令和２年度厚生労働行政推進調査事業費
食品の安全確保推進研究事業

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

平成 30～令和２年度　総合研究報告書
令和２年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　辻　学

令和３（2021）年３月

平成 30～令和 2 年度　総合研究報告書
令和 2 年度　総括・分担研究報告書

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

平成30年度研究班構成員氏名

研究代表者

古江　増隆　（九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 教授）

研究分担者

赤羽　学　（奈良県立医科大学　公衆衛生学講座　准教授）

石井　祐次　（九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野　准教授）

上松　聖典　（長崎大学病院眼科　講師）

香月　進　（福岡県保健環境研究所　所長）

川崎　五郎　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科　准教授）

古賀　信幸　（中村学園大学栄養科学部　教授）

近藤　英明　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　助教）

申　敏哲　（熊本保健科学大学リハビリテーション学科　准教授）

園田　康平　（九州大学大学院医学研究院眼科学分野　教授）

竹中　基　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 准教授）

月森　清巳　（福岡市立こども病院　周産期センター長）

辻　学　（九州大学病院皮膚科　講師）

辻　博　（北九州若杉病院 西日本総合医学研究所　所長）

戸高　尊　（公益財団法人北九州生活科学センター　室長）

鳥巣　剛弘　（九州大学病院消化管内科　助教）

中西　洋一　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　教授）

二宮　利治　（九州大学大学院医学研究院 衛生・公衆衛生学分野　教授）

福士　純一　（九州大学大学院医学研究院人工関節・生体材料学講座　准教授）

三苫　千景　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　准教授）

室田　浩之　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 准教授）

山下　謙一郎　（九州大学大学院臨床神経生理学分野　助教）

（五十音順）

研究協力者

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

（五十音順）

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）

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　（九州大学病院消化管内科　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　主任技師）
鈴木　邦裕　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教）
高尾　佳子　（福岡県保健環境研究所　企画情報管理課　研究員）
高橋　浩司　（福岡県保健環境研究所　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）

令和２年度研究班構成員氏名

研究代表者

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　（国立循環器病研究センター 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　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）

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　講師）

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）

古江　増隆　（九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野　教授）

前田　英史　（九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学分野　教授）

室田　浩之　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 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　（富山大学病院和漢診療科　特命教授）
梶原　淳睦　（公益財団法人北九州生活科学センター　参事）
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）
北岡　隆　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 眼科・視覚科学分野　教授）
小木曽俊孝　（福岡県保健環境研究所　計測技術課　主任技師）
酒谷　圭一　（福岡県保健環境研究所　計測技術課　主任技師）
佐藤　環　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　主任技師）
新谷　依子　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　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　由香　（九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野　学術研究員）
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）
友清　淳　（九州大学病院歯内治療科　講師）
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）
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）
平川　周作　（福岡県保健環境研究所　水質課　研究員）
平川　博仙　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　専門研究員）
広瀬　勇気　（公益財団法人北九州生活科学センター　検査員）
古谷　貴志　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　技師）
堀　就英　（福岡県保健環境研究所　生活化学課　生活化学課長）
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）
村山　直也　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　助教）
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．平成 30～令和 2 年度総合研究報告書

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　辻　学

II. 令和 2 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……6
研究代表者　辻　学

III. 令和 2 年度分担研究報告書

01. 油症患者の 50 年間追跡調査……12
研究分担者　小野塚　大介
研究協力者　中村　優子，辻　学，古江　増隆

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……15
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，
古谷　貴志，宮脇　崇，平川　周作，酒谷　圭一，小木曽　俊孝，
戸高　尊，広瀬　勇気

03. 油症検診データを用いた基礎的解析……24
研究分担者　香月　進
研究協力者　高尾　佳子，高橋　浩司

04. Thermo Scientific DFS Dual Data XL システムによる
油症患者血液中ダイオキシン類分析法の検討……30
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. 油症曝露による女性特有の健康影響に関する研究……36
研究分担者　月森　清巳
研究協力者　加藤　聖子，諸隈　誠一

06. 油症患者における体脂肪率推定式の作成、体内負荷量に基づく半減期の再検証と
アンケート調査による意識調査・テキスト分析……40
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. 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……54
研究分担者　園田　康平

08. 油症検診受診者における角膜内皮細胞……55
研究分担者　上松　聖典
研究協力者　北岡　隆

09. 油症患者における口腔粘膜色素沈着に関する文献的研究……56
研究分担者　川崎　五郎
研究協力者　吉冨　泉

10. 油症における末梢血ヘルパーT 細胞亜集団に関する検討……59
研究分担者　辻　博

11. 長崎県油症認定患者における神経栄養因子の血中濃度評価と考察……65
研究分担者　室田　浩之
研究協力者　村山　直也

12. カネミ油症患者における中枢･末梢神経障害の文献的考察と安静時機能的 MRI による神経可塑性の神経基盤の研究……69
研究分担者　山下　謙一郎

13. 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 AhR 発現への影響……71
研究分担者　濵田　直樹
研究協力者　鈴木　邦裕, 柳原　豊史

14. 継続的なベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討 ……77
研究分担者　申　敏哲
研究協力者　吉村　惠

15. 芳香族炭化水素受容体による皮膚アレルギーの制御機構に関する研究……83
研究分担者　古江　増隆

16. ベンゾピレンによる皮膚障害に対する生薬成分バイカレインの効果の検討……85
研究分担者　古江　増隆
研究協力者　田中　由香

17. 2,4,6-三塩素置換 PCB 異性体 PCB154 の動物肝ミクロゾームによる代謝……91
研究分担者　古賀　信幸
研究協力者　太田　千穂

18. 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……98
研究分担者　石井　祐次

19. 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：脂質代謝の制御とストレス応答との関連性の検討 ……112
研究分担者　石井　祐次

20. Ah 受容体とアルギニン代謝を介した活性酸ストレスと腸炎の研究……126
研究分担者　鳥巣　剛弘

21. AhR シグナルの活性化が歯槽骨量へ及ぼす影響の解明に関する研究……131
研究分担者　前田　英史
研究協力者　友清　淳

22. 油症患者の関節症状に関する研究 ―Kynurenine pathway の関節炎への影響―……132
研究分担者　津嶋　秀俊

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表……135

総合研究報告書

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　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

【背景】油症はPCB類やダイオキシン類の摂取による混合中毒である。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。

【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、それらの生体への毒性を緩和する治療法を見出すことである。

【研究成果】

１）油症患者の支援と治療研究の推進

①油症相談支援員制度の拡充：九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センターとの協力体制の維持し、油症患者の支援を行なった

②検診データベースの集積と構築：健康実態調査、一斉検診の実施、検診結果を集積した患者データベースを更新した。患者および健常人の血中のPCDF類の実態調査を行った。

③油症患者血液中ダイオキシン類分析法の検討：大量注入装置内の分析カラムの精度と感度を検証し、分析時間の短縮に成功した。また、ガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析装置を更新し、測定可能であることを確認した。

２）臨床的追跡調査・疫学研究

①死因調査：油症患者の50年間の追跡調査を実施し、死亡リスクを検証した。H30年度より死因調査の基盤作りに取り掛かり、R2年度に死因調査の結果をまとめ、論文報告した。その結果、一般の人と比較すると、男性の油症患者では、全がん（SMR: 1.22, 95% CI: 1.02-1.45)、肺がん（SMR: 1.59, 95% CI: 1.12-2.19）の死亡リスクが高かった。また、女性の油症患者では、肝がん（SMR: 2.05, 95% CI: 1.02-3.67）の死亡リスクが高いことが明らかとなった。

②血中ダイオキシン類濃度と疾病マーカーとの関係性：心臓の機能障害のマーカーであるNTpoBMPとPeCDFの濃度について調査したが、明らかな因果関係は見出せなかった。

③油症患者におけるダイオキシン類の濃度変化：ダイオキシン類の半減期が約10年の群と無限大の群があることを確認した。

④油症検診における眼病変に関する研究：油症検診で眼症状の有無を評価し、油症特有の眼症状がないか、検討している。これまでのところは、特に見つかっていない。

⑤油症患者における口腔内病変に関する研究：油症患者における残存歯数、歯周病、歯肉の色素沈着について解析を行なっている。

⑥油症患者における神経障害の解明：油症患者における睡眠障害、触覚の鈍化を報告した。ダイオキシン類による神経障害の報告は、年々減少傾向にある。

⑦油症患者における骨・関節病変の研究：ダイオキシン類の濃度は、筋力やバランス感覚に影響する可能性が示唆された。

⑧油症患者における免疫機能の検討：油症患者ではTh2細胞の割合が増加する傾向にあることが認められている。
⑨油症による次世代健康影響に関する研究：胎児期のダイオキシン類の曝露は、口腔内粘膜の色素沈着に影響する可能性が示唆されている。喫煙と母体のPeCDF濃度に相関が認められた。

