'-hexachlorobiphenyl (PCB155)を用い、ラットとモルモット肝Msによる代謝を調べた。その結果、①両動物ともに代謝物3-OH体が1種類生成されること、②両動物ともに3-OH体の生成はPB前処理で促進されること、③3-OH体の生成活性はラットではるかに高いこと、が明らかになった。そこで本年度は、ヒト肝Msおよびこれまでに PCB代謝に関与することが報告されている4種類のヒトチトクロムP450（CYP）、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6およびCYP3A4、を用いて、CB155代謝を調べた。

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 ヒト肝 Ms およびヒト CYP 分子種：ヒト肝 Ms は 20 人から調製されたものを、ヒト CYP（1A2、2A6、2B6 および 3A4）はヒトリンパ芽球様細胞由来のものを、いずれも BD Gentest 社より購入した。③ ヒト肝 Ms およびヒト CYP による代謝：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 $MgCl_2$、ヒト肝 Ms (0.5 mg protein)あるいは各 CYP 分子種(0.5 mg protein)を 100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)あるいは 100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)とともに合計 0.5 mL として、37℃で 60 min インキュベートした。反応後、反応液に chloroform-methanol (2:1) 0.5 mL と n-hexane 1.5 mL を加えボルテックスで振とう抽出した。抽出は 3 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-ECD で分析した。GC-ECD の測定条件は次の通りである。分析機器、Agilent 7890B（Agilent 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、N_2 (1 mL/min);カラム温度、210℃;注入口温度、250℃;検出器温度、300℃。

（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、ラットおよびモルモットの屠殺に際し、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

ヒト肝 Ms による代謝:PCB155 を、NADPH 存在下、好気的にヒト肝 Ms とともに、37℃、60 min 反応させた。その結果、Fig. 1 に示すように、昨年度ラットおよびモルモット肝 Ms により生成された M1（3-OH 体）がヒト肝 Ms でも生成され、PCB155（保持時間 3.81min）に続き、保持時間 5.58min に検出された。

次に、M1 の定量であるが、昨年度は、GC-ECD が修理不能のため、GC-MS を用いて定量し報告した。今年度は新たに購入した GC-ECD を用いて、ラットおよびモルモット肝 Ms で検討するとともに、ヒト肝 Ms でも検討し比較した(Table 1)。定量は PCB155 の検量線を用いて行った。まず、ラット肝では PB 前処理 Ms でのみ、M1（3-OH 体）が生成され、その活性は 4.662 nmol/hr/mg protein であった。一方、モルモット肝では、M1（3-OH 体）は PB 前処理 Ms で最も多く生成されたものの、その生成活性は 0.193 nmol/hr/mg protein と低いものであった。ただし、ラットで見られなかった未処理および MC 前処理 Ms によっても、それぞれ 0.056 と 0.060 nmol/hr/mg protein の活性を示した。

一方、ヒト肝 Ms では、ラットおよびモルモットと同様に、M1（3-OH 体）の生成が見られたが、その生成活性は 0.292 nmol/hr/mg protein であり、PB 前処理モルモットの 1.5 倍であった。

ヒト肝CYP分子種による代謝:これまでにPCB代謝に関与することが報告されているCYP分子種4種類による代謝を調べた。その結果、CYP1A2、CYP2A6およびCYP3A4では代謝物は全く検出されなかったが、CYP2B6でのみM1（3-OH体）の生成が確認された。その活性は0.702 pmol/hr/pmol CYPと高いものであった(Table 2)。

D. 考察

これまでにPCB155代謝に関して論文が2報出されている。それらによると、PCB155 を経口投与したラットの糞中に 3-OH 体が排泄されること、また、イヌ肝 Ms により、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（4-OH 体や、塩素が1個脱離した OH 体）が生成されることが報告されている。

本研究では、ヒト肝における PCB155 代謝を調べた。その結果、Fig. 2 に示すように、今回初めてヒト肝において、PCB155 が CYP2B6 により、3-OH 体へ代謝されることを明らかにした(Fig. 2)。CYP2B6 の代謝活性もこれまでの PCB 代謝反応のうちで最も高いものであった。

しかしながら、246 型 PCB が、構造的に非常に類似した 245 型 PCB に比べ、なぜ極めて代謝され易いかといった理由はまだ不明であり、今後の課題である。

E. 結論

PCB155は、ラットおよびモルモット肝Msと同様に、ヒト肝Msでも、一水酸化体（3-OH体）へと代謝された。また、PCB代謝活性を有することが報告されている4種類のCYP分子種のうち、CYP2B6のみが3-OH体を生成した。以上のことから、ヒト肝におけるPCB155代謝にはCYP2B6が強く関与す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, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村　治, 遠藤哲也, 古賀信幸, 2,2',3,4',5,6,6'-七塩素化ビフェニル(CB188)のラットおよびモルモット肝ミクロゾームによる代謝. 福岡医誌, **110**(2), 83-90 (2019).

2) Y. Kato, S. Tamaki, K. Haraguchi, S. Ikushiro, Y. Fujii, C. Ohta, K. Atobe, O. Kimura, T. Endo, N. Koga, S. Yamada, M. Degawa, Kanechlor 500-mediated changes in serum and hepatic thyroxine levels primarily occur in a transthyretin-unrelated manner. J. Appl. Toxicol., **39**, 1701-1709 (2019).

3) 山本健太，太田千穂，徳富美沙紀，古賀信幸, 5,7,4′-Trimethoxyflavonoid 類のラット肝ミクロゾームによる代謝ーフラボン類とフラバノン類との比較ー. 中村学園研究紀要, **52**, in press (2020).

4) 太田千穂，山本健太，徳富美沙紀，古賀信幸, レスベラトロールメチル誘導体のラット肝ミクロゾームによる代謝および代謝物の抗酸化活性. 中村学園研究紀要, **52**, in press (2020).

2. 学会発表

1) 太田千穂, 山本健太, 木村　治, 遠藤哲也, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 古賀信幸, マメ科由来メトキシイソフラボン類の代謝と抗酸化性. 第 73 回日本栄養・食糧学会大会（静岡県立大学、静岡）、講演要旨集, p. 321. 令和元年 5 月 17 -19 日.

2) C. Ohta, K. Yamamoto, O. Kimura, T. Endo, Y. Kato, Y. Fujii, K. Haraguchi, N. Koga, Metabolism of luteolin tetramethyl ether with rat liver microsomes. Asian Congress of Nutrition 2019 (Bali, Indonesia) 令和元年 8 月 4～7 日

3) N. Koga, K. Yamamoto, M. Tokutomi, C. Ohta, In vitro metabolism of 3,5,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone by rat liver microsomes. Asian Congress of Nutrition 2019 (Bali, Indonesia) 令和元年 8 月 4～7 日

4) Y. Fujii, T. Nakamura, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, K. H. Harada, A. Koizumi, K. Haraguchi, Seafood in lower trophic level is a possible source of human dietary exposure: perfluorinated carboxylic acids in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Japan. Dioxin 2019 (京都国際会議場, 京都) 令和元年 8 月 26～30 日

5) 山本健太，徳富美沙紀，太田千穂，古賀信幸，5,7,4'-Trimethoxyflavanone のヒト肝ミクロゾームによる代謝. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会（佐賀大・農） 令和元年 10 月 12, 13 日

6) 太田千穂，山本健太，徳富美沙紀，古賀信幸，福岡県産香酸かんきつ木酢（キズ）果皮の機能性成分の分析および抗酸化特性. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会（佐賀大・農） 令和元年 10 月 12, 13 日

7) 太田千穂, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村　治, 遠藤哲也, 古賀信幸, PCB155 の動物肝ミクロゾームによる代謝. 日本薬学会第 140 回年会（京都国際会議場、

京都）令和 2 年 3 月 25～28 日

8) 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 140 回年会（京都国際会議場、京都）令和 2 年 3 月 25～28 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

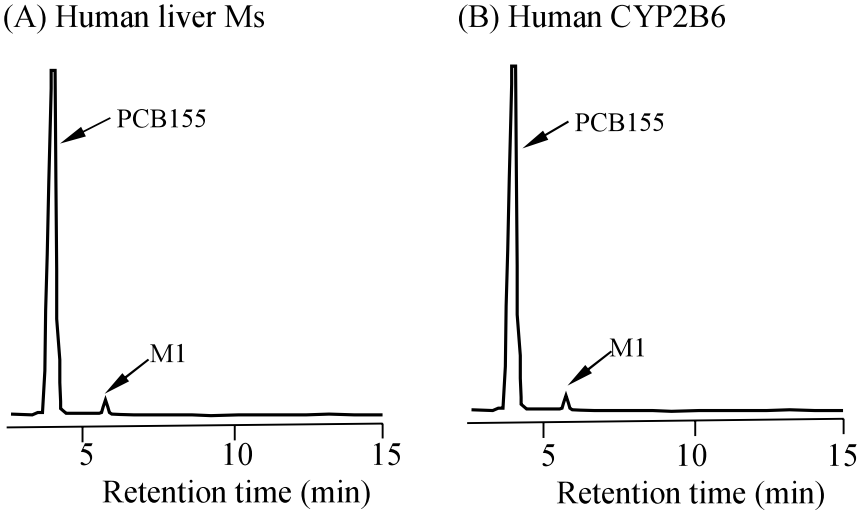


Fig.1 GC-ECD chromatograms of a methylated derivative of PCB155 metabolite produced by human liver Ms (A) and human CYP2B6 (B)

Table 1 Metabolism of PCB155 by liver microsomes of rats, guinea pigs and human

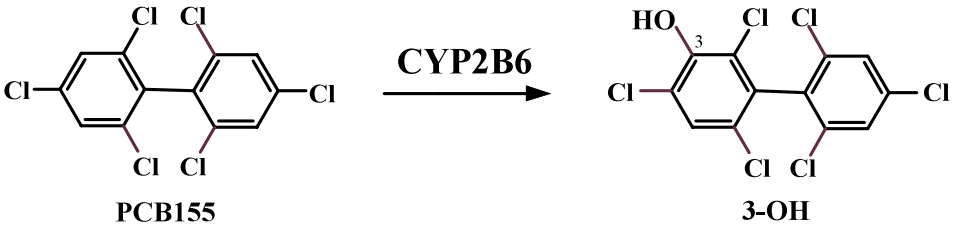
Animal	Treatment	3-OH-PCB155 formed (nmol/hr/mg protein)
Rat	Untreated	N.D.
	PB-treated	4.662 ± 0.201
	MC-treated	N.D.
Guinea pig	Untreated	0.056 ± 0.013
	PB-treated	0.193 ± 0.011
	MC-treated	0.060 + 0.010
Human		0.292 ± 0.017*

N.D., not detected.
Rat and guinea pig liver microsomes were prepared from untreated, PB-treated and MC-treated animals.
Each value represents mean ± S.D. of four animals.
*Value represents mean ± S.D. of three determinations.

Table 2　Metabolism of PCB155 by human CYP isoforms

CYP	3-OH-PCB155 formed (pmol/hr/pmol CYP)
1A2	N.D.
2A6	N.D.
2B6	0.702 ± 0.024
3A4	N.D.

N.D., not detected.
Each value represents the mean ± S.D. of three determinations.



PCB155　　3-OH

Fig. 2　Postulated metabolic pathway of PCB155 in human liver

分担研究報告書

母親の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と子供の症状の関係に関する研究

分担研究者　赤羽　学　国立保健医療科学院　医療・福祉サービス研究部　部長
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　母親が摂取したダイオキシン類は、胎盤や母乳を通して、子供に移行するが、子供は摂取したとしても成長期に体重が増加するため成長後の濃度は一般人と同等のレベルまで低下すると考えられる。そこで本研究では、母親のダイオキシン類濃度と子供の症状の関係に着眼して分析を行った。母親の濃度と子供の測定項目のうち骨関連のマーカーの「MMP-3」が関係の強い項目として見つかった。しかし、同系統の他項目と比較して突出していることから、偶然の可能性も考えられた。

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排出に長期間を要する。女性が体内に取り込んだ後に出産する場合には、経胎盤や経母乳的に子供に移行することが知られている[1]。直接曝露した患者よりは曝露量は少なく、その後の成長による体重増加により体内のダイオキシン類濃度は減少し、一般人の濃度とほとんど変わらなくなると考えられる。しかし、一般人と比較して濃度の高い期間があることにより、何らかの影響が存在したことが疑われる。

本研究では、母親の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が子供にどのような影響を与えているかを確認するために、母親の血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と子供の症状の関係を評価することを目的とした。

B．研究方法

B．１．対象患者

油症患者のうち親子関係が特定された患者（243 組）のうち母親 129 名とその子供（男性 94 名、女性 107 名）を対象とした。子供の性と生年による分布を図１に示す。

母親から子供への移行経路による影響を限定するため、経胎盤的に暴露した子供に限定するために、1971 年以降に出産した子供の 103 患者を対象とした（表１）。これを分析①として分析を行った。

分析①の結果を受け成長期の状況が影響している可能性が疑われたため、20 歳以下の子供を除外して、分析②として、1971 年～1995 年に出産した子供の 80 患者を対象とした。表２に対象患者の認定・未認定と性別での分布を示す（表２）。

B．２．解析方法

経胎盤曝露と現在の子供の症状を比較するために、母親の出産時におけるダイオキシン類濃度と比較することが求められるが、母親の出産時の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度は計測されていない。そこで本研究では、出産時に近い油症一斉検診で血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の測定を開始した 2002 年以降の測定結果の中から、最も古い測定結果を当該の患者の濃度とした。

母親の血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の

対数と、子供の油症一斉検診の症状および計測結果の各項目とのピアソンの相関係数を求めた。また、比較のために子供の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と子供の油症一斉検診の症状および計測結果の各項目とのピアソンの相関係数を求めた。

Ｃ．研究結果

Ｃ．１．分析①　母親の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と関係の強い子供の症状項目

表３に母親の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と関係の強い子供の症状項目のうち、対象人数が１５人以上で、相関係数の絶対値が 0.3 以上の項目を示す。

正の相関係数で 1 番大きな値を示したのは、血液検査の「MMP3」で 0.5884 であった。2 番目に大きな値を示したのは、「年齢」で 0.5545 であった。

負の相関係数で 1 番大きな値を示したのは、「P1NP」で-0.5139 であった。2 番目に大きな値を示したのは、「TRACP5b」で-0.4896 であった。

Ｃ．２．分析①　子供の 2,3,4,7,8-PeCDF の対数と強い子供の症状項目

表４に子供の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と関係の強い子供の症状項目のうち、対象人数が 15 人以上で、相関係数の絶対値が 0.3 以上の項目を示す。

相関係数の絶対値が 0.3 以上の項目は４項目であった。最も相関係数が大きな項目は「CB%比」で、0.4354 であった。2 番目に相関係数が大きな項目は「PCB パターン」で 0.3712 であった。

Ｃ．３．分析②　母親の 2,3,4,7,8-PeCDF の対数と強い子供の症状項目

表５に母親の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と関係の強い子供の症状項目のうち、対象人数が 15 人以上で、相関係数の絶対値が 0.3 以上の項目を示す。

正の相関係数で 1 番大きな値を示したのは、血液検査の「MMP3」で 0.6196 であった。2 番目に大きな値を示したのは、「HbA1c」で 0.5629 であった。

負の相関係数で 1 番大きな値を示したのは、「ピーク１_ND」で-0.3858 であった。2 番目に大きな値を示したのは、「ピーク３_ND」で-0.3858 であった。

Ｃ．４．分析②　子供の 2,3,4,7,8-PeCDF の対数と強い子供の症状項目

表６に子供の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と関係の強い子供の症状項目のうち、対象人数が 15 人以上で、相関係数の絶対値が 0.3 以上の項目を示す。

正の相関係数で 1 番大きな値を示したのは、血液検査の「SP-A」で 0.4425 であった。2 番目に大きな値を示したのは、「CB%比」で 0.4097 であった。

負の相関係数で 1 番大きな値を示したのは、「抗 SS-B 抗体」で-0.5309 であった。2 番目に大きな値を示したのは、「喫煙本数」で-0.3818 であった。

Ｄ．考察

分析①の結果として、母親の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と相関係数が大きな項目として、「年齢」「喫煙年数」「MMP」「TRACP5b」が見つかった。「MMP」「TRACP5b」は骨関連のマーカーであるが、骨関連マーカーは成長期と大人において、大きな値を示す。また、「年齢」「喫煙年数」も成長期と大人において傾向を示すため、成長期の影響が疑われた。

分析②では、成長期の子供を除外し、分析を行ったところ、骨関連マーカーの「MMP」が相関係数 0.6196 で、大きな値であった。図２（a）に示す「MMP-3」と母子の濃度の散布図では、右上に４人がいるために相関係数が大きくなっている可能性が高い。この４名のうち１組の兄弟（つまり、母親が同じ）が存在するために、母親 3 名であった。他の骨関連マーカーで相関係数が大きな項目は存在せず、同系統の項目と比較して突出していることに加え、人数が少ないことから偶然の結果である可能性が考

えられた。

「飲酒年数」「喫煙年数」は、「年齢」に関係が強い。また、ダイオキシン類の濃度は年齢と関係が強いことが知られている。「ダイオキシン類の濃度」➔「母親の年齢」➔「子供の年齢」➔「飲酒・喫煙年数」という推移が考えられる。

「HbA1c」「血小板」「白血球」などの血液成分も相関係数が 0.3 以上であった。「HbA1c」は人数が少なかった。また、「血小板」「白血球」は、相関係数は、相関係数がさほど高くないため偶然の可能性が考えられる。

E. 参考文献

1) 口岩俊子, 口岩聡, 森司朗. ″ダイオキシン胎盤・母乳経由暴露に起因する接触逃避行動および対物攻撃行動の思春期発現時期と雌雄差.″ 鹿児島純心女子大学大学院人間科学研究科紀要 8 (2013): 3-10.

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

なし

表１　分析①の対象患者の認定・未認定と性別での分布

	男	女	計
認定患者	9	6	15
未認定患者	39	49	88
計	48	55	103

表２　分析②の対象患者の認定・未認定と性別での分布

	男	女	計
認定患者	9	6	15
未認定患者	26	39	65
計	35	45	80

表３　分析①母親の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と関係の強い子供の症状項目（対象人数 15 人以上、相関係数絶対値 0.3 以上）

検査種類	検査項目	患者人数	母親の 23478PeCDF 濃度の対数との相関係数	子供の 23478PeCDF 濃度の対数との相関係数	標準偏差	歪度	尖度
血液検査	MMP-3	30	0.5884	0.0288	27.7731	0.9700	0.6601
内科	年齢	103	0.5545	0.1848	8.2691	-0.5914	-0.7652
内科	喫煙年数	37	0.5064	-0.1438	6.1081	-0.2787	-1.1488
血液検査	SP-A	28	0.4571	0.2327	12.5068	1.5731	2.7046
血液検査	HbA1c	28	0.4563	0.0406	0.3746	2.6528	9.7101
内科	飲酒年数	32	0.4137	-0.0464	5.3000	-0.0427	-1.1408
血液検査	白血球数	44	0.3876	0.0335	1968.7660	0.5187	-0.0001
血液検査	ｸﾚｱﾁﾆﾝ	115	0.3561	0.1000	0.1643	0.1930	-0.3098
血液検査	スギ Class	55	0.3047	0.2684	1.7774	0.5452	-1.1004
…	…	…	…	…	…	…	…
血液検査	LDH	115	-0.3095	-0.0230	42.4145	1.4733	2.2380
血液検査	SP-D	28	-0.3128	0.2533	26.5164	1.2690	1.1920
血液検査	ﾋﾟｰｸ 3_ND	117	-0.3549	-0.0733	0.4540	0.9344	-1.1468
血液検査	ﾋﾟｰｸ 1_ND	117	-0.3815	-0.0053	0.4743	0.6754	-1.5710
血液検査	ｱﾙﾌｫｽ	101	-0.4182	-0.1231	245.0064	2.3230	4.7403
血液検査	無機リン	113	-0.4185	-0.1534	0.6961	0.9232	0.5345
血液検査	TRACP5b	30	-0.4896	-0.1005	423.3533	3.5569	13.4667
血液検査	P1NP	30	-0.5139	-0.0004	239.0212	3.9487	15.6933

表４　分析①母親の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と関係の強い子供の症状項目（対象人数 15 人以上、相関係数絶対値 0.3 以上）

検査種類	検査項目	患者人数	母親の 23478PeCDF 濃度の対数との相関係数	子供の 23478PeCDF 濃度の対数との相関係数	標準偏差	歪度	尖度
血液検査	CB%比	111	0.1049	0.4354	0.7990	3.0229	10.9914
血液検査	PCB パターン	113	0.2103	0.3712	0.9685	1.4899	0.7386
血液検査	DHEA-S	30	0.2509	0.3510	72.9568	0.1859	-0.6602
血液検査	異型リンパ球	41	0.0249	0.3389	0.3507	3.1345	9.1282

表５　分析②母親の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と関係の強い子供の症状項目（対象人数 15 人以上、相関係数絶対値 0.3 以上）

検査種類	検査項目	患者人数	母親の 23478PeCDF 濃度の対数との相関係数	子供の 23478PeCDF 濃度の対数との相関係数	標準偏差	歪度	尖度
血液検査	MMP-3	22	0.6196	0.2051	26.7651	1.1286	0.9812
血液検査	HbA1c	18	0.5629	0.0468	0.4450	2.2750	6.7609
血液検査	血小板数(旧)	74	0.4984	0.0712	5.6014	0.4093	-0.0671
内科	年齢	80	0.4207	-0.0949	5.1928	-0.5579	0.2014
内科	飲酒年数	32	0.4137	-0.0464	5.3000	-0.0427	-1.1408
血液検査	白血球数	33	0.4076	0.0475	2174.5500	0.4279	-0.4631
血液検査	SP-A	18	0.3889	0.4425	13.9913	1.0469	1.0087
内科	喫煙年数	34	0.3691	-0.2154	5.5772	-0.3202	-1.1133
血液検査	抗ｾﾝﾄﾛﾒｱ抗体	22	0.3508	-0.3379	2.1600	0.2345	1.3171
血液検査	白血球数(旧)	74	0.3337	0.0098	1.8232	0.5856	0.4850
血液検査	抗 SS-A 抗体	21	0.3180	-0.2831	1.9404	4.5199	20.6116
血液検査	スギ Class	38	0.3036	0.2629	1.8571	0.4204	-1.3277
…	…	…	…	…	…	…	…
血液検査	ﾋﾟｰｸ 3_ND	80	-0.3817	-0.1115	0.4400	1.1003	-0.8102
血液検査	ﾋﾟｰｸ 1_ND	80	-0.3858	0.0371	0.4583	0.8896	-1.2402

表６　分析②子供の 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度の対数と関係の強い子供の症状項目（対象人数 15 人以上、相関係数絶対値 0.3 以上）

検査種類	検査項目	患者人数	母親の 23478PeCDF 濃度の対数との相関係数	子供の 23478PeCDF 濃度の対数との相関係数	標準偏差	歪度	尖度
血液検査	SP-A	18	0.3889	0.4425	13.9913	1.0469	1.0087
血液検査	CB%比	75	0.0701	0.4097	0.8736	3.0805	10.6074
血液検査	DHEA-S	22	0.2092	0.3871	66.0171	0.3887	-0.7101
血液検査	PCB パターン	76	0.1970	0.3789	1.0293	1.4449	0.4805
血液検査	異型リンパ球	33	-0.0005	0.3448	0.3554	3.3194	10.4913
…	…	…	…	…	…	…	…
血液検査	高感度 CRP	21	0.0584	-0.3215	2949.3460	1.7330	1.6577
血液検査	抗セントロメア抗体	22	0.3508	-0.3379	2.1600	0.2345	1.3171
血液検査	HCV 抗体	24	0.1671	-0.3549	0.0381	1.2225	2.4958
内科	喫煙本数	34	-0.1727	-0.3818	5.6102	-0.4641	-1.2352
血液検査	抗 SS-B 抗体	21	0.1904	-0.5309	2.1419	3.1315	10.3721

図１　母子が特定された子供の生年と性別の分布

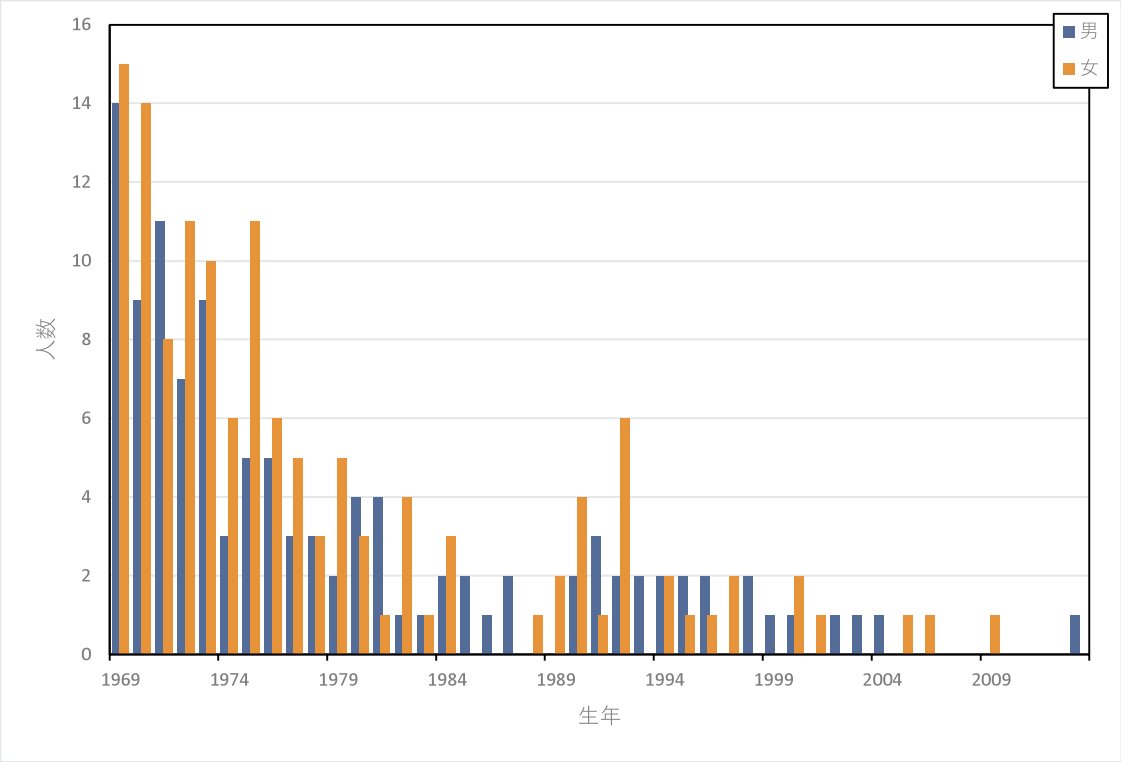
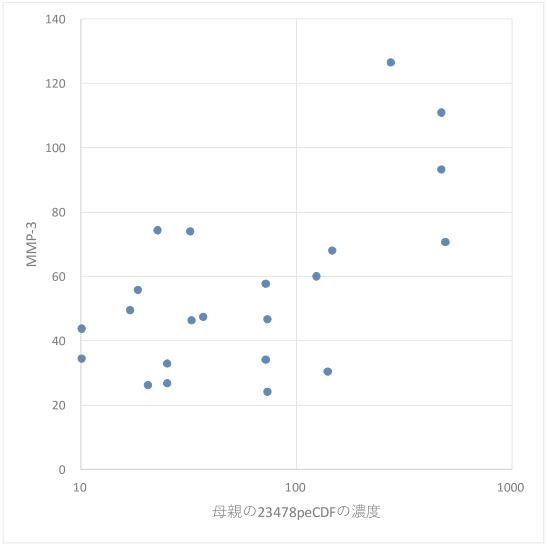
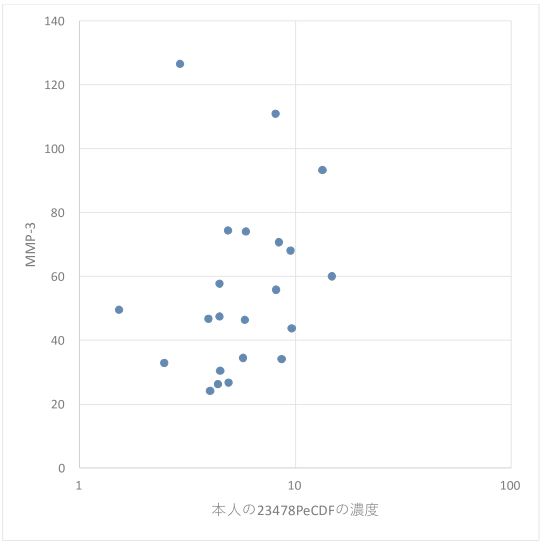


図２　血液検査 MMP-3 と母子の濃度の分布

(a)母親の濃度と散布図



(b)子供の濃度との散布図



分担研究報告書

油症認定患者追跡調査

研究分担者　小野塚　大介　国立循環器病研究センター　疫学研究推進室　室長
研究協力者　中村　優子　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
川上　義仁　九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　テクニカルスタッフ
辻　学　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
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　油症認定患者の生存情報および死亡情報をアップデートし、死亡リスクの再評価を行うことを目的として、油症認定患者を対象とした 50 年間の追跡調査を実施した。その結果、追跡対象者 1,664 名のうち、2017 年 12 月 31 日時点で生存の確認ができた患者が 922 名(55.4%)、死亡の確認ができた患者が 640 名(38.5%)、生死不明の者が 102 名(6.1%)であった。なお、追跡調査はさらに継続中である。

A．研究目的

我々はこれまで、油症認定患者を対象とした 40 年間の追跡調査を実施し、男性の油症患者では全がん、肺がん、肝がんの死亡リスクが一般人より高いことを報告した(Onozuka et al., Am J Epidemiol, 2009)。しかし、その後の追跡調査の結果についてはこれまでに報告されていない。

油症認定患者の予後と死因を長期的に追跡調査し、各種疾病による死亡リスクを評価することは、人体におけるダイオキシン類の長期健康影響を明らかにする上で非常に重要である。

そこで本研究は、追跡期間を 50 年間に延長し、油症認定患者における死亡リスクを再評価することを目的として実施した。

B．研究方法

前回の追跡調査の対象者 1,664 名について、油症認定患者の名簿記録をもとに、それぞれの住所地の各市区町村に対して住民票抄本および戸籍の附票(いずれも除票含む)の交付を依頼した。また、行政機関、油症センター、油症相談員等の関係者から情報収集を行い、生存情報のアップデートを行った。

死亡者の死因については、これまでの調査で死因が不明であった油症認定患者について、油症認定患者の名簿記録と人口動態調査（基幹統計調査）の死亡票との照合による死因の特定を行う必要があることから、当該死亡票の使用について、厚生労働省政策統括官付参事官付審査解析室に申請を行った。

（倫理面への配慮）

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「カネミ油症の実態調査」（許可番号 30-384）の審査を経て実施した。

C．研究結果

追跡対象者 1,664 名のうち、2017 年 12 月 31 日時点の生存が確認できた者が 922 名(55.4%)、死亡の確認ができた者が 640 名(38.5%)、生死不明の者が 102 名(6.1%)であった。ただし、これらの情報のすべてが、住民票抄本等の公文書によって確認で

きたものではないことから、暫定的な数値である。

D．考察

今回、住民票抄本等による公的情報をはじめ、行政機関、油症センター、油症相談員等の関係者に対する調査を実施し、油症認定患者の追跡情報を最新のものにアップデートした。しかし、公的情報による確認が一部できていないことや、生死不明の者が 102 名(6.1%)いることから、今後も追跡調査を継続する予定である

また、死因の特定に必要な人口動態調査（基幹統計調査)の死亡票の使用については、厚生労働省審査解析室及び調査担当室において現在審査中である。今後、死亡票の使用が許可された場合は、今までに死因の特定がなされていなかった死亡患者について、死亡票と照合させることで死因の特定を行うとともに、主要死因別の死亡リスクの解析を行う予定である。

E．結論

油症認定患者の追跡調査を実施した結果、追跡対象者 1,664 名のうち、2017 年 12 月 31 日時点の生存が確認できた者が 922 名(55.4%)、死亡の確認ができた者が 640 名(38.5%)、生死不明の者が 102 名(6.1%)であった。

今後、公的情報等よる追跡調査をさらに継続するとともに、主要死因別の死亡リスクの解析を進めていく予定である。

（謝辞）

本研究の実施にあたり、九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センターの勝野裕子氏、九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野の梶嶋啓子氏、油症相談員の只熊幸代氏と山根美喜子氏に多大なるご協力をいただきましたことを深く感謝いたします。

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

油症患者における歯肉色素沈着と残存歯に関する検討

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　准教授
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多くみられる症状のひとつである。今回、平成 31 年度の長崎県油症検診において、特に上下顎前歯部について口腔粘膜色素沈着および残存歯数について重点的に精査し解析を行った。残存歯数に関しては上顎が平均 4 歯、下顎が平均５歯で、比較的残存歯が多かった。歯肉色素沈着に関しては、上顎では色素沈着がみられた者が 61 名でみられなかった者が 88 名であった。下顎では色素沈着のみられた者が 84 名で、みられなかった者が 65 名であった。今回の結果では、上顎前歯部においては残存歯数と歯肉色素沈着の程度との間に相関性が認められた。今後さらに症例数を増やし他の因子との相関についても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は多彩で、発症当初より、口腔粘膜の色素沈着、永久歯の放出遅延、歯の先天性欠損、高度の歯肉炎や歯周炎の発症などが報告されている。特に口腔粘膜色素沈着は主症状として挙げられている。油症発症当時より現在まで油症検診における油症発症地区の歯科検診として、毎年、歯周疾患やカリエス検査とともに口腔粘膜の色素沈着について検査しているが、現在も多くの患者において歯肉や頬粘膜を中心に色素沈着が認められる。

特に歯肉に色素沈着が認められる傾向にあるため、今回は、上下前歯部の歯肉を重点的に複数の歯科医師で検査し、色素沈着の残存歯との関係について検討した。

B．研究方法

平成 31 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について、3 名の歯科医師で上下顎前歯部歯肉の色素沈着について各歯ごとに検査し、同時に残存歯の確認も行った。それらのデータをもとに色素沈着の程度と残存歯との関係について検討した。

（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 31 年度長崎県油症検診で歯科検診を行った患者で歯科検診を受診し、データの採取が可能であった者を対象者とした。内訳は長崎地区、五島福江、奈留、玉之浦地区の計 149 名であった。性別では男性 80 名、女性 69 名で、年齢別では 29 歳から 89 歳で平均 66 歳であった。残存歯数に関しては上顎が平均 4 歯、下顎が平均５歯であった。歯肉色素沈着に関しては、上顎では色素沈着がみられた者が 61 名、みられなかった者が 88 名であった。下顎では色素沈着のみられた者が 84 名で、みられなかった者が 65 名であった。残存歯数と色素沈着との相関に関しては、下顎では有意差は認められなかったが、上顎では色素沈着の少ないものが歯数も少なく、有意差が認められた。年齢と色素沈着に関しては、下顎においては年齢の高いほど有意に色素沈着が少なかったが、上顎では有意差は認められなかった。

認定の有無と色素沈着の有無については、認定者に多く色素沈着がみられる傾向にあったものの明らかな相関性は認められなかった。

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。

頬粘膜や舌、軟口蓋などの口腔軟組織と歯が関係する歯肉とは色素沈着の発現状態が異なる。以前、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。しかしながら総義歯の患者において、頬粘膜や口唇に色素沈着がみられる場合はあったが、顎堤粘膜には色素沈着があまりみられず、歯の喪失期間が長くなると色素が消失するのか、あるいは義歯床による刺激が色素の消失と関係するのか検討が必要と思われた。