（３）基礎的研究
①ダイオキシン類による気道障害の機構：肺サーファクタントタンパクは、ダイオキシン類による肺障害を緩和する働きがあることが明らかとなった。
②肝臓におけるPCB異性体の代謝経路：ラット肝ミクロゾームを用いて、PCB異性体の代謝経路の一部を明らかにした。
③芳香族炭化水素受容体の制御機構：ダイオキシン類によって活性化された芳香族炭化水素受容体が炎症を起こすメカニズムにおいて、活性酸素の産生による酸化ストレスが重要な働きをすることが明らかとなった。このメカニズムを抑制する薬剤として、糖尿病治療薬であるメトホルミン、漢方薬である黄連解毒湯にその可能性があることを報告した。
④母児曝露による性未成熟機構の解析：香族炭化水素受容体が出生児の脳で機能し、脳性分化に関与する可能性を明らかとした。また芳香族炭化水素受容体は、精巣の発達に関与することが分かった。
⑤ダイオキシン誘導性蛋白質Selenbp1の役割：Selenbp1は脂質代謝に関与し、酸化ストレスを軽減する役割を明らかにした。
⑥ダイオキシン類による神経障害の機構：桂枝茯苓丸の有効成分である桂皮を実験動物に投与し、ベンゾピレンによる神経障害が緩和される可能性が示されつつある。

Ａ．研究目的

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

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

Ｂ．研究方法

<u>Ⅰ.班長が担当する研究</u>
１．班長は、九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター（以下、油症センター）センター長を兼任する。
２．班の総括と研究班会議開催
３．油症検診の実施（各自治体に委託）と検診結果の全国集計
４．油症相談員・相談支援員制度
健康の問題を含め、様々な不安を抱く患者の相談を行う。また、患者に対して既往歴、症状、生活習慣の聞き取りまたは文書による調査を行う。
５．死因・次世代調査
ダイオキシンの生体への影響、次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
１）油症患者の支援と治療研究の推進
① 油症相談支援員制度の拡充:
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。2016年には、相談支援員制度を施行した。定期的にセミナーを開催し、情報共有に努めている。
② 検診データベースの集積と構築：
健康実態調査、一斉検診の実施、検診結果を集積した患者データベースを更新した。患者および健常人の血中のPCDF類の実態調査を行った。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。
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。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。
③ 油症患者血液中ダイオキシン類分析法の検討：
大量注入装置内の分析カラムの精度と感度を検証し、分析時間の短縮に成功した。また、ガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析装置を更新し、測定可能であることを確認した。しかし、従来法と比較した場合、低塩素化体の感度が約1/3低下していたため、至適条件の検討を行なっている。
２）臨床的追跡調査・疫学研究
① 死因調査：
油症患者の50年間の追跡調査を実施し、死亡リスクを検証した。H30年度より死因調査の基盤作りに取り掛かり、R2年度

に死因調査の結果をまとめ、論文報告した。その結果、一般の人と比較すると、男性の油症患者では、全がん（SMR: 1.22, 95% CI: 1.02-1.45)、肺がん（SMR: 1.59, 95% CI: 1.12-2.19）の死亡リスクが高かった。また、女性の油症患者では、肝がん（SMR: 2.05, 95% CI: 1.02-3.67）の死亡リスクが高いことが明らかとなった。

② 血中ダイオキシン類濃度と疾病マーカーとの関係性：
住民検診のデータを用いて、心臓の機能障害のマーカーである NTpoBMP と PeCDF の濃度について調査したが、明らかな因果関係は見出せなかった。

③ 油症患者におけるダイオキシン類の濃度変化：
ダイオキシン類の血中濃度について、体脂肪率で補正を行いあらためて解析した。ダイオキシン類の半減期が約 10 年の群と無限大の群があることを確認し、従来の報告と同じ傾向であった。

④ 油症検診における眼病変に関する研究：
油症検診で眼症状の有無を評価し、油症特有の眼症状がないか、検討している。これまでのところは、特に見つかっていない。眼脂過多の症例が多い傾向にある。

⑤ 油症患者における口腔内病変に関する研究：
油症患者における残存歯数、歯周病、歯肉の色素沈着について解析を行なっている。

⑥ 油症患者における神経障害の解明：
油症患者における睡眠障害、触覚の鈍化を報告した。神経栄養因子やセマフォリンタンパクの一部は血中ダイオキシン類の濃度と関連性がある可能性がある。ダイオキシン類による神経障害の症例報告は、年々減少傾向にある。

⑦ 油症患者における骨・関節病変の研究：ダイオキシン類の濃度は、筋力やバランス感覚に影響する可能性が示唆された。

⑧ 油症患者における免疫機能の検討：
油症患者末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の細胞内サイトカインを測定し、Th2 細胞の割合が増加する傾向にあることが認められている。

⑨ 油症による次世代健康影響に関する研究：
胎児期のダイオキシン類の曝露は、口腔内粘膜の色素沈着に影響する可能性が示唆されている。喫煙と母体の PeCDF 濃度に相関が認められている。

３）基礎的研究

① ダイオキシン類による気道障害の機構：肺サーファクタントが欠損したマウスにベンゾピレンを投与し、解析を行った。肺サーファクタントタンパクは、ダイオキシン類による肺障害を緩和する働きがあることが明らかとなった。

② 肝臓における PCB 異性体の代謝経路：
ラット肝ミクロゾームを用いて、PCB 異性体の代謝経路の一部を明らかにした。動物の種類によって、代謝経路が異なる可能性も示唆された。

③ 芳香族炭化水素受容体の制御機構：
ダイオキシン類によって活性化された芳香族炭化水素受容体が炎症を起こすメカニズムにおいて、活性酸素の産生による酸化ストレスが重要な働きをすることが明らかとなった。このメカニズムを抑制する薬剤として、糖尿病治療薬であるメトホルミン、漢方薬である黄連解毒湯にその可能性があることを報告した。

④ 母児曝露による性未成熟機構の解析：
芳香族炭化水素受容体が出生児の脳で機能し、脳性分化に関与する可能性を明らかとした。また香族炭化水素受容体は、思春期における精巣の発達に関与することが明らかとなり、生殖障害に影響を及ぼす可能性がある。

⑤ ダイオキシン誘導性蛋白質 Selenbp1 の役割：
ダイオキシン類が肝臓のセレン結合性タンパク 1(Selenbp1)を誘導するという結果に基づき、Selenbp1 遺伝子欠損マウスを作成して、その解析を行った。

Selenbp1 は脂質代謝に関与し、酸化ストレスを軽減する役割を明らかにした。
⑥ ダイオキシン類による神経障害の機構：桂枝茯苓丸の有効成分である桂皮を実験動物に投与し、ベンゾピレンによる神経障害が緩和されるかを検討した。単回投与による影響に関しては、桂皮は一定の効果を表したが、慢性的な投与ではその効果は今のところ、認められていない。

D．結論

環境汚染物質であるダイオキシン類が環境、生物に与える影響は国内外で検証されている。油症は住民が高濃度の PCB/ダイオキシン類を経口摂取した世界的にも稀有な事件である。生体内で代謝されにくく、生体内に長期間残存するダイオキシン類がヒトに及ぼす慢性影響を検証した疫学研究は油症研究の他にない。油症班では、血液中にごく微量に存在するダイオキシン類各異性体濃度を精確かつ再現性をもって分析している。この油症研究により、患者のみならず、人類にとって有益な知見が得られると期待される。すなわち、油症患者、そして継世代の症状・所見、血中ダイオキシン類濃度、および個々の経時的変化を解析することは、ダイオキシン類の慢性的な生体への影響を解明することにつながる。疫学調査では、油症発生から 50 年の追跡調査による死因調査で、油症患者は、がんのリスクが高いことが明らかとなった。特に女性では肝臓がんの発生が２倍以上高く、この結果は、油症検診で肝臓に関する検査（血液検査、腹部エコー）がより重要となる可能性がある。また、ダイオキシン類は、骨・関節病変、口腔粘膜の色素沈着、血液細胞の免疫機能、神経の働きに影響を及ぼすことが明らかとなった。
基礎的研究においては、芳香族炭化水素受容体が、薬物代謝に加えて、気道障害、感覚障害、性分化・生殖障害にも重要な働きをしていることが明らかとなった。さらに、これまで油症の症状の緩和に桂枝茯苓丸が有用であることを明らかとしたが、今回、黄連解毒湯が新たな治療薬となる可能性が示唆された。漢方薬による治療では、桂枝茯苓丸と黄連解毒湯の組み合わせによる治療も行われる。したがって、油症患者において桂枝茯苓丸で症状の緩和が乏しい場合には、黄連解毒湯の使用・併用も選択肢の一つとして考慮することが可能となった。

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。

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　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

【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50年以上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】

臨床的追跡調査・疫学研究

（１）油症患者の支援と治療研究の推進

①健康実態調査、一斉検診の実施、検診結果を集積した患者データベースを更新した。令和元年度全国油症検診の受診者の検診結果をデータベースに入力した。 ②油症相談支援員制度による死因調査の結果を論文公開した。油症患者の50年間の追跡調査を実施し、死亡リスクを検証した。その結果、一般の人と比較すると、男性の油症患者では、全がん（SMR: 1.22, 95% CI: 1.02-1.45)、肺がん（SMR: 1.59, 95% CI: 1.12-2.19）の死亡リスクが高かった。また、女性の油症患者では、肝がん（SMR: 2.05, 95% CI: 1.02-3.67）の死亡リスクが高いことが明らかとなった。③油症に関する知識の共有と患者の生活の質の向上を図る目的での油症相談員(福岡県、広島県、長崎県、五島市)を対象にWEBセミナーを行った。今回は、油症の治療に用いる漢方薬の考え方・指導について知識を深めた。

（２）臨床的追跡調査・疫学研究

①令和元年度の全国油症検診受診者の検診情報の収集と管理を行った。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。血液中ダイオキシン類濃度を測定した認定患者109名と未認定者119名について結果集計を行った。油症認定患者109名の内訳は、油症検診結果に基づく認定者（検診認定者）が89名、同居家族の条件による認定者（同居認定者）が20名であった。認定患者全体（109名）の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は67 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47 pg TEQ/g-fatであった。このうち同居認定者（20名）の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は32 pg/g-fat であり、Total TEQの平均濃度は29 pg TEQ/g-fatであった。これに対して、未認定者（119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19 pg TEQ/g-fatであった。また、油症患者のダイオキシン類の半減期について、体脂肪率で補正して再度検証したところ、これまでの報告と同様に、半減期が約10年と無限大の群が存在することが確かめられた。

②油症患者血液中ダイオキシン類分析法の検討では、ガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析装置を更新した。
③油症曝露による女性特有の健康影響に関しては、油症女性患者では月経異常が高率に認められるが、50 年間という年月が経つと月経異常の頻度は減少していること、また婦人科疾患の合併頻度は増加しないことが明らかとなった。
④健康実態調査における自由記載欄のテキスト分析では、「感染」「コロナ」「心配」「ウイルス」「新型」が多くみられた。
⑤心不全マーカーである血清 NTproBNP 高値と血中ダイオキシン類の濃度との関連性は見出せなかった。
（３）基礎的研究
①ダイオキシン類による肺障害では肺サーファクタントタンパクが欠損したマウスに対してベンゾピレンを投与すると、野生型マウスに較べて AHR シグナルが亢進することが明らかとなった。
②各 PCB 異性体で体内に残留しやすい異性体に関して、ラット肝ミクロゾームを用いて検討し、PCB154 の代謝経路を明らかにした。
③酸化ストレスを軽減する可能性がある漢方薬の探索を行ったところ、バイカレインという化合物がダイオキシン類の毒性を緩和することを論文発表した。バイカレインは漢方薬では黄連解毒湯に多く含まれる。今後、油症の症状を緩和する可能性がある漢方薬として、油症外来などで使用していく予定である。
④実験動物を用い、AHR が出生児の脳で機能し、脳性分化に関与する可能性を明らかとした。また、ダイオキシン誘導性蛋白質である Selenbp1 は酸化ストレスを軽減する役割を明らかにした。
⑤油症患者では神経栄養因子と血中 PCQ 濃度に弱い相関を認めた。
⑥ベンゾピレンで AHR シグナルが活性化すると歯根膜細胞のコラーゲンや血管新生因子が抑制される可能性が示唆された。
⑦AHR と活性酸素産生の両方に関与するアルギナーゼという酵素は、腸炎を防御するように働く可能性がある。
⑧油症患者の関節症状に関する研究では、AHR を活性化するキヌレインという物質が関節内に過剰産生すると、軟骨変性をきたす可能性があることが示唆された。
⑨油症患者の血液細胞を分析したところ、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高いと Th2 細胞の割合が増加することが明らかとなった。

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、次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。2016年には、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。今年度は新型コロナウイルス感染症の拡大を防ぐため、WEB 会議・書面会議で行った。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、更新した。

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、一般の人と比較すると、男性の油症患者では、全がん（SMR: 1.22, 95% CI: 1.02-1.45)、肺がん（SMR: 1.59, 95% CI: 1.12-2.19）の死亡リスクが高かった。また、女性の油症患者では、肝がん（SMR: 2.05, 95% CI: 1.02-3.67）の死亡リスクが高いことが明らかとなった。

６．油症患者の血液中ダイオキシン類分析におけるガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析装置の検討
ガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析装置による測定は、感度的には可能であるが、従来法と比較した場合、低塩素化体の感度が約 1/3 低下していた。今後、この問題を解決するために、PTV-LVI システムの設定条件、注入口の初期温度、試料の注入速度およびキャリアガス流量を最適化し、新しい分析法を確立した上で、従来法との妥当性評価を行う。

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
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。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た。血液中ダイオキシン類濃度を測定した認定患者 109 名と未認定者 119 名について結果集計を行った。油症認定患者 109 名の内訳は、油症検診結果に基づく認定者（検診認定者）が 89 名、同居家族の条件による認定者（同居認定者）が 20 名であった。認定患者全体（109 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 67 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 47 pg TEQ/g-fat であった。このうち同居認定

者（20 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 32 pg/g-fat であり、Total TEQ の平均濃度は 29 pg TEQ/g-fat であった。これに対して、未認定者（119 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 19 pg TEQ/g-fat であった。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。

２．油症患者における眼科的所見

１）福岡県・長崎県検診における眼科的所見

本年度は新型コロナウイルス感染症の影響で眼科的診察を行うことが難しかった。

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

本年度は新型コロナウイルス感染症の影響で歯科診察を行うことが難しかった。油症患者における口腔粘膜色素沈着について文献的研究を行った。油症患者においてはいまだ高い発現がみられ、特に歯肉に発現が多く認められていた。

4. 油症における末梢血 CD4 陽性 T 細胞亜集団に関する検討

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ところ、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高いと Th2 細胞の割合が増加することが明らかとなった。

５．長崎県油症認定患者における神経栄養因子の血中濃度評価と考察

油症患者では神経栄養因子と血中 PCQ 濃度に弱い相関を認めた。

６．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

文献を考察したところ、PCB、PCDF、dioxin による中毒症状による中枢神経障害そのものが評価されていない可能性が考えられた。

７．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

心不全マーカーである血清 NTproBNP 高値と血中ダイオキシン類の濃度との関連性は見出せなかった。

８．油症曝露による継世代健康影響に関する研究

油症曝露による女性特有の健康影響に関しては、油症女性患者では月経異常が高率に認められるが、50 年間という年月が経つと月経異常の頻度は減少していること、また婦人科疾患の合併頻度は増加しないことが明らかとなった。

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 AhR 発現への影響

ダイオキシン類による肺障害では肺サーファクタントタンパクが欠損したマウスに対してベンゾピレンを投与すると、野生型マウスに較べて AHR シグナルが亢進することが明らかとなった。

２．継続的なベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討

継続的にベンゾピレンを投与したラットにおける神経異常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で評価したが、現段階では、明らかな改善効果は示されなかった。

３． 芳香族炭化水素受容体による皮膚アレルギーの制御機構に関する研究

皮膚バリア機能は、AHR 軸（バリア亢進）と IL-13/IL-4- JAK-STAT6/STAT3 軸（バリア抑制）がちょうどシーソーのように競合しあって調節されているという概念に到達した。また塩素痤瘡は、表皮

細胞とりわけ脂腺細胞のAHRがダイオキシン類によって過剰に活性化され、表皮細胞化生が起こり、脂腺が消失することによって発生すると考えられた。このような概念の提示は、皮膚炎や塩素痤瘡の今後の治療薬の開発に寄与すると考えられた。

４． ベンゾピレンによる皮膚障害に対する生薬成分バイカレインの効果の検討

バイカレインがAHR経路阻害とNRF2-HMOX1抗酸化経路活性化により、ベンゾピレンによる炎症・酸化ストレスから皮膚を保護することを明らかにした。またバイカレインを含む方剤も同様の作用を示したことから、炎症初見の強い油症患者に対してはバイカレインを含む黄連解毒湯とシンナムアルデヒドを含む桂枝茯苓丸を組み合わせることで、より大きな効果が得られる可能性が示唆された。