そこで今回は残存歯と色素沈着との関係をみるために歯肉の色素沈着について検討した。検診現場での歯科検診は歯科専用チェアーではなく、通常の椅子で行われ、そのため口腔内を照らすための光が十分ではなく、診察を行う際に目視が困難な場合がある。また、非常に限られた時間内に他の歯科的疾患も診査するため見落とし等が生じる可能性がある。そのため、今回は、光が届きやすく視診が容易な上下前歯部（左右 3 番から 3 番）に限定し、さらに正確度をあげるため、複数の歯科医師で検診をおこなった。

今回の結果では、例年に比べて歯肉の色素沈着の発現数が高い数値であった。統計学的解析では、特に上顎では色素沈着発現と残存歯数との間に相関性が認められた。下顎では統計学的有意差はなかったが、上下顎ともに、欠損歯部位に色素沈着が認められなかったのは特徴的であった。ただし、今回の対象者は、比較的残存歯の多い人が多かったため、今後は臼歯部を含めた検討が必要かと思われる。

今回は、認定者と未認定者で有意差がみられなかった。過去の口腔粘膜での色素沈着についての検討では、認定者が未認定者に比べて多い傾向にあり、血中 PCB 濃度との相関が認められている。今回の結果で有意差が出なかったことについては、未認定者が少なかったこと、色素沈着は全て陽性としたため、金属などによる影響が排除できなかったこと、などが原因としてあげられる。今後は、生活習慣や慢性疾患等の有無などの影響についても検討する予定である。

E．結論

油症患者における上下顎前歯部歯肉の色素沈着と同部位の残存歯について検討を行った。歯肉粘膜色素沈着と残存歯との間には一定の相関性が認められた。

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

油症曝露による継世代健康影響に関する研究
- 油症 2 世の口腔内色素沈着に影響する因子の検討-

研究分担者　月森　清巳　福岡市立こども病院　副院長　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）の口腔内色素沈着に影響する因子について検討した。対象は油症 2 世 144 例とし、油症検診で得られた歯科検診票データをもとに、口腔内色素沈着所見をー/±、＋、＋＋、＋＋＋の 4 群に分類し、臨床的特徴（年齢、性別、油症認定状況、油症曝露状況、油症発生から出生までの期間、喫煙状況）や母児血中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzo furan（PeCDF）濃度との関連について検討した。その結果、１）臨床的な特徴としては、色素沈着が重症化するにつれて、男性と喫煙者の割合が増えてくること、２）母児血中 PeCDF 濃度との関連では、重症化するにつれて母親血中 PeCDF 濃度が高い値を示すこと、３）重回帰分析では、口腔内色素沈着の重症度は喫煙(偏回帰係数 0.6431, p<0.0001)と母親血中 PeCDF 濃度（偏回帰係数 0.0003, p=0.0027)と有意な相関を示すことが分かった。これらの成績から、油症 2 世の口腔内色素沈着に影響する因子として、母親の血中 PeCDF 濃度および喫煙があげられる。しかしながら母親の血中 PeCDF 濃度の偏回帰係数は極めて低いので、色素沈着に影響するのかどうかさらなる評価が求められる。今後次世代研究をすすめていくうえには、コホート研究が必要であると考える。

A．研究目的

油症の特徴的な症状のなかで、ざ瘡様皮疹、皮膚・爪・口腔内の色素沈着などの皮膚・粘膜症状は、油症発生当時は他の症状より顕著に認められ、油症の診断において非常に重要な所見であった[1)]。われわれは、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・粘膜症状の有症割合について観察し、口腔内色素沈着が最も多く認められる（有所見率 58.3%）ことを報告した[2)]。また、口腔内の色素沈着を認めた油症 2 世では、母親の血中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzo furan（PeCDF）濃度は色素沈着がない群と比較して有意に高く、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。

本研究では、油症検診で得られたデータをもとに、油症 2 世における口腔内色素沈着の重症度と臨床的特徴や母児血中 PeCDF 濃度との関連について観察することによって、油症 2 世の口腔内色素沈着に影響する因子について検討した。

B．研究方法

１．対象：油症 2 世 144 例を対象とした。

２．方法：

油症検診で得られた歯科検診票データをもとに、口腔内色素沈着所見をー/±、＋、＋＋、＋＋＋の 4 群に分類し、臨床的特徴（年齢、性別、油症認定状況、油症曝露状況、油症発生から出生までの期間、喫煙状

況)、母児血中 PeCDF 濃度との関連について検討した。

口腔内色素沈着の程度については、口腔内のいずれかの部位に認められた所見のなかで最も重症度の高いものを集計した。また、複数回検診を受診した場合には、いずれかの検診で認められた所見のなかで最も重症度の高いものを集計した。

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、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。

統計学的解析には、一元配置分散分析法、カイ二乗検定、Bonferroni t-検定、重回帰分析を用いた。

（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．臨床的特徴との関連：

油症 2 世の口腔内色素沈着の重症度と臨床的特徴を表 1 に示す。口腔内色素沈着の重症度でみると、－/±群は 57 例（39.6%）、＋群は 59 例（41.0%）、＋＋群は 24 例（16.6%）、＋＋＋群は 4 例（2.8%）であった。口腔内色素沈着の重症度と臨床的特徴（年齢、性別、油症認定状況、油症曝露状況、油症発生から出生までの期間、喫煙状況）とを比較検討すると、色素沈着が重症化するにつれて、男性（p=0.0454）と喫煙者（p=0.0001）の割合が有意に増加した。

２．母児の血中 PeCDF 濃度との関連：

油症 2 世の血中 PeCDF 濃度の平均値±標準偏差（範囲）は、－/±群で 9.0±5.5（2.5-31.5）pg/g lipid、＋群は 10.0±8.1（2.2-51.6）pg/g lipid、＋＋群は 10.4±10.5（1.5-53.5）pg/g lipid、＋＋＋群は 6.7±2.6（4.4-10.2）pg/g lipid であった。各群間に有意な差はなかった（p=0.7223）（図 1)。

一方、油症 2 世の母親の血中 PeCDF 濃度の平均値±標準偏差（範囲）は、－/±群で 71.6±98.3（9.0-479.9）pg/g lipid、＋群は 104.9±179.4（3.3-851.3）pg/g lipid、＋＋群は 227.7±286.1（4.4-851.3）pg/g lipid、＋＋＋群は 190.4±338.4（9.8-697.9）pg/g lipid であった。＋＋群は、－/±群および＋群に比して有意に（各々 p=0.0034、p=0.0362）高値を示した（図 2)。

３．口腔内色素沈着の重症度に影響する因子の検討：

口腔内色素沈着の重症度に影響する因子として、年齢、性別、喫煙、血中 PeCDF 濃度について重回帰分析で解析すると、喫煙（偏回帰係数 0.6431, p<0.0001)と母親血中 PeCDF 濃度（偏回帰係数 0.0003, p=0.0027)で有意な相関を示すことが分かった（表 2)。

D．考察

今回、油症 2 世における口腔内色素沈着に影響する因子について油症検診で得られたデータをもとに検討した。口腔内色素沈着が重症化するにつれて、男性と喫煙者の割合が増え、また母親の血中 PeCDF 濃度が高くなることが示された。さらに、重回帰分析では、油症 2 世の口腔内色素沈着の重症度は、母親の血中 PeCDF 濃度および喫煙と有意な正の相関を示した。

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[3]。一方、タバコの煙は AhR の活性化、microphthalmia-associated transcription factor（MITF)の発現を増強し、メラノサイトの活性化、メラニン色素の産生を亢進することによって色素沈着をきたすことが報告されている[4]。

これらの成績から、油症 2 世の口腔内色素沈着に影響する因子として、母親の血中 PeCDF 濃度および喫煙があげられる。しかしながら母親の血中 PeCDF 濃度の偏回帰係数は 0.0003 と極めて低いので、色素沈着に影響するのかどうかさらなる評価が求められる。この問題を解決し、今後次世代研究をすすめていくうえには、コホート研究が必要であると考える。

E．結論

油症 2 世の口腔内色素沈着の重症度は、母親の血中 PeCDF 濃度および喫煙と有意な正の相関を示した。しかしながら母親血中 PeCDF 濃度の偏回帰係数は極めて低いので、色素沈着に影響するのかどうかさらなる評価が求められる。今後次世代研究をすすめていくうえには、コホート研究が必要であると考える。

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

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) 月森清巳ほか. 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-. 平成 30 年度分担研究報告書. 100-105, 2019.
3) Luecke S, et al. The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. Pigment Cell Melanoma Res. 23(6):828-833, 2010.
4) Nakamura M, et al. Tobacco smoke-induced skin pigmentation is mediated by the aryl hydrocarbon receptor. Exp Dermatol. 22(8):556-558, 2013.

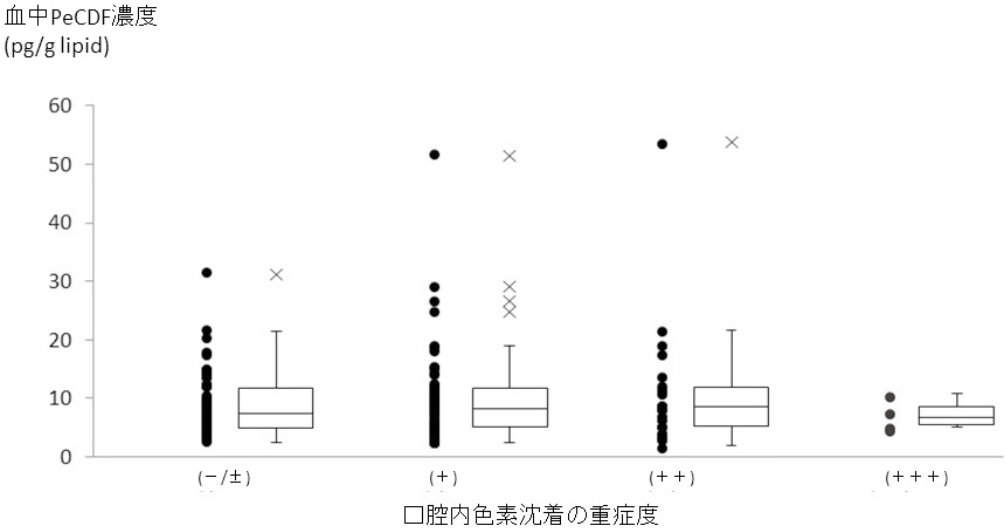
表 1 油症 2 世の口腔内色素沈着の重症度と臨床的特徴

項目	口腔内色素沈着				
	(-/±)	(+)	(++)	(+++)	P値*
症例数	57/144 (39.6%)	59/144 (41.0%)	24/144 (16.6%)	4/144 (2.8%)	
油症検診時年齢(才)	35.9±7.8 (12-47)	34.3±10.4 (5-47)	33.5±10.2 (11-47)	38.5±5.2 (31-43)	0.5679
性別					
男性	21/57 (36.8%)	31/59 (52.5%)	13/24 (54.2%)	4/4 (100%)	0.0454
女性	36/57 (63.2%)	28/59 (47.5%)	11/24 (45.8%)	0/4 (0%)	
油症認定状況					
油症認定患者数	7/57 (12.3%)	13/59 (22.0%)	8/24 (33.3%)	2/4 (50%)	0.1946
同居家族認定	4/57 (7.0%)	2/59 (3.4%)	0/24 (0%)	0/4 (0%)	
未認定	46/57 (80.7%)	44/59 (74.6%)	16/24 (66.7%)	2/4 (50%)	
油症曝露状況					
両親曝露(両親油症認定患者)	17/57 (29.8%)	21/59 (35.6%)	8/24 (33.3%)	3/4 (75.0%)	0.3503
母親曝露(母親油症認定患者)	31/57 (54.4%)	24/59 (40.7%)	10/24 (41.7%)	0/4 (0%)	
曝露なし(両親未認定)	9/57 (15.8%)	14/59 (23.7%)	6/24 (25.0%)	1/4 (25.0%)	
油症発生から出生までの期間(年)					
10年以内	42/57 (73.7%)	38/59 (64.4%)	19/24 (79.2%)	3/4 (75.0%)	0.1274
10-20年	13/57 (22.8%)	11/59 (18.6%)	1/24 (4.2%)	1/4 (25.0%)	
20年以降	2/57 (3.5%)	10/59 (16.9%)	4/24 (16.7%)	0/4 (0%)	
喫煙状況					
喫煙あり	17/56 (30.4%)	28/54 (51.9%)	20/22 (90.9%)	4/4 (100%)	0.0001
血中PeCDF濃度測定時年齢(才)					
油症2世	33.5±7.6 (12-46)	30.6±10.2 (5-45)	30.9±10.0 (5-43)	32.3±7.5 (21-36)	0.2100
母親	61.4±9.5 (40-87)	58.2±9.8 (36-75)	58.0±10.4 (37-76)	60.3±11.9 (45-74)	0.2836

データは、n/N(%)あるいはMean±SD(range)で示す。
*: 統計学的解析には一元配置分散分析法、カイ二乗検定を用いた。

表 2 油症 2 世の色素沈着の重症度に影響する因子の重回帰分析

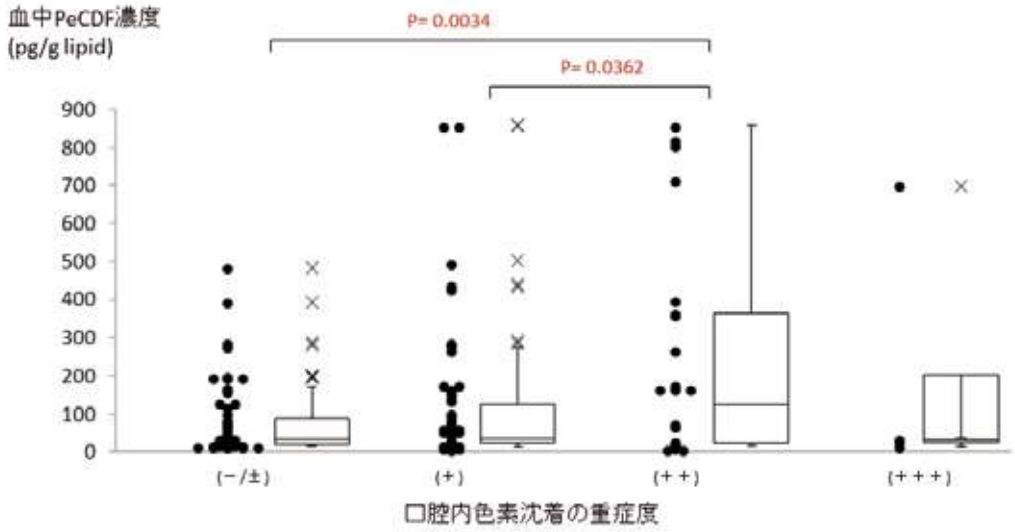
変数名	油症2世				母親(油症患者)			
	偏回帰係数 B	標準誤差	標準偏回帰係数 β	P 値	偏回帰係数 B	標準誤差	標準偏回帰係数 β	P 値
年齢	-0.0088	0.0087	-0.0799	0.3158	-0.0111	0.0085	-0.1007	0.1931
性別	-0.2193	0.1302	-0.1354	0.0947	-0.2080	0.1243	-0.1284	0.0966
喫煙	0.6889	0.1327	0.4257	<0.0001	0.6431	0.1276	0.3974	<0.0001
血中PeCDF濃度	0.0017	0.0084	0.0162	0.8384	0.0010	0.0003	0.2324	0.0027
定数項	0.8763	0.3218		0.0073	0.8742	0.3076		0.0052
回帰式	自由度調整済み決定係数R2=0.1948 (P<0.0001)				自由度調整済み決定係数R2=0.2484 (P<0.0001)			



項目	口腔内色素沈着				
	(−/±)	(+)	(++)	(+++)	P値*
2世血中PeCDF値(pg/g lipid)	9.0±5.5 (2.5-31.5)	10.0±8.1 (2.2-51.6)	10.4±10.5 (1.5 -53.5)	6.7±2.6 (4.4-10.2)	0.7223

データは、Mean±SD(range)で示す。
*: 統計学的解析には一元配置分散分析法を用いた。

図 1 油症 2 世における色素沈着の重症度と血中 PeCDF 濃度との関連



項目	口腔内色素沈着				
	(−/±)	(+)	(++)	(+++)	P値*
母血中PeCDF値(pg/g lipid)	71.6±98.3 (9.0-479.9)	104.9±179.4 (3.3-851.3)	227.7±286.1 (4.4-851.3)	190.4±338.4 (9.8-697.9)	0.0052

データは、Mean±SD(range)で示す。
*: 統計学的解析には一元配置分散分析法を用いた。また, 群間の多重比較にはBonferroni t検定を用いた。

図 2 油症 2 世における色素沈着の重症度とその母親の血中 PeCDF 濃度との関連

分担研究報告書

油症における末梢血 CD4 陽性 T 細胞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　2019 年度福岡県油症一斉検診受診者 220 例について末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の細胞内サイトカインを測定し、Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞と血中 PCB 濃度との関連について検討した。血中 PCB 濃度と Th0 細胞および Th2 細胞との間に正の相関を認めたが、Th1 細胞との間に相関をみなかった。Th0 細胞および Th2 細胞は PCB 高濃度群では PCB 低濃度群に比べ上昇を認めた。Th1 細胞は両群間に差をみなかった。血中 PCB 濃度が高値の油症患者では Th0 細胞および Th2 細胞の上昇を認め、油症において Th0 細胞および Th2 細胞の上昇に対する 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 51 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、2019 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CD4陽性T細胞中の細胞内サイトカインを測定し、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

2019 年度福岡県油症一斉検診における 15 歳以上の受診者 225 例中、細胞性免疫検査にアンケートにて同意が得られた 220 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。末梢血 CD4

陽性 T 細胞中の細胞内サイトカイン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行なった。細胞内サイトカインの産生は Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (Sigma) および Ionomycin (Sigma) により細胞を刺激した。細胞表面染色は CD4-PC5 (Immunotech) を用い、細胞内サイトカイン interferon (IFN)-γ および inter-leukin (IL)-4 の染色は BD FastImmune Anti-Human IFN-γ FITC/IL-4 PE (BD Biosciences) 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。IFN-γ 産生かつ IL-4 産生細胞を Th0 細胞、IFN-γ 産生かつ IL-4 非産生細胞を Th1 細胞、IFN-γ 非産生かつ IL-4 産生細胞を Th2 細胞として総 CD4 陽性細胞に対する比率で表した。

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 2019 年度福岡県油症一斉検診において測定した 220 例の測定値を用い Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞亜集団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

2019 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 220 例の内訳は女性 127 例、男性 93 例で、平均年齢は 65.2±13.2 (16－92) 歳であり、油症患者 162 例、油症患者 (同居家族) 26 例、未認定患者 31 例、観察者 1 例であった。血中 PCB 濃度と年齢の間に有意の正の相関 (r=0.540, P＜0.001) を認めた。

2019 年度福岡県油症一斉検診の受診者 220 例について血中 PCB 濃度と Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞との関連について検討した (表 1)。血中 PCB 濃度と Th0 細胞の間に弱いながらも有意の正の相関 (r=0.154, P＜0.05) を、Th2 細胞との間にも弱いながらも有意の正の相関 (r=0.141, P＜0.05) を認めた。血中 PCB 濃度と Th1 細胞の間に相関をみなかった。

福岡県油症一斉検診受診者220例について血中PCB濃度上位25％をPCB高濃度群、下位25 ％をPCB低濃度群とし両群間のTh0細胞、Th1細胞およびTh2細胞について検討した (表 2)。PCB高濃度群55例の血中PCB濃度は1.15 ppb以上、平均血中PCB濃度は1.94±1.08ppbであり、油症患者51例、油症患者 (同居家族) 4例であった。PCB低濃度群55例の血中PCB濃度は0.40 ppb以下、平均血中PCB濃度は0.26±0.08ppbであった。Th0細胞はPCB高濃度2.0±2.0％とPCB低濃度群1.3±0.8％に比べ有意の上昇を認めた (P＜0.05)。Th1細胞はPCB高濃度群24.9±12.5％、PCB低濃度群22.2±9.7％であり、両群間に差をみなかった。Th2細胞はPCB高濃度群2.4±1.4％とPCB低濃度群1.9±0.7％に比べ有意の上昇を認めた (P＜0.05)。

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 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 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油症における免疫機能に対する慢性的影響が示唆された。

Mosmann ら[14][15]はマウス CD4 陽性 T 細胞が産生されるサイトカインの違いにより Th1 細胞および Th2 細胞の亜集団に分けられることを報告した。ヒトにおいても Th1 細胞および Th2 細胞の亜集団が認められ、ナイーブ CD4 陽性 (Th0) 細胞が IFN-γ や IL-2 を産生する Th1 細胞、IL-4、IL-5、IL-13 を産生する Th2 細胞に分化すると考えられている[16][17][18]。そして、Th1 細胞は T 細胞の活性化や細胞障害活性の増強により細胞性免疫に、Th2 細胞は B 細胞の活性化により液性免疫に関与すると考えられる。今回の検討では、2019 年度福岡県油症一斉検診の受診者 220 例について血中 PCB 濃度と末梢血 Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞亜集団の関連について検討し、血中 PCB 濃度と Th0 細胞および Th2 細胞との間に正の相関を認めた。そして、PCB 高濃度群では PCB 低濃度群に比べ Th0 細胞および Th2 細胞の上昇を認めた。油症において Th0 細胞および Th2 細胞に対する PCB の慢性的影響が示唆される。血中 PCB 濃度が高値の油症患者に認められる Th2 細胞の上昇が油症における CD4 陽性細胞の増加や免疫グロブリンの上昇の原因となっている可能性が考えられる。

油症発生 51 年後の 2019 年度福岡県油症一斉検診受診者における末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の細胞内サイトカインの検討において血中 PCB 濃度が高値の油症患者に Th0 細胞および Th2 細胞の上昇を認め、血中 PCB 濃度と Th0 細胞および Th2 細胞の間に正の相関を認めることより油症における Th0 細胞および Th2 細胞の上昇に PCB の関与が示唆された。Th2 細胞は気管支喘息、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患、全身性強皮症、特発性肺線維症等の自己免疫疾患の発症や病態形成に関与することが報告されている[19][20][21]。油症において気管支喘息、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患、全身性強皮症、特発性肺線維症等の自己免疫疾患との関連について検討が必要と思われる。油症における Th0 細胞および Th2 細胞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 51 年が経過しているが、2019 年度福岡県油症一斉検診受診者 220 例の末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の細胞内サイトカインを検討し Th0 細胞および Th2 細胞と血中 PCB 濃度の間に正の相関を認めた。Th0 細胞および Th2 細胞は PCB 高濃度群で

はPCB低濃度群に比べ上昇を認めた。油症においてTh0細胞およびTh2細胞に対するPCBの慢性的影響が示唆された。

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.
14. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL：Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 136:2348-2357, 1986.
15. Mosmann TR, Coffman RL：TH1 and TH2 cells:different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. 7：145-173, 1989.
16. Romagnani S：Human TH1 and TH2 subsets：doubt no more. Immunol. Today 12：256-257, 1991.
17. Romagnani S:Biology of human TH1 and TH2 cells. J. Clin. Immunol. 15：

121-129, 1995.
18. Miner KT, Croft M : Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells : role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. J. Immunol. 160 : 5280-5287, 1998.
19. Barnes PJ : Th2 cytokines and asthma: an introduction. Respir. Res. 2 : 64-65, 2001.
20. Brandt EB, Sivaprasad U : Th2 cytokines and atopic dermatitis. J. Clin. Cell Immunol. 2 : 1-25, 2011.
21. Romagnani S : T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann. Allergy Asthma Immunol. 85 : 9-18, 2000.

G．研究発表

１．論文発表

辻 博, 蓮尾裕 : 油症における甲状腺機能の検討. 福岡医学雑誌 108:111-117, 2017

辻 博, 松村潔 : 油症における末梢血リンパ球亜集団に関する検討. 福岡医学雑誌 110:109-112, 2019

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

表１　血中 PCB 濃度と Th0, Th1 および Th2 細胞の関連

	r
Th0 細胞	0.154*
Th1 細胞	0.052
Th2 細胞	0.141*

*P<0.05.

表２　血中 PCB 高濃度群および低濃度群における Th0, Th1 および Th2 細胞

		PCB 濃度	
		≧1.15 ppb	≦0.40 ppb
No.		55	55
Th0 細胞	(%)	2.0±2.0*	1.3±0.8
Th1 細胞	(%)	24.9±12.5	22.2±9.7
Th2 細胞	(%)	2.4±1.4*	1.9±0.7

*P<0.05 vs. blood PCB concentration ≦0.40 ppb.

分担研究報告書

オートファジーによる酸化ストレスの制御機構

研究分担者　辻 学　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

研究要旨　これまでの研究で、糖尿病の治療薬であるメトホルミンは、表皮細胞における芳香族炭化水素受容体を活性化し、さらにオートファジーを誘導することが明らかとなった。そこで、今回は、表皮細胞における酸化ストレスによる炎症をメトホルミンがどのような機序で制御するかについて研究を行なった。その結果、メトホルミンは炎症性サイトカインである IL-17A・TNF-αによる酸化ストレスによって誘導されるインフラマソームの活性化を抑制し、最終的に IL-1βの産生を抑制することで、炎症を抑制する働きがあることが明らかとなった。メトホルミンは、油症のみならず IL-1βが病態形成に関わる炎症性疾患の治療に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでの研究で、糖尿病治療薬であるメトホルミンは、表皮細胞における芳香族炭化水素受容体を活性化し、さらにオートファジーを誘導することが明らかとなった。そこで、今回は、表皮細胞における酸化ストレスによる炎症をメトホルミンがどのような機序で制御するかについて研究を行なった。

B. 研究方法

培養ヒト表皮細胞に対して、炎症性サイトカインである IL-17A と TNF-αによる刺激を行い、酸化ストレスによる炎症を誘導した。これに対して、メトホルミンの投与を行い、IL-17A と TNF-αによる炎症性サイトカインの産生が抑制される機構について検討した。

次に、イミキモド(Toll-like receptor 7 アゴニスト)を C57/BL6 マウスの耳介に反復外用することで皮膚炎を生じるモデルを用いてメトホルミンの効果を in vivo で検証した。5%イミキモドを 2-4 日外用する間に、同時にメトホルミンの内服を行った。耳介の皮膚組織を回収し、耳介の炎症による肥厚を病理組織学的に評価した。また、炎症性サイトカインの産生について免疫染色・RT-PCR を用いて検討を行なった。

(倫理面への配慮)

本実験で行なった動物実験に関しては、自施設の倫理委員会で既に承認を得ている。

C. 研究結果

実験 1. ヒト表皮細胞においてメトホルミンは IL-17A と TNF-αによって誘導される IL-1βの産生を抑制した。

ヒト表皮細胞をメトホルミン(15 mM)存在下・非存在下で、IL-17A(10 ng/ml)と TNF-α(10 ng/ml)で 24 時間刺激を行なった。Total RNA を抽出し、microarray を用いて炎症性サイトカインの産生について網羅的な解析を行なったところ、メトホルミンは IL-1βの発現の誘導を抑制する可能性が考えられた。そこで、qRT-PCR で検証したところ、メトホルミンは IL-17A と TNF-αによる pro IL-1β mRNA の発現を抑制した(Figure 1A)。さらに、細胞培養液の上清中の mature IL-1βの産生量を ELISA で測定したところ、同様にメトホルミンは IL-17A と TNF-αによる mature IL-1βの産生を抑制した(Figure 1B)。Pro IL-1βから mature IL-1βの変換にはインフラマソームの活性化が必須であるため、次に IL-17A と TNF-αによって活性化されるインフラマソームに対して、メトホルミンがどのよう

な影響を及ぼすのかについて検討した。抗 pro IL-1β抗体、抗 Caspase-1 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なったところ、メトホルミンは IL-17A と TNF-αによって誘導される pro IL-1βタンパクの発現を抑制することが明らかとなった(Figure 1C)。さらに、メトホルミンは Caspase-1 の発現を抑制することが分かった。

メトホルミンが Caspase-1 の発現を抑制する機構を明らかにするため、メトホルミンの濃度を 0.1 mM-15 mM に調節して、表皮細胞に投与して、Caspase-1 の発現を qRT-PCR・ウエスタンブロッティングで評価した。その結果、Caspase-1 の mRNA の発現は変わらなかった(Figure 1D)が、メトホルミンの用量依存性に Caspase-1 のタンパクの発現が低下することが分かった(Figure 1E)。

メトホルミンは、AMPK のリン酸化と SIRT1 の活性化によってオートファジーを誘導することが様々な細胞で報告されている。そこで、メトホルミンがヒト表皮細胞において AMPK のリン酸化を生じるか、抗リン酸化 AMPK 抗体を用いてウエスタンブロットで評価した。メトホルミンはヒト表皮細胞においても用量依存性に AMPK のリン酸化を誘導することが分かった(Figure 1F)。そこで、AMPK の選択的阻害薬であるドルソモルフィン、または SIRT1 の選択的阻害薬であるサーチノール存在下・非存在下でメトホルミン(15 mM)を 24 時間投与し、Caspase-1 の発現が低下するかを評価した。ドルソモルフィン、サーチノール存在下では、メトホルミンによる Caspase-1 の発現の減少は認められなかった(Figure 1G and 1H)。

これらの結果から、メトホルミンは、AMPK―SIRT1 を介して Caspase-1 の発現を減少させ、IL-17A と TNF-αによるインフラマーソームの活性化を抑制することで、IL-1βの産生を抑制することが明らかとなった。

実験 2. ヒト表皮細胞において IL-1βは IL-36γ、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現を誘導した。

IL-1βは、非常に多くの炎症性サイトカイン・ケモカイン・抗菌ペプチドを誘導するサイトカインである。ヒト表皮細胞を IL-1β(10 ng/ml)で 24 時間刺激を行ない、total RNA を回収し、qRT-PCR で mRNA の発現を評価した。IL-1βは IL-36γ、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の mRNA の発現を誘導することが分かった(Figure 2A)。そこで、細胞よりタンパクを抽出し、IL-36γ、S100A7/8/9 の発現をウエスタンブロットで解析した(Figure 2B)。また、培養液の上清を回収し、CXCL1/2、CCL20 の産生を ELISA で解析した(Figure 2C)。

その結果、IL-1βはタンパクレベルでも IL-36γ、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現を誘導することが分かった。

実験 3. ヒト表皮細胞においてメトホルミンは IL-17A と TNF-αによって誘導される IL-36γ、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現の誘導を抑制した。

メトホルミンが IL-17A と TNF-αによって誘導される IL-1βの産生を抑制する結果より、メトホルミンは IL-1βによって誘導される IL-36γ、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現を抑制する可能性が考えられた。そこで、ヒト表皮細胞をメトホルミン(15 mM)存在下・非存在下で、IL-17A(10 ng/ml)と TNF-α(10 ng/ml)で 24 時間刺激を行ない、IL-36γ、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現について、実験 2 と同様の手順で検討を行った。

ヒト表皮細胞においてメトホルミンは IL-17A と TNF-αによって誘導される IL-36γ、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現の誘導を抑制した(Figure 3A, 3B and 3C)。

実験 4. イミキモド誘導性のマウス皮膚炎モデルにおいてメトホルミンは皮膚炎の病勢を

抑えた。

次に in vivo でのメトホルミンの効果を検討するため、C57BL/6 マウスにイミキモド（Toll-like receptor 7 agonist）外用することで皮膚炎を生じるマウス皮膚炎モデルを用いた。このマウスモデルでは、イミキモドによって生じる表皮における IL-1β・TNF-α の産生と、病変部に浸潤する T 細胞による IL-17A の産生が病態形成に重要であることが明らかとなっている。

イミキモドをマウス耳介に 5 日間連続で外用し、その際にメトホルミン（100 mg/kg、200 mg/kg）の経口投与を行なった。メトホルミン（200 mg/kg）は、イミキモドによって誘導される皮膚炎を軽減することが、臨床的評価(Figure 4A)・病理組織学的評価(Figure 4B)によって確かめられた。また、皮膚組織における IL-1β、IL-36γ、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 mRNA の発現を RT-PCR で評価したところ、メトホルミンはイミキモドによるこれらの mRNA の発現を抑制することが分かった(Figure 4C)。

これらの結果から、メトホルミンは in vivo でも IL-1β・TNF-α・IL-17 による皮膚の炎症を軽減させる効果がある可能性が示唆された。

D. 考察

本研究で、糖尿病の治療薬であるメトホルミンが IL-17・TNF-α によるインフラマソームの活性化を抑制することで、IL-1β の産生を抑制し、結果的に IL-1β 誘導性の多くの炎症性サイトカイン・ケモカイン・抗菌ペプチドの発現を抑えることが明らかとなった。さらに、この効果はマウス皮膚炎モデルでも確認された。

IL-1β の産生機構については、産生を調節するプロモーター領域に芳香族炭化水素受容体が結合する部位が特定されており、芳香族炭化水素受容体が活性化されると pro IL-1β mRNA の発現が誘導することが分かっている。その際に、酸化ストレスを生じるリガンドであった場合には、さらにインフラマソームが活性化され、mature IL-1β が産生されて炎症が誘導される。これまでの研究で、ヒト表皮細胞においてベンゾピレンは mature IL-1β の産生を誘導することが分かっている。したがって、油症においても IL-1β を主体とした炎症反応を生じている可能性がある。

E. 結論

本研究で、医薬品であるメトホルミンが酸化ストレスによるインフラマソームの活性化を抑えることが明らかとなり、メトホルミンが油症の病態を改善する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Metformin inhibits IL-1β secretion via impairment of NLRP3 inflammasome in keratinocytes.

Cell Death Discovery 2019 (in press)

2. 学会発表

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

なし

Figure 1

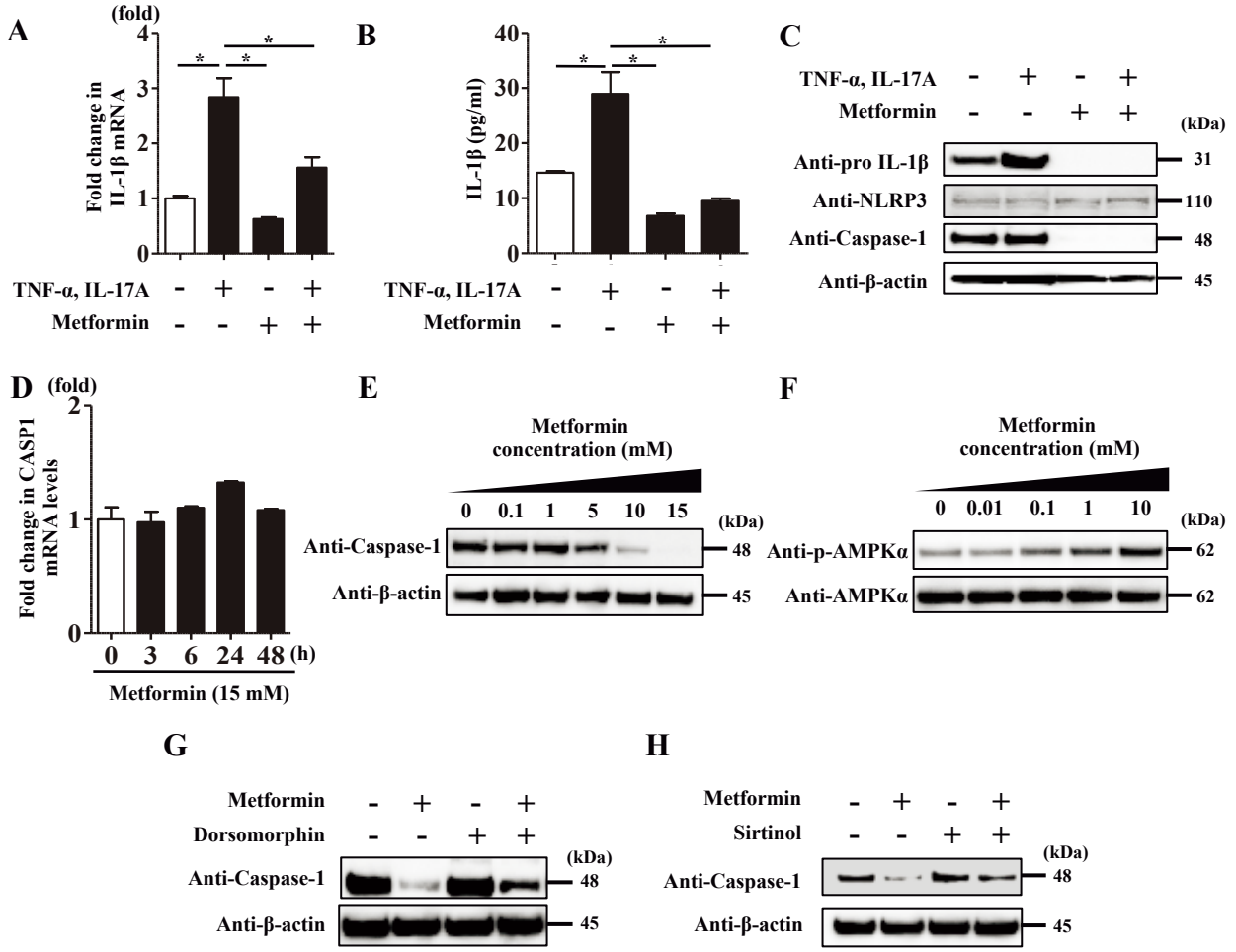

A
(fold)
Fold change in IL-1β mRNA
TNF-α, IL-17A
Metformin
B
IL-1β (pg/ml)
TNF-α, IL-17A
Metformin
C
TNF-α, IL-17A
Metformin
(kDa)
Anti-pro IL-1β
Anti-NLRP3
Anti-Caspase-1
Anti-β-actin
D
(fold)
Fold change in CASP1 mRNA levels
0 3 6 24 48 (h)
Metformin (15 mM)
E
Metformin concentration (mM)
0 0.1 1 5 10 15
(kDa)
Anti-Caspase-1
Anti-β-actin
F
Metformin concentration (mM)
0 0.01 0.1 1 10
(kDa)
Anti-p-AMPKα
Anti-AMPKα
G
Metformin
Dorsomorphin
(kDa)
Anti-Caspase-1
Anti-β-actin
H
Metformin
Sirtinol
(kDa)
Anti-Caspase-1
Anti-β-actin

Figure 2

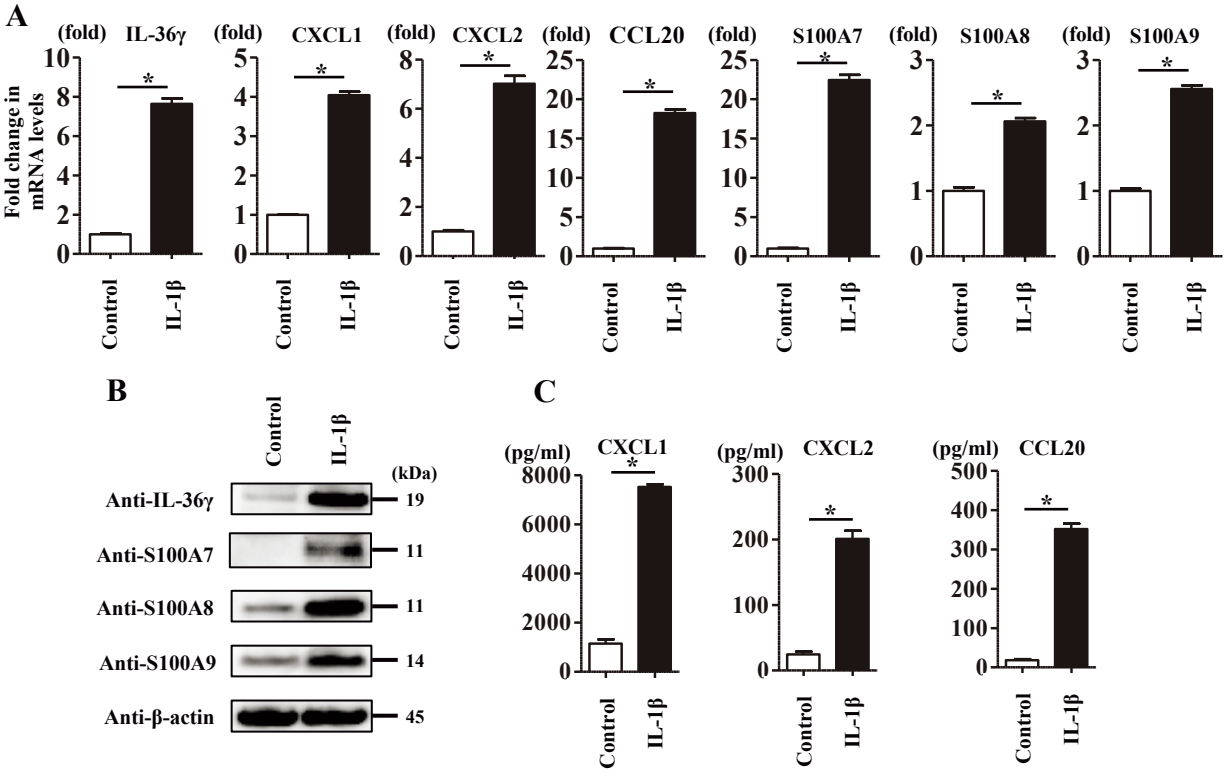

A
(fold) IL-36γ
(fold) CXCL1
(fold) CXCL2
(fold) CCL20
(fold) S100A7
(fold) S100A8
(fold) S100A9
Fold change in mRNA levels
Control
IL-1β
B
Control
IL-1β
(kDa)
Anti-IL-36γ
19
Anti-S100A7
11
Anti-S100A8
11
Anti-S100A9
14
Anti-β-actin
45
C
(pg/ml) CXCL1
(pg/ml) CXCL2
(pg/ml) CCL20

Figure 3

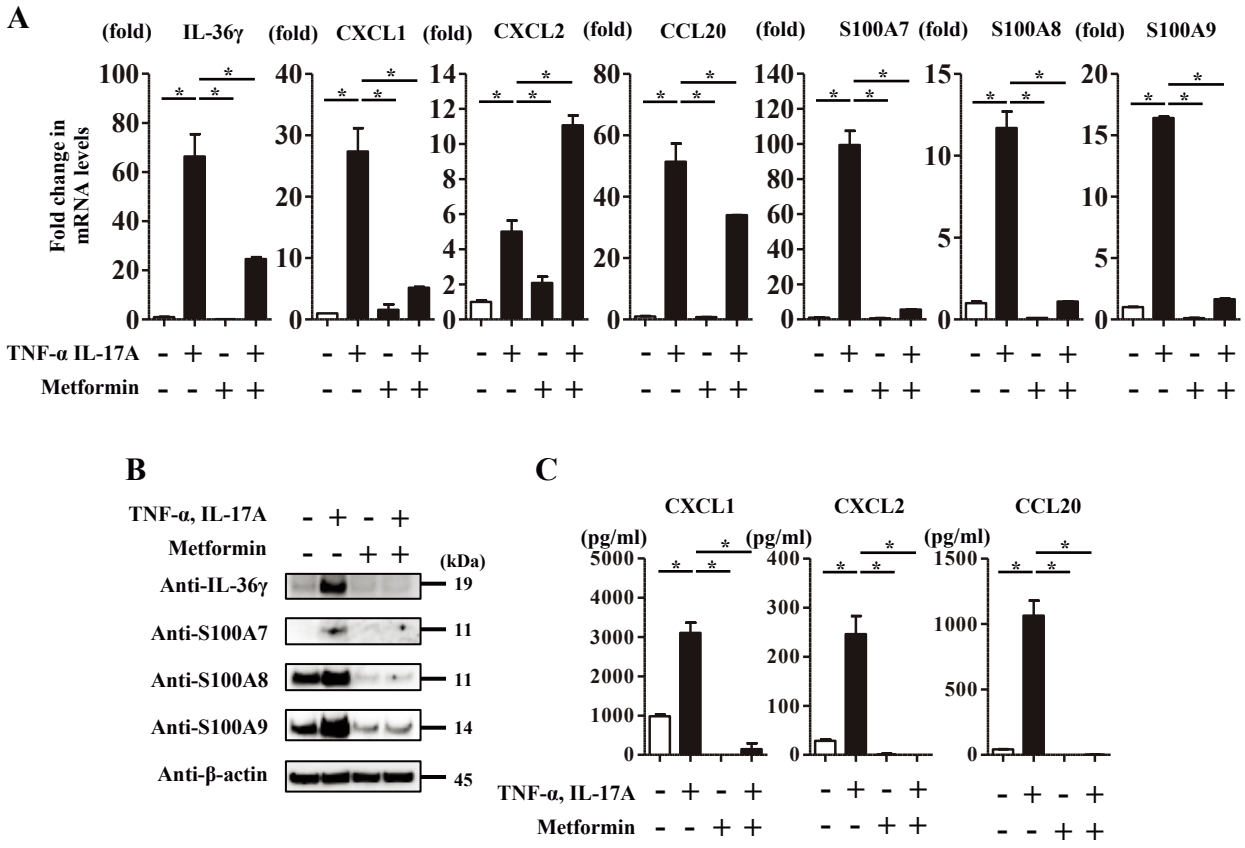
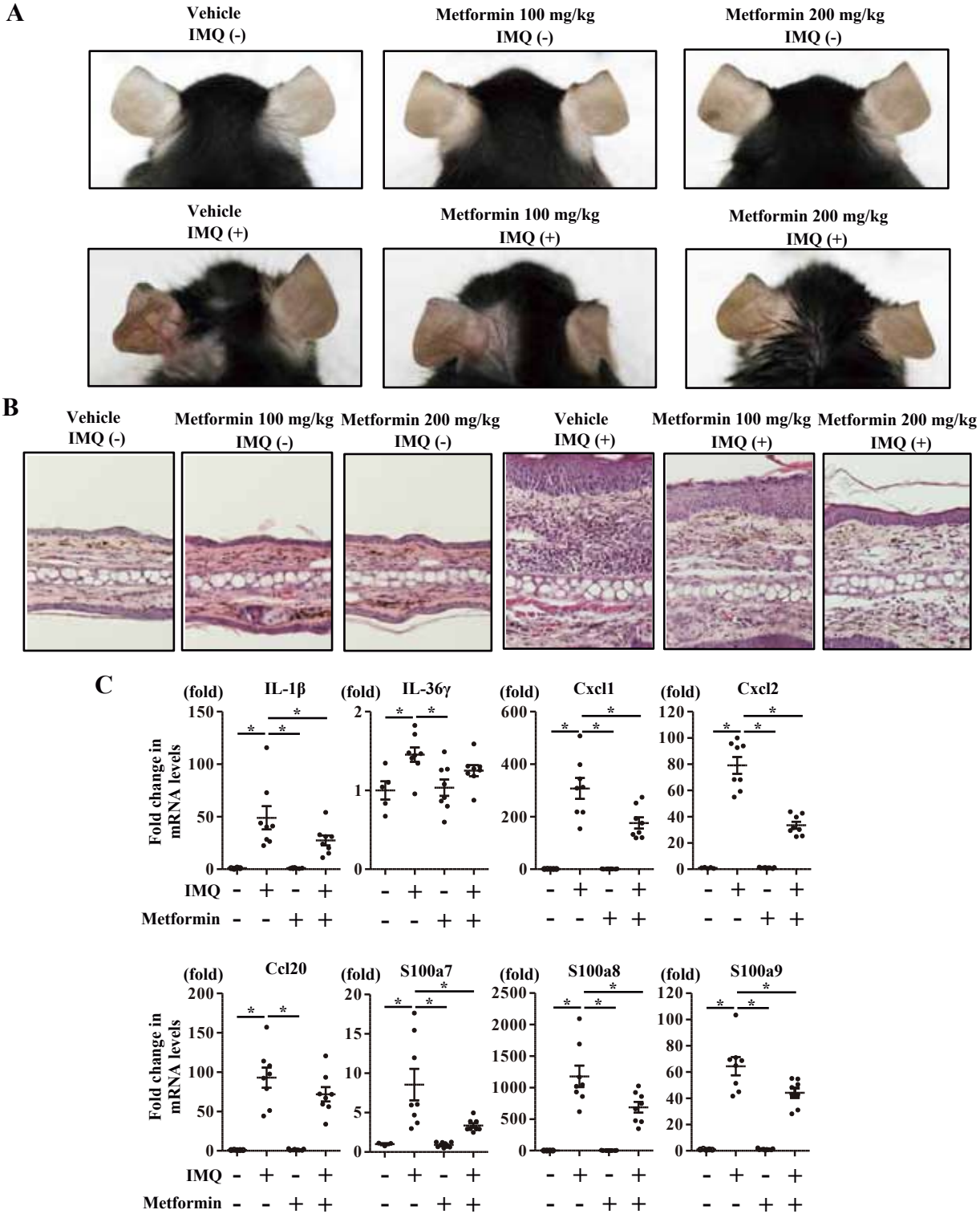

A
(fold) IL-36γ
(fold) CXCL1
(fold) CXCL2
(fold) CCL20
(fold) S100A7
(fold) S100A8
(fold) S100A9
Fold change in mRNA levels
TNF-α IL-17A
Metformin
B
TNF-α, IL-17A
Metformin
(kDa)
Anti-IL-36γ
Anti-S100A7
Anti-S100A8
Anti-S100A9
Anti-β-actin
19
11
11
14
45
C
CXCL1
CXCL2
CCL20
(pg/ml)
TNF-α, IL-17A
Metformin

Figure 4


A
Vehicle
IMQ (-)
Metformin 100 mg/kg
IMQ (-)
Metformin 200 mg/kg
IMQ (-)
Vehicle
IMQ (+)
Metformin 100 mg/kg
IMQ (+)
Metformin 200 mg/kg
IMQ (+)
B
Vehicle
IMQ (-)
Metformin 100 mg/kg
IMQ (-)
Metformin 200 mg/kg
IMQ (-)
Vehicle
IMQ (+)
Metformin 100 mg/kg
IMQ (+)
Metformin 200 mg/kg
IMQ (+)
C
IL-1β
IL-36γ
Cxcl1
Cxcl2
Ccl20
S100a7
S100a8
S100a9
(fold)
Fold change in mRNA levels
IMQ
Metformin

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

分担研究者　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　令和１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

令和１年度の油症検診が下記の通り行われた。

8 月 7 日北九州会場・受診者数 23 名（うち患者 22 名・未認定者 1 名)、8 月 22 日久留米会場・受診者 28 名（うち患者 22 名・未認定者 6 名)、8 月 24 日福岡会場・受診者 58 名（うち患者 51 名・未認定者 7 名)、8 月 29 日北九州会場・受診者 49 名（うち患者 39 名・未認定者 10 名)、9 月 7 日福岡会場・受診者 68 名（うち患者 56 名・未認定者 12 名)。受診者合計は 226 名（うち患者 200 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

油症検診受診者における落屑症候群

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：落屑症候群は緑内障を伴いやすく、視野欠損をきたすことがある。今回油症認定患者の水晶体落屑物質の有無を判定し、血中の PCB 濃度との関連を調査した。

A. 研究目的

落屑症候群は虹彩、瞳孔縁や水晶体前面など前眼部組織に灰白色の水晶体落屑物質が沈着する疾患で、緑内障を合併することが多い。落屑症候群の発症の原因についてはまだ詳細は解明されていないが、日光の曝露や加齢が関係しているとも言われている。今回の研究では油症検診受診者における落屑症候群の有病率を調査し、血中 PCB 濃度と落屑物質の関連を検討する。

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 2019 年度油症検診の眼科部門を受診し、細隙灯による前眼部観察および眼圧の測定が可能であった油症認定患者を対象とし、水晶体落屑物質の有無を判定し、アイケア®を用いて眼圧を測定した。水晶体落屑物質の有無、眼圧、および血中 PCB 濃度を調査した。

（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 188 人（男性 97 人、女性 91 人）で、年齢は中央値 67 歳(30～91 歳)であった。水晶体落屑物質を認めたのは 8 人(4.3%)、11 眼で、そのうち両眼に認めたものは 3 人であった。水晶体落屑物質のある眼の眼圧は 11.4±2.7mmHg（平均±標準偏差）で、水晶体落屑物質のない症例の眼圧は 13.2±2.5mmHg であった。直近の血中 PCB 濃度を得ることができた 138 人において、血中 PCB 濃度の中央値は 0.9ppb(0.01-6.0 ppb)であった。このうち水晶体落屑物質を認めたのは 1 人 1 眼で、この症例の血中 PCB 濃度は 0.01ppb、眼圧は 13.3mmHg であった。

D. 考察

水晶体落屑物質は線維柱帯の房水の通過を阻害し、眼圧の上昇を生じさせ、緑内障を引き起こす場合がある。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。落屑症候群の有病率には地域差があり、日本では特に九州地方で高い有病率となっている。落屑症候群の全国調査において、40 歳以上の落屑症候群の有病率は熊本県では 2.95%と報告されている[1)]。また福岡県の久山町スタディーでは 50 歳以上の 3.4%に落屑症候群が認

められた[2]。日本以外ではノルウェーで16.9%[3]，ギリシャで 11.9%[4]との報告もある。今回の調査では受診者の 4.3%で落屑症候群が認められた。血中 PCB 濃度が得られた症例における落屑症候群症例の血中 PCB 濃度は低値であり、血中 PCB が落屑症候群に関与する可能性は低いと思われる。

E. 結論

今回の長崎県油症検診受診者の落屑症候群の有病率は 4.3%であった。落屑症候群のある症例の血中 PCB 濃度は低値であった。

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) 布田ら. 眼紀.1992; 43: 549-553.
2) Miyazaki M, et al. J Glaucoma. 2005; 14: 482-484.
3) Ringvold A, et al. Acta Ophthal. 1988; 66: 652-658.
4) Topouzis F, et al. Am J Ophthalmol. 2007; 144: 511-519.

分担研究報告書

「カネミ油症患者における中枢神経障害に関する文献的研究」

研究分担者　　山下 謙一郎　九州大学大学院臨床神経生理学分野　助教

研究要旨　カネミ油症患者に生じる中枢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中枢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。当科では平成20年度および平成30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での中枢神経障害の特徴を抽出するため PCB(polychlorinated biphenyl)　、　PCDF(polychlorinated dibenzofuran)とdioxinにおける中枢神経障害を文献的に検索した。

B．研究方法

Pubmed にて PCB、PCDF、dioxin、myelopathy、encephalopathy をキーワードとして検索を実施した。平成21年以降のヒト対象の研究の発表年、中毒経路、中枢神経障害に関しての要点を検証した。

（への配慮）

個人情報は原則的に検証の倫理面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

PCB、PCDF、dioxin、 myelopathy、encephalopathy をキーワードとした文献検索では、平成 21 年以降で PCDF と myelopathy で文献はなく、dioxin と myelopathy でも文献なし。PCB と myelopathy で 1 文献[1]、encephalopathy で4文献[2)-5)]が抽出された。日本からの報告は1報[4]であった。全てヒトが暴露されることによって生じた中枢神経障害に関する報告であった。

D．考察

PCB、PCDF、dioxin、myelopathy、encephalopathy 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。

平成 21 年以降では、Dioxin と intoxicationを検索した場合は18件、PCBとintoxicationの検索では10件の文献が検索されることを考えると、臨床症状としての中枢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。

E．結論

PCB、PCDF、dioxin による myelopathy、encephalopathy の報告は平成 21 年以降日本からは1報のみであり、末梢神経障害同様に減少傾向であった。

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

参考文献

1)
Ruder AM et al., Mortality among 24,865 workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs) in three electrical capacitor manufacturing plants: a ten-year update.
Int J Hyg Environ Health. 2014;217:2176-87.

2)
Pesatori AC et al., Update of the mortality study of workers exposed to polychlorinated biphenyls (Pcbs) in two Italian capacitor manufacturing plants.
Med Lav. 2013 ;104(2):107-14.

3)
Lin KC et al., Comparing Mini-Mental State Examination and Attention and Digit Span in elderly exposed to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans.
Psychogeriatrics. 2010 : 10 : 191-7.

4)
Akahane M et al., 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 : 74 : 203-17.

5)
Konduracka E et al., A link between environmental pollution and civilization disorders: a mini review.
Rev Environ Health. 2019 : 34:227-233.

分担研究報告書

油症患者におけるダイオキシン類の運動器機能への影響

研究分担者　津嶋　秀俊　九州大学病院　整形外科　助教
福士　純一　九州医療センター　整形外科リウマチ科　科長

研究要旨　油症患者におけるダイオキシン類の運動器機能における影響を調査した。ファンクショナルリーチテスト、歩行速度、握力、足趾把持力を計測し、ダイオキシン類の被曝指標である total ＴＥQとの関連性を評価した。特に、男性患者において、ファンクショナルリーチテストおよび握力が total ＴＥQと負の相関にあることが明らかとなった。

A.研究目的

ダイオキシン類の運動器機能への影響については不明な点が多い。そこで、ダイオキシン類への被曝の程度と油症患者における運動器機能を評価することで、その影響を調べることが本研究の目的である。

B.研究方法

平成 28 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者 142 名を対象とした。運動器評価テストとして、ファンクショナルリーチテスト、4 m歩行速度、握力、足趾把持力を測定した。これらの検査項目は、転倒のリスク、フレイル、骨粗鬆症、脂質異常、関節痛との関連性が報告されている。血中のダイオキシン類濃度より、総合的毒性等価換算濃度（total ＴＥQ）を算出した。

（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た。個人情報の保護については厳重に管理された。本研究は倫理面に問題がないと判断した。

C.研究結果

男性が65名、女性77名であった(Table1)。油症認定患者はおよそ 80%であった。平均年齢は男性 65.7 歳、女性 64.7 歳であった。平均ＢＭＩは男性 23.9kg/m^2、女性 22.4kg/m^2 であり、BMI>25 は全体の 25%を占めていた。

多変量解析による分析では、ファンクショナルリーチテストは、特に男性において total TEQ 増加と負の相関を示していた(Table 2 および Figure 1)。女性においては、ファンクショナルリーチテストは、身長と握力と有意に相関を認めていた。歩行速度に関しては、身長が男女ともに相関していた（Table 3)。女性において、筋量、握力と相関していた。Total TEQ とは女性において負の相関を示す傾向にあったが、男性では有意な相関を認めなかった。握力では、男性において total TEQ と有意な負の相関を呈していた(Table 4)。足趾把持力では、total TEQ とは男女ともに有意な相関を認めなかった（Table 5)。

D．考察

過去において、ダイオキシン類物質と運動器機能評価の関連性に関しては不明な点が多い。今回の研究では、29 種のダイオキシ

ン類物質血中濃度を調査し、運動器機能を評価する４つのテストを施行し、その関連性を分析した。その結果、total TEQ の増加がファンクショナルリーチテストや握力の低下と相関していた。特に男性においてよりその相関が示された。

ファンクショナルリーチテストは、機能的バランスを評価できるテストであり、年齢、転倒リスク、フレイル、糖尿病や心疾患など様々な健康問題と関連していることが報告されている。また油症患者では、ダイオキシン類物質の血中濃度が関節痛や知覚障害に影響を及ぼすことが報告されている。今回、ファンクショナルリーチテストに影響を与えるこれらの合併症については解析に含んでいないが、これらの合併症もファンクショナルリーチテストには負の影響を及ぼすことが予想される。握力は、全身の運動活動性の指標となることが報告されている。また、入院や死亡リスクとは負の相関を示すといわれている。今回、男性においてではあるが total TEQ と握力に負の関連性が示されたことから、ダイオキシン類物質が神経―運動器に影響を及ぼすことが示唆された。

E.結論

Total TEQ は、男性油症患者においてファンクショナルリーチテストと握力に負の相関を呈していた。

Ｆ.研究発表

1.論文発表

Heliyon 2019 Oct 23;5(10): e02702.
doi: 10.1016/j.heliyon.2019. e02702.
Influence of dioxin-related compounds on physical function in Yusho incident victims.
Fukushi JI, Tsushima H, Matsumoto Y, Mitoma C, Furue M, Miyahara H, Nakashima Y.

2.学会発表

日本リハビリテーション医学会秋期学術集会　（2019 年 11 月 16 日　静岡）
ダイオキシン類が高齢者運動機能に及ぼす影響
福士純一、川口謙一、中島康晴

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

Table1 患者背景

Demographic characteristics of the participants.

	Men (n = 65)					Women (n = 77)				
	mean	SD	min	max	median	mean	SD	min	max	median
Age (years)	65.7	12.1	39	87	67	64.7	12.6	38	91	66
Height (cm)	165.6	6.5	147.4	177.6	165.5	152.9	6.7	132.1	171.6	153.3
Weight (kg)	65.7	9.9	42.2	91.5	64	52.1	8.9	27.9	74.5	52.3
BMI (kg/m^2)	23.9	2.8	19	31.8	23.5	22.4	3.4	16.1	33	22.1
Fat mass (kg)	15.4	4.7	6.2	29.4	14.8	16.3	5.9	5.2	34.3	16
Muscle mass (kg)	47.7	5.6	32.1	60.6	47.6	33.9	3.4	27.2	42.8	33.7
Body fat ratio (%)	22.9	4.1	12.6	32.1	22.7	30.3	6.7	12.0	46.1	30.2
Physical function										
Functional reach (cm)	30.8	7.7	2.8	48	31	29.4	8.5	7	48	29
4M gait time (s)	2.89	6.0	2.01	5.8	2.71	3.46	3.6	2	7.5	3.06
Hand grip strength (kg)	37.2	7.5	20.6	53.7	37.2	20.9	5.1	10	31.6	20.7
Toe grip strength (kg)	8.92	4.2	2.4	23.7	8.8	4.87	3.1	1	19.1	4.5
Congeners (pg/g lipid)										
1,2,3,7,8-PeCDD	6.31	4.0	0.5	21.3	5.18	8.72	6.4	0.5	32.2	7.13
1,2,3,6,7,8-HxCDD	24.2	19.8	1	115	19.2	39.4	42.2	5.3	254.1	24.3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	43.5	76.8	10.9	638.8	31.2	39.9	28.4	9.55	231.9	36.5
2,3,4,7,8-PeCDF	54.0	85.1	4.42	478.9	20.9	117.9	179.1	3.46	851.3	29.5
3,3',4,4',5-PeCB(#126)	77.7	53.4	13.6	192.1	53.1	66.8	43.9	2.34	210.8	53.6
3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)	126.3	113.5	15.5	677.2	97.4	148.6	162.7	13.3	738.8	86.8
Total TEQ	44.5	43.4	7.9	241.4	33	64.2	79.9	7.6	415.7	27.9

Table2　ファンクショナルリーチテストとの関連因子　多変量解析結果

Factors associated with Functional reach:multiple regression.

	Men (n = 65)				Women (n = 77)			
	b	SE	t	p	b	SE	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	0.0918823	0.320907	0.29	0.776	-0.184179	0.306455	-0.6	0.5501
Hand grip strength	-0.050298	0.25642	-0.2	0.8454	0.4034887	0.189326	2.13	0.0372
Toe grip strength	0.5216215	0.336659	1.55	0.1284	0.2633973	0.289112	0.91	0.3659
Log [Total TEQ]	-4.078505	1.644629	-2.48	0.017	-0.9811	0.952079	-1.03	0.3069

Table3　歩行速度との関連因子　多変量解析結果

Factors associated with 4M gait time:multiple regression.

	Men (n = 65)				Women (n = 77)			
	b	SE	t	p	b	SE	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	0.4899113	0.274994	1.78	0.0816	0.1333505	0.038684	3.45	0.001
Hand grip strength	-0.14679	0.226209	-0.65	0.5197	-0.049477	0.024021	-2.06	0.0437
Toe grip strength	0.295504	0.298024	0.99	0.3267	-0.048862	0.036686	-1.33	0.1878
Log [Total TEQ]	0.4234022	1.471497	0.29	0.7749	0.2401731	0.120897	1.99	0.0515

Table4　握力との関連因子　多変量解析結果

Factors associated with hand grip strength:multiple regression.

	Men (n = 65)				Women (n = 77)			
	b	SE	t	p	b	SE	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	0.1496828	0.179455	0.83	0.4084	0.1607535	0.203498	0.79	0.4326
Toe grip strength	0.6377272	0.1788	3.57	0.0008	0.51006	0.182821	2.79	0.007
Log [Total TEQ]	-2.204849	0.948922	-2.32	0.0245	-0.233044	0.638498	-0.36	0.7164

Table5　足趾把持力との関連因子　多変量解析結果

Factors associated with toe grip strength:multiple regression.

	Men (n = 65)				Women (n = 77)			
	b	SE	t	p	b	SE	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	-0.003309	0.130831	-0.03	0.9799	0.0345901	0.133844	0.26	0.7969
Hand grip strength	0.3340187	0.093649	3.57	0.0008	0.218682	0.078382	2.79	0.007
Log [Total TEQ]	0.9202673	0.712587	1.29	0.2029	0.0130998	0.418522	0.03	0.9751

Figure1

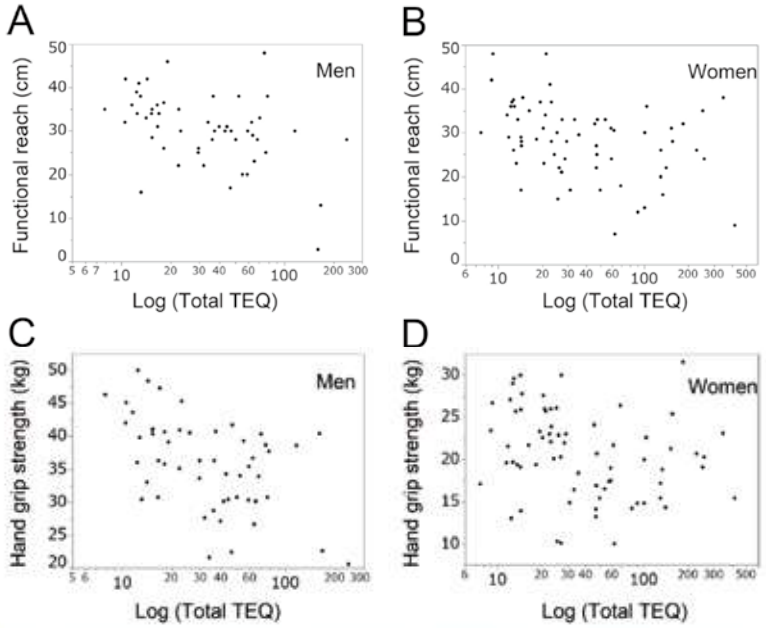


Fig. 1. (Upper) The distribution of functional reach and total TEQ in men (A) and women (B). (Lower) The distribution of hand grip strength and total TEQ in men (C) and women (D).