５．2,4,6-三塩素置換PCB異性体PCB154の動物肝ミクロゾームによる代謝

各PCB異性体で体内に残留しやすい異性体に関して、ラット肝ミクロゾームを用いて検討し、PCB154の代謝経路を明らかにした。

６．2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxinによる出生児の性未成熟の機構解析：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

AHRが出生児の脳で機能し、脳性分化に関与する可能性を明らかとした。

７．ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質１（SelenBP1）の腎臓における役割：脂質代謝の制御とストレス応答との関連性の検討

ダイオキシン誘導性蛋白質であるSelenbp1は酸化ストレスを軽減する役割を明らかにした。

８．Ah受容体とアルギニン代謝を介した酸化ストレスと腸炎の研究

AHRと活性酸素産生の両方に関与するアルギナーゼという酵素は、腸炎を防御するように働く可能性がある。

９．AhRシグナルの活性化が歯槽骨量へ及ぼす影響の解明に関する研究

ベンゾピレンでAHRシグナルが活性化すると歯根膜細胞のコラーゲンや血管新生因子が抑制される可能性が示唆された。

１０．油症患者の関節症状に関する研究（Kynurenine pathwayの関節炎への影響 ）

油症患者の関節症状に関する研究では、AHRを活性化するキヌレインという物質が関節内に過剰産生すると、軟骨変性をきたす可能性があることが示唆された。

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。

F．謝辞

本研究を行うにあたり、研究分担者・協力者の先生方をはじめ、九州大学大学院医学研究院 衛生・公衆衛生学分野・教授 二宮利治　先生、富山大学附属病院和漢診療科 特命教授貝沼茂三郎 先生に厚く御礼を申し上げます。

分担研究報告書

油症患者の 50 年間追跡調査

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
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　油症患者を対象に 50 年間の追跡調査を実施し、油症患者の生存状況および死因を調査した。また、油症患者における主要死因別の死亡率について、一般人と比較して評価を行った。その結果、男性の油症患者では、全がん（SMR: 1.22, 95% CI: 1.02-1.45)、肺がん（SMR: 1.59, 95% CI: 1.12-2.19)の死亡率が、一般人と比較して高かった。また、女性の油症患者では、肝がん（SMR: 2.05, 95% CI: 1.02-3.67)の死亡率が、一般人と比較して高かった。その他の主な死因については、顕著な傾向はみられなかった。

A．研究目的

我々はこれまで、油症患者を対象とした 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。

そこで本研究は、追跡期間を 50 年間に延長し、油症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。

死亡者における死因の特定については、これまでの調査で死因が不明であった油症患者も含めて、油症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い、承認を得た（厚生労働省発政統 0309 第３号・令和２年３月９日、厚生労働省発政統 1209 第２号・令和２年 12 月９日)。

油症患者における死亡リスクの評価については、性別および主要死因別に標準化死亡比(standardized mortality ratio: SMR)および 95%信頼区間を求めた。なお、一般人の死亡率を基準値とした。

（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

1968 年から 2017 年までの油症患者における主要死因別死亡数、SMR および 95%信頼区間を Table 1 に示す。一般人と比較すると、男性の油症患者では、全がん（SMR:

1.22, 95% CI: 1.02-1.45)、肺がん（SMR: 1.59, 95% CI: 1.12-2.19)の死亡率が高かった。また、女性の油症患者では、肝がん（SMR: 2.05, 95% CI: 1.02-3.67)の死亡率が高かった。

全死亡、糖尿病、高血圧、心疾患、脳血管疾患、肝疾患の死亡率については、一般人と比較した際に顕著な差はみられなかった。

D．考察

油症患者を対象に 50 年間の追跡調査を実施した結果、男性の油症患者では、全がんおよび肺がんの死亡率が高かった。また、女性の油症患者では、肝がんの死亡率が高かった。今回実施した 50 年間追跡調査の結果は、我々が前回実施した 40 年間追跡調査の結果と概ね傾向が一致しており、油症事件発生後 50 年が経過した時点においても、PCB やダイオキシン類による発がんによる死亡リスクは、一般人と比較して高い傾向を維持していることが示唆された。

E．結論

油症患者を対象に、50 年間の追跡調査を実施した結果、一般人と比較した場合、男性の油症患者では、全がんと肺がんの死亡率が高かった。また、女性の油症患者では、肝がんの死亡率が高かった。

今後も油症患者を対象とした追跡調査を継続するとともに、PCB やダイオキシン曝露による、さらに長期の健康影響について明らかにしていく必要がある。

（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、川上義仁氏、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、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

(1) Onozuka D, Nakamura Y, Tsuji G, Furue M. Mortality in Yusho patients after exposed to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans: a 50-year restrospective cohort study. Environ Health 2020;19(1):119.

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

Table 1. Numbers of observed and expected deaths, SMRs, and 95% CI for the major causes of death in Japanese Yusho patients, 1968 and 2017.

Cause of death (ICD–9 codes)	Males					Females				
	Observed, no.	Expected, no.	SMR	95% CI		Observed, no.	Expected, no.	SMR	95% CI	
All causes (001–999)	360	346.2	1.04	0.94,	1.15	283	270.8	1.05	0.93,	1.17
All cancers (140–208)	132	108.3	1.22	1.02,	1.45	66	67.9	0.97	0.75,	1.24
Stomach (151)	24	22.3	1.07	0.69,	1.60	5	11.8	0.43	0.14,	0.99
Rectum (154)	4	4.5	0.88	0.24,	2.25	2	2.7	0.75	0.08,	2.70
Liver (155)	19	12.8	1.49	0.90,	2.33	11	5.4	2.05	1.02,	3.67
Pancreas (157)	8	6.5	1.24	0.53,	2.44	7	5.2	1.34	0.54,	2.75
Lung (162)	37	23.3	1.59	1.12,	2.19	8	8.1	0.99	0.42,	1.94
Breast (174)	0	0.0				6	5.2	1.15	0.42,	2.51
Uterus (179–182)						5	3.6	1.39	0.45,	3.25
Leukemia (204–208)	2	2.5	0.81	0.09,	2.93	0	1.7	0.00	0.00,	0.00
Diabetes mellitus (250)	1	4.1	0.24	0.00,	1.36	3	3.7	0.82	0.16,	2.38
Hypertension (401–405)	2	2.6	0.77	0.09,	2.77	1	3.4	0.29	0.00,	1.62
Heart disease (393–398, 410–429)	54	51.3	1.05	0.79,	1.37	51	47.8	1.07	0.79,	1.40
Cerebrovascular disease (430–438)	39	46.2	0.84	0.60,	1.15	44	42.7	1.03	0.75,	1.38
Hepatic disease (570–573)	12	8.5	1.42	0.73,	2.49	4	3.7	1.07	0.29,	2.73

Abbreviation: ICD–9, *International Classification of Diseases*, Ninth Revision; SMR, standardized mortality ratio; CI, confidence interval.

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
	古谷　貴志	福岡県保健環境研究所	生活化学課　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
	小木曽　俊孝	福岡県保健環境研究所	計測技術課　主任技師
	戸高　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。2019 年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度を測定した認定患者 109 名と未認定者 119 名について結果集計を行った。油症認定患者 109 名の内訳は、油症検診結果に基づく認定者（検診認定者）が 89 名、同居家族の条件による認定者（同居認定者）が 20 名であった。認定患者全体（109 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 67 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 47 pg TEQ/g-fat であった。このうち同居認定者（20 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 32 pg/g-fat であり、Total TEQ の平均濃度は 29 pg TEQ/g-fat であった。これに対して、未認定者（119 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 19 pg TEQ/g-fat であった。

2019 年度に実施した血液中 PCB 分析精度管理についてデータ解析を行った。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 PCB 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、ヒト体内におけるチトクローム P450（CYP）によるダイオキシン類（PCDDs、PCDFs、non-*ortho* PCBs）の代謝能を解析するため、*in silico* 解析によるダイオキシン類とヒト CYP 7 分子種のドッキングシミュレーションを実施した。その結果、ダイオキシン類に対して、代謝能を有している可能性がある 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、2020 年度に行われた全国油症一斉検診の受診者のうち 85 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、2019 年度現在の認定患者数は 2,350 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体外排泄速度の解析等に寄与している。

本年度は以下の 3 項目について検討した。
（１）2019 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 228 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）ヒト体内におけるダイオキシン類の代謝に関する知見を獲得するため、*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分子種に依存するダイオキシン類の代謝特性を解析した。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に準じて行った。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ているか確認した。

2019 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 109 名及び未認定者 119 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 2019 年の検診受診時のものを用いた。