分担研究報告書

長崎県油症認定患者における皮膚感覚異常の検討

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
Dioxin類化合物による神経障害は感覚障害が主で、末梢神経障害によるものと考えられている。油症の発生から50年経過しているが感覚異常のある油症患者が多くいる。今後の治療介入戦略を探索する目的に、2019年度は油症患者の皮膚感覚異常について触覚、温痛覚をそれぞれVon freyフィラメントと温熱計を用いて評価した。その結果、触覚については油症患者で健常コントロールと比較して鈍くなっている傾向にあった。

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]。

カネミ油症患者の約 6 割に自覚的感覚障害が存在するが、末梢神経伝導速度検査や神経学的診察による客観的な検査では末梢神経障害を示すものは2割程度である[2]。

しかし、油症発生から 50 年経過した現在でも神経障害の残る油症患者は多い。今後の治療介入戦略を探索する目的に、2019 年度は油症患者の皮膚感覚異常について触覚、温冷覚をそれぞれ Von frey フィラメントと温熱計を用いて評価した。

B. 研究方法

①対象:五島中央病院皮膚科油症外来へ通院中の患者18名(未認定患者含む)、および長崎大学病院皮膚科を受診した油症でない患者13名に口頭で研究内容について説明し同意を得て触覚、温冷覚を評価した。

②触覚の評価:決まった圧力を加えることができる太さの異なるVon freyフィラメントを用いて手掌でどの程度の圧力までを認識することができるか評価した。

③温冷覚の評価:簡易温冷覚計により手掌での熱さおよび冷たさを感じる温度を測定した。

④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、③で測定した値と同一患者の最も新しいPCB、PCQ、PCDF 濃度との相関を検討した。

⑤統計処理:油症認定患者と健常人の比較には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。また、未認定患者は健常コントロール群に含めた。

C. 研究結果

長崎県の油症認定患者 (Pt) 16 名、

健常人および未認定患者（CON）15 名の平均年齢はそれぞれ 70.5±8.6 歳、および 77.5±6.8 歳で有意差は認めなかった。それぞれの群における触覚と温冷覚の閾値の比較を図１～3 に示す。触覚、温冷覚ともに油症患者と健常人とに有意な差は認めなかった(触覚：P=0.1515、温熱覚：P=0.3703、冷覚：P=0.5621)。また、認定患者における触覚、温冷覚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、触覚、温冷覚ともに PCDF、PCB、PCQ のいずれとも相関していなかった(図 4～12)。

D. 考察

多くの油症患者が訴える手足のしびれ感や感覚鈍麻、自律神経失調症などの末梢神経障害や中枢神経障害などの発症機序については明らかとなっていない。今回の研究では今後の治療介入戦略を探索する目的に皮膚における触覚や温冷覚について検討を行った。その結果触覚は油症患者と健常者の間で有意差を認めなかった。しかし、自覚症状がないにもかかわらず明らかに触覚の低下している油症患者が含まれていた。温冷覚についても有意差はなかったが、油症患者で冷覚が鈍麻している傾向にあった。

ヒトの温覚や冷覚の温度感受性は加齢により低下する[3]。油症発生から 50 年が経過しており、患者の年齢も高くなっているため、加齢による温度感受性の鈍麻はあると考えられる。しかし油症患者で冷覚がもっとも低下している患者においては、血液中のダイオキシン濃度もほかの油症患者よりも高くなっていた(図 10～12)。このことから油症患者では温度感受性が血液中のダイオキシン濃度に相関して低下していることが予測される。温度感受性ではないが、過去には血液中の PCDF の値としびれの症状が相関しているという報告がある[4]。今回の研究ではVon freyフィラメントと簡易温冷覚計を用いて神経症状の客観的評価を試みた。しびれなどの自覚症状のない油症患者が対象であったが、その中に皮膚感覚の低下している患者がいたことから、自覚症状はなくとも潜在的に皮膚感覚が低下している油症患者がいる可能性がある。

E. 結論

油症患者と健常人との間に皮膚感覚の有意な変化の差は認めなかった。しかし、油症患者では未だしびれなどの神経障害が残っており、今回の結果が油症患者に対する今後の治療介入戦略を探索する一助となることを期待する。

謝辞

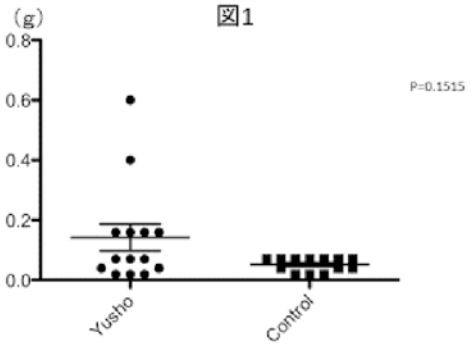
これまでの油症研究にお力添え頂いた関係者の皆様、快く研究に強力下さった油症患者の皆様に深謝致します。

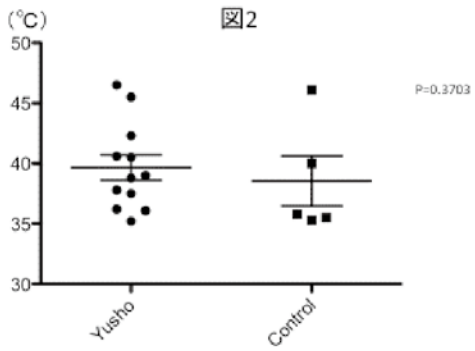
参考文献

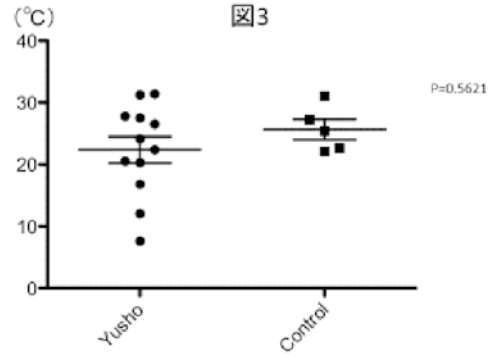
1. Aoki Y: Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters--what we have learned from Yusho disease. Environmental research 2001, 86(1):2-11.
2. 申　敏哲、吉村　恵, 福岡医誌 108(3): 75-82, 2017
3. 深沢　太香子、谷　明日香, 繊維製品消費科学 58 巻 1 号: 108-114, 2017
4. Imamura T et al, Environ Toxicol. Apr;22(2):124-31, 2007

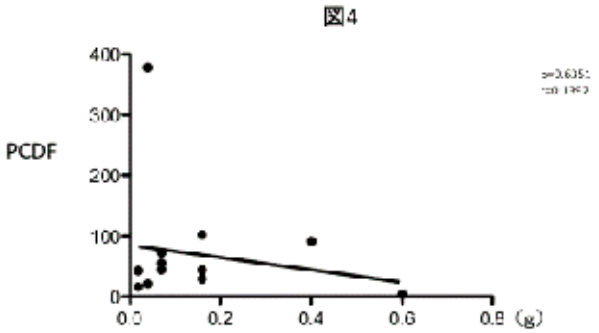
Ｆ．研究発表
なし

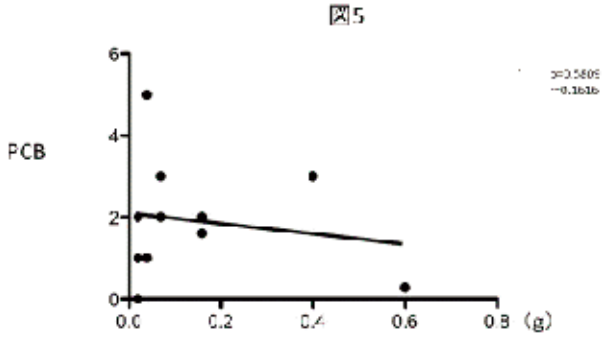
Ｇ．知的財産権の出願・登録状況
なし











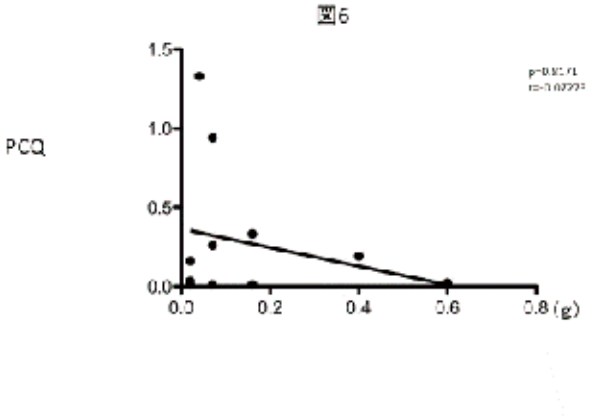
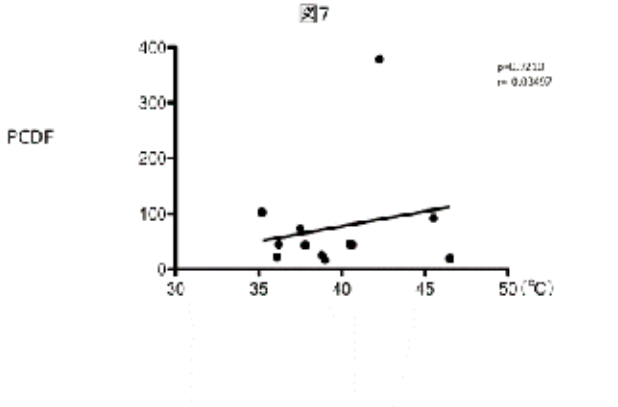
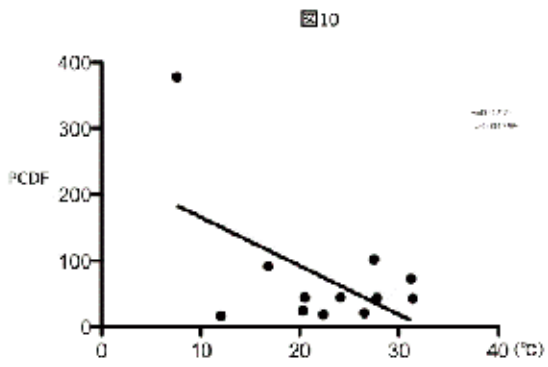
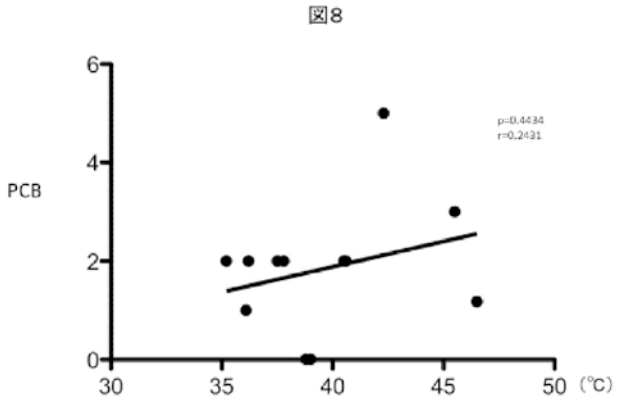
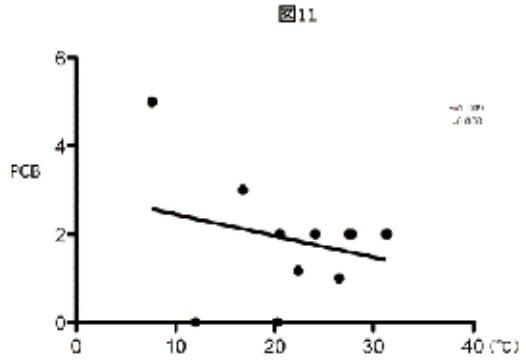


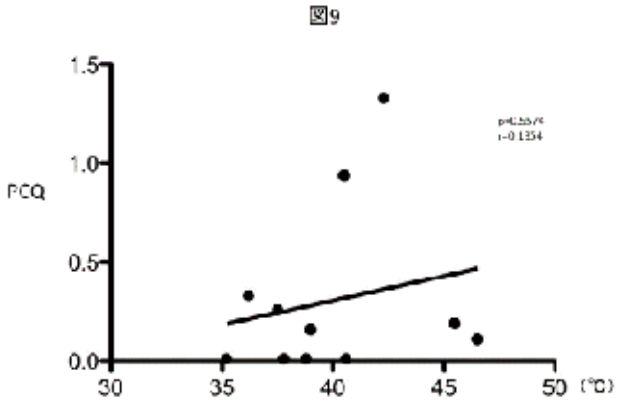
図 1. Von frey フィラメントによる触覚の評価。油症患者と健常人では触覚に有意差はなかった。
図 2.3. 簡易温冷覚計による温冷覚の評価。油症患者と健常人では温冷覚に有意差はなかった。
図 4.5.6. 油症患者の触覚と各種ダイオキシン濃度との相関性。有意な相関性はなかった。











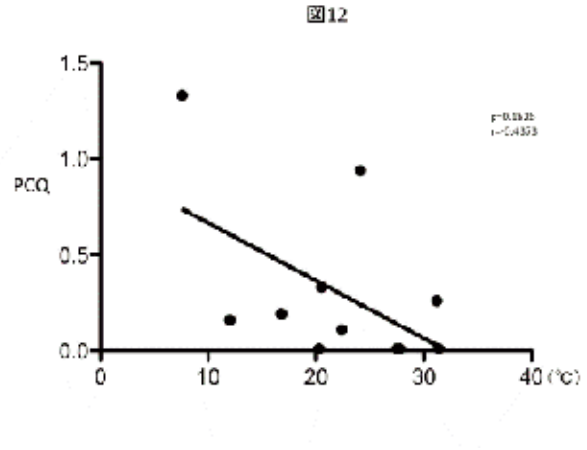


図 7.8.9. 油症患者の温覚と各種ダイオキシン濃度との相関性。有意な相関性はなかった。
図 10.11.12. 油症患者の冷覚と各種ダイオキシン濃度との相関性。有意な相関性はなかった。

分担研究報告書

Myelin proteinsを用いたベンゾピレン投与ラットでの生薬の効果検討

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　准教授
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、感覚刺激による定量的閾値評価法、酸化ストレス・抗酸化力の測定法、Western blot 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が、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の有意な上昇がみられ、その閾値上昇はケイヒの投与により有意に抑制された。酸化ストレス度に関しては、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で有意な酸化ストレス状態の改善が見られた。また、Western blot 法を用いた myelin basic protein (MBP)、cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1)、myelin-associated glycoprotein (MAG)の発現検討では、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒの投与群で MAG の発現低下の抑制、CYP1A1 の発現増加の抑制がみられた。しかし、MBP の発現に関しては群間有意な差はみられなかった。本研究の結果から、ベンゾピレン投与はその毒性が触・圧覚を伝えるAβ線維に作用し、脱髄を起こすことで、感覚異常等を発生させた可能性が示唆された。また、その作用は抗酸化作用と AHR 活性化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が改善され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患者は、現在でも様々な後遺症で苦しんでいる[1)]。 特に、一部の患者では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等が報告されている[2-4)]。近年、ベンゾピレン（ダイオキシン類似化合物）を用いた動物実験の結果、ベンゾピレン投与ラットで末梢のしびれ感等に関連するAβ神経線維の伝導速度が低下していることが確認された。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)]。ベンゾピレンの様な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ことが報告されている。また、Uchi ら[6)] はその AHR の活性を様々な植物成分や生薬で抑制させることが出来ると報告している。特に、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明らかになっている。近年、我々はベンゾピレン投与ラットにケイヒを投与し、その効果を検討した結果、ケイヒの投与がベンゾピレン投与ラットの感覚異常を改善させる可能性を確認した。しかし、そのケイヒの効果やメカニズムはまだ明らかではない。そこで本実験では、ベンゾピレン投与ラットにケイヒを投与し、5Hz、250Hz、2000Hz の正弦波感覚刺激による定量的閾値評価法、ウェスタンブロッティング法、酸化ストレス・抗酸化力測定法を用いて、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明確にすることを目的とした。

B．研究方法

5 週齢の Wistar 系雄性ラット(SLC㈱、静岡)を用いた。ベンゾピレン投与群、ベ

ンゾピレン+ケイヒ投与群に分けた。ベンゾピレン投与は 30mg/kg を、経口投与器を用いてそれぞれのラットに一回 500μℓずつ胃に直接投与した。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、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、2 週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。測定に際しては、ラットを拘束装置に入れて一定時間放置し、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、心臓から採血後、左右の坐骨神経と脊椎標本を採集し、-80℃に凍結した。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。凍結した坐骨神経と脊椎標本は解凍後、T-PER Tissue Protein Extraction Reagent(Thermo Fisher Scientific)を用いてタンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液は cytochrome P450 (P450) 1A1(CYP1A1、Santa Cruz Biotechnology)、myelin basic protein (MBP、Cosmo Bio)、myelin-associated glycoprotein (MAG、Cosmo Bio)、2′ 3′ -cyclic nucleotide 3 ′ -phosphodiesterase (CNPase 、GENETEX) 、 β -Actin(Cell Signaling Technology)の抗体を用いてタンパク質自動分析装置、WES (Protein simple) により分離し分析を実施した。

(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 2 週間後わずかな感覚閾値の変化がみられたが、有意差は認められなかった。また、ベンゾピレン+ケイヒ投与群でもベンゾピレン投与群と比較し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に関しても、ベンゾピレン投与群、ベンゾピレン+ケイヒ投与群共に投与 2 週間後でも群間の有意な感覚閾値の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において,ベンゾピレン投与群では、投与前と比較して投与 2 週間後に感覚閾値の上昇がみられた。ベンゾピレン+ケイヒ投与群では、投与 2 週後、ベンゾピレン投与群に対して感覚閾値の上昇抑制がみられた (Fig.1C)。

酸化ストレス度に対する影響の検討では、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で、酸化ストレスの抑制傾向がみられたが、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、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)。これらの結果から酸化ストレス度を計算した結果が Fig.2C である。BAP/d-ROMs≦12.5 の場合を酸化ストレス状態とみなす。酸化ストレス度では、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で有

意な酸化ストレス状態の改善が見られた。

ケイヒの投与による感覚閾値の改善メカニズムを検討するため、取り出した坐骨神経からCYP1A1(Fig.3A)、MBP(Fig.3B)、MAG (Fig.3C) タンパク質の変化を測定した。AHR の標的遺伝子である CYP1A1 に関しては、ベンゾピレン投与群において、Corn oil 投与群と比較して CYP1A1 タンパク質の発現増加がみられたが、ケイヒ投与群においては、発現増加の抑制傾向が観察された。また MBP、MAG タンパク質に関して、MBP では群間有意な差はみられなかったが、MAG タンパク質において、ベンゾピレン投与群で Corn oil 投与群より発現の低下がみられ、ケイヒ投与群においてその低下の抑制がみられた。

D．考察

本実験では、ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を電気刺激による感覚閾値の評価法を用いて行った。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がみられた。PCB、PCDF、dioxin 等の dioxin 類化合物の複合中毒であるカネミ油症事件は、末梢神経障害由来のもの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]。また、古谷ら[4]はカネミ油症患者で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。末梢のしびれ感は、Aβ線維の伝導速度の緩徐化が関係していると考えられ、近年我々はベンゾピレンがAβ神経線維の伝導速度を低下させることを明らかにした[5]。Aβ神経線維の場合、2000Hz の電気刺激でも選択的に刺激することが出来ると植田ら[8]は報告しており、Koga ら[9]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。これらの結果から、本研究における 2000Hz の電気刺激による閾値の上昇はベンゾピレンの毒性による Aβ線維の異常で発生した感覚異常である可能性が考えられる。また、末梢神経の障害による感覚異常では、感覚神経の伝導速度の遅延を認めることが多いとの報告がある[10-12]。伝導速度の遅延の一つ原因として脱髄（脱ミエリン）が考えられ、また脱髄は神経細胞の軸索を取り巻く髄鞘には障害が生じるが、中の軸索は保たれる現象である。脱髄性病変による感覚障害の電気生理学的検討では、感覚神経の伝導速度遅延が報告されている[12,13]。脱髄疾患は、神経を覆っているミエリンが消失し(脱ミエリン化)、神経信号がうまく伝達できなくなるため、四肢のしびれなど様々の神経症状が出る原因不明の難病である。本研究では伝導速度の遅延と脱ミエリンの関係を検討するために MBP、MAG タンパク質の発現を比較した結果、ベンゾピレン投与群で MAG タンパク質の有意な発現低下がみられたが、ケイヒ投与群では発現低下の抑制がみられた。Pronker ら[14]によると MAG は、ミエリン鞘の形成と維持に重要なタンパク質であり、MAG 遺伝子の変異は、脱髄疾患に関係すると報告している。これらの結果から、ベンゾピレン投与群における感覚閾値の上昇はベンゾピレンの毒性により脱髄が起こることで、神経の伝導速度が低下し、感覚閾値上昇がみられた可能性が考えられる。

本研究の結果、ケイヒの投与はベンゾピレン投与群に対し、感覚閾値の上昇抑制、酸化ストレス度の改善、CYP1A1 の発現増加の抑制、MAG の発現低下を抑制させた。

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 の標的遺伝子である CYP1A1 タンパク質の発現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)]。これらの結果は、AHR の活性化抑制と抗酸化ストレス作用を持つケイヒはベンゾピレンの毒性により発生される AHR の活性化や酸化ストレスを抑制させることを示唆している。

本研究の結果から、ベンゾピレン投与はその毒性が触・圧覚を伝えるAβ線維に作用し、脱髄（脱ミエリン）を起こすことで、感覚異常等を発生させた可能性が示唆された。また、その作用は抗酸化作用と AHR 活性化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が改善され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 活性の阻害作用を持つケイヒ等の植物成分や生薬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。今後、更なる研究を通して、慢性中毒モデルでの効果検討も必要である。

引用文献

1) Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlor-inated dibenzofurans as endocr-ine 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 antioxi- dant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. J Dermatol Sci. 85(1):36-43, 2017.

7) 林 信太郎, 他：大脳認知機能の客観的評価法の開発. 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２４年度 総括・分担研究報告書, 2012.

8) 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.

9) Koga K, et al. Selective Activation of Primary Afferent Fibers Evaluated by Sine-Wave Electrical Stimulation. Mol. Pain 1:13, 2005.

10) Michalek JE, et al: Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation Ranch Hand. Neurotoxicol. 22(4):479-90, 2001.

11) Thömke F, et al : Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans . Acta Neurol . Scand . 106(3):155-158, 2002.

12) 三井 良之, 他：末梢神経の障害. 日本内科学会雑誌.97(8):1771-1777,

2008.
13)荒記俊一，村田勝敬：鉛による末梢神経障害の診断. 26(1)：3-8,1984.
14) Pronker MF, et al : Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling. Nature Communicati-ons. 7:13584, 2016.

F．研究発表

１．論文発表

無し

２．学会発表

申敏哲，行平崇，小牧龍二，土井篤，福永貴之，吉村惠. 感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討. 第 70 回西日本生理学会. 令和元年 11 月 2 日.

G．知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得

無し

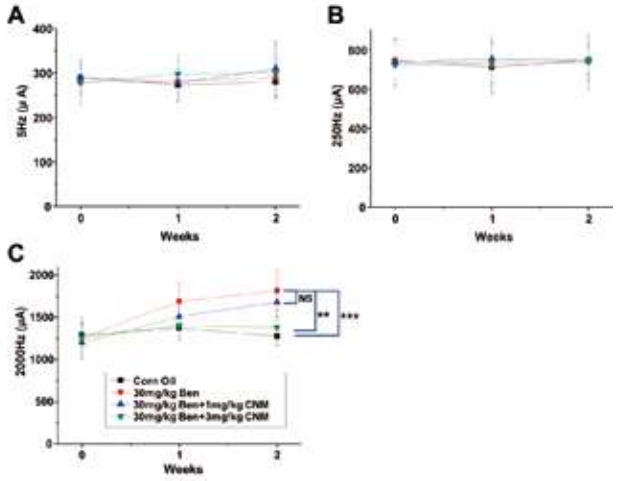
２．実用新案登録

無し

３．その他

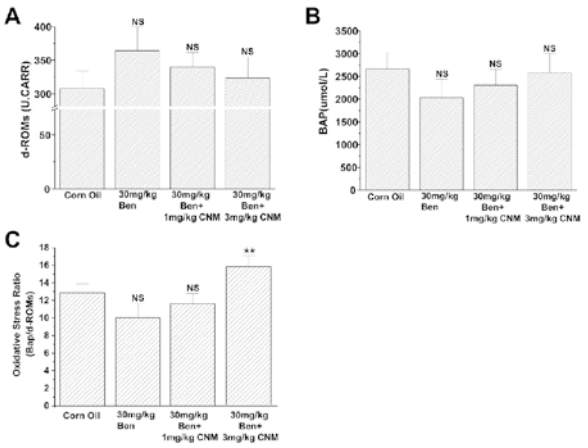
無し

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。



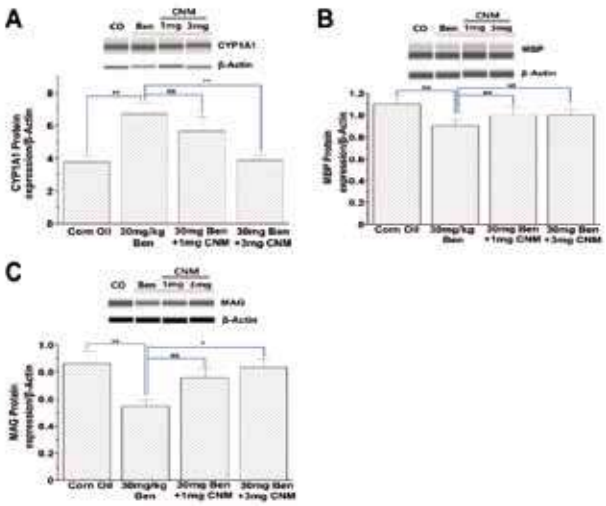
A, 5 Hz 電気刺激周波数. B, 250 Hz 電気刺激周波数. C, 2000 Hz 電気刺激周波数. Ben, ベンゾピレン； CNM, ケイヒ； NS, no significant；**, P<0.01；***, P<0.001；Mean±S.D. n=6.

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. C, 酸化ストレス度. Ben, ベンゾピレン； CNM, ケイヒ； NS, no significant；**, P<0.01；Mean±S.E. n=6.

Fig3. ベンゾピレ又はベンゾピレ＋ケイヒ投与が CYP1A1、MBP、MAG タンパク質の変化に及ぼす影響。



A, 抗酸化力. B, 酸化ストレス. C, 酸化ストレス度. Ben, ベンゾピレン； CNM, ケイヒ； NS, no significant；*, P<0.05;**, P<0.01；Mean±S.E. n=6.

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 SP-D の役割

研究分担者　濵田　直樹　九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教
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
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　肺サーファクタント蛋白(SP-D)ノックアウトマウスに Benzo[a]pyrene(BaP)を経気道的に投与すると、細気管支領域で PAS 陽性細胞の著明な増加が観察され、BaP による気道傷害が野生型マウスに比して増悪しており、油症肺傷害における SP-D の保護的役割が考察された。

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 CYP1A1 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-CYP1A1 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-A、SP-D)に役割に着目して研究を行った。

B．研究方法

BaP をマウスに経気道的に投与し、7 日後に組織学的評価を行った。
具体的には C57BL/6 マウス(雄)10 週齢の SP-D ノックアウトマウスもしくは、野生型のマウスに Tricaprylin(TR)で溶解した BaP を 1 匹あたり 500μg(50μl)を 気管切開の上、経気管的に投与した[1)2)]。対照群には溶媒のみを 50μl 投与した。投与 7 日後に肺を取り、パラフィン固定を行った。その後、薄切スライドを作成し、WT-TR、WT-BaP、SP-D(-/-)-TR、SP-D (-/-)-BaP の 4 群に対して、HE 染色にて病変を評価した。次に、PAS 染色, Alcian blue(AB)染色、 SurfactantProtein(SP)-A、SP-C、CC10 による免疫染色を施行した。

C．研究結果

BaP 経気管投与後、投与 7 日後に肺を取り出して HE 染色にて検討した結果、WT-TR、WT-BaP、SP-D(-/-)-TR、SP-D(-/-)-BaP の 4 つの群の炎症所見などに差は認めなかった。細気管支領域を中心に観察すると、SP-D(-/-)-BaP の群で、細気管支上皮の肥厚と、配列の乱れが観察された。(Figure

1)
PAS 染色では、WT-BaP 群において比較的区域支に近い終末細気管支領域で、PAS 陽性細胞が認められた。SP-D(-/-)-TR 群においてもわずかな PAS 陽性細胞を認めた。しかし、SP-D(-/-)-BaP 群で著明な PAS 陽性細胞の増加を認めた。(Figure 2)
AB 染色で、塩基性のムコ多糖類を染色すると、同様の傾向がみられ、SP-D(-/-)-BaP 群の気道上皮で多数、濃染する細胞を認めた。(Figure 3)
Club 細胞特異的タンパク質 CC10 に対する抗体で免疫染色を行うと、終末細気管支上皮の大部分が濃染され、ほとんどが Club 細胞であると考えられた。SP-D(-/-)-BaP 群で区域気管支に近い細気管支領域(PAS 染色で陽性細胞が多数認められていた部位)を観察すると、上皮の配列中に、CC10 で染まらない細胞が観察され、Club 細胞以外の細胞の増加、すなわち杯細胞の過形成が推測された。(Figure 4)
SP-A で免疫染色を行うと、終末細気管支付近、Club 細胞主体の気管支上皮での SP-A の発現は、WT-TR 群と比して WT-Bap 群で抑制されて見えた。同様の傾向は SP-D(-/-)の 2 つの群においても観察された。(Figure 5)

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。一般に、SP-D ノックアウトマウスは肺気腫モデルとして研究に用いられ、病理像としては、肺胞腔の拡大が確認される[7]。今回の検討で、SP-D ノックアウトマウスに BaP を経気道的に投与することにより PAS 染色陽性の気道上皮細胞の増加を認めたが、これらは杯細胞の過形成によるムチン類の増加、つまり気道分泌物の増加を表していると考えられる。SP-A 染色では、BaP を投与された群で、比較的末梢の終末細気管支領域での気道上皮の SP-A の発現に抑制があるようであり、これは Club 細胞傷害による結果と推測できる。これらの結果から、SP-D がダイオキシン類(BaP)に対する気道保護作用を有している可能性があると考えられる。平成 30 年度の報告書で示す通り、我々はリコンビナント SP-D が club 細胞を保護する所見を in vitro で観察している。今後、どのようにして SP-D がダイオキシン類に対する気道保護作用を呈するのかを、引き続きリコンビナント SP-D や、ドメイン欠損した SP-D を強制発現させた Club 細胞の cell line を用いて機序解明を行う予定である。

E．結論

SP-D ノックアウトマウスに BaP を経気道的に投与することによって気道分泌物増加が確認された。

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

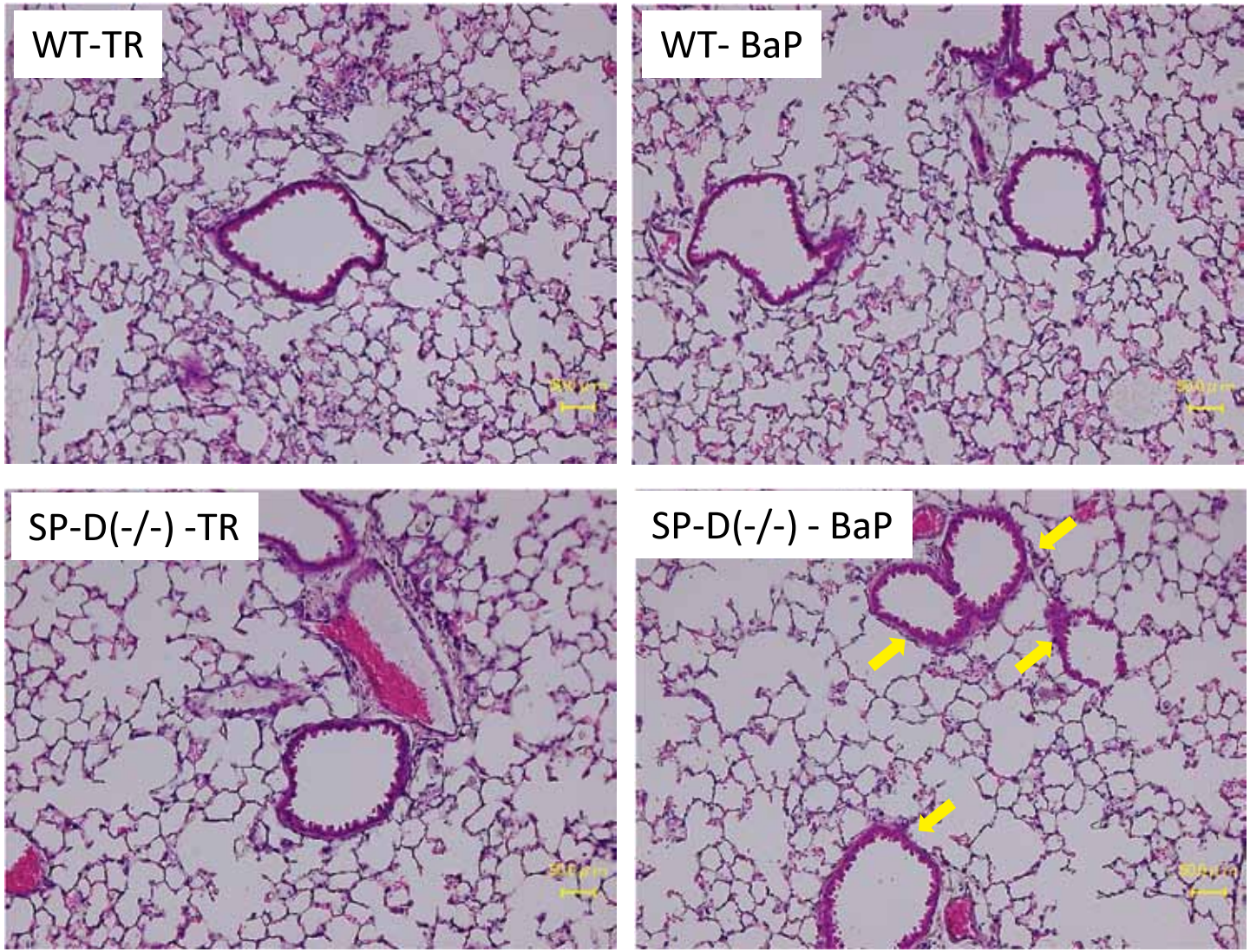
なし

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, 2007.