２．血液中 PCB 濃度分析の精度管理

国内の分析機関（5 か所）に 2 種類の血液試料を配付し、PCB 異性体の分別定量を依頼した。分析は各機関で通常行っている試験法に従って実施された。

各機関の報告値に福岡県保健環境研究所の測定値を加えた 6 機関分のデータを集計して解析した。全体解析では各 PCB 異性体の全血重量あたりの濃度を用い、ピーク分離不可として報告された異性体があった場合は、一律に未分離扱いとし、該当する異性体の濃度を合算した。定量下限未満の異性体濃度はゼロとし、Total PCB 濃度や同族体ごとの濃度を集計した。各分析機関の比較には CV 値および Z スコアを用いた。

３．油症患者におけるダイオキシン類・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共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」との共同研究協力を得て、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、ダイオキシン類（PCDDs 7 種類、PCDFs 10 種類、non-ortho PCBs 4 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、ヒト体内におけるダイオキシン類の代謝に関与する CYP 分子種を推定した。

また、高分解能 GC/MS を用いて油症患者の血液中 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl（PCB183）の鏡像異性体（キラル体）を分離・定量し、油症発生直後（1974～1976 年）と近年（2015～2016 年）の蓄積状況を比較した。

（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 値は約 10%で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 PCB 濃度の測定結果（全血重量あたり）を表 1 に示した。PCB 低塩素化体（塩素化数 1～3）を計測対象としていない機関、またこれらの同族体濃度を定量下限値未満で報告した機関もあったが、4～10 塩素化物は全ての検査機関が実測値を報告した。

血液サンプル FBCC1901 の血液中 PCB 濃

度の総和（Total PCB）は平均 450 pg/g-wet（範囲：390－490 pg/g-wet）となり、CV は 8.1％と良好な結果であった。また図 1 に示すように Z スコアが 2 を超えた機関は認められなかった。

一方、血液サンプル FBCC1902 の Total PCB は平均 440 pg/g-wet（範囲：330－520 pg/g-wet）であり、CV は 15％とややバラツキの大きい結果となったが、Z スコアが 2 を超えた機関は無かった。

２．2019 年度油症一斉検診受診者の血液中ダイオキシン類濃度

2019 年度の血液中ダイオキシン類測定対象者は 228 名（内訳：認定患者 109 名及び未認定者 119 名）であり、2018 年度の 320 名に比べて 92 名減少した。2007 年度以降、ダイオキシン類測定対象者は初回受診者と過去 3 年以内に測定歴の無い認定患者としており、4 年周期で測定件数が多くなる傾向がある。2019 年度はそのピークの翌年に当たり測定件数が減少したと考えられる。また、未認定者は 2018 年度と比べて 6 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一因と考えられる。

表 2 に 2019 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（109 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 67 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 47 pg TEQ/g-fat であった。このうち検診認定者（89 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 75 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（20 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 32 pg/g-fat であり、Total TEQ の平均濃度は 29 pg TEQ/g-fat であった。未認定者 119 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 19 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、検診認定者及び同居認定者の平均濃度は一般住民に対してそれぞれ 3.8 倍、1.9 倍高く、未認定者は一般住民とほぼ同等の濃度であった。

表 3 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と未認定者でそれぞれ 3 名認められた。

３．油症患者におけるダイオキシン類・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 解析によるダイオキシン類（21 種）と CYP 7 分子種のドッキングシミュレーションを実施した。得られたドッキングポーズから CYP の活性中心にあるヘム鉄とダイオキシン類の骨格構造における水酸化標的部位の距離を測定し、代謝の可能性を評価した。なお、OCDD および OCDF は、その骨格構造において塩素原子が結合していない炭素原子が存在しないため、水酸化標的部位を特定できず、距離の測定は行なえなかった。解析の結果、ヒト CYP2A6 と CYP2B6 は、複数のダイオキシン類に対して

代謝能を有している可能性が示唆された（表 4）。

油症発生直後と近年の油症患者の血液中 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl（PCB183）の鏡像異性体（キラル体）を分析し、右旋性のもの（PCB183(+)）の割合（*EF* 値）を算出した。その結果、*EF* 値は 0.57～0.75 であり、油症患者の血液中で PCB183(+)がキラル選択的に蓄積されることが確認された。また、油症発生直後の *EF* 値は 0.57～0.66（平均 0.63）、現在の *EF* 値は 0.70～0.75（平均 0.73）であり、現在の方が優位に大きいことが明らかとなった（図 2）。このことから、PCB183(+)の蓄積が経時的に進んでいることが示唆された。

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。

2019 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 109 名と未認定者 119 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 75 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 32 pg/g-fat であり、Total TEQ の平均濃度は 29 pg TEQ/g-fat であった。未認定者 119 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 19 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 18 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 5857 件となった。2019 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。油症患者の血液中 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、油症患者血液中において PCB183(+)の蓄積が経時的に進んでいることが示唆された。

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　　なし

２．学会発表　　なし

G．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 PCB 測定結果（単位：pg/g-wet）

（１）試料名　FBCC1901

化合物名	分析機関						Mean	CV%
	A	B	C	D	E	F		
Total MoCBs	0.9	1.0	0	0	—	—	0.47	—
Total DiCBs	1.5	2.0	0	0	—	—	0.87	—
Total TriCBs	1.0	2.1	0	0	0.8	6.2	1.7	140
Total TeCBs	5.8	6.6	3.9	4.0	5.0	12.2	6.2	49
Total PeCBs	15	19	16	14	17	19	17	12
Total HxCBs	200	190	200	220	180	170	190	9.1
Total HpCBs	190	160	190	200	160	140	170	14
Total OcCBs	41	43	50	48	46	41	45	8.4
Total NoCBs	4.2	5.2	5.3	4.0	4.9	4.3	4.7	12
DeCB	2.8	3.2	2.6	3.0	2.5	2.7	2.8	10
Total PCBs	460	440	470	490	420	390	450	8.1

（２）試料名　FBCC1902

化合物名	分析機関						Mean	CV%
	A	B	C	D	E	F		
Total MoCBs	1.1	1.1	0	0	—	—	0.55	—
Total DiCBs	1.6	1.6	0	0	—	—	0.80	—
Total TriCBs	1.1	1.3	0	0	0.87	3.5	1.1	110
Total TeCBs	5.4	5.7	3.7	4.0	5.8	9.2	5.6	35
Total PeCBs	26	26	25	28	27	22	26	8
Total HxCBs	230	220	240	280	210	170	230	16
Total HpCBs	160	140	160	170	140	100	150	17
Total OcCBs	29	26	34	32	31	24	29	13
Total NoCBs	2.8	3.2	3.6	3.0	3.5	2.3	3.1	15
DeCB	1.3	1.2	1.3	0	0.98	0.85	0.93	53
Total PCBs	460	430	460	520	410	330	440	15

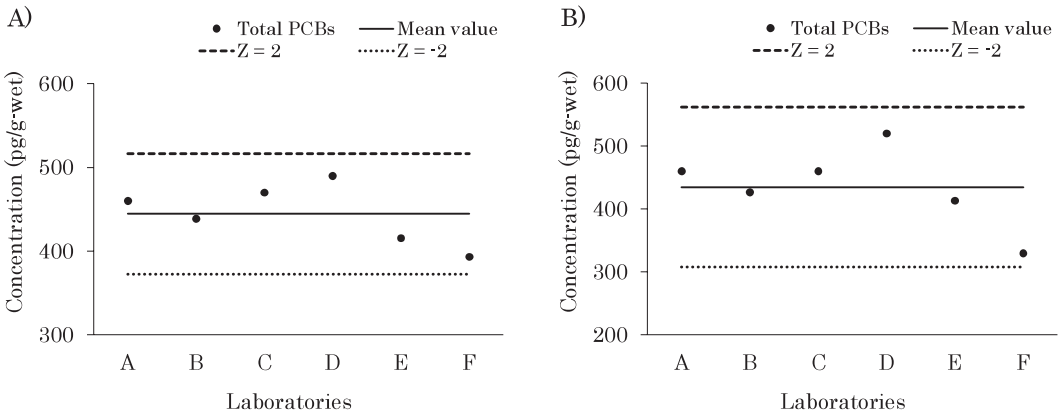


図１　機関別血液中 Total PCB 濃度の$\bar{X}$管理図（A：FBCC1901、B：FBCC1902）

表２　2019 年度血液中ダイオキシン類濃度調査結果（単位：pg/g-fat）

	2019年度検診結果								一般住民			
	認定患者(N=109)				未認定者(N=119)				(2004年, N=127)			
Congeners	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
2,3,7,8-TCDD	1.3	0.88	ND	4.7	0.94	0.68	ND	3.7	1.9	0.84	ND	4.3
1,2,3,7,8-PeCDD	8.1	4.3	ND	20	4.0	3.2	ND	15	9.0	3.4	3.2	20
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.5	1.8	ND	10	1.7	1.2	ND	8.4	3.6	1.9	ND	13
1,2,3,6,7,8-HxCDD	26	22	2.4	110	12	7.2	ND	38	28	11	7.3	70
1,2,3,7,8,9-HxCDD	3.7	2.6	ND	18	2.3	1.5	ND	7.1	4.5	2.8	ND	16
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	34	19	6.6	140	25	17	3.1	97	78	55	18	470
OCDD	540	340	100	2300	470	310	95	1800	1200	640	180	7600
Total PCDDs	620	370	120	2500	520	340	110	1900	1300	1000	210	8200
2,3,7,8-TCDF	2.3	1.9	ND	15	1.8	1.8	ND	6.8	1.0	0.72	ND	4.5
1,2,3,7,8-PeCDF	1.3	0.90	ND	5.5	1.1	0.75	ND	4.2	0.67	0.55	ND	4.6
2,3,4,7,8-PeCDF	67	99	3.4	490	13	15	2.0	120	17	7.7	6.0	63
1,2,3,4,7,8-HxCDF	14	24	ND	120	3.4	3.3	ND	22	5.0	2.7	ND	20
1,2,3,6,7,8-HxCDF	7.2	8.5	ND	38	3.3	3.2	ND	25	5.7	2.6	ND	16
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.1	0.46	ND	4.5	1.1	0.47	ND	4.6	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	1.7	1.0	ND	6.1	1.7	1.2	ND	6.7	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	98	130	12	620	29	22	11	160	37	14	15	86
3,4,4',5-TCB(81)	5.3	2.1	ND	23	5.1	1.1	ND	15	5.6	2.3	ND	24
3,3',4,4'-TCB(77)	6.5	3.5	ND	20	6.5	3.3	ND	21	8.4	4.8	ND	31
3,3',4,4',5-PenCB(126)	74	60	ND	270	57	58	ND	290	110	80	17	520
3,3',4,4',5,5'-HxCB(169)	130	120	17	750	58	57	ND	250	64	27	16	190
Total Non-*ortho* PCBs	220	170	34	900	130	110	20	560	190	110	59	740
Total	930	540	170	2900	680	430	140	2300	1600	1000	290	8500
PCDDs-TEQ	13	6.9	2.4	32	6.9	4.5	1.4	23	16	5.9	5.1	35
PCDFs-TEQ	23	33	1.5	160	5.0	5.2	1.1	38	6.6	2.5	2.3	14
Non-*ortho* PCBs-TEQ	11	8.7	1.1	40	7.4	7.3	0.65	36	13	8.6	2.6	58
Total TEQ	47	43	5.9	200	19	15	3.8	82	37	16	12	100

表３　血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度（単位：pg/g-fat）の度数分布

濃度範囲		検診認定者	同居認定者	未認定者
以上	未満			
400 ～	500	1	-	-
300 ～	400	6	-	-
200 ～	300	3	-	-
100 ～	200	10	2	1
90 ～	100	2	-	1
80 ～	90	-	-	-
70 ～	80	2	-	-
60 ～	70	5	-	-
50 ～	60	5	1	1
40 ～	50	2	2	-
30 ～	40	6	1	5
20 ～	30	10	2	11
10 ～	20	14	6	34
0 ～	10	23	6	66
	人数計	89	20	119

表４　CYP 分子種のヘム鉄とダイオキシン類の水酸化標的部位の距離(単位：Å)

Congeners	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C9	CYP3A4
PCDDs							
2,3,7,8-TeCDD	5.78	5.51	5.72	**3.63**	**4.69**	8.44	7.89
1,2,3,7,8-PeCDD	6.22	5.54	5.83	**4.17**	**4.95**	8.14	7.69
1,2,3,4,7,8-HxCDD	5.93	5.68	5.78	8.00	5.21	8.80	8.71
1,2,3,6,7,8-HxCDD	6.71	5.67	6.54	5.91	**4.74**	8.88	7.36
1,2,3,7,8,9-HxCDD	5.82	5.57	6.44	**3.35**	**4.99**	9.01	8.21
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	5.96	5.71	6.58	6.08	**4.80**	10.48	7.00
OCDD	—	—	—	—	—	—	—
PCDFs							
2,3,7,8-TeCDF	5.86	5.76	5.81	**4.43**	**5.00**	9.86	6.68
1,2,3,7,8-PeCDF	5.90	5.80	5.87	5.16	5.19	9.52	8.26
2,3,4,7,8-PeCDF	6.00	6.00	5.81	**3.68**	5.23	9.05	5.85
1,2,3,4,7,8-HxCDF	6.83	5.99	5.81	8.10	5.14	10.05	7.66
1,2,3,6,7,8-HxCDF	6.87	5.96	6.23	5.24	5.27	9.07	7.56
1,2,3,7,8,9-HxCDF	5.84	5.56	6.02	**4.02**	5.29	8.46	8.28
2,3,4,6,7,8-HxCDF	6.64	6.64	6.80	5.19	6.10	10.09	7.94
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	7.84	6.61	6.73	5.33	5.96	8.96	8.25
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	6.32	5.94	5.87	**3.94**	5.32	8.57	9.94
OCDF	—	—	—	—	—	—	—
Non-*ortho* PCBs							
3,3',4,4'-TeCB(77)	5.90	6.08	5.66	**4.11**	**4.69**	10.50	9.53
3,4,4',5-TeCB(81)	5.59	5.34	5.64	**3.39**	**4.60**	10.69	9.58
3,3',4,4',5-PeCB(126)	6.13	5.38	5.77	**4.27**	**4.57**	8.70	10.03
3,3',4,4',5,5'-HxCB(169)	6.11	6.71	6.69	**4.27**	6.05	9.34	9.21

Bold: The shortest distance of the target site in all docking poses is within 5Å.

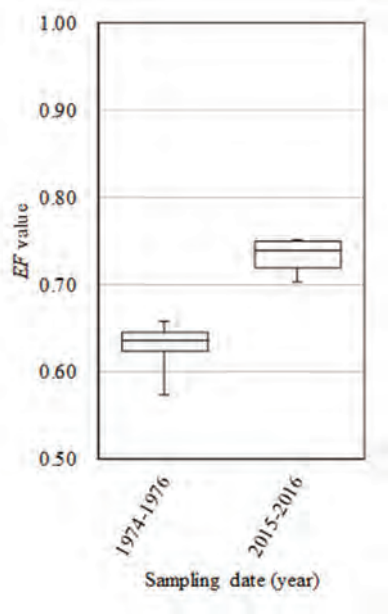


図２　1974～1976 年と 2015～2016 年に採取された油症患者血液における *EF* 値の比較

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

研究要旨　2019 年度に実施された油症検診の受診者は 613 名で、50 歳以上が全体の 90%以上を占めていた。認定者における有所見率は、自覚症状では全身倦怠感が、他覚所見では肝・胆・脾エコーが高かった。

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いる。患者の健康管理のため、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う。

B．研究方法

2019 年 7 月から 10 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、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。2019 年度は、613 名が受診し、認定者が 493 名、未認定者は 120 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%以上を占めた。

表 3 から表 6 に各検診の有所見率を示す。認定者については、内科の自覚症状では全身倦怠感（73.1%）、関節痛（70.0%）、他覚所見では肝・胆・脾エコー（81.2%）、心電図（27.6%）の有所見率が高かった。皮膚科検診では、問診はかつてのざ瘡様皮疹（49.0%）、かつての色素沈着（26.4%）、他覚所見は黒色面皰（15.7%）、瘢痕化（8.9%）が高かった。眼科では、眼脂過多は 13.7%が訴えていたが、他覚所見はいずれの項目も低かった（0.2%-4.1%）。歯科では、口腔所見の辺縁性歯周炎（40.6%）、歯肉炎（15.7%）が、色素沈着所見は歯肉（30.6%）が高かったが、その他は低かった（0.8%-7.5%）。

D．結論

2019 年度の油症検診受診者数は 613 名で、50 歳以上が 90%以上を占めていた。認定者では、自覚症状は全身倦怠感が、他覚所見では肝・胆・脾エコーの有所見率が高かった。