Figure.1

HE染色

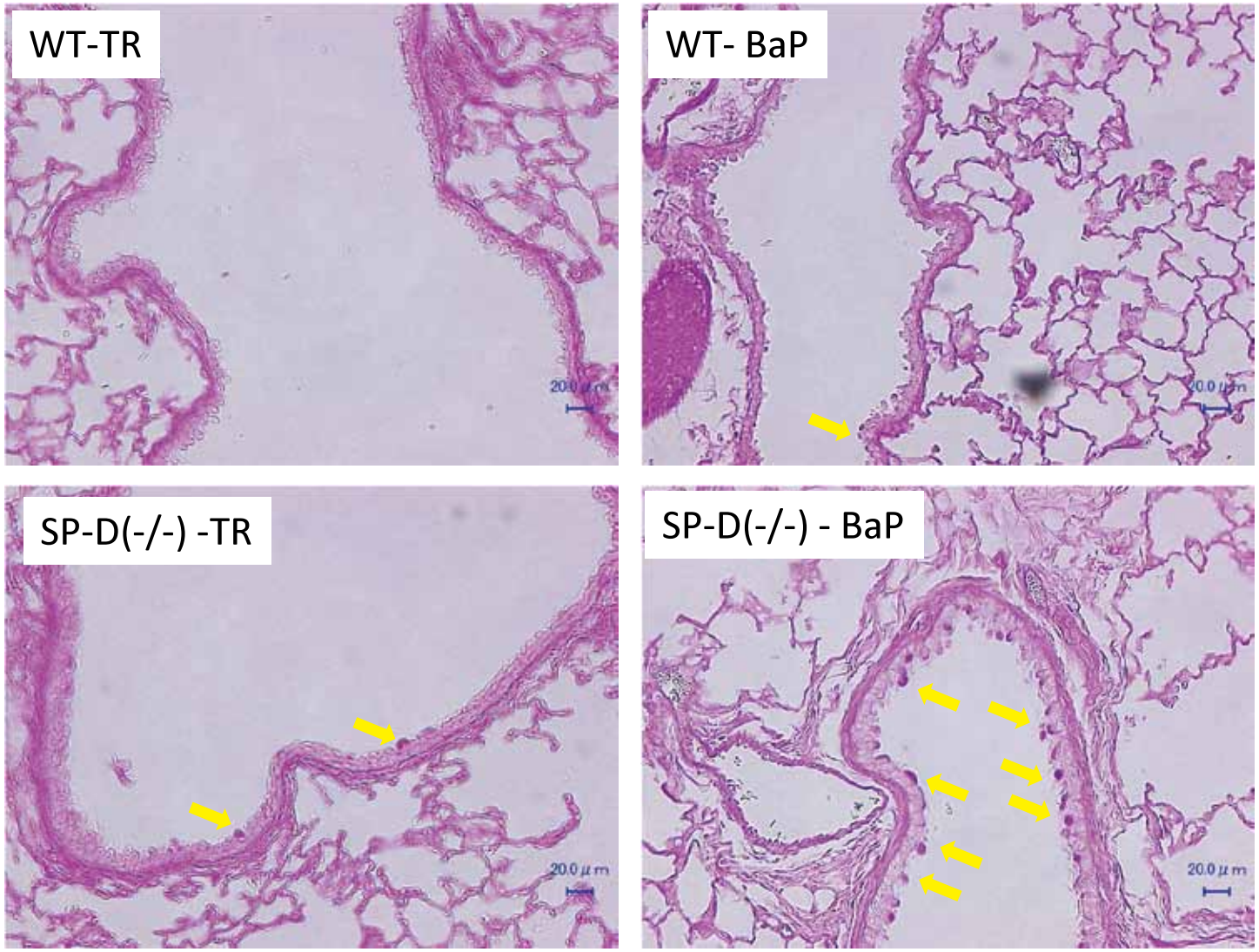


細気管支領域を中心に観察すると、SP-D(–/–)-Bap群で、細気管支上皮の肥厚を認める(↑)。

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金

Figure.2

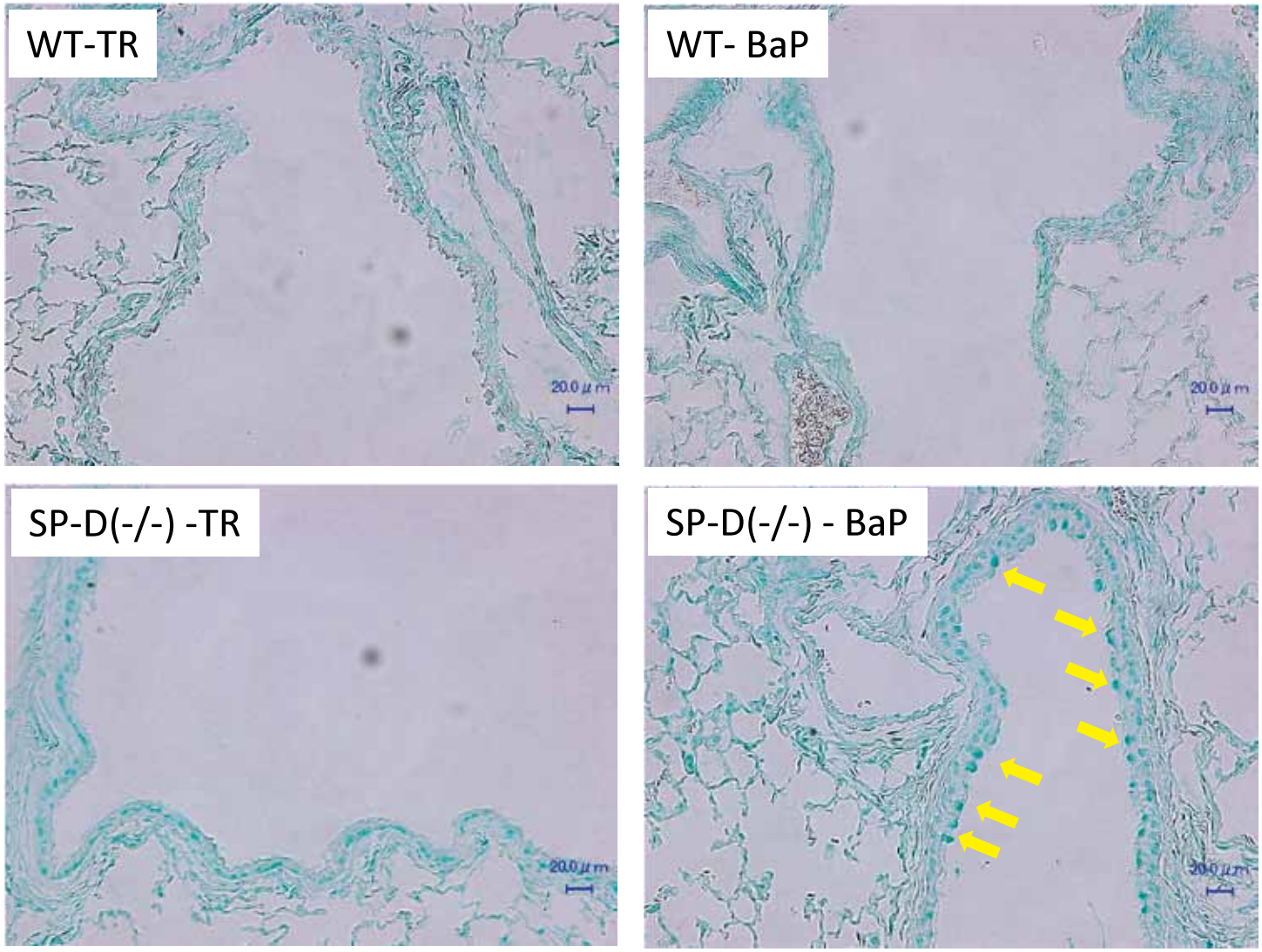
PAS染色(強拡大)



比較的区域支に近い終末細気管支領域で、PAS陽性細胞が認められる(↑)。
SP-D(−/−)-TR群に比して、SP-D(−/−)-Bap群で著名なPAS陽性細胞の増加を認める。

Figure.3

Alcian blue染色(強拡大)

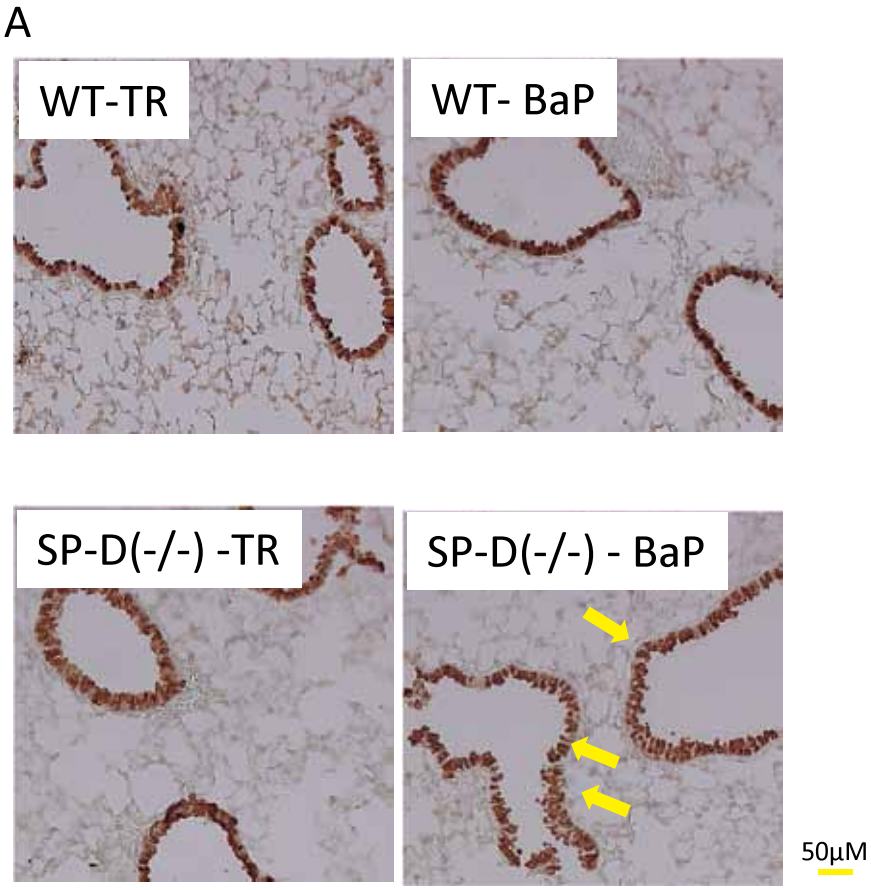


PAS染色同様、SP-D(–/–)-Bap群で著名なAlcian blue陽性細胞の増加を認める。

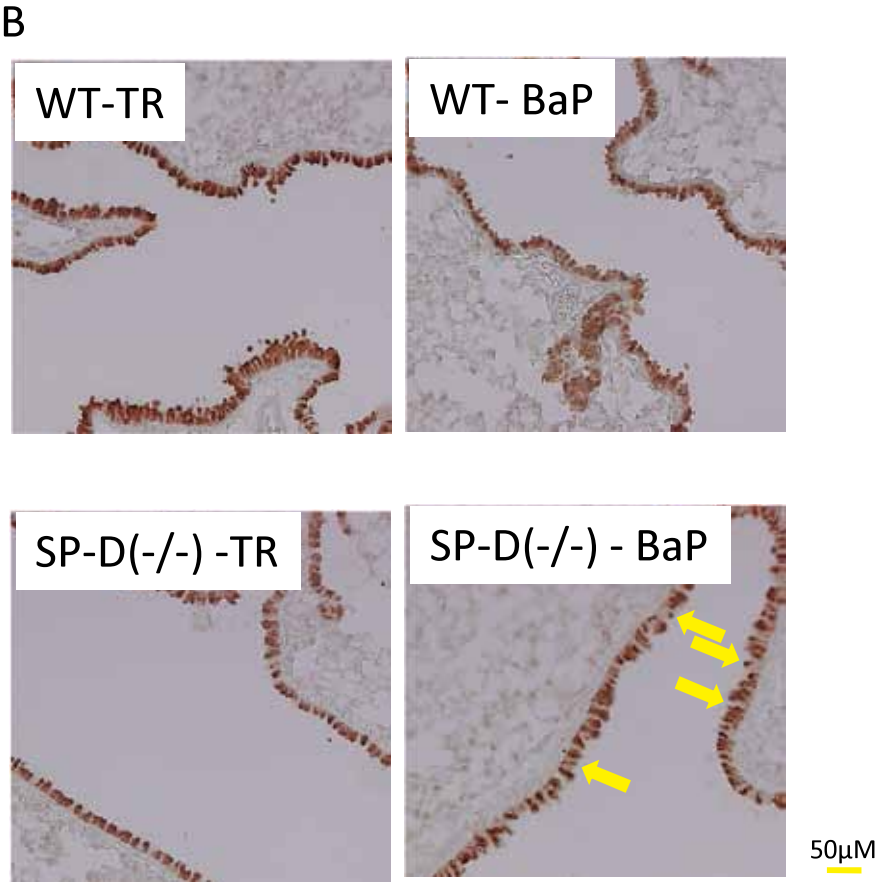
令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金

Figure.4

CC10免疫染色



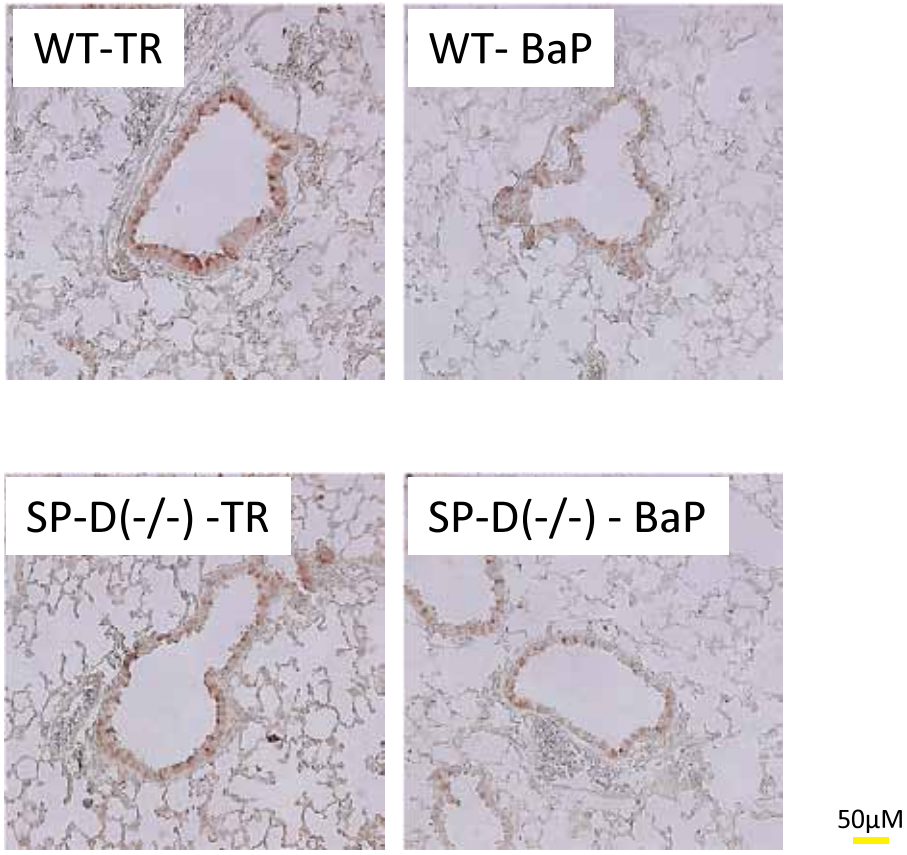
A
.細気管支領域を中心に観察すると、
HE染色同様SP-D(−/−)-Bap群で、
細気管支上皮の肥厚と
配列の乱れを認める(↑)。



B
SP-D(-/-)-Bap群で、より区域気管支に近い細気管支領域を
観察すると、上皮の配列中に、CC10で染まらない細胞が
観察され、杯細胞の過形成が推測される。

Figure.5

SP-A免疫染色



終末細気管支付近、気管支上皮のSP-Aの発現は、
WT-TR群と比してWT-Bap群で抑制されて見える。
同様の傾向はSP-D(–/–)の2つの群においても観察される。

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金

ドラッグデリバリーシステムと腸粘膜内アミノアセチル酸濃度の研究

研究分担者　　鳥巣　剛弘　九州大学病態機能内科　併任講師

研究要旨　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、消化器症状として下痢や過敏性腸炎症状が報告されてきた。ダイオキシン類の生体への毒性には活性酸素が中心的な役割を果たすと考えられている。5-アミノサリチル酸は活性酸素の産生抑制や活性酸素による細胞傷害の抑制に働くことが知られている。今回、ドラッグデリバリーシステムの相違による盲腸と直腸粘膜内での 5-アミノサリチル酸ならびに代謝産物のアセチル 5-アミノサリチル酸の濃度を明らかにした。

A 研究目的

ダイオキシン類による中毒である油症の早期より下痢が男性では 19.1%女性で 17.0%見られ、その後の経過においても 1988 年には 42.0%、2001-2003 年でも 31.5%に下痢症状が報告されている。ほかにも腹痛、嘔気や食欲不振などの多くの消化器症状が報告されてきた。一般住民と比較しても油症患者は明らかに下痢や過敏性腸症候群様の症状が多いことが明らかになってきている(1)。

ダイオキシン類の毒性は消化管を含む様々な臓器に広く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。ダイオキシン類は生体内に取り込まれたのち Ah 受容体に結合し、Ah 受容体が細胞質から核内へ移行することにより様々な転写産物が作られる。その際に酸化ストレスが生じることで、たんぱく質や DNA に障害を与え細胞傷害が生じると考えられている。ダイオキシン類による消化器症状のメカニズムは不明であるが活性酸素の寄与が仮説として挙げられる。

5 アミノサリチル酸は活性酸素産生の抑制や活性酸素による細胞傷害の抑制効果が知られている薬剤である。5 アミノノアセチル酸は腸管局所で作用し、腸粘膜内に吸収後は速やかに消化管粘膜内でアセチル化され、また血中に移行した際も肝臓で速やかにアセチル化され尿中に排泄される。そのため病変局所におけるアミノノアセチル酸濃度は薬効に重要な役割を占める。

潰瘍性大腸炎は原因不明の慢性腸炎を生じる疾患で下痢を主症状とするが、活性酸素が病因の中心的役割を果たすことが知られている。潰瘍性大腸炎は直腸炎型や全大腸炎型など病変

範囲が異なる。そのため病型によりドラッグデリバリーシステムを考慮することでより有用な治療ができると考えられる。また5アミノノアセチル酸製薬は炎症性腸疾患に対し臨床応用されており、5アミノサリチル酸の濃度は腸炎の治療の有効性に相関することが報告されている(2)。現在、時間依存的薬剤とPH依存的に薬剤が放出される内服薬が存在する。時間依存的に小腸から大腸にわたり徐放的に作用する薬剤は盲腸で、小腸と大腸でPH が異なることを利用し、PH 依存的に薬剤が放出される内服薬はより直腸で粘膜内濃度が高くなると考えられている。

そこで本研究では5アミノノアセチル酸薬内服中の潰瘍性大腸炎の患者において大腸粘膜内の薬剤濃度を測定することで異なるドラッグデリバリーシステムが薬剤分布に影響があるか検証をした。

B. 研究方法

九州大学病院の通院中の潰瘍性大腸炎患者 20 名を対象とした。材料として大腸内視鏡施行時に生検により大腸粘膜組織を直腸と盲腸から採取した。50%acetonitrile を加えたのち内部標準液を加え破砕し遠心により抽出液を分離した。抽出液を LC-MS/MS により5アミノアセチル酸と代謝産物であるアセチル5アミノアセチル酸を測定した。

C. 研究結果

5 アミノサリチル酸ならびにアセチル 5 アミノサリチル酸に関して 20 症例(40 検体)測定を行った。盲腸における粘膜内の5アミノサリチル酸濃度は最大 4429.8ug/mL 最小 89.8ug/mL で中央値 126.9ug/mL、より病変が多い直腸においては最大 7177.6ug/mL 最小 78.6ug/mL で中央値 132.2ug/mL と直腸において濃度が高かった。しかし同一患者における盲腸と直腸の5アミノサリチル酸の粘膜内濃度は相関がなかった(図 1)。この結果はアセチル 5 アミノサリチル酸でも同様であった。内服量と盲腸および直腸の5アミノサリチル酸の粘膜内濃度も内服量が多くなるにつれ濃度が高くなる傾向があったものの影響はさほど大きくなかった(図 2)。PH 依存による徐放薬と時間依存性の徐放薬で大腸粘膜内の5アミノサリチル酸濃度は差がなかった。しかし時間依存製薬は個人による差が大きい傾向がみられた(図 3)。アセチル5アミノサリチル酸も同様の傾向であった。

D. 考察

ダイオキシン類での消化器症状については頻度が明らかになっているも

のの、いまだメカニズムは明らかではない。しかしダイオキシン類による毒性に活性酸素ストレスが大きな影響を与えていることから、消化器症状に対して活性酸素の抑制や活性酸素による細胞傷害を抑制する5アミノアセチル酸が有用な可能性が考えられる。本研究で同じ個人において盲腸と直腸の大腸粘膜内5アミノアセチル酸濃度が相関しないことは興味深い結果であった。薬剤の分布が個人により違うことを意味し、腸炎の分布に合わせてより適切な薬剤を選択することで治療効果が高まる可能性があることを意味する。本研究は時間依存的な薬はより盲腸で、PH 依存薬はより直腸で粘膜内5アミノアセチル酸濃度が高いことを仮説としたものの、時間依存製剤とPH依存製剤で特徴的な薬剤分布を示さなかったことから単純に直腸炎に対しPH分布、全大腸炎型に時間依存薬が良いとは意味しなかった。むしろ個人の状態が大きく寄与する。特に時間依存性徐放薬はばらつきが大きく、下痢や食事などの薬剤の通過速度が粘膜内濃度に影響していると推察され、今後腸管蠕動などの評価も含めて解析をすることで詳細が明らかになると考えられる。

また本研究では大腸粘膜での活性酸素の評価ができていないため大腸粘膜内の5アミノアセチル酸濃度と活性酸素除去の生体での評価はできていない。しかし大腸粘膜に5アミノアセチル酸を添加することで活性酸素産生の抑制効果が報告され、In vitro 試験での活性酸素産生抑制効果は1umol/L 以上で効果が生じ、活性酸素による細胞傷害抑制には10umol/L 以上の濃度が必要とされている(3)。本研究では通常臨床の薬剤内服で生体においても十分な5アミノアセチル酸濃度が分布できていることが示された。今後、大腸粘膜における活性酸素や腸炎の治療効果を含めて評価をすることでより5アミノアセチル酸による活性酸素除去の臨床的意義が明らかになると考えられる。

E. 結論

ダイオキシン類の毒性に中心的役割を果たす活性酸素の腸管における軽減に5アミノサリチル酸が寄与しえるが、粘膜内5アミノサリチル酸濃度は薬剤特性よりも個人差が大きいことが推測された。

参考文献

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.

Frieri G1, Giacomelli R, Pimpo M, Palumbo G, Passacantando A, Pantaleoni G, Caprilli R. Mucosal 5-aminosalicylic acid concentration inversely correlates with severity of colonic inflammation in patients with ulcerative colitis. Gut. 2000 Sep;47(3):410-4.

Simmonds NJ, Millar AD, Rampton DS. Antioxidant effects of aminosalicylates and potential new drugs for inflammatory bowel disease: assessment in cell-free systems and inflamed human colorectal biopsies. Aliment Pharmacol Ther. 1999; 13: 363-72.

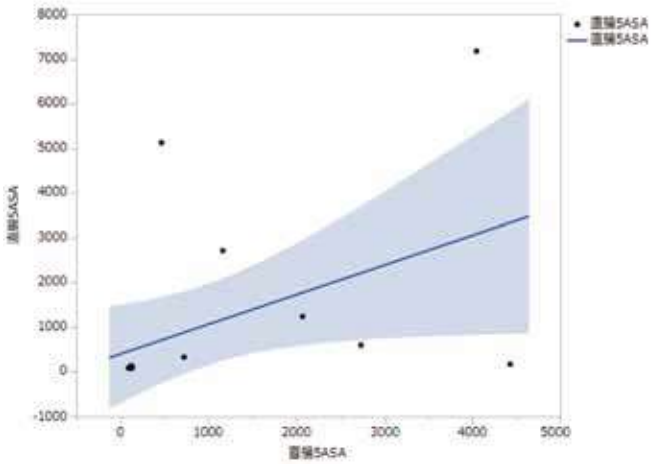


図 1: 5 アミノノアセチル酸の直腸粘膜と盲腸粘膜内濃度の相関

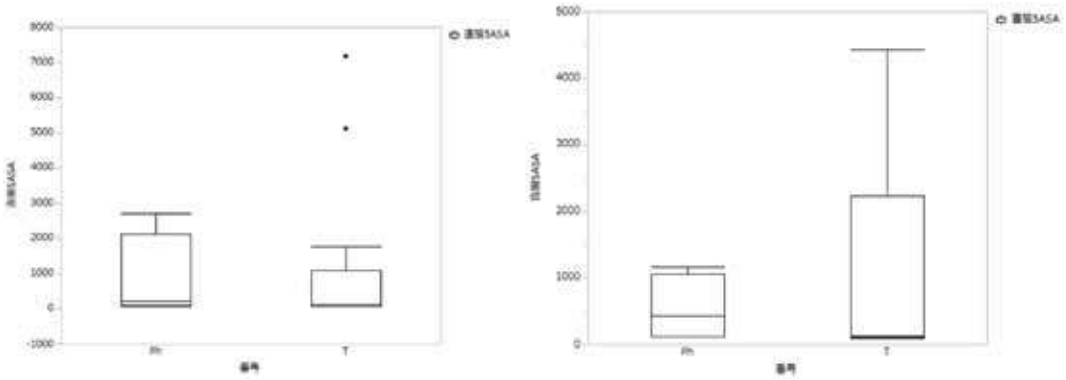


図 2: PH 依存薬(ph)と時間依存薬(T)での直腸と盲腸の 5 アミノノアセチル酸濃度

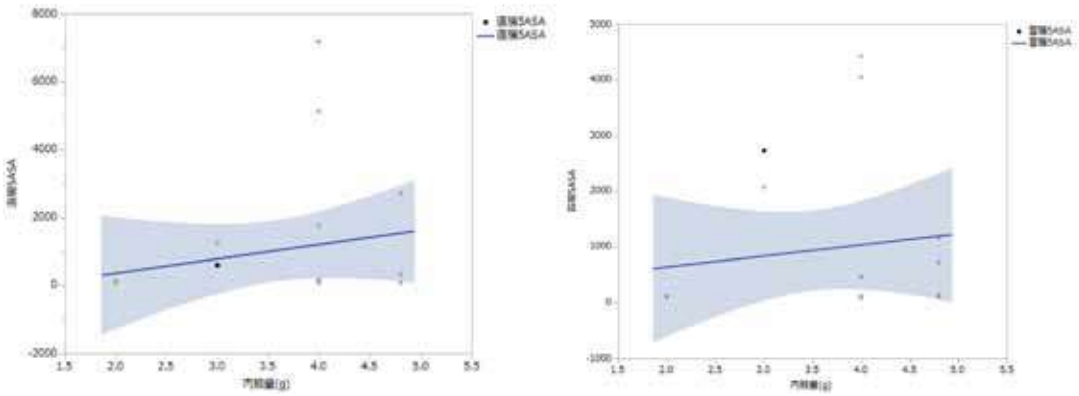


図 3：直腸と盲腸の 5 アミノノアセチル酸濃度と内服量の相関

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：脳の性分化と生殖腺の発達に対する芳香族炭化水素受容体の寄与

研究分担者　　石井　祐次　九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野　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。2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)による出生児の性未成熟の機構解析を目指して、芳香族炭化水素受容体(AHR)欠損ラットで検討を行った。その結果、TCDD 母体暴露していない AHR 欠損雄ラットでは、脳の性分化が起こる周産期において、AHR 欠損により脳下垂体の LHβ の mRNA 発現の低下、さらに、それを起点とした性ステロイド合成系タンパク質、および、性ステロイドである testosterone の低下およびその傾向を示すことが明らかになった。このことから、AHR が脳下垂体 LHβ 遺伝子のエンハンサー配列である xenobiotic responsive element (XRE) 配列に直接結合し、転写を制御している可能性が考えられた。そこで、LHβ 遺伝子に対して AHR が AHR 依存的に LHβ の転写に有意な影響があるのか否かを検証するため、抗 AHR 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) にて解析を行った。その結果、WT と AHR ヘテロ欠損雄胎児間で AHR の LHβ の XRE 配列への結合能に有意な差は見られなかった。次に、GD18 において脳下垂体の LH 産生細胞への分化に関与する因子、GATA2, Pitx1 および Prop1 の発現の有意な低下を認めた。AHR は胎児期の脳下垂体に作用し LH 産生細胞への分化に重要な役割を示す可能性が浮上した。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。AHR 欠損により、思春期の血中 testosterone の減少が明らかになった。さらに、この結果に付随して、AHR 欠損により、精子数の減少も明らかとなった。すなわち、AHR は精巣の性ホルモン分泌や機能維持に関与する可能性が示唆された。出生 2 日目(PND2)の雄では、AHR 欠損により著しく血中 testosterone 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 週齢および 8 週齢では、AHR 欠損雄ラットで、testosterone 濃度が野生型ラットに比べ著しく低かった。しかし、13 週齢および 20 週齢では、野生型と遜色ないレベルであった。AHR 欠損により、生殖器官に形態学的な影響がおよぶか否かを検討するため、精子形成が始まる思春期である 8 週齢雄ラットの精巣ならびに精巣上体管を HE 染色により、観察した。野生型と比較して、欠損型は精巣上体管内の精子数の減少傾向が観察され、AHR 欠損による精子数減少が想定された。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 testosterone の減少、およびその後の持続的な精子数の減少が引き起こされたことから、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。当研究室

の先行研究 (15)および平成30年度分担研究報告における経過報告を一部参照しつつ、令和元年度の知見を合わせて報告する。

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 testosterone 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。

5. クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)

WT および KO の雌ラット (7-10 週齢) のラットと WT の雄ラットを交配させ、妊娠ラットを作製した。そののち、GD20 の胎児より脳下垂体を採取して、定法に従って行った。LHβ遺伝子 (GenBank accession number: AC_000069)の XRE1 および XRE2 を解析対象とした。抗体には Anti-AHR antibody (Anti-Aryl hydrocarbon Receptor antibody [RPT9]-ChIP Grade: Aabcam, Inc.)および非感作ウサギ IgG を用い、沈降物から real-time PCR により定量を行った。

(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 でも、差は大きくはないものの脳下垂体の LHβ mRNA は有意に低下していた (Fig. 1B)。また、血液中の LH レベルも、GD20 にて有意に低下していたが (15)、PND2 では有意ではなかった (Fig. 1A)。一方、複数の脳下垂体ホルモンに共通のα–サブユニットである glycoprotein hormone α-subunit (α-GSU)の発現には AHR 欠損の影響はなかった (Fig. 1C)。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 GD18 で有意な減少、PND2 でも減少傾向を示した (Fig. 2B)。また、CYP17 の変動は GD18 および PND2 において減少傾向を示すに止まった (Fig. 2E)。ステロイド産生系酵素である 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD)および CYP11A1 も GD18 において AHR-KO では有意な減少を示し、PND2 では前者にのみ僅かではあるが有意な減少が認められた (Fig. 2CD)。これらのことに合致して、血中 testosterone 濃度は、PND2 において著しく低下していた (Fig. 2A)。

下垂体前葉は、LHβ、成長ホルモン (GH)、thyroid-stimulating hormone β (TSHβ)、propiomelanocortin (POMC)、および prolactin など、異なるホルモンを産生する細胞に分化していることが知られているが (Fig. 3)、LHβ の場合とは異なり、これらホルモンの発現には AHR-KO の影響が見出されなかった (Fig. 4)。従って、AHR-KO の影響は LHβ に特異的である可能性が浮上した。また、上位器官である視床下部で下垂体の LHβ に影響し得る因子である gonadotropin-releasing hormone (GnRH)、Kisspeptin (Kiss1) および gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) の発現に AHR-KO の影響は見出せなかった (Fig. 5)。そこで、LHβ 遺伝子に対して AHR が AHR 依存的に LHβ の転写に有意な影響があるのか否かを検証するため、抗 AHR 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) にて GD20 の胎児脳下垂体の解析を行った。その結果、WT と AHR ヘテロ欠損雄胎児間で AHR の LHβ の XRE 配列への結合能に有意な差は見られなかった (Fig. 6)。次に、GD18 において脳下垂体の LH 産生細胞への分化に関与する因子、GATA2 (GATA-binding factor 2), Pitx1(pituitary homeobox 1) および Prop1 (paired like homeodomain factor 1) の発現の有意な低下を認めた (Fig. 7)。AHR は胎児期の脳下垂体に作用し LH 産生細胞への分化に重要な役割を示す可能性が浮上した。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 testosterone 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 週齢および 8 週齢においては、血中 testosterone 濃度は、AHR-KO 雄で著しく低かった (Fig. 8)。一方、13 週齢および 20 週齢では、野生型と遜色ないレベルであった。testosterone の低下が顕著であった 6 週齢および 8 週齢において視床下部および下垂体の上位調節因子の変動を調べたところ、8 週齢において下垂体の LHβ が僅かながら有意に低下していた (Fig. 9A)。視床下部の GnRH、Kiss1 および GnIH には影響がなかった (Fig. 9BCD)。そこで、そこで、AHR 欠損により、生殖器官に形態学的な影響がおよぶか否かを検討するため、精子形成が始まる思春期である 8 週齢雄ラットの精巣ならびに精巣上体管を HE 染色により、観察した。精巣の精細管を観察した結果を Fig. 10 左側 に示す。上段の野生型と比較して、下段の欠損型は精細管内の細胞間の間隔が広く、細胞密度が低い傾向が観察された。続いて、精巣上体管を観察した結果を Fig. 10 右側に示す。こちらも、野生型と比較して、欠損

型は精巣上体管内の精子数の減少傾向が観察され、AHR 欠損による精子数減少が想定された。なお、同データは平成 30 年度報告書にて提示したものであるが、データ内容を再考して再提示するものである。これに合致して、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. 11)。また、同期間において体重、精巣重量、精巣上体の重量には有意な差は認められなかった (Fig. 12ABC)。なお、6 週齢、8 週齢において、下垂体の prolactin (PRL) および follicle-stimulating hormone β (FSHβ)の発現には影響は認められなかった。

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、3β-HSD ならびに CYP11A1 の mRNA レベルが減少ないし減少傾向を示すことを確認した (Figs. 1-2)。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。StAR、3β-HSD ならびに CYP11A1 mRNA レベルは、GD18 において減少、また生後の PND2 においても LHβ および 3β-HSD への低下が認められた (Figs. 1 and 2)。また、血中 testosterone 濃度は、PND2 において著しく低下していた (Fig. 2: 平成 30 年度報告参照)。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 欠損による臨界期の LH の低下機構は、現時点では明確ではない。ChIP 解析から、AHR が直接 LH 遺伝子を調節することを明確に示す結果は得ていないものの、GD18 において脳下垂体の LH 産生細胞への分化に関与する因子、GATA2, Pitx1 および Prop1 の発現の有意な低下を認めた (Fig. 7)。AHR は胎児期の脳下垂体に作用し LH 産生細胞への分化に重要な役割を示す可能性が浮上した。

AHR 欠損により周産期に低下した testosterone 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 testosterone 濃度は、AHR-KO 雄で著しく低かった (Fig. 8: 平成 30 年度報告参照)。この低下は 8 週齢でも顕著であったが、13 週齢および 20 週齢では AHR-KO においても遜色ないレベルであった (Fig. 8) また、8 週齢におい精巣上体管内の精子数の減少傾向が観察され、AHR 欠損による精子数減少が想定された (Fig. 10)、これに合致して 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. 11: 平成 30 年度報告参照)。AHR-KO ラットでは、20 週齢において testosterone レベルは対照群と同程度であるにもかかわらず、精子数が減少していた。PRL や FSHβ には変動はなかったことから、思春期における testosterone レベルの低下が成獣における精子低下の要因であることが強く疑われた。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、血中 testosterone レベルの低下があること、および8週齢において精巣上体管内の精子数の減少傾向を伴って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 testosterone 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。その働きはLH産生細胞への分化の過程において重要と推定される。AHR の欠損は、思春期の testosterone 合成を低下させ、精巣上体管内の精子数の減少傾向を伴って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36回日本薬学会九州支部大会 (長崎、2019 年 11 月 16 -17 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).

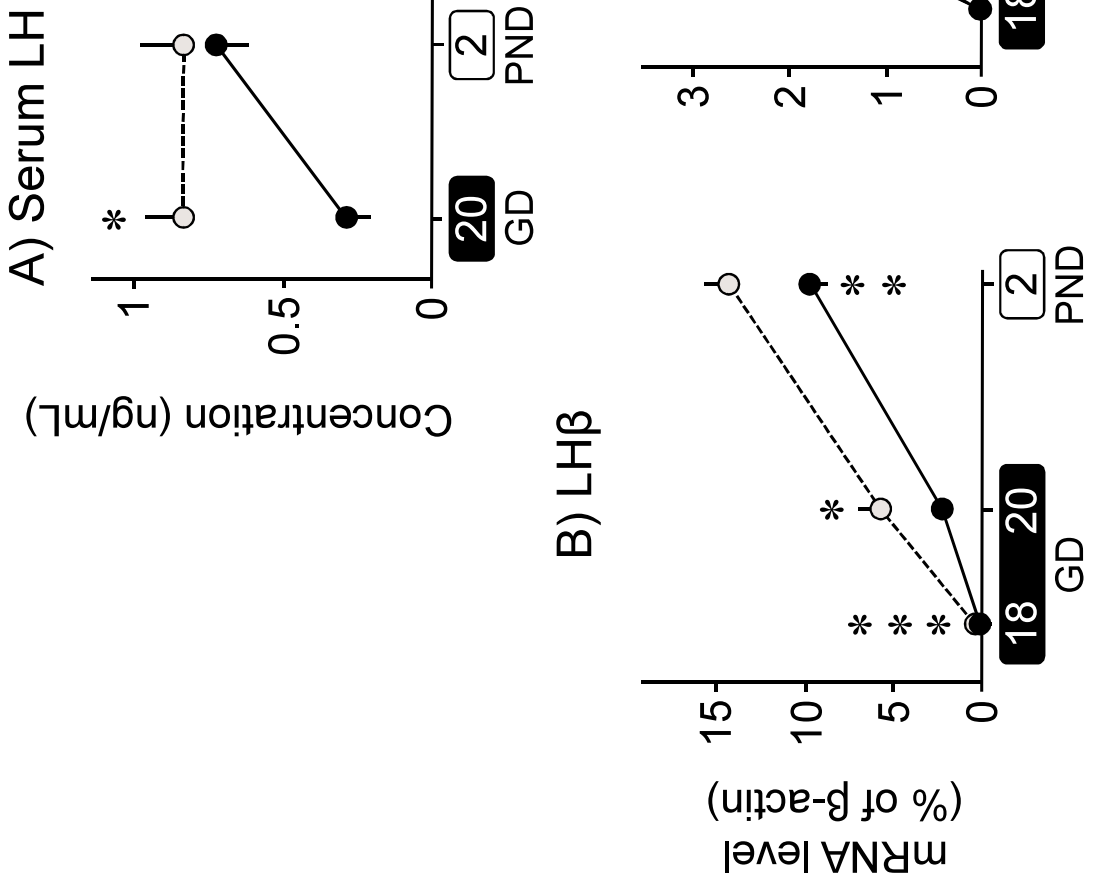


Fig. 1. The age-dependent effects of the AHR deletion on the circulation level of LH (A) and the pituitary expression of LHβ mRNA (B) and αGSU mRNA (C) in male rats. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 6-15 fetuses (neonates). Significantly different from the control: *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$. abbreviation used: αGSU, glycoprotein hormone α-subunit. Data for serum LH and LHβ mRNA level at GD20 are quoted from Hattori et al (2018)(15). Data for the mRNA level of LHβ at PND2 are quoted from the annual report at Fiscal year 2018.