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　2019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	613	100.0	300	100.0	313	100.0
0 － 29 歳	10	1.6	6	2.0	4	1.3
30 － 39 歳	7	1.1	3	1.0	4	1.3
40 － 49 歳	34	5.5	17	5.7	17	5.4
50 － 59 歳	125	20.4	61	20.3	64	20.4
60 － 69 歳	193	31.5	90	30.0	103	32.9
70 － 79 歳	145	23.7	76	25.3	69	22.0
80 歳以上	99	16.2	47	15.7	52	16.6
認定	493	100.0	245	100.0	248	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	11	2.2	7	2.9	4	1.6
50 － 59 歳	105	21.3	52	21.2	53	21.4
60 － 69 歳	165	33.5	79	32.2	86	34.7
70 － 79 歳	125	25.4	65	26.5	60	24.2
80 歳以上	87	17.6	42	17.1	45	18.1
未認定	120	100.0	55	100.0	65	100.0
0 － 29 歳	10	8.3	6	10.9	4	6.2
30 － 39 歳	7	5.8	3	5.5	4	6.2
40 － 49 歳	23	19.2	10	18.2	13	20.0
50 － 59 歳	20	16.7	9	16.4	11	16.9
60 － 69 歳	28	23.3	11	20.0	17	26.2
70 － 79 歳	20	16.7	11	20.0	9	13.8
80 歳以上	12	10.0	5	9.1	7	10.8

表3　2019年度内科検診の有所見率

	全体	男性	女性
認定			
自覚症状			
全身倦怠感	73.1% (358/490)	69.1% (168/243)	76.9% (190/247)
頭重・頭痛	54.2% (264/487)	41.7% (100/240)	66.4% (164/247)
咳嗽	55.7% (272/488)	53.5% (129/241)	57.9% (143/247)
喀痰	49.3% (240/487)	51.3% (123/240)	47.4% (117/247)
腹痛	38.5% (188/488)	33.5% (81/242)	43.5% (107/246)
下痢	42.1% (205/487)	44.6% (107/240)	39.7% (98/247)
便秘	47.3% (232/490)	39.1% (95/243)	55.5% (137/247)
しびれ感	65.6% (321/489)	59.9% (145/242)	71.3% (176/247)
関節痛	70.0% (339/484)	65.4% (155/237)	74.5% (184/247)
月経異常	4.8% (8/165)	―	4.8% (8/165)
他覚所見			
栄養	23.9% (112/469)	24.4% (57/234)	23.4% (55/235)
心音	3.6% (17/475)	4.2% (10/236)	2.9% (7/239)
呼吸音	2.1% (10/475)	1.7% (4/236)	2.5% (6/239)
肝腫	2.2% (10/465)	1.7% (4/233)	2.6% (6/232)
脾腫	0.4% (2/466)	0.4% (1/234)	0.4% (1/232)
浮腫	4.9% (23/474)	3.8% (9/235)	5.9% (14/239)
リンパ節腫大	1.1% (5/472)	1.3% (3/235)	0.8% (2/237)
四肢けん反射	18.8% (89/473)	20.0% (47/235)	17.6% (42/238)
感覚障害	21.8% (103/473)	20.4% (48/235)	23.1% (55/238)
胸部レ線	21.1% (64/304)	21.9% (37/169)	20.0% (27/135)
心電図	27.6% (130/471)	31.5% (74/235)	23.7% (56/236)
肝・胆・脾エコー	81.2% (134/165)	85.2% (75/88)	76.6% (59/77)
未認定			
自覚症状			
全身倦怠感	70.3% (83/118)	61.1% (33/54)	78.1% (50/64)
頭重・頭痛	57.6% (68/118)	44.4% (24/54)	68.8% (44/64)
咳嗽	50.8% (60/118)	44.4% (24/54)	56.3% (36/64)
喀痰	43.2% (51/118)	42.6% (23/54)	43.8% (28/64)
腹痛	39.8% (47/118)	33.3% (18/54)	45.3% (29/64)
下痢	41.9% (49/117)	48.1% (26/54)	36.5% (23/63)
便秘	41.5% (49/118)	33.3% (18/54)	48.4% (31/64)
しびれ感	59.3% (70/118)	53.7% (29/54)	64.1% (41/64)
関節痛	63.6% (75/118)	50.0% (27/54)	75.0% (48/64)
月経異常	28.9% (13/45)	―	28.9% (13/45)
他覚所見			
栄養	32.2% (37/115)	37.7% (20/53)	27.4% (17/62)
心音	0.9% (1/117)	0.0% (0/53)	1.6% (1/64)
呼吸音	0.9% (1/117)	1.9% (1/53)	0.0% (0/64)
肝腫	0.0% (0/115)	0.0% (0/52)	0.0% (0/63)
脾腫	0.0% (0/114)	0.0% (0/52)	0.0% (0/62)
浮腫	4.3% (5/117)	3.8% (2/53)	4.7% (3/64)
リンパ節腫大	0.9% (1/115)	0.0% (0/52)	1.6% (1/63)
四肢けん反射	23.9% (28/117)	28.3% (15/53)	20.3% (13/64)
感覚障害	20.5% (24/117)	28.3% (15/53)	14.1% (9/64)
胸部レ線	21.3% (16/75)	28.2% (11/39)	13.9% (5/36)
心電図	24.1% (27/112)	29.4% (15/51)	19.7% (12/61)
肝・胆・脾エコー	82.5% (47/57)	85.2% (23/27)	80.0% (24/30)

表4　2019年度皮膚科検診の有所見率

	全体	男性	女性
認定			
問診			
最近の化膿傾向	14.2% (67/471)	12.4% (29/233)	16.0% (38/238)
最近の粉りゅう再発傾向	12.7% (60/471)	14.2% (33/233)	11.3% (27/238)
かつてのざ瘡様皮疹	49.0% (231/471)	43.6% (102/234)	54.4% (129/237)
かつての色素沈着	26.4% (124/469)	22.4% (52/232)	30.4% (72/237)
他覚所見			
黒色面皰	15.7% (74/472)	14.1% (33/234)	17.2% (41/238)
ざ瘡様皮疹	6.8% (32/472)	5.1% (12/234)	8.4% (20/238)
瘢痕化	8.9% (42/472)	10.7% (25/234)	7.1% (17/238)
色素沈着	6.6% (31/472)	6.4% (15/234)	6.7% (16/238)
爪変形	3.8% (18/471)	3.8% (9/234)	3.8% (9/237)
未認定			
問診			
最近の化膿傾向	15.3% (18/118)	18.5% (10/54)	12.5% (8/64)
最近の粉りゅう再発傾向	15.3% (18/118)	16.7% (9/54)	14.1% (9/64)
かつてのざ瘡様皮疹	47.5% (56/118)	44.4% (24/54)	50.0% (32/64)
かつての色素沈着	21.2% (25/118)	24.1% (13/54)	18.8% (12/64)
他覚所見			
黒色面皰	8.5% (10/118)	11.1% (6/54)	6.3% (4/64)
ざ瘡様皮疹	9.3% (11/118)	7.4% (4/54)	10.9% (7/64)
瘢痕化	4.2% (5/118)	7.4% (4/54)	1.6% (1/64)
色素沈着	6.8% (8/118)	11.1% (6/54)	3.1% (2/64)
爪変形	1.7% (2/118)	0.0% (0/54)	3.1% (2/64)

表5　2019年度眼科検診の有所見率

	全体		男性		女性	
認定						
主訴						
眼脂過多	13.7%	(64/466)	15.0%	(35/234)	12.5%	(29/232)
他覚所見						
眼瞼浮腫	1.5%	(7/466)	1.7%	(4/234)	1.3%	(3/232)
眼瞼結膜色素沈着	4.1%	(19/466)	5.1%	(12/234)	3.0%	(7/232)
瞼板腺嚢胞形成	2.4%	(11/466)	3.4%	(8/234)	1.3%	(3/232)
瞼板腺チーズ様分泌物圧出	0.2%	(1/466)	0.0%	(0/234)	0.4%	(1/232)
未認定						
主訴						
眼脂過多	20.7%	(24/116)	25.9%	(14/54)	16.1%	(10/62)
他覚所見						
眼瞼浮腫	0.0%	(0/116)	0.0%	(0/54)	0.0%	(0/62)
眼瞼結膜色素沈着	3.4%	(4/116)	5.6%	(3/54)	1.6%	(1/62)
瞼板腺嚢胞形成	0.0%	(0/116)	0.0%	(0/54)	0.0%	(0/62)
瞼板腺チーズ様分泌物圧出	0.0%	(0/116)	0.0%	(0/54)	0.0%	(0/62)