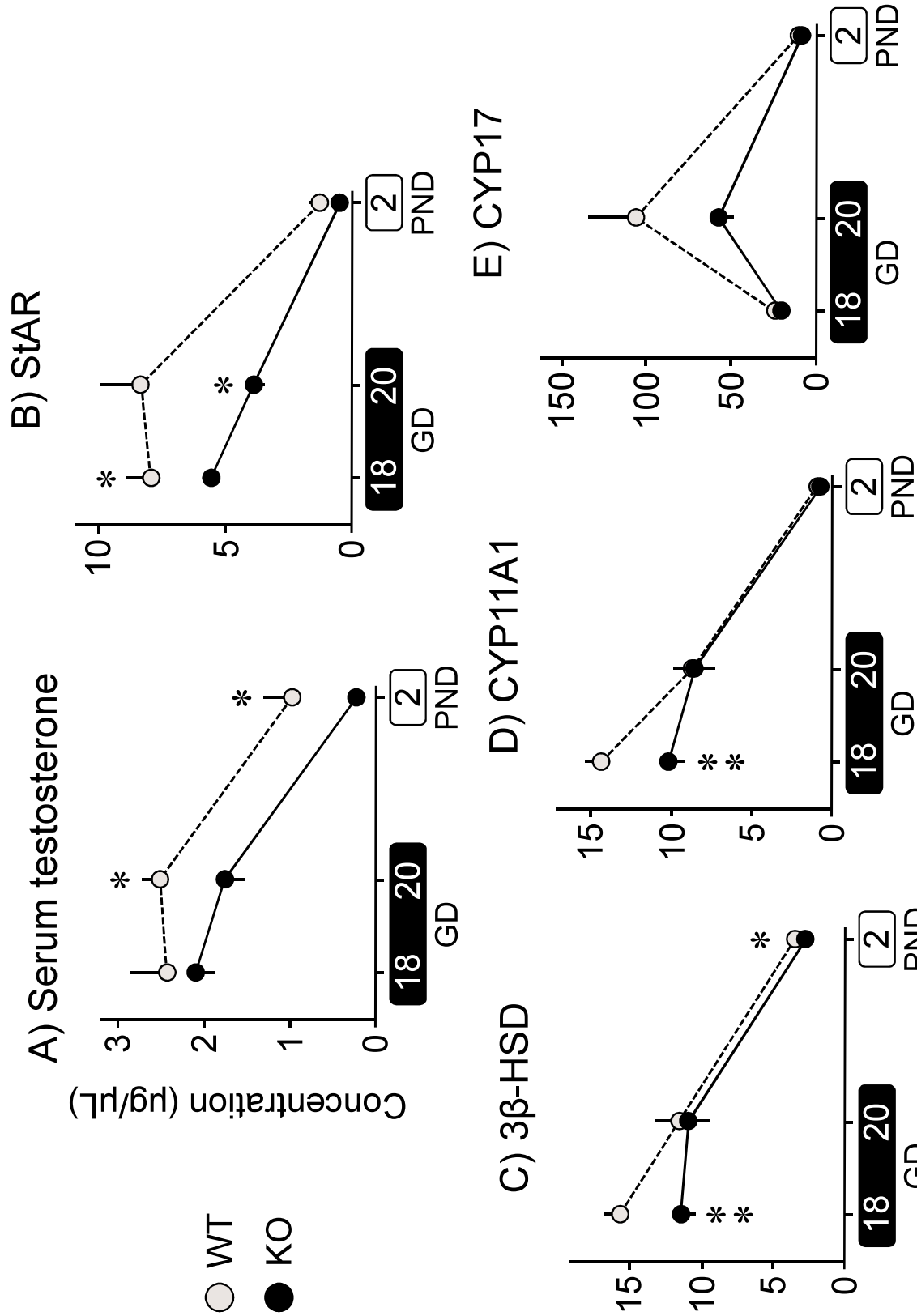


Fig. 2. The age-dependent effects of the AHR deletion on circulation level of testosterone (A) and the testicular expression of sex-steroid synthesis proteins mRNAs (B-G). Each bar represents the mean ±S.E.M. of 5-10 fetuses (neonates). Significantly different from the control: $*p<0.05$, $**p<0.01$. Data for the serum testosterone and mRNA levels (StAR and CYP17) at GD20 are quoted from Hattori et al (2018)(15) . Data for the serum testosterone at PND2 are quoted from the annual report at Fiscal year 2018.

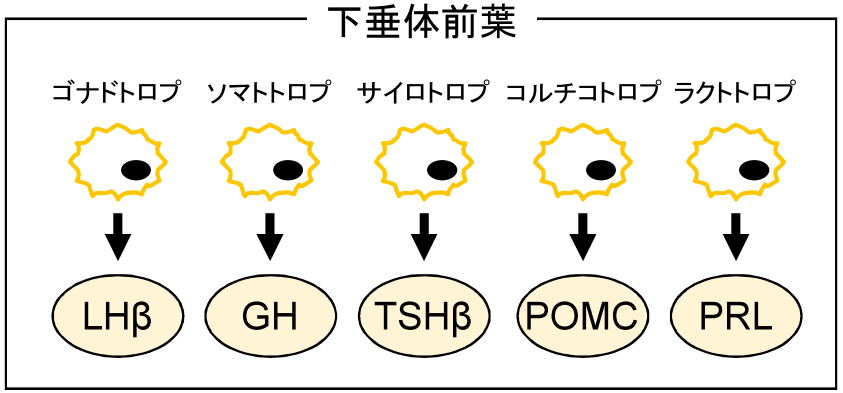


Fig. 3. The hormone production in the anterior pituitary gland. Abbreviations used: GH, growth hormone; TSHβ, thyroid-stimulating hormone β; POMC, propiomelanocortin; PRL, prolactin.

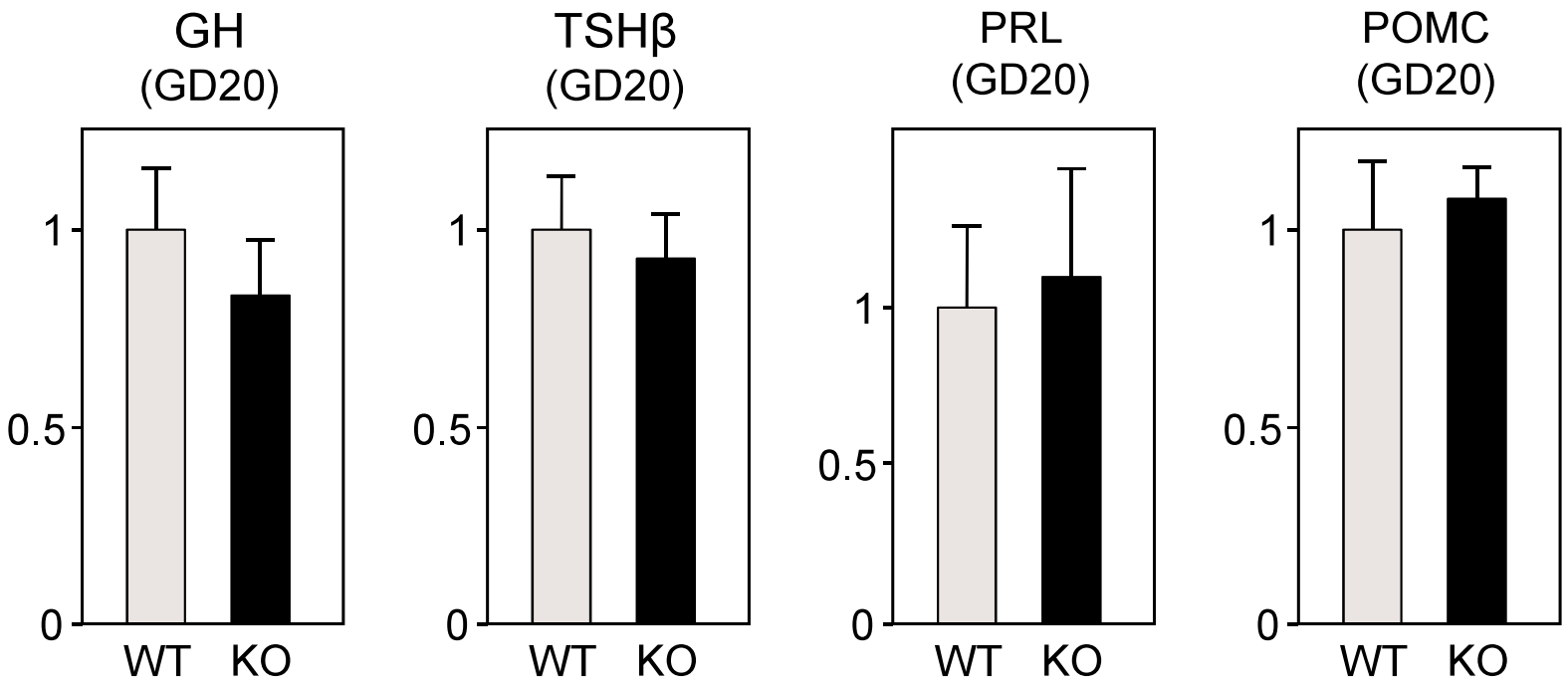


Fig. 4. Effect of AHR ablation on the pituitary expression of mRNAs coding for GH, TSHβ, POMC PRL in GD20 male fetuses. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 6-9 fetuses. The WT levels of mRNAs (% of β-actin; mean ±S.E.M.) were as follows: GH (445 ± 70), TSHβ (34.2 ± 4.8), POMC (74.8 ± 12.4), PRL (1.72 ± 0.43).

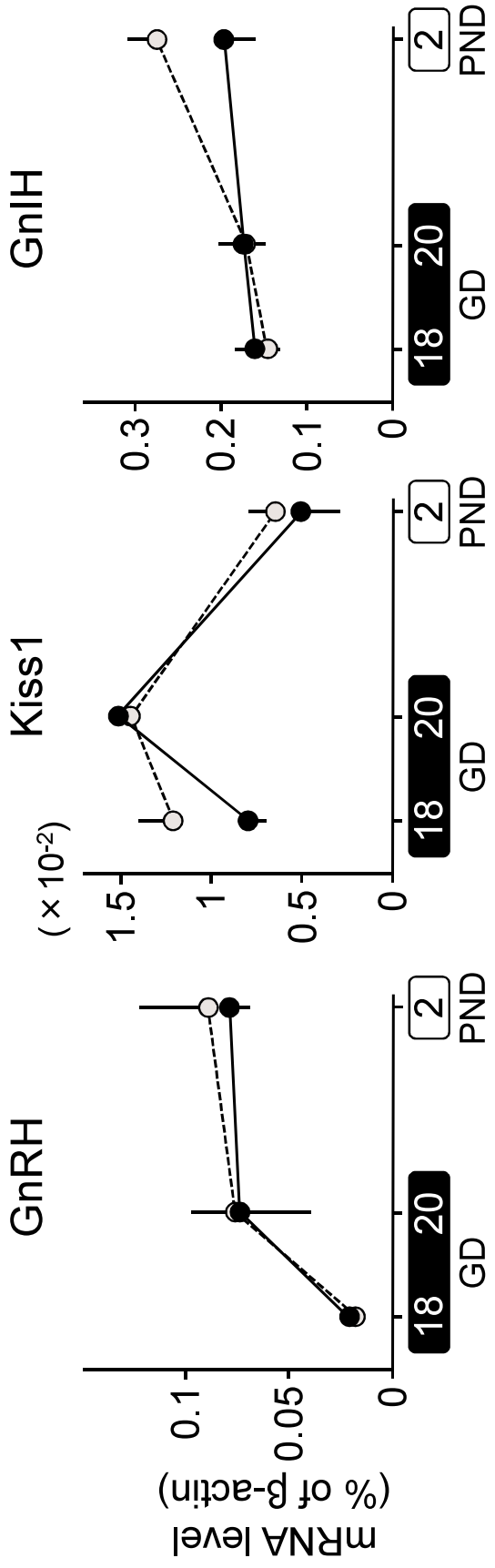
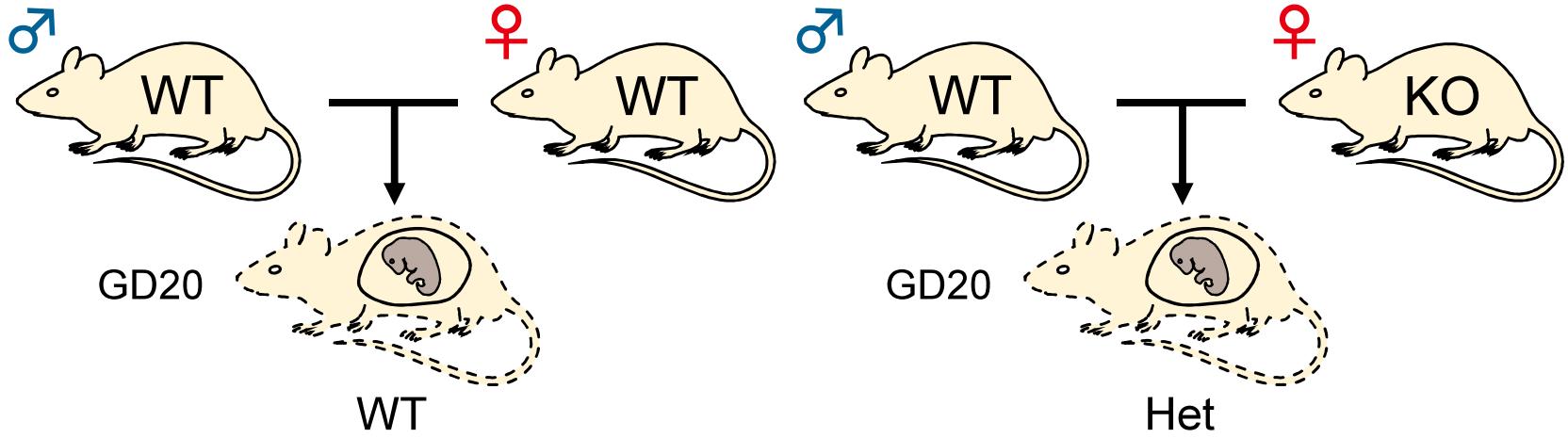


Fig. 5. The age-dependent effects of the AHR deletion on the hypothalamic expression of mRNAs coding for upstream regulators of LH synthesis in male rats. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 4-11 fetuses (neonates). Abbreviations used: GnRH, gonadotropin-releasing hormone; Kiss1, Kisspeptin; GnIH, gonadotropin-inhibitory hormone. Data for mRNA levels of GnRH, Kiss1 and GnIH at GD20 are quoted from Hattori et al (2018)(15) .



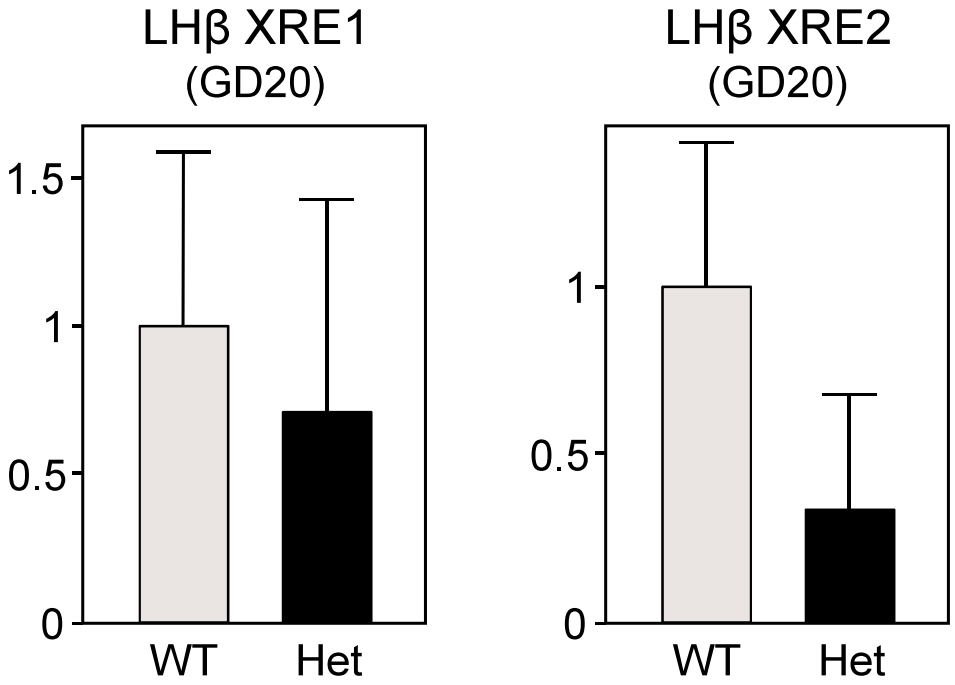


Fig. 6. AHR binding ability to XRE in LHβ DNA between wild type and Het fetuses. The AHR binding ability to XRE in fetal pituitary was analyzed by the ChIP-qPCR. The relative level of AHR binding ability was normalized by input sample. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 3-6 fetuses. The WT levels of AHR binding ability (% of input; mean ± S.E.M.) were as follows: LHβ XRE1 (2.98 ± 1.76) and LHβ XRE2 (1.88 ± 0.80).

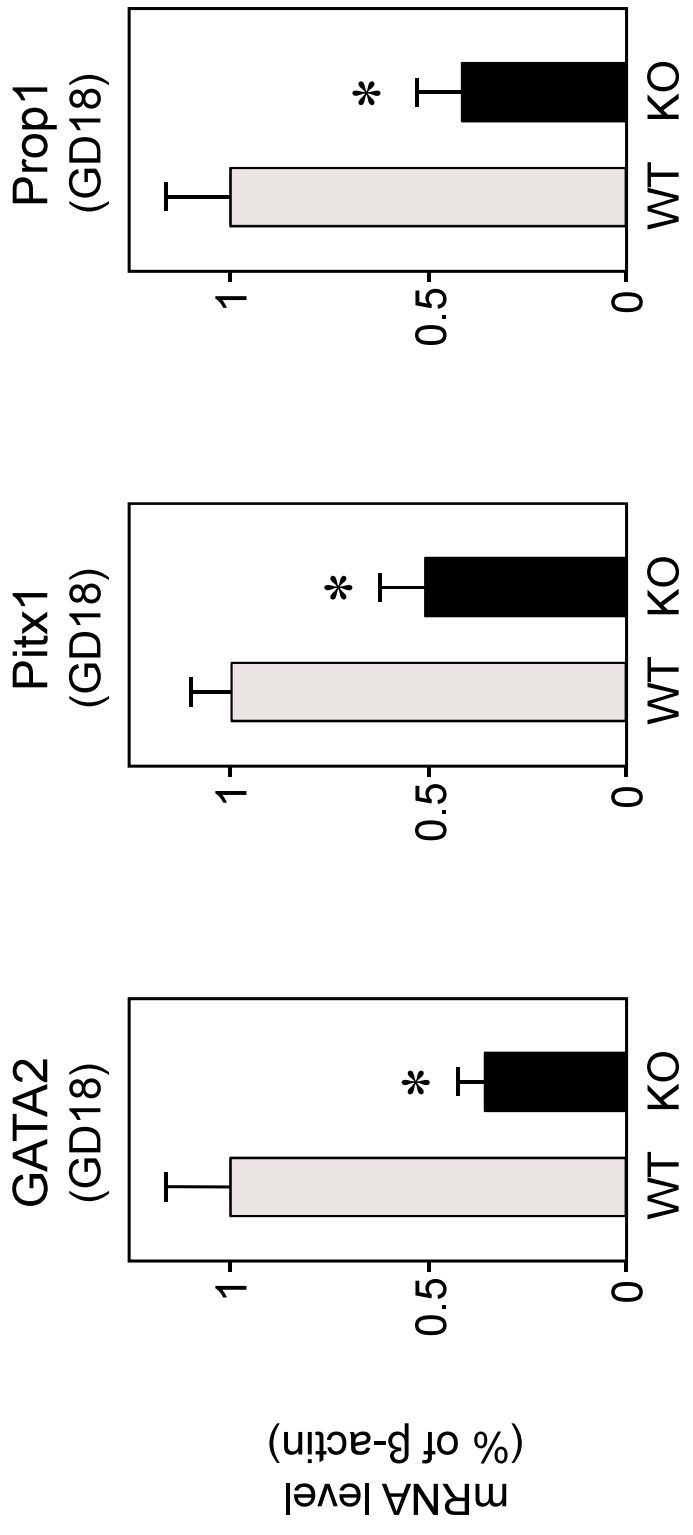


Fig. 7. Effect of AHR ablation on the pituitary expression of mRNAs coding for GATA2, Pitx1, Prop1 in GD18 male fetuses. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 8-10 fetuses. Significantly different from the control: *p<0.01. The WT levels of mRNAs (% of β-actin; mean ±S.E.M.) were as follows: GATA2 (0.220 ± 0.037), Pitx1 (0.167 ± 0.018), Prop1 (0.853 ± 0.089).

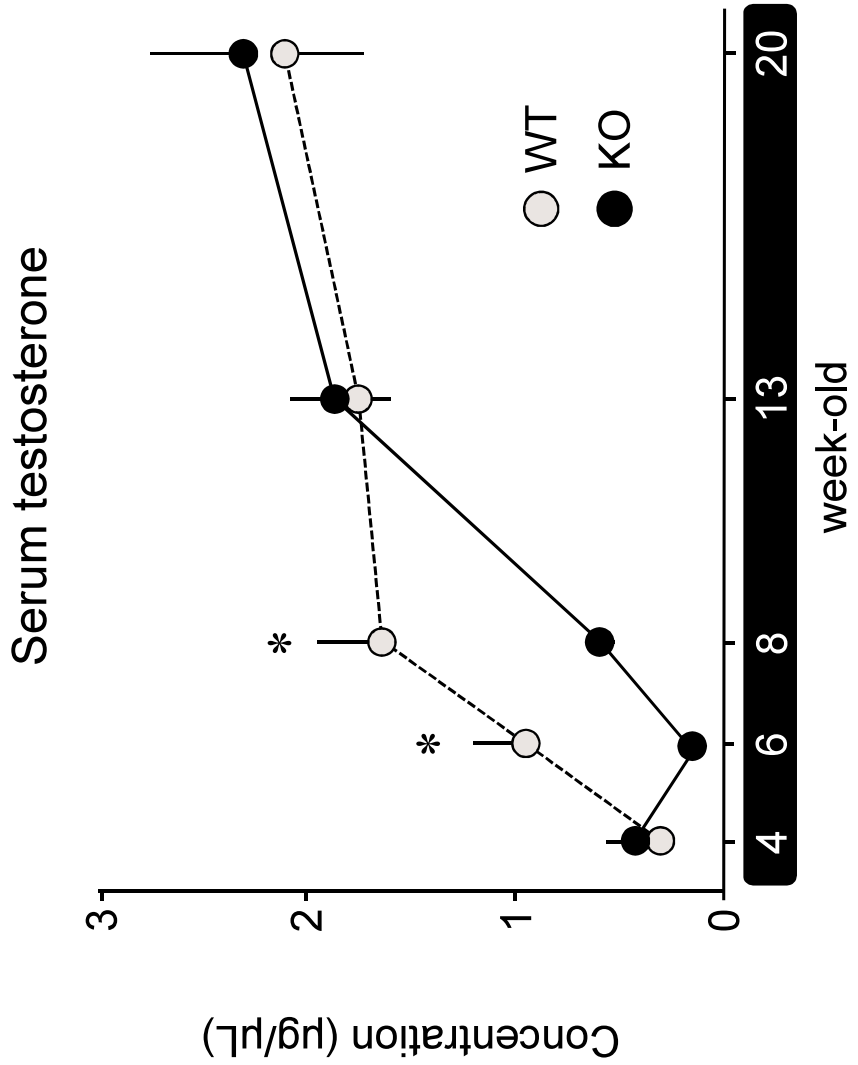


Fig. 8. The age-dependent effects of the AHR deletion on circulating level of testosterone in male rats. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6-13 rats. Significantly different from the wild-type: *$p<0.05$. Data for the serum testosterone at 4 and 6 week-old rats are quoted from the annual report at Fiscal year 2018.

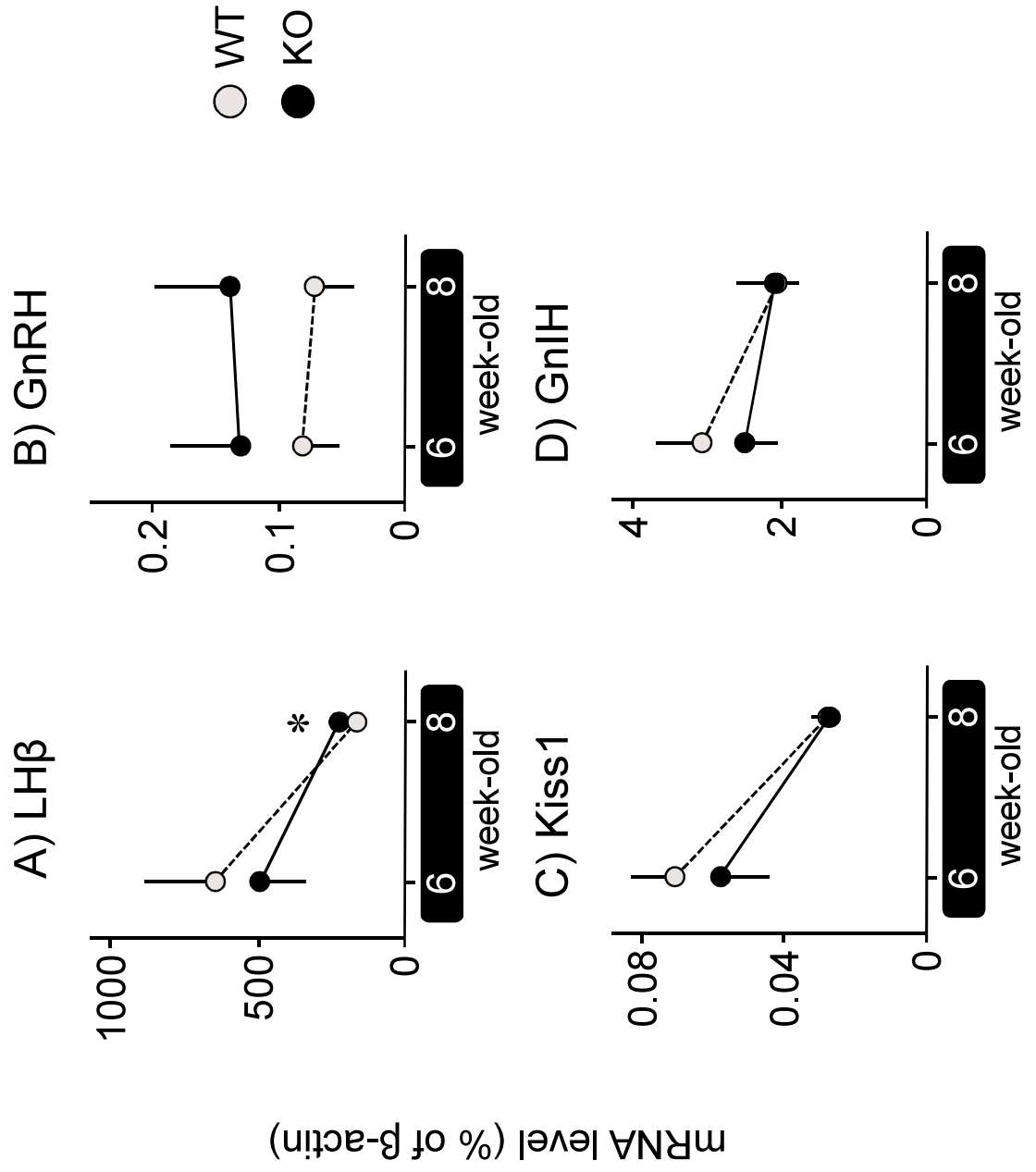


Fig. 9. The pubertal effects of the AHR deletion on the pituitary expression of LHβ mRNA (A) and the hypothalamic expression of mRNAs coding for upstream regulators of LH synthesis in male rats. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 3-8 rats. Significantly different from the wild-type: *$p<0.05$.

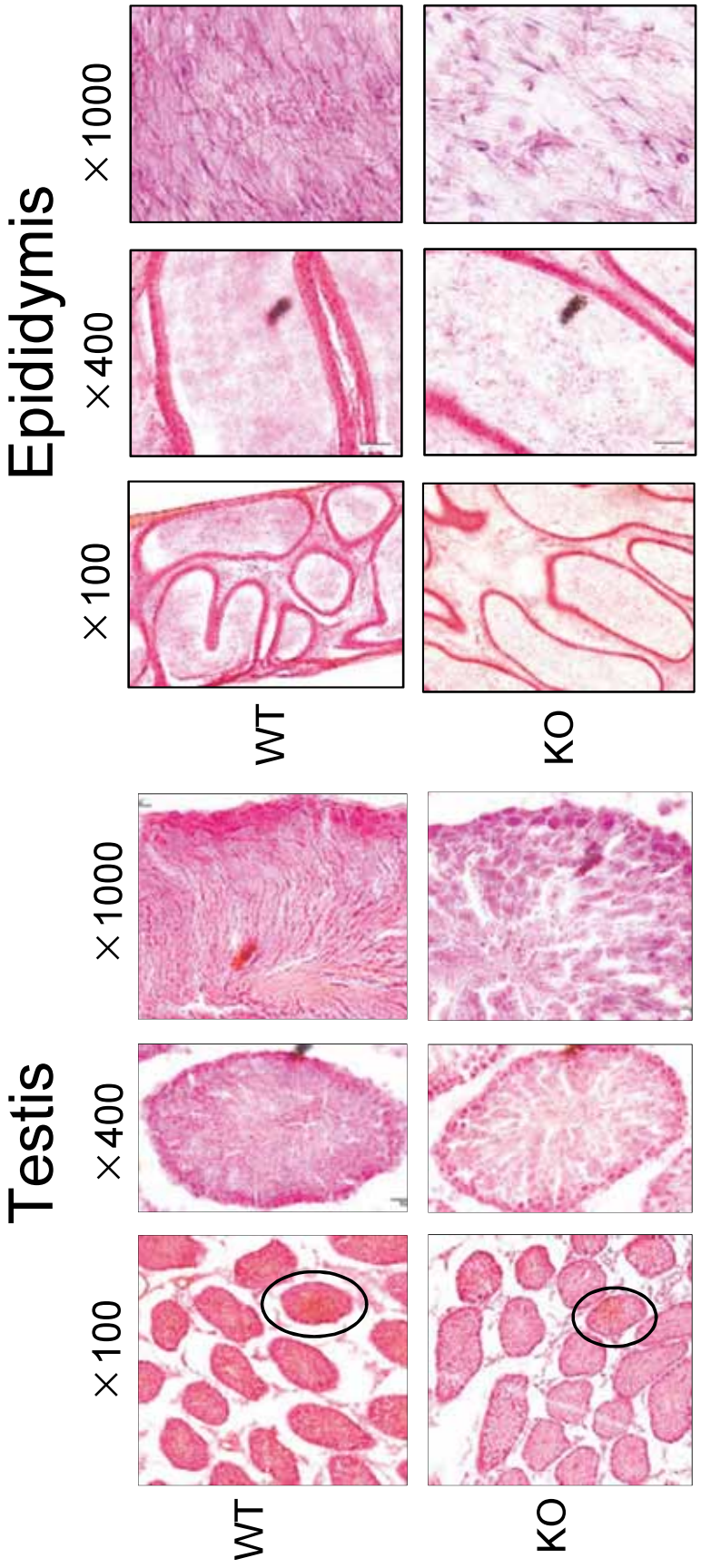


Fig. 10. Histopathological changes by knocking out the AHR in the testis (A) and epididymis (B) of male rats at 8 weeks old. The sections (14 μm) of testis and epididymis were stained by hematoxylin and eosin solutions. Data are quoted from the annual report at Fiscal year 2018.

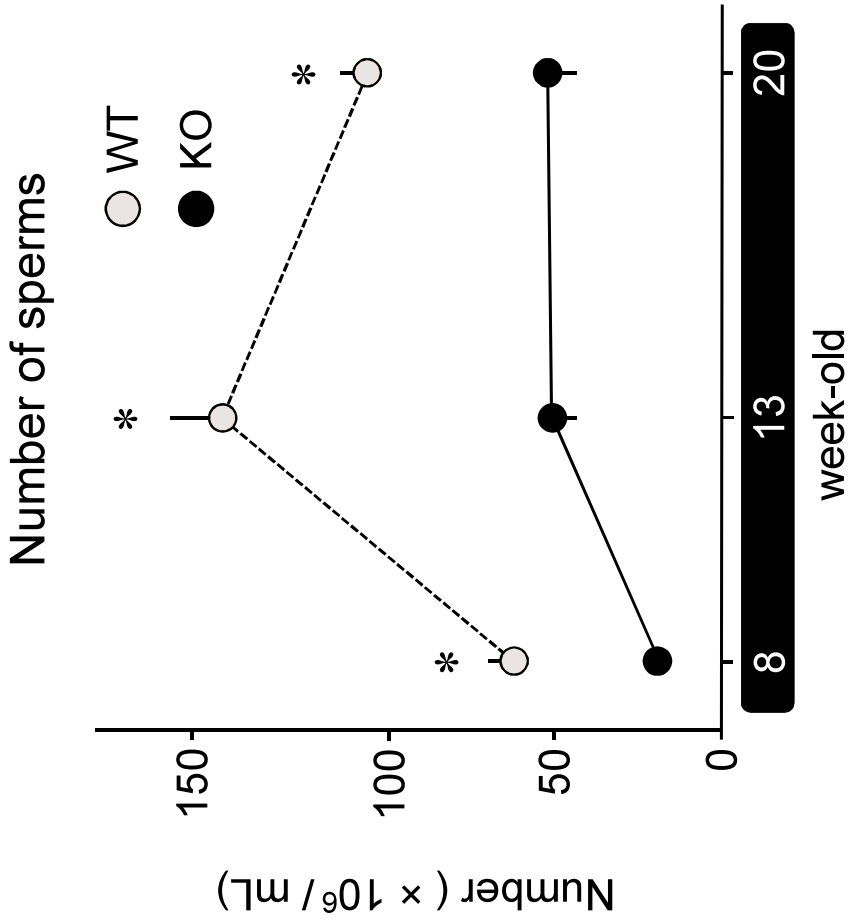


Fig. 11. The age-dependent effect of the AHR deletion on the number of sperms in male rats. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 4-7 rats. Significantly different from the wild-type: *p<0.05. Data are quoted from the annual report at Fiscal year 2018.

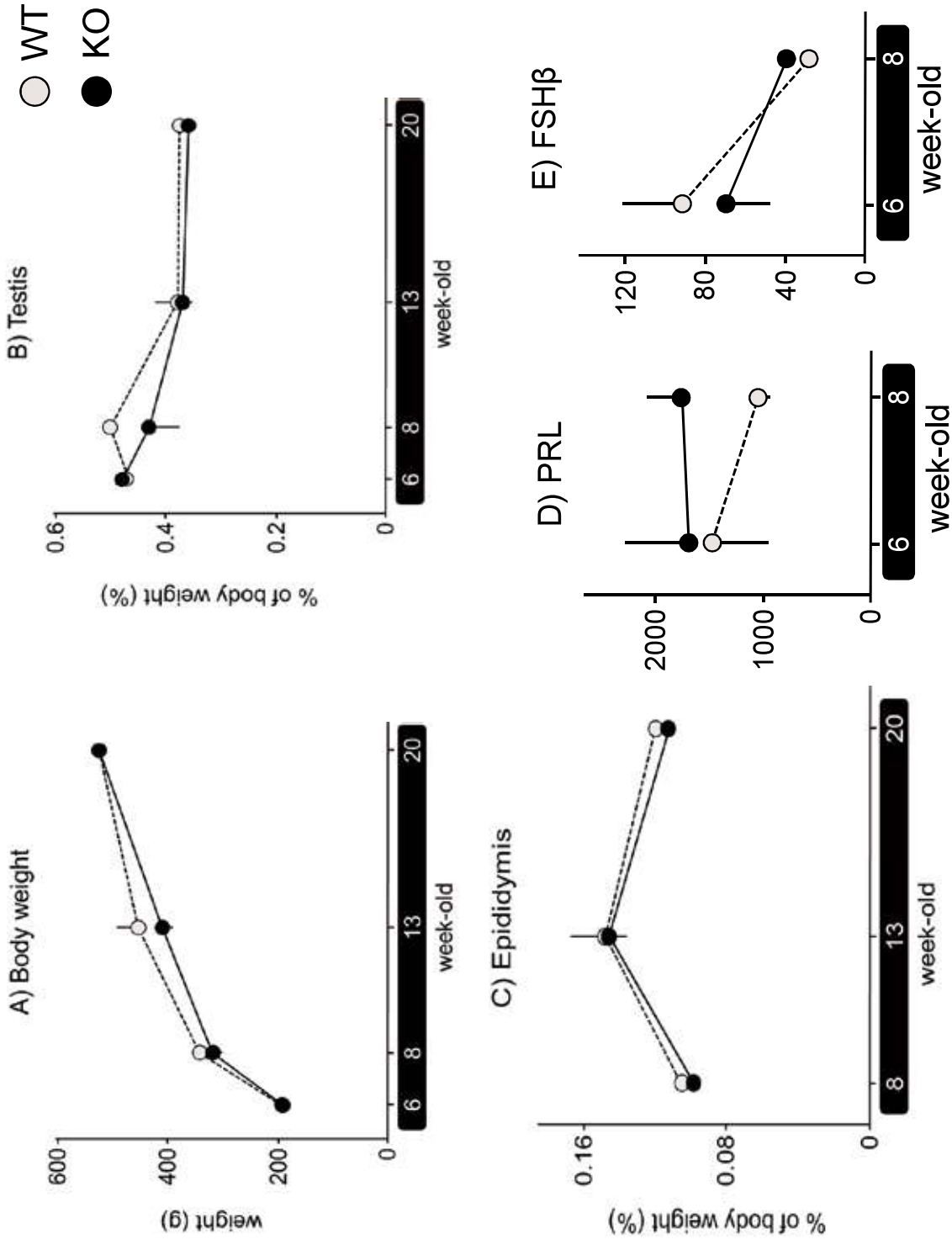


Fig. 12. The age-dependent effect of the AHR deletion on the body weight (A), the relative weight of testis (B), epididymis (C), and the pituitary expression of PRL mRNA (D) and FSHβ mRNA (E) in male rats. Each bar represents the mean ±S.E.M. of 4-7 rats. Significantly different from the wild-type: *$p<0.05$. Data for (A), (B) and (C) at 8-week old are quoted from the annual report at Fiscal year 2018.

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: 脂質代謝との関連性の検討

研究分担者　　石井　祐次　九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野　准教授

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予備的に行った。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。昨年度までの検討において 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することが示唆された。また、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。本年度の検討により、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor-α (Ppara)の発現レベルの有意な低下が示唆された。これは、先に行ったマイクロアレイの結果を支持した。一方、Ppar-β (Pparb)および Ppar-γ (Pparg)の発現レベルには影響がなかった。また、昨年度までの検討から 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)の発現の低下が示唆されている。従って、Ppara および Rxra の発現低下を通じた Cyp4a の低下が示唆された。一方、cyclooxygenase 1 (Cox1), Cox2 および 3 種の lipoxygenase レベルは変動しなかった。これに符合して、ロイコトリエン類の増加が推定された。より精度をあげるために、例数を増やしてメタボロミクス解析を行った結果も、それを支持した。また、抗酸化酵素の発現解析を行ったところ、superoxide dismutase 1 (Sod1)および Sod2 の発現が有意に低下していた。これらのことから、SelenBP1 は酸化ストレス軽減に寄与している可能性が示唆された。

A．研究目的

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、リアルタイム RT-PCR により検討を行った際に、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。昨年度までの検討により、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った。さらに、リア

ルタイム RT-PCR による解析を通じて、脂質代謝関連因子が変動する可能性が示唆された。本年度は、個体数を増やして、メタボロミクスの精度を上げるとともに、引き続き SelenBP1 の脂質代謝への影響に着目してさらなる解析を行った。

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 モードおよび negative 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 11 匹で行った。

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: 1-8)。

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 11 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. 1)、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. 2)。そこで、相関係数 0.7 以上、-0.7 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。20-carboxy-leukotriene B4 および 11-epi-prostaglandin F2αなどプロスタグランジンやロイコトリエンの代謝物が増加した。また、パルミチン酸も増加した。こ

れら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。昨年までの検討では、DNA マイクロアレイ解析結果を基にして、変動が示唆された脂質代謝関連因子についてリアルタイム RT-PCR にて発現変動を解析した。データの関連性からここでは、昨年既に報告した結果も併せて提示する。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 : H30 年度報告書参照)。マイクロアレイで変動が示唆されていた脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor-α (Ppara) (18)の発現が、有意に低下することが示唆された。一方、Ppar-δ (Ppard)(19)および Ppar-γ (Pparg) (19)の発現レベルには影響がなかった (Fig. 4)。Ppara への影響は前年度も検討していたが、変化なしとの結果であった。昨年度用いたプライマーでは、isoform 間で交差反応することが懸念されたため、それを回避するため、より特異性の高いプライマーをデザインし直した。結果、有意な抑制を認めた。また、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)の発現も低下していた (Fig. 5 : H30 年度報告書参照)。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 : H30 年度報告書参照)。本研究では、筆者らの先行研究で、SelenBP2 の mRNA レベルは絶食により著しく低下するのに対して、SelenBP1 のそれは、高く維持されていたことに着眼し、絶食条件下に SelenBP1 は重要な役割を示すと考えて計画を行っている。上述の結果は、絶食条件下のものであるため、非絶食下での検討も行った。非絶食下では、Cyp4a12a, Cyp4a12b, Ppara, Pparb, Pparg, Rxra, Acox3 のいずれの発現レベルも、SelenBP1-KO による影響は受けなかった (Figs. 6-8)。これらのことから、SelenBP1 が脂質代謝関連遺伝子に及ぼす影響は絶食下において特に重要であることが示唆された。アラキドン酸の代謝酵素である、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現が低下していたが、アラキドン酸は、これ以外に prostaglandin-endoperoxide synthase (cyclooxygenase, Ptgs or Cox)(23)および arachidonate lipoxygenase (Alox)(24)を介してプロスタグランジンおよびロイコトリエン生成にも向かうことが知られている。絶食下でこれらに関する酵素の発現への SelenBP-KO の影響を調べたが、Alox5, Alox12, Alox15, Ptgs1 (Cox1), Ptgs2 (Cox2) のレベルには影響を与えなかった (Figs. 9-10)。次に、SelenBP1 の欠損が活性酸素消去系に及ぼす影響を調べるために、絶食条件下で、Superoxide dismutase 1 (Sod1)および Sod2 について検討したところ、いずれも SelenBP1-KO により有意に発現が低下した (Fig. 11)。

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 (25-27)、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、昨年度の成果は、その

仮説を支持していた。しかし、用いた個体数が少なかったため、メタボロミクスとしては予備的知見に止まった。今年度は、個体数を 11 匹に増やし、また positive mode および negative mode でメタボロミクスを実施した (Table 1)。結果、やはり、脂質代謝への影響があることを支持した。また、増加の示唆された 20-carboxy-leukotriene B4 および 11-epi-prostaglandin F2αなど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。

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、いずれも Ppara により正に調節されていることが知られている。また、SelenBP1-KO により Ppara の発現レベルが低下したことから (Fig. 4)、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現低下には Ppara の発現低下が影響したと推察される。また、Rxra の発現も低下していた (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。昨年度の検討から、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ていた (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 (28)。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 Ppara および Rxra の発現低下と符合する。

一方、メタボロミクスからは、プロスタグランジン類およびロイコトリエン類の増加が示唆されたが、これらの合成系酵素には SelenBP1-KO の影響はほとんど見られなかった (Figs. 10-11)。従って、Cyp4a12a および Cyp4a12b の系が抑制された代償として、プロスタグランジンおよびロイコトリエンが増加したことが示唆された。これらは、炎症との関連からも注視すべきことである。

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。昨年度行ったマイクロアレイの結果に加え、今年度のメタボロミクスの結果からも、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、Ppara および 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 (29)。また、グルコース代謝に影響することも示唆され (30)、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 (31)。これに符合して、本研究でも、SelenBP1-KO により抗酸化酵素である Sod1 および Sod2 の発現が低下した。Ppara が Sod1 および Sod2 を誘導することが知られており (32)、このことは、本研究で SelenBP1-KO により Ppara の発現が抑制されたことと合致している。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は、まだ十分明らかではないものの、今後は、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) 絶食条件下 SelenBP1-KO により脂質酸化酵素 Cyp4a12a、Cyp4a12b および Acox3 に発現低下が確認された。また、これらの遺伝子の発現に関与する Ppara および Rxra も低下した。3) Alox および Ptgs には影響がなかったが、プロスタグランジン類、ロイコトリエン類の増加が認められた。4) 活性酸素消去系酵素 Sod1 および Sod2 の発現が低下していた。これらのことから、SelenBP1 が脂肪酸酸化を促進的に調節し、炎症に対しては抑制的な役割を担っている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 第 36 回日本薬学会九州支部大会 (長崎、2019 年 11 月 16 -17 日)

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) Issemann I, Green S. *Nature*, **347**: 645-650 (1990).
19) Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **91**: 7355-7359 (1994).
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) Hara S, Kamei D, Sasaki Y, Tanemoto A, Nakatani Y, Murakami M. *Biochimie*, **92**:651-659 (2010).
24) Mashima R, Okuyama T. *Redox Biol*, **6**: 297-310 (2015).
25) Hatsumura M, Ishida T, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H. *Fukuoka Acta Medica*, **86:** 135-143 (1995).
26) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K. *Chem Res Toxicol*, **12**: 1158-1165 (1999).
27) 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).
28) 植田伸夫. *油化学*, 20: 663-669 (1971)
29) Ansong E, Ying Q, Ekoue DN, Deaton R, Hall AR, Kajdacsy-Balla A, Yang W, Gann PH, Diamond AM. *PLoS One*, **10**: e0127295 (2015).
30) Ying Q, Ansong E, Diamond AM, Lu Z, Yang W, Bie X. *PLoS One*, **10**: e0126285 (2015).
31) Zhao C, Zeng H, Wu RT, Cheng WH. PLoS One, **11**: e0158650 (2016).
32) Liu X, Jang SS, An Z, Song H, Kim WD, Yu JR, Park WY. *Radiat Oncol J*, **30**: 88-95 (2012)

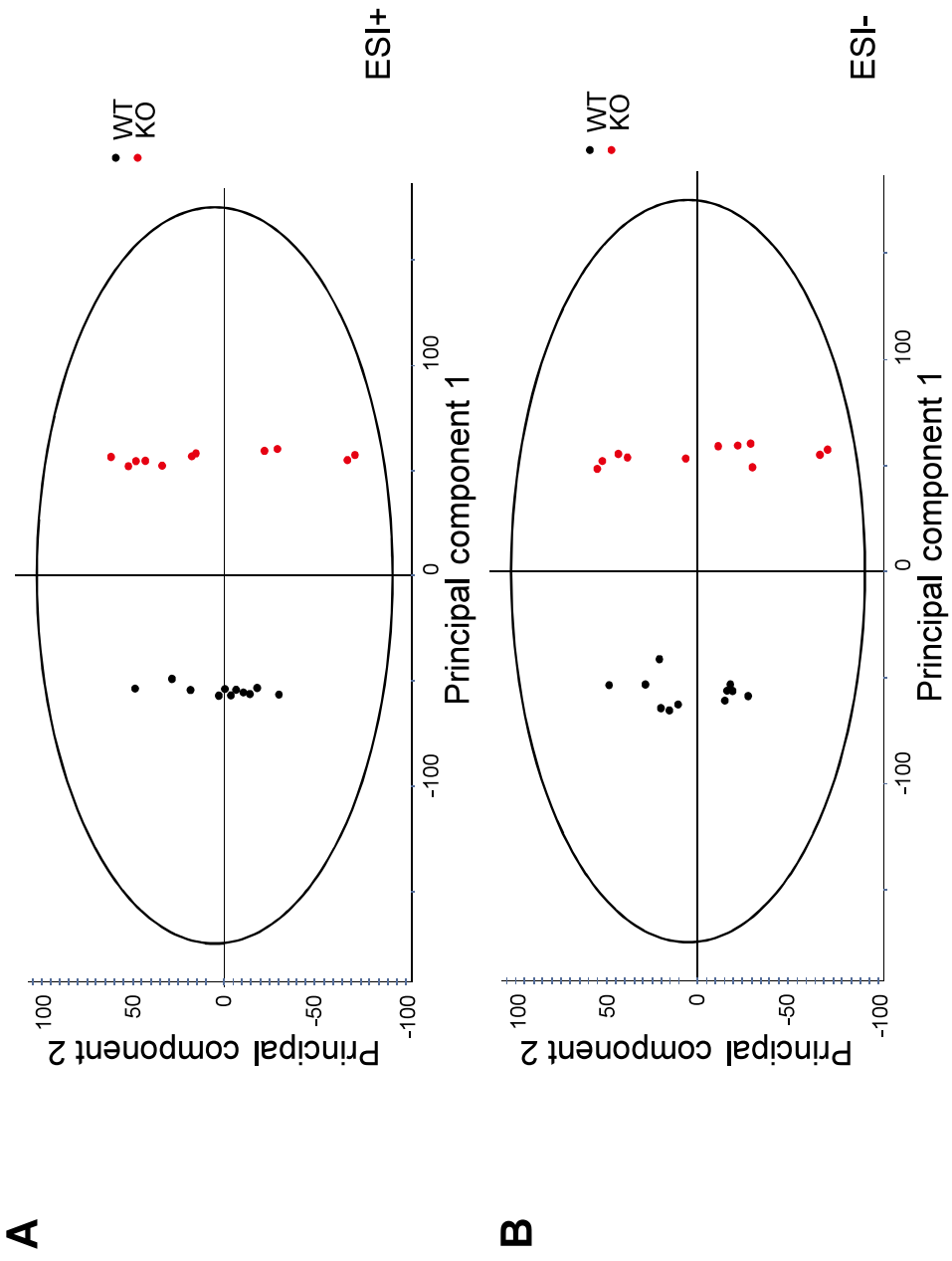


Fig. 1. Principal component analysis (PCA) regarding the effect of SelenBP1 deletion on the kidney metabolome: the data from positive (A) and negative (B) ion mode analysis. SelenBP1 deletion effect on the profile of kidney metabolome. Each dot is a different animal (N = 11 mice/group). Wild-type and SelenBP1-KO are shown in black and red, respectively.

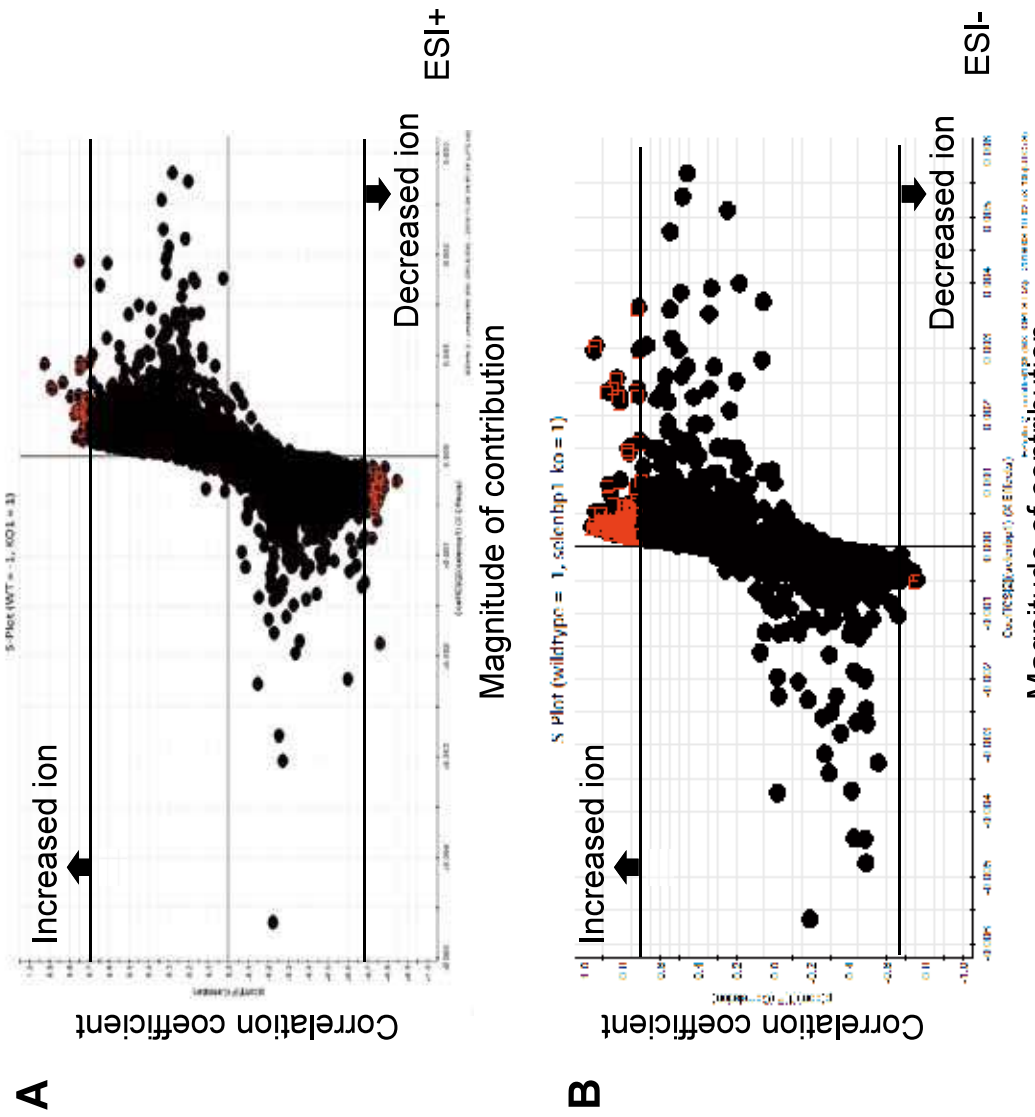


Fig. 2. S-plot based on the PCA regarding the effect of SelenBP1 deletion on the kidney metabolome: the data from positive (A) and negative (B) ion mode analysis. Fragment ions in LC-TOF-MS analysis that exhibit an alteration by SelenBP1 deletion in the kidney of male mice (8-week old). Each dot shows 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 0.7 or less than -0.7 of the correlation coefficient (Red dots).

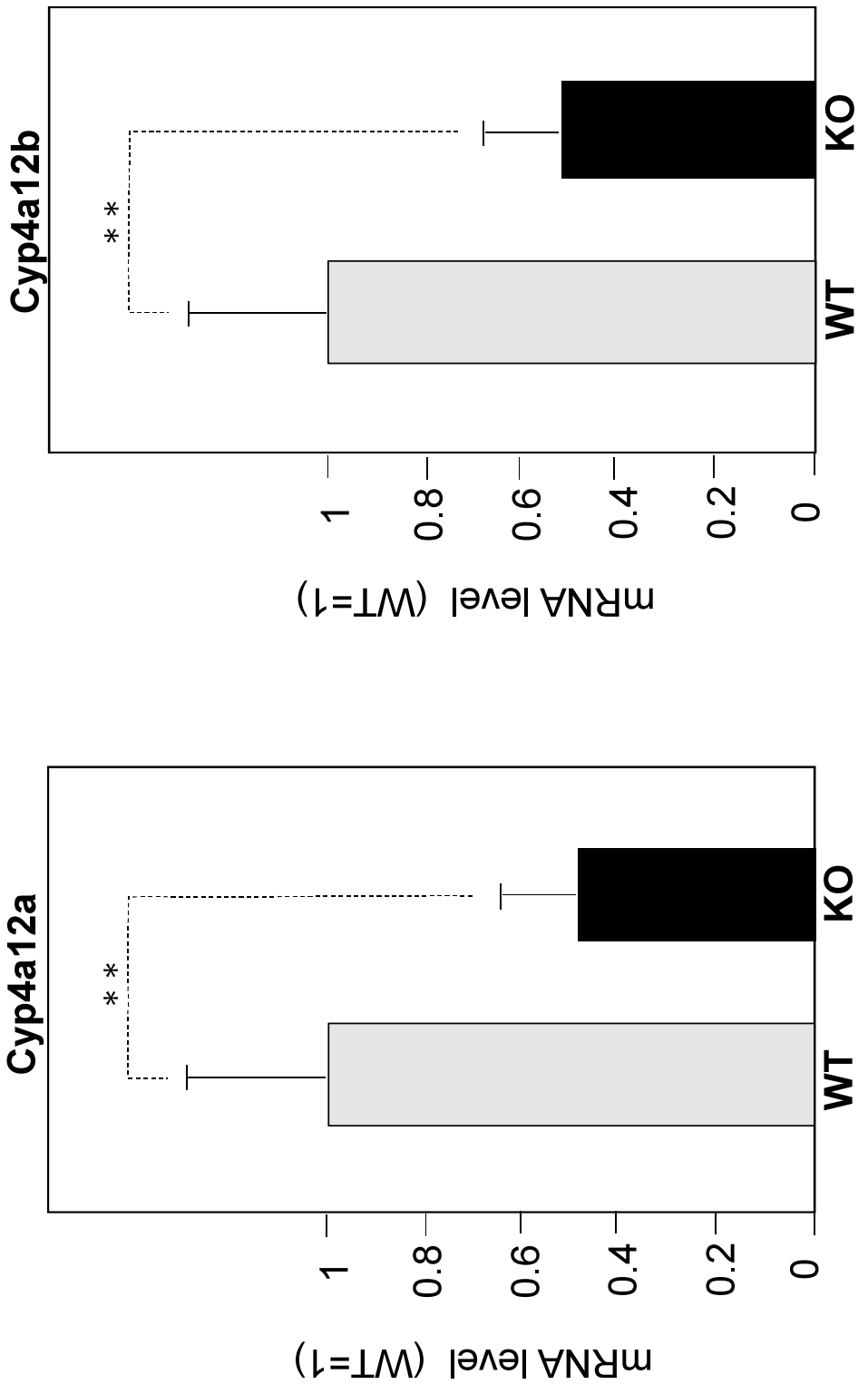


Fig. 3. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Cyp4a12a and Cyp4a12b mRNA in 8-week old male mice which treated with 20 hours fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. **$p<0.01$. β-actin was used as an internal control. (Data are quoted from the Annual Report H30)

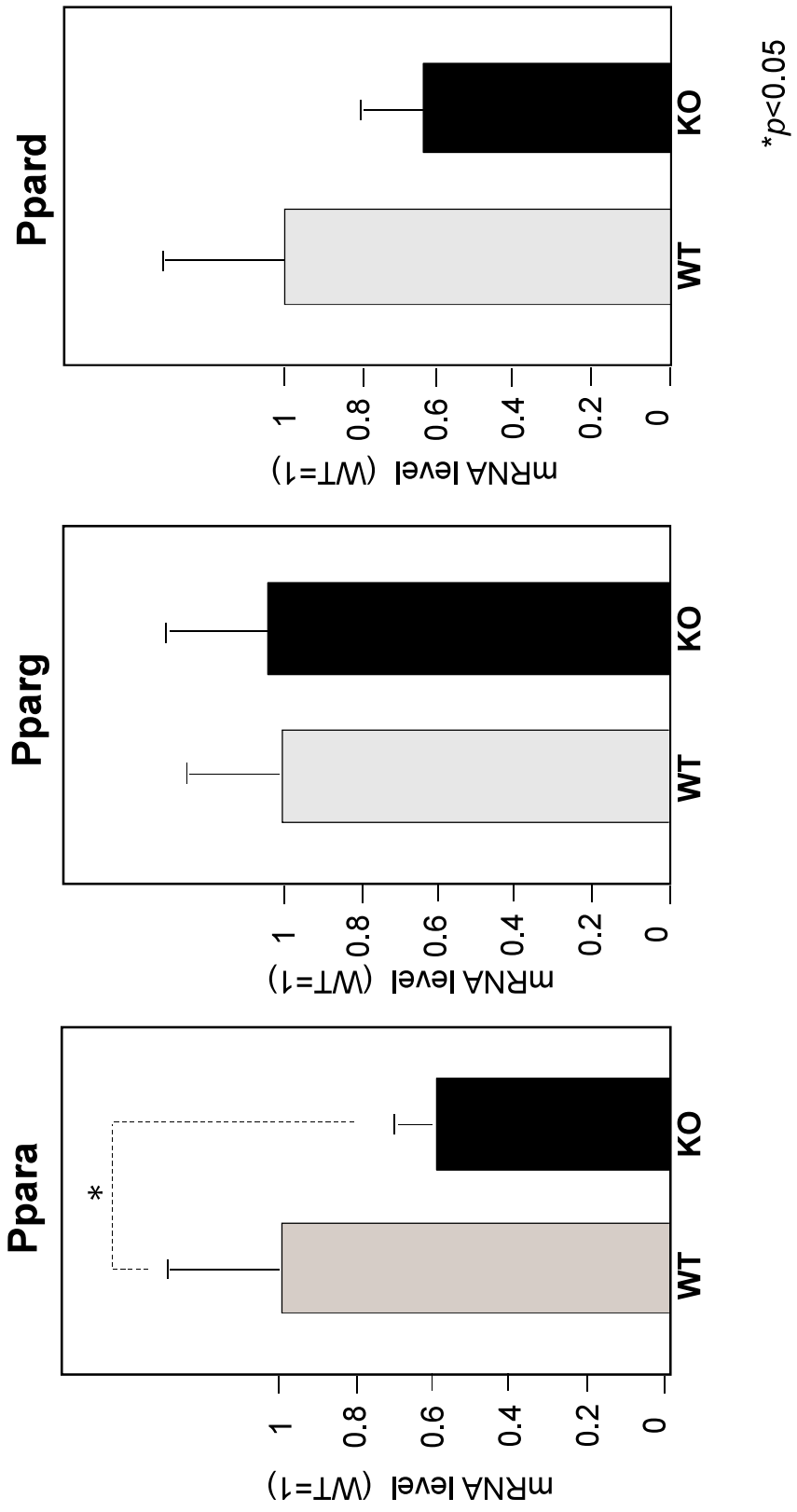


Fig. 4. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Ppara、Pparg and Ppard mRNA in 8-week old male mice which treated with 20 hours fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. *p<0.05. β-actin was used as an internal control.

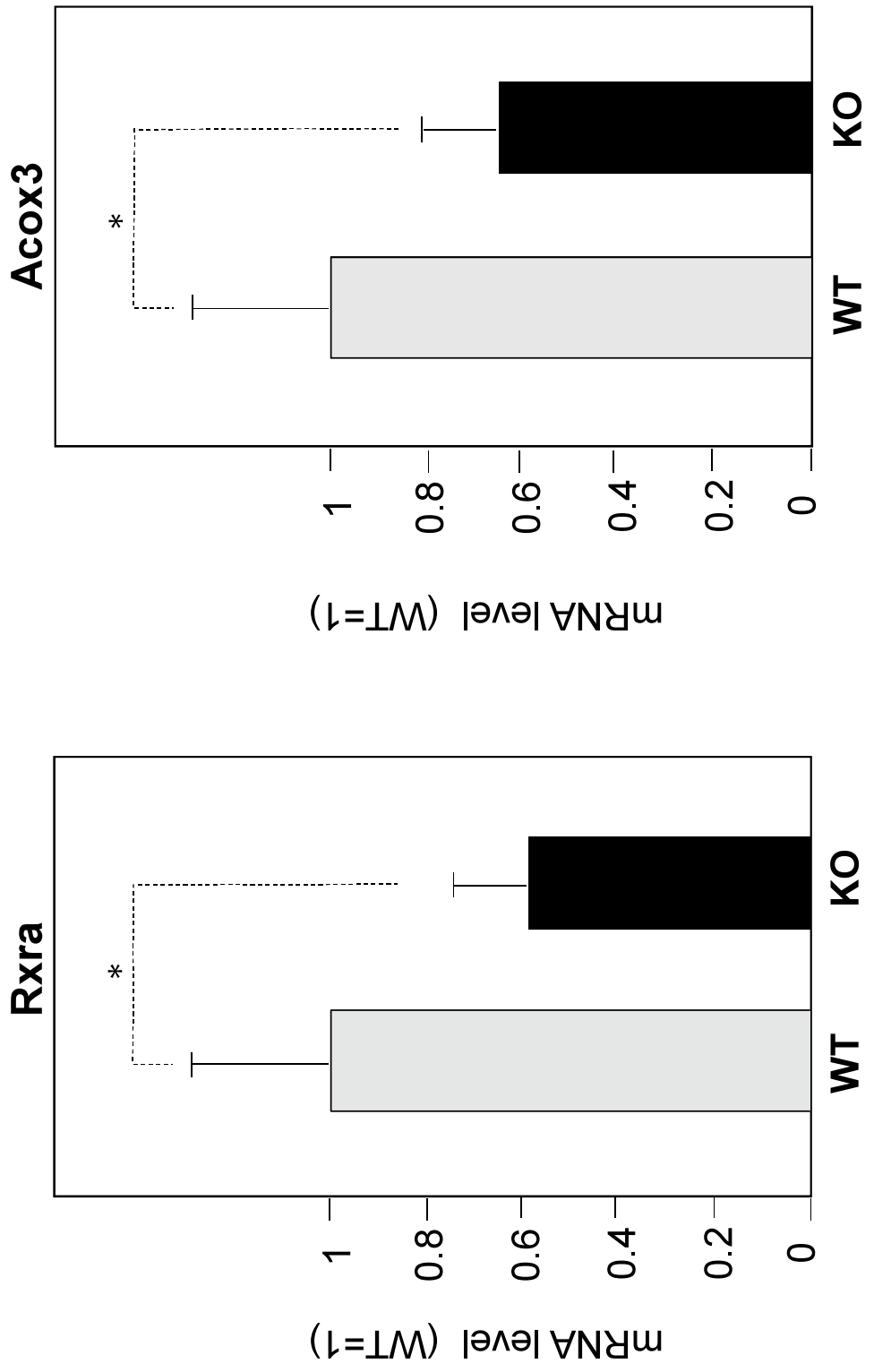


Fig. 5. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Rxra and Acox3 mRNA in 8-week old male mice which treated with 20 hours fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. *$p<0.05$. β-actin was used as an internal control. (Data are quoted from the Annual Report H30)

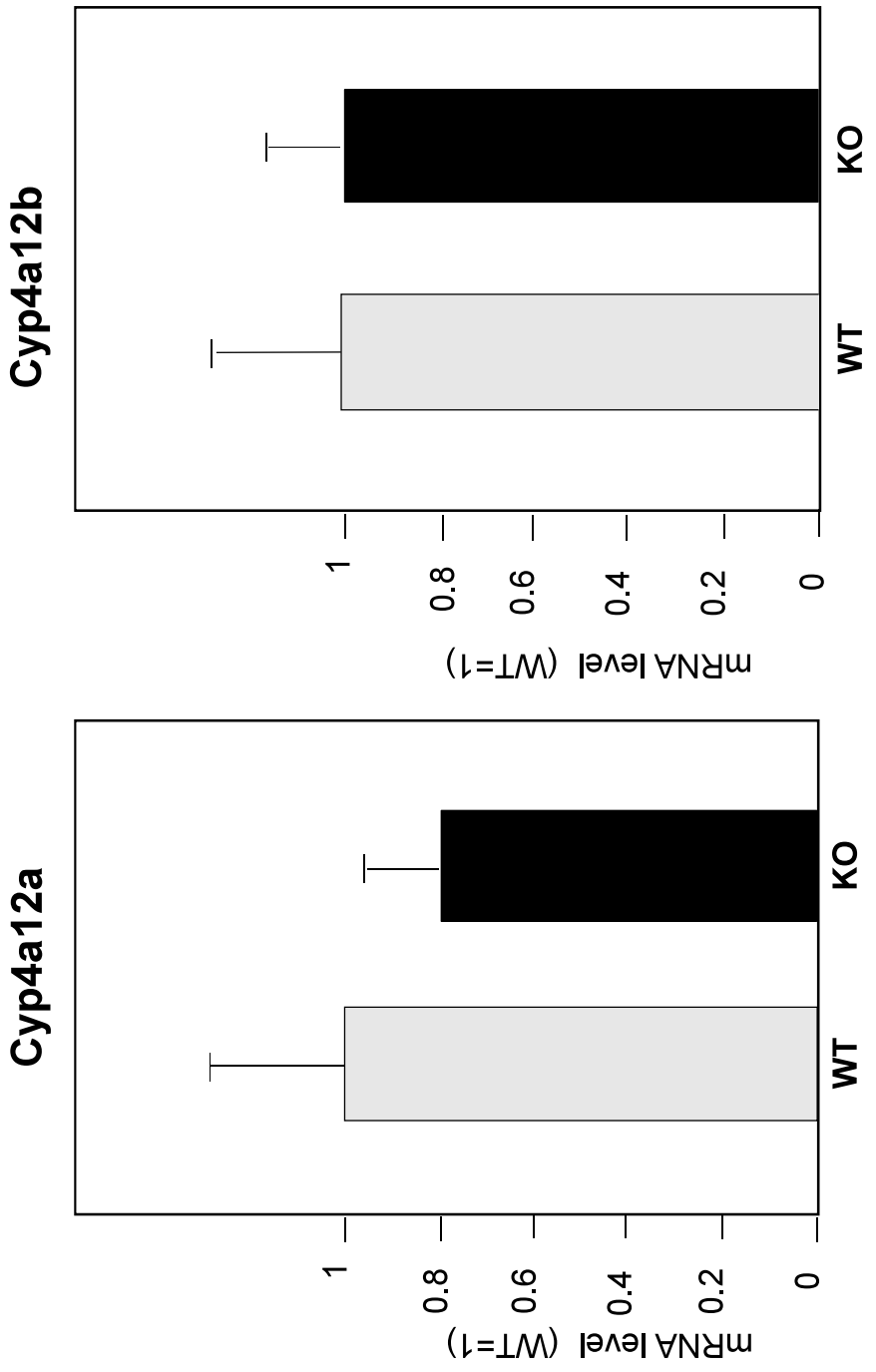


Fig. 6. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Cyp4a12a and Cyp4a12b mRNA in 8-week old male mice which treated with non-fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. β-actin was used as an internal control.

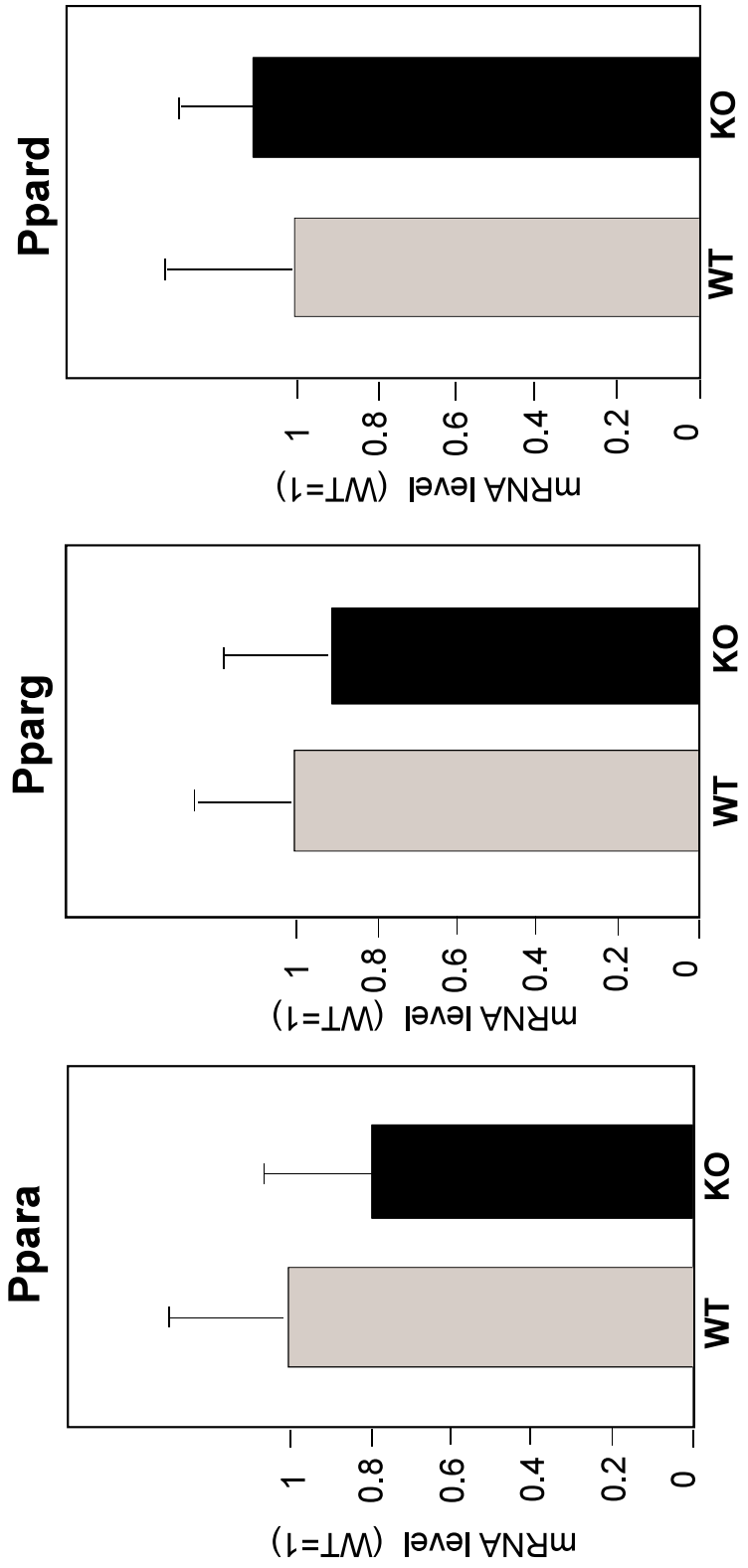


Fig. 7. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Ppara, Pparg and Ppard mRNA in 8-week old male mice which treated with non-fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. β-actin was used as an internal control.

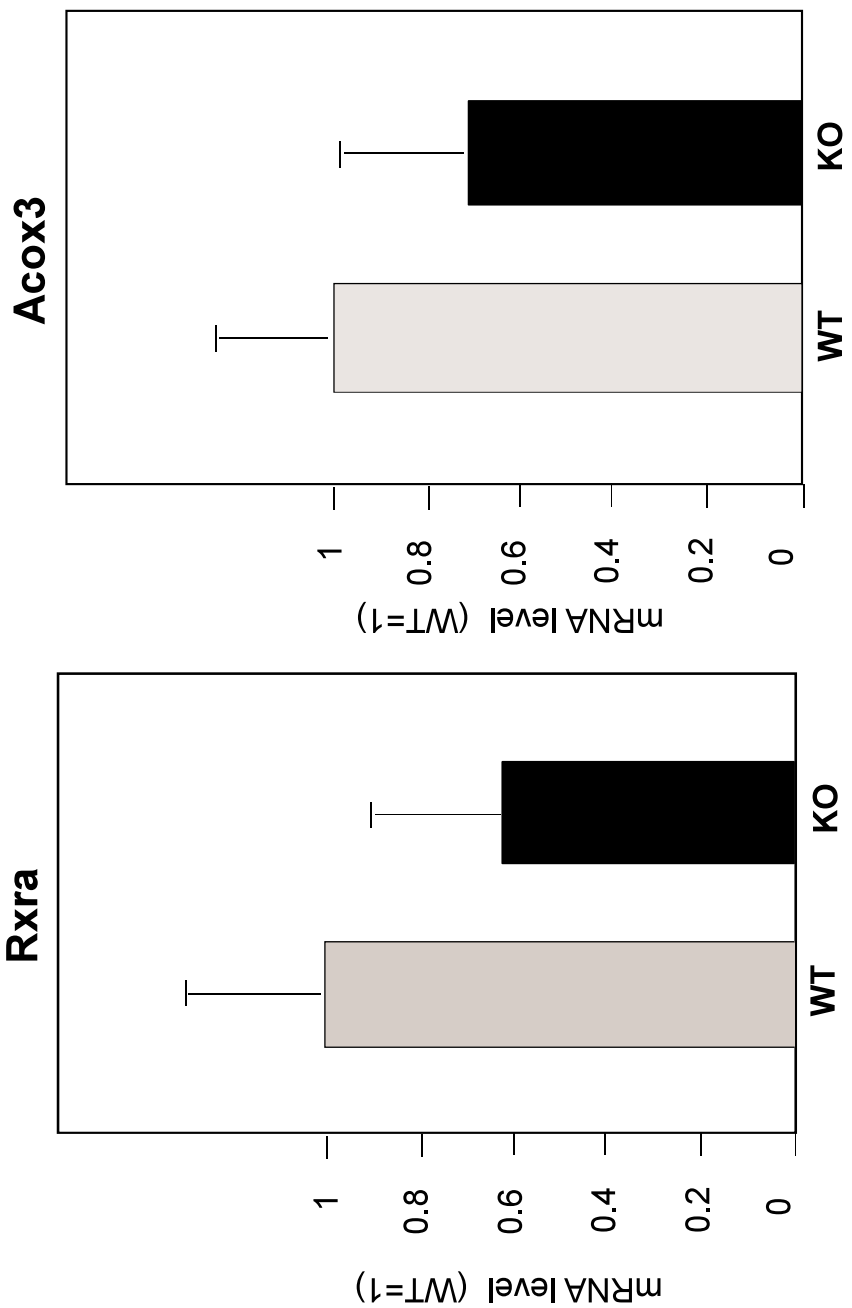


Fig. 8. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Rxra and Acox3 mRNA in 8-week old male mice which treated with non-fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. β-actin was used as an internal control.

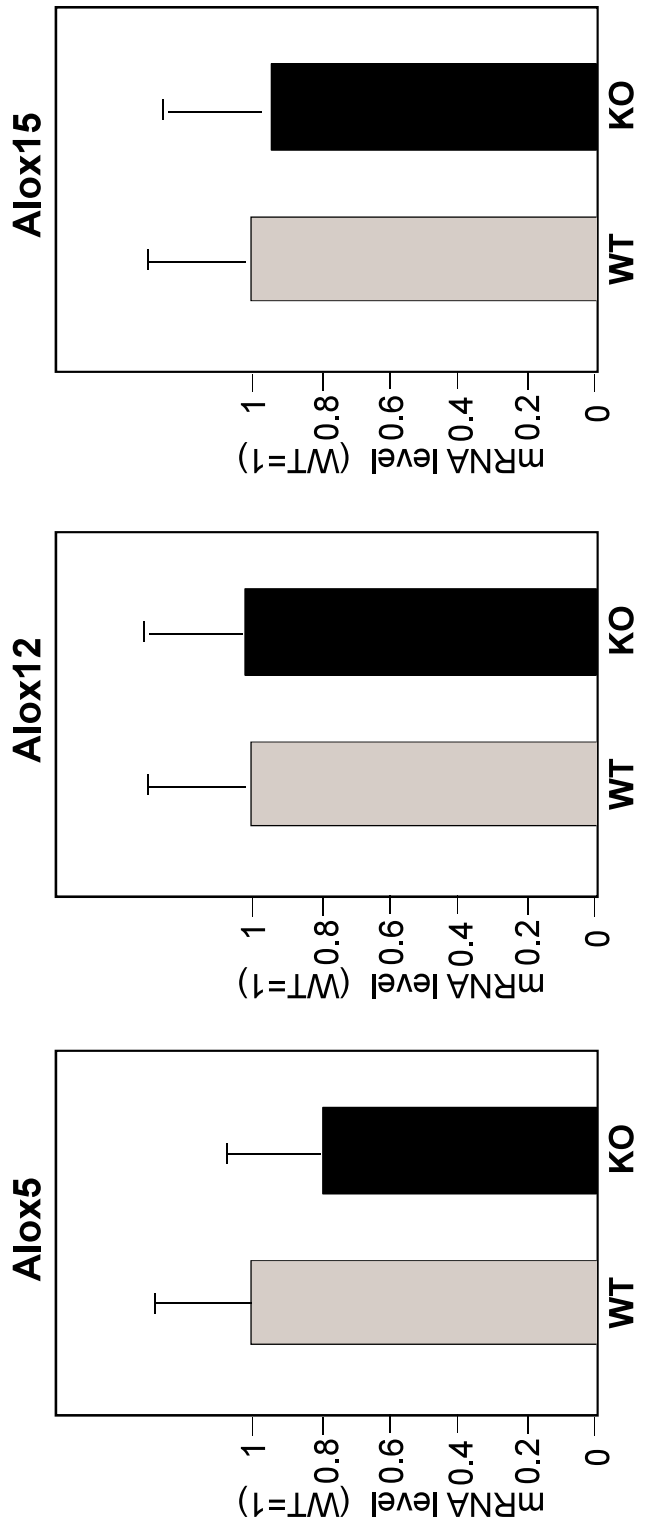


Fig. 9. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of arachidonate lipoxygenase (Alox)5, 12 and 15 mRNA in 8-week old male mice which were treated with 20 hours fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. β-actin was used as an internal control.

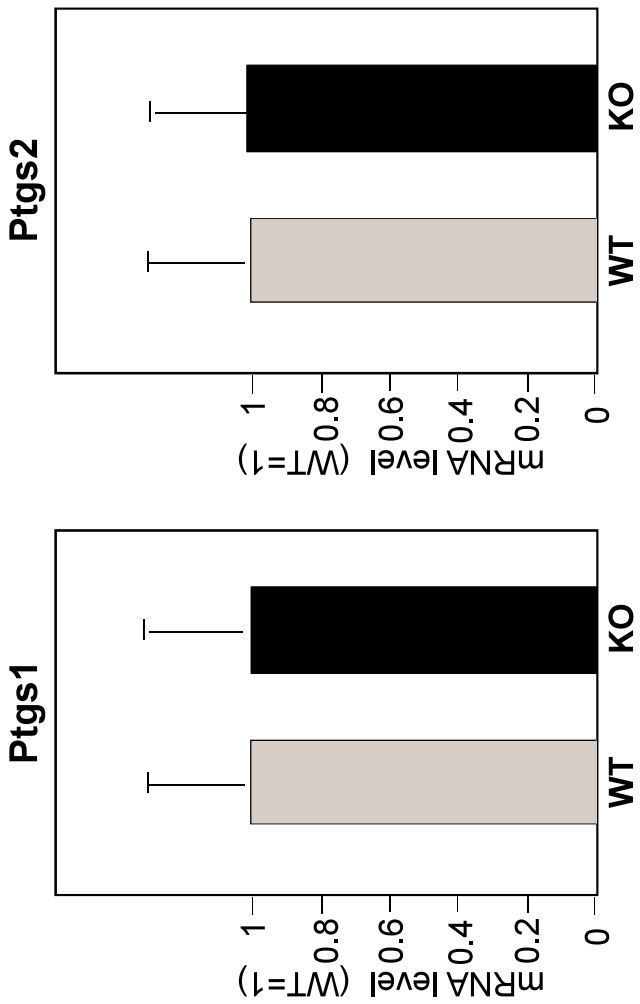


Fig. 10. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of prostaglandin-endoperoxide synthase (Ptgs)1 and 2 mRNA in 8-week old male mice which were treated with 20 hours fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. β-actin was used as an internal control.

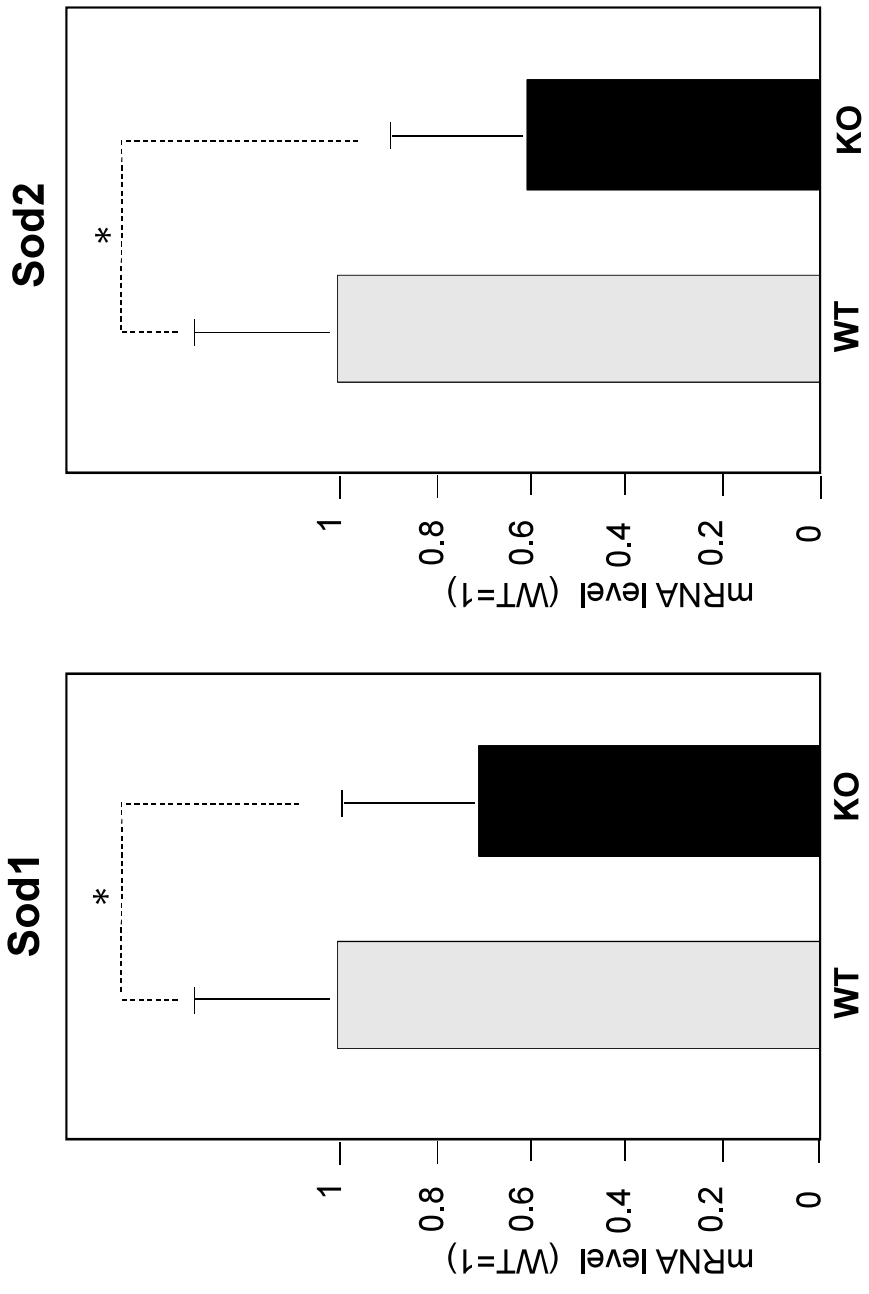


Fig. 11. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Sod1 and Sod2 mRNA in 8-week old male mice which treated with 20 hours fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. *$p<0.05$. β-actin was used as an internal control.

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	X-flod	Decreased	X-flod
SelenBP1(-) vs Control	**Tryptophan metabolism**		**C21-steroid hormone metabolism**	
	Melatonin	7.8	17α-Hydroxycortexone	54.5
	6-hydroxymelatonin	12.6	20α-Hydroxycholesterol	8.3
	Androgen and estrogen metabolism		**Ubiquinone biosynthesis**	
	16α-hydrodehydroepiandrosterone	4.9	Vitamin K2	65.6
	Estrone 3-glucuronide	63.9		
	Estrone	12.5		
	Prostaglandin and leukotriene metabolism			
	20-carboxy-leukotriene B4	5.2		
	11-epi-prostaglandin F2 α	6.3		
	Fatty acid biosynthesis			
	Palmitic acid (PAL)	2.6		
	TCA cycle			
	Cis-Aconitate	9		

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

Asada M, et al. Serum lipopolysaccharide -binding protein levels and the incidence of cardiovascular disease in a general Japanese population: the Hisayama Study. J Am Heart Assoc. 2019; 8: e013628.
Nagata T, et al. ○NT-proBNP and risk of dementia in a general Japanese elderly population: the Hisayama Study. J Am Heart Assoc. 2019; 8: e011652.

Hata J, et al. Association between serum beta-alanine and risk of dementia. Am J Epidemiol. 2019; 188: 1637-1645.

Ninomiya T, et al. Serum ethylamine lLevels as an indicator of l-theanine consumption and the risk of type 2 dDiabetes in a general Japanese population: the Hisayama Study. Diabetes Care. 2019; 42: 1234-1240.

Yoshida D, et al. Dairy consumption and risk of functional disability in an elderly Japanese population: the Hisayama Study. Am J Clin Nutr. 2019; 109: 1664-1671.

Inaishi J, et al. Association between genetic risk and development of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama Study. J Clin Endocrinol Metab. 2019; 104: 3213-3222.

Ohara T, et al. Serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2 as a biomarker for incident dementia: the Hisayama Study. Ann Neurol. 2019; 85: 47-58.

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，

堀就英、安武大輔、平川博仙、戸髙尊、広瀬勇気、新谷依子、梶原淳睦、香月進、三苫千景、古江増隆, 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と傾向（2001～2017 年度）, 福岡医学雑誌, 110(2). 61-66. 2019.

松本伸哉、赤羽学、神奈川芳行、梶原淳睦、三苫千景、内博史、古江増隆、今村知明　カネミ油症におけるダイオキシン類の排出速度は延長している　福岡医学雑誌　110（2）:67-72、2019.

戸高尊、広瀬勇気、上原口奈美、千々和勝己、池田光政、高尾圭子、三苫千景、古江増隆. 平成 16 および平成 26 年度に測定した油症患者血液中ダイオキシン類濃度の比較.　福岡医学雑誌, 2019. 110(2): 73-81.

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, 2,2',3,4',5,6,6'-七塩素化ビフェニル(CB188)のラットおよびモルモット肝ミクロゾームによる代謝. 福岡医誌, 110(2), 83-90 (2019).

酒谷圭一、安武大輔、高橋浩司、堀就英、梶原淳睦、香月進、中野武、三苫千景、古江増隆、油症一斉検診における血液試料中の 2,2’,3,4,4’,5’,6-Heptachlorobiphenyl（PCB183）のキラル分析、福岡医学雑誌, 110(2). 91-96. 2019.

辻　博、松村潔. 油症における末梢血リンパ球亜集団に関する検討. 福岡医学雑誌 110(2):109-112, 2019

武田知起, 人見将也, 山田英之, 石井祐次, 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-p-dioxin のダイオキシン毒性に対する拮抗作用.福岡医学雑誌, 110(2): 122-131 (2019).

宋 穎霞*, 藤本景子*, 黒瀬 厚, 石田卓巳, 古賀貴之, 李 任時, 武田知起, 武知進士, 山田英之, 田中嘉孝, 石井祐次, 雌マウス肝臓におけるセレン結合性タンパク質 (SelenBP)の発現と 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin 被誘導性: SelenBP1 欠損動物を用いた検討. 福岡医学雑誌, 110(2): 128-132 (2019). *Equally contributed to this work

山本健太，太田千穂，徳富美沙紀，古賀信幸，5,7,4′-Trimethoxyflavonoid 類のラット肝ミクロゾームによる代謝 －フラボン類とフラバノン類との比較－. 中村学園研究紀要, **52**, in press.

太田千穂，山本健太，徳富美沙紀，古賀信幸，レスベラトロールメチル誘導体のラット肝ミクロゾームによる代謝および代謝物の抗酸化活性. 中村学園研究紀要, **52**, in press.

Furue M, Tsuji G. Chloracne and Hyperpigmentation Caused by Exposure to Hazardous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands. Int J Environ Res Public Health. 2019 Dec 3;16(23). pii: E4864.

Tanaka Y, Uchi H, Ito T, Furue M. Indirubin-pregnane X receptor-JNK axis accelerates skin wound healing. Sci Rep. 2019 Dec 3;9(1):18174.

Furue M, Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G. Aryl Hydrocarbon Receptor in Atopic Dermatitis and Psoriasis. Int J Mol Sci. 2019 Oct 31;20(21). pii: E5424.

Chiba T, Nakahara T, Kohda F, Ichiki T, Manabe M, Furue M. Measurement of trihydroxy-linoleic acids in stratum corneum by tape-stripping: Possible biomarker of barrier function in atopic dermatitis. PLoS One. 2019 Jan 4;14(1):e0210013.

Eto A, Nakao M, Furue M. Three cases of palmoplantar pustulosis successfully treated with apremilast. J Dermatol. 2019 Jan;46(1):e29-e30.

Fukushi JI, Tsushima H, Matsumoto Y, Mitoma C, Furue M, Miyahara H, Nakashima Y. Influence of dioxin-related compounds on physical function in Yusho incident victims. Heliyon. 2019 Oct 23;5(10):e02702.

Furue K, Ito T, Tanaka Y, Yumine A, Hashimoto-Hachiya A, Takemura M, Murata M, Yamamura K, Tsuji G, Furue M. Cyto/chemokine profile of in vitro scratched keratinocyte model: Implications of significant upregulation of CCL20, CXCL8 and IL36G in Koebner phenomenon. J Dermatol Sci. 2019 Apr;94(1):244-251.

Furue K, Ito T, Tsuji G, Esaki H, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Furue M. Does mechanical scratching cause the recruitment of T-helper 17 cells in atopic dermatitis? J Dermatol. 2019 Nov;46(11):e436-e437.

Furue K, Furue M, Furue M. Detailed visualization of Demodex mites by Dylon staining. Pathol Res Pract. 2019 Jun;215(6):152421.

Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G, Furue M. Antioxidants cinnamaldehyde and Galactomyces fermentation filtrate downregulate senescence marker CDKN2A/p16INK4A via NRF2 activation in keratinocytes. J Dermatol Sci. 2019 Oct;96(1):53-56.

Ichiki T, Kohda F, Hiramatsu T, Saiki R, Sakai A, Furue M. Early pathology in venom-induced consumption coagulopathy by Rhabdophis tigrinus (Yamakagashi snake) envenomation. Clin Toxicol (Phila). 2019 Jul;57(7):668-671.

Itoh E, Furumura M, Furue M. Rate of actual metal allergy prior to dental treatment in subjects complaining of possible metal allergy. Asian Pac J Allergy Immunol. 2019 Mar 24. doi: 10.12932/AP-241018-0425.

Kaneko S, Tsuruta N, Yamaguchi K, Miyagi T, Takahashi K, Higashi Y, Morizane S, Nomura H, Yamaguchi M, Hino R, Sawada Y, Nakamura M, Ohyama B, Ohata C, Yonekura K, Hayashi H, Yanase T, Matsuzaka Y, Sugita K, Kikuchi S, Mitoma C, Nakahara T, Furue M, Okazaki F, Koike Y, Imafuku S; Western Japan Inflammatory Disease Research Group. Mycobacterium tuberculosis infection in psoriatic patients treated with biologics: Real-world data from 18 Japanese facilities. J Dermatol. 2019 Nov 24. doi: 10.1111/1346-8138.15156.

Kido-Nakahara M, Nakahara T, Furusyo N, Shimoda S, Kotoh K, Kato M, Hayashi J, Koyanagi T, Furue M. Pruritus in Chronic Liver Disease: A Questionnaire Survey on 216 Patients. Acta Derm Venereol. 2019 Feb 1;99(2):220-221.

Kitahara Y, Hojo S, Nomoto M, Onozuka D, Furue M, Hagihara A. Pharmacokinetic disposition of topical phosphodiesterase-4 inhibitor E6005 in patients with atopic dermatitis. J Dermatolog Treat. 2019 Aug;30(5):466-470.

Koito R, Kohda F, Dugu L, Suenaga A, Ichiki T, Furue M. Scrotal angiomyxoma. Australas J Dermatol. 2019 Sep 10. doi: 10.1111/ajd.13158.

Tanaka Y, Uchi H, Furue M. Antioxidant cinnamaldehyde attenuates UVB-induced photoaging. J Dermatol Sci. 2019 Nov 6. pii: S0923-1811(19)30340-8.

Kudo K, Masuda A, Mizobe T, Kihara J, Onoyama S, Furuno K, Furue M. Bullous artificial dermatitis due to aerosol sprays masquerading as fixed drug eruption. J Dermatol. 2019 Jun;46(6):e222-e224.

Kurihara Y, Furue M. Gluteal hidradenitis suppurativa presenting pemphigus-like findings: case report. BMC Dermatol. 2019 Jul 23;19(1):11.

Kurihara Y, Nakano K, Eto A, Furue M. Successful treatment of acrodermatitis continua of Hallopeau with apremilast. J Dermatol. 2019 Oct;46(10):e370-e371.

Kurihara Y, Furue M. Occult Basal Cell Carcinoma Arising in Seborrheic Keratosis. Case Rep Dermatol. 2019 Feb 14;11(1):48-51.

Miake S, Tsuji G, Takemura M, Hashimoto-Hachiya A, Vu YH, Furue M, Nakahara T. IL-4 Augments IL-31/IL-31 Receptor Alpha Interaction Leading to Enhanced Ccl 17 and Ccl 22 Production in Dendritic Cells: Implications for Atopic Dermatitis. Int J Mol Sci. 2019 Aug 20;20(16). pii: E4053.

Mihara R, Kabashima K, Furue M, Nakano M, Ruzicka T. Nemolizumab in moderate to severe atopic dermatitis: An exploratory analysis of work productivity and activity impairment in a randomized phase II study. J Dermatol. 2019 Aug;46(8):662-671.

Nakahara T, Fujita H, Arima K, Taguchi Y, Motoyama S, Furue M. Treatment satisfaction in atopic dermatitis relates to patient-reported severity: A cross-sectional study. Allergy. 2019 Jun;74(6):1179-1181.

Nakahara T, Konishi S, Yasukochi Y, Esaki H, Tsuji G, Kido-Nakahara M, Furue M. Thrombocytopenia in a psoriatic patient sequentially treated with adalimumab, secukinumab and ustekinumab. J Dermatol. 2019 May;46(5):e157-e158.

Ohno F, Nakahara T, Kido-Nakahara M, Ito T, Nunomura S, Izuhara K, Furue M. Periostin Links Skin Inflammation to Melanoma Progression in Humans and Mice. Int J Mol Sci. 2019 Jan 4;20(1). pii: E169.

Prinsen CAC, Spuls PI, Kottner J, Thomas KS, Apfelbacher C, Chalmers JR, Deckert S, Furue M, Gerbens L, Kirkham J, Simpson EL, Alam M, Balzer K, Beeckman D, Eleftheriadou V, Ezzedine K, Horbach SER, Ingram JR, Layton AM, Weller K, Wild T, Wolkerstorfer A, Williams HC, Schmitt J. Navigating the landscape of core outcome set development in dermatology. J Am Acad Dermatol. 2019 Jul;81(1):297-305.

Sakaguchi C, Ashida K, Yano S, Ohe K, Wada N, Hasuzawa N, Matsuda Y, Sakamoto S, Sakamoto R, Uchi H, Furue M, Nomura M, Ogawa Y. A case of nivolumab-induced acute-onset type 1 diabetes mellitus in melanoma. Curr Oncol. 2019 Feb;26(1):e115-e118.

Sakaguchi C, Yano S, Ashida K, Wada N, Ohe K, Nagata H, Matsuda Y, Sakamoto S, Sakamoto R, Ohnaka K, Uchi H, Furue M, Nomura M, Ogawa Y. A Case of Acute Exacerbation of Chronic Adrenal Insufficiency Due to Ipilimumab Treatment for Advanced Melanoma. Am J Case Rep. 2019 Jan 25;20:106-110.

Sakata D, Uruno T, Matsubara K, Andoh T, Yamamura K, Magoshi Y, Kunimura K, Kamikaseda Y, Furue M, Fukui Y. Selective role of neurokinin B in IL-31-induced itch response in mice. J Allergy Clin Immunol. 2019 Oct;144(4):1130-1133.

Sasaki Y, Uchi H, Furue M, Matsunaga K. Post-inflammatory depigmentation caused by Basic Blue 75. Contact Dermatitis. 2019 Aug;81(2):141-143.

Satake M, Kudo K, Sasaki T, Furue M, Kubo A. Case of Conradi-Hünermann-Happle syndrome due to a nonsense mutation of c.245G>A (p.W82*). J Dermatol. 2019 Aug;46(8):e296-e298.
Sato S, Chiba T, Nakahara T, Furue M. Upregulation of IL-36 cytokines in folliculitis and eosinophilic pustular folliculitis. Australas J Dermatol. 2019 Aug 19. doi: 10.1111/ajd.13143.

Shiratori-Hayashi M, Hasegawa A, Toyonaga H, Andoh T, Nakahara T, Kido-Nakahara M, Furue M, Kuraishi Y, Inoue K, Dong X, Tsuda M. Role of P2X3 receptors in scratching behavior in mouse models. J Allergy Clin Immunol. 2019 Mar;143(3):1252-1254.

Suga M, Furue MK. Neural Crest Cell Models of Development and Toxicity: Cytotoxicity Assay Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cranial Neural Crest Cell Model. Methods Mol Biol. 2019;1965:35-48.

Sugiyama A, Kishikawa R, Honjo S, Nishie H, Iwanaga T, Furue M. Anti-gluten IgE titer is associated with severity of provocation test-evoked symptoms in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. Allergol Int. 2019 Oct;68(4):541-543.

Takeuchi S, Furusyo N, Ono J, Azuma Y, Takemura M, Esaki H, Yamamura K, Mitamura Y, Tsuji G, Kiyomatsu-Oda M, Hayashi J, Izuhara K, Furue M. Serum squamous cell carcinoma antigen (SCCA)-2 correlates with clinical severity of pediatric atopic dermatitis in Ishigaki cohort. J Dermatol Sci. 2019 Aug;95(2):70-75.

Tsuruta N, Narisawa Y, Imafuku S, Ito K, Yamaguchi K, Miyagi T, Takahashi K, Fukamatsu H, Morizane S, Koketsu H, Yamaguchi M, Hino R, Nakamura M, Ohyama B, Ohata C, Kuwashiro M, Sato T, Saito K, Kaneko S, Yonekura K, Hayashi H, Yanase T, Morimoto K, Sugita K, Yanagihara S, Kikuchi S, Mitoma C, Nakahara T, Furue M, Okazaki F. Cross-sectional multicenter observational study of psoriatic arthritis in Japanese patients: Relationship between skin and joint symptoms and results of treatment with tumor necrosis factor-α inhibitors. J Dermatol. 2019 Mar;46(3):193-198.

Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Tsuji G, Furue K, Hashimoto-Hachiya A, Furue M. Scratching Counteracts IL-13 Signaling by Upregulating the Decoy Receptor IL-13Rα2 in Keratinocytes. Int J Mol Sci. 2019 Jul 6;20(13). pii: E3324.

Wada N, Uchi H, Furue M. Trichophytic closure for cicatricial alopecia on the scalp. J Dermatol. 2019 Jun;46(6):e189-e191.

Yamada Y, Kohashi K, Kinoshita I, Yamamoto H, Iwasaki T, Yoshimoto M, Ishihara S, Toda Y, Itou Y, Koga Y, Hashisako M, Nozaki Y, Kiyozawa D, Kitahara D, Inoue T, Mukai M, Honda Y, Toyokawa G, Tsuchihashi K, Matsushita Y, Fushimi F, Taguchi K, Tamiya S, Oshiro Y, Furue M, Nakashima Y, Suzuki S, Iwaki T, Oda Y.
Clinicopathological review of solitary fibrous tumors: dedifferentiation is a major cause of patient death. Virchows Arch. 2019 Oct;475(4):467-477.

Yamasaki R, Yonekawa T, Inamizu S, Shinoda K, Ochi H, Matsushita T, Isobe N, Tsuji G, Sadashima S, Kuma Y, Oda Y, Iwaki T, Furue M, Kira JI. A case of overlapping adult-onset linear scleroderma and Parry-Romberg syndrome presenting with widespread ipsilateral neurogenic involvement. Neuropathology. 2019 Nov 27. doi: 10.1111/neup.12614.

Yano-Takamori A, Tsuji G, Nakahara T, Kido-Nakahara M, Furue M. A Case of Atrophic Dermatofibroma Overexpressing Matrix Metalloproteinase-1. Case Rep Dermatol. 2019 Oct 1;11(3):264-267.

Yoshimoto M, Yamada Y, Ishihara S, Kohashi K, Toda Y, Ito Y, Yamamoto H, Furue M, Nakashima Y, Oda Y. Comparative Study of Myxofibrosarcoma With Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma: Histopathologic and Clinicopathologic Review. Am J Surg Pathol. 2019 Oct 22. doi: 10.1097/PAS.0000000000001389.

Fukushi JI, Tsushima H, Matsumoto Y, Mitoma C, Furue M, Miyahara H, Nakashima Y.
Influence of dioxin-related compounds on physical function in Yusho incident victims.
Heliyon 2019 Oct 23;5(10): e02702. doi: 10.1016/j.heliyon.2019. e02702.

Hirakawa, S, Miyawaki, T, Hori, T, Kajiwara, J, Katsuki, S, Hirano, M, Yoshinouchi, Y, Iwata, H, Mitoma, C, Furue, M, In silico prediction of the metabolism of PCB congeners by Cytochrome P450 isozymes in Yusho patients. Organohalogen Compounds, 81. 171-174. 2019.

Sakatani, K, Yasutake, D, Takahashi, K, Hori, T, Nakano, T, Mitoma, C, Furue, M, Enantiomeric analysis of 2,2’,3,4,4’,5’,6-heptachlorobiphenyl in the blood of Yusho patients, Organohalogen Compounds, 81. 25-28. 2019.

Tsuji G, Metformin inhibits IL-1 β secretion via impairment of NLRP3 inflammasome in keratinocytes. Cell Death Discovery (in press)