表6　2019年度歯科検診の有所見率

	全体		男性		女性	
認定						
主訴	19.1%	(49/256)	15.6%	(22/141)	23.5%	(27/115)
口腔所見						
歯肉炎	15.7%	(41/261)	17.2%	(25/145)	13.8%	(16/116)
辺縁性歯周炎	40.6%	(106/261)	46.2%	(67/145)	33.6%	(39/116)
歯牙萌出異常	0.8%	(2/261)	0.7%	(1/145)	0.9%	(1/116)
歯牙着色	2.7%	(7/261)	2.1%	(3/145)	3.4%	(4/116)
歯牙形成不全	0.8%	(2/261)	0.7%	(1/145)	0.9%	(1/116)
咬合異常	5.0%	(13/260)	3.5%	(5/144)	6.9%	(8/116)
その他	3.1%	(8/260)	3.5%	(5/144)	2.6%	(3/116)
色素沈着所見						
歯肉	30.6%	(78/255)	31.5%	(45/143)	29.5%	(33/112)
頬粘膜	7.5%	(19/253)	10.6%	(15/142)	3.6%	(4/111)
口蓋粘膜	0.8%	(2/253)	0.7%	(1/142)	0.9%	(1/111)
口唇粘膜	3.6%	(9/253)	3.5%	(5/142)	3.6%	(4/111)
未認定						
主訴	16.5%	(13/79)	7.7%	(3/39)	25.0%	(10/40)
口腔所見						
歯肉炎	24.1%	(19/79)	33.3%	(13/39)	15.0%	(6/40)
辺縁性歯周炎	17.7%	(14/79)	25.6%	(10/39)	10.0%	(4/40)
歯牙萌出異常	0.0%	(0/79)	0.0%	(0/39)	0.0%	(0/40)
歯牙着色	6.3%	(5/79)	10.3%	(4/39)	2.5%	(1/40)
歯牙形成不全	0.0%	(0/79)	0.0%	(0/39)	0.0%	(0/40)
咬合異常	6.3%	(5/79)	10.3%	(4/39)	2.5%	(1/40)
その他	0.0%	(0/79)	0.0%	(0/39)	0.0%	(0/40)
色素沈着所見						
歯肉	43.6%	(34/78)	47.4%	(18/38)	40.0%	(16/40)
頬粘膜	1.3%	(1/78)	2.6%	(1/38)	0.0%	(0/40)
口蓋粘膜	0.0%	(0/78)	0.0%	(0/38)	0.0%	(0/40)
口唇粘膜	2.6%	(2/78)	2.6%	(1/38)	2.5%	(1/40)

分担研究報告書

Thermo Scientific DFS Dual Data XL システムによる油症患者血液中ダイオキシン類分析法の検討

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　Thermo Fisher Scientific DFS Dual Data XL システムに Programmed Temperature Vaporization-Large Volume Injection(PTV-LVI)システムを装備したガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置を用いて、油症患者血液中ダイオキシン類の高感度分析法を検討した。その結果、感度的に測定は可能ですが、従来法と比較した場合、低塩素化体の感度が約 1/3 低下していた。今後、この問題を解決するために、PTV-LVI システムの設定条件、注入口の初期温度、試料の注入速度およびキャリアガス流量を最適化し、新しい分析法を確立した上で、従来法との妥当性評価を行う。

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。油症患者の生体試料中（血液、母乳、皮脂および脂肪組織）ダイオキシン類(PCDDs,PCDFs および PCBs)の分析は、油症研究の一環として、1980 年代の後半から福岡県保健環境研究所の飯田らによって行われてきた[1)]。高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置を用いて血液中ダイオキシン類を精度よく定量する場合、100fg オーダーの分析が可能な装置でも 50-100g の血液量が必要であった。2000 年頃から大量注入法が検討され、装置の感度が 10 倍程度向上したので、抽出・精製に用いる血液量も 1/10 量で行えるようになった[2) 3)]。近年、使用していた装置の生産が終了し、装置のフルメンテナンスサポートも限定サポートに移行する事態が発生している。したがって、装置の故障発生時に部品供給が得られない場合、血液中ダイオキシン類の分析業務が出来なくなります。

油症の発生から 50 年以上経過した現在も何人かの患者が、ダイオキシン類特有の症状に悩まされている。我々は、油症患者のダイオキシン類による人体汚染とその健康影響を把握する目的で、患者の血液中ダイオキシン類濃度の測定を行ってきた。今後も油症事業を継続して行うのであれば、新しい装置によるダイオキシン類の高感度分析法の開発が必要です。従来行っていた大量注入法は、細かい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プレカラムにより系外に排出され、分析目的物質もロスなく分析カラムに導入することが可能ですが、条件設定が非常に複雑です。

今回、Thermo Scientific DFS Dual Data XL システムに PTV-LVI システムを装備したガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置を用いて、従来法よりも装置を簡素化し、圧力バランス等の細かい条件設定を必要としない大量注入法を検討した。

B．研究方法

PTV-LVI 装置（PTV-BKF、Thermo Fisher Scientific）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（DFS、Thermo Fisher Scientific）を使用した。カラムは Agilent Technologies 社製で、プレカラムはフューズドシリカチューブ（0.15mm×10m）および分析カラムは VF-5ms（5%フェニルメチルカラム,0.15mm×30m,膜厚 0.15μm）を用いた。

（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濃度の分析は、胃袋型インサートを備えた LVI-S200（AiSTI Science 社）と Solvent Cut Large Volume Injection システム（Trajan 社）を連結した大量注入装置を装備したガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置（AutoSpec Premier, Waters 社）を用いて行ってきた。大量注入法のメカニズムに関して、注入口初期温度を試料溶媒の沸点より低く設定し、液体状態でインサートの胃袋形状部分に保持させた後、インサート内で濃縮を行う（図 1）。さらに、注入口温度の上昇に伴い、分析目的物質をプレカラムに導入し、カラム恒温槽の昇温が開始される。試料はプレカラムで分析目的物質と溶媒に分離され、溶媒のみをパージラインから排出させた後、分析目的物質は液化炭酸ガスが噴霧されたコールドトラップ部にトラップされる（図 2）。その後、カラム恒温槽を設定の温度まで下温させ、コールドトラップを解除する。直ちに、恒温槽の昇温を開始し、分析目的物質を分析カラムへ導入し、ダイオキシン類異性体の分離・分析が行われる[3)]。このシステムは、試料注入後、分析目的物質のみ分析カラムに導入されるので、通常よりも内径の細い分析用キャピラリーカラムを用いることで可能です。その結果、各異性体の良好な分離が得られるばかりでなく、ピークの半値幅が狭くなり、ピーク強度が相対的に向上し、ダイオキシン類異性体の S/N 比が改善される。しかしながら、条件設定が非常に複雑で装置維持のためのメンテナンスにも熟練および高度な知識が必要です。

今回、従来法の原理を踏まえた上で検討を行い、PTV-LVI システムの濃縮条件を緩和するために、分析カラムの前に不活性化処理カラムを接続し、インサート内での溶媒濃縮が不十分でも注入した試料中の溶媒が不活性化処理カラム中である程度気化され、分析目的物質のみを分析カラムに導入する方法を検討した（図 3）。その結果、ダイオキシン類標準液（250fg）を注入後に得られた各異性体のクロマトグラムから、感度的には十分測定可能と思われるが、従来法と比較した場合、低塩素化体（TetraCB-77 および TetraCB-81）の感度が低下していた。今後、注入口の初期温度、試料の注入速度およびキャリアガス流量の条件設定を再検討する必要性があるので、これらパラメーターの最適化を行い、従来法よりも血液中のダイオキシン類を高感度および高精度に分析できる方法を確立する。

Ｄ．結論

今回､PTV-LVI システムを装備した DFS Dual Data XL システムを用いて、従来法よりも装置を簡素化し、圧力バランス時の細かい条件設定を必要としない大量注入法を検討した。その結果、感度的には十分測定可能と思われるが、従来法と比較した場合、低塩素化体(TetraCB-77 および TetraCB-81)の感度が低下するという問題が生じた。今後、この問題を解決するために、PTV-LVI システムの設定条件、注入口の初期温度、試料の注入速度およびキャリアガス流量を最適化する必要性があり、これらパラメーターの最適化が、来年度の最重要課題として残された。

今年度、油症患者血液中ダイオキシン類濃度の測定に用いるガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置を更新した。しかしながら、新型コロナウイルス感染症の影響により、人の移動が制限される等のために新しい装置の搬入および装置の調整が遅れ、血液中ダイオキシン類濃度を高感度および高精度に分析できる方法を検討する時間が十分得られなかった。来年度も今年度のテーマを継続し、新しい分析法を確立した上で、従来法との妥当性評価を行う。

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

参考文献

1) 小栗一太、赤嶺昭文、古江増隆編、油症 30 年歩み。九州大学出版会、ISBN 4-87378-642-8.

2) Todaka T, *et al.* Improvement in dioxin analysis of human blood and their concentrations in blood of Yusho patients. Dermatological Science Supplement 2005; 1: 21-28.

3) 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): 110-116.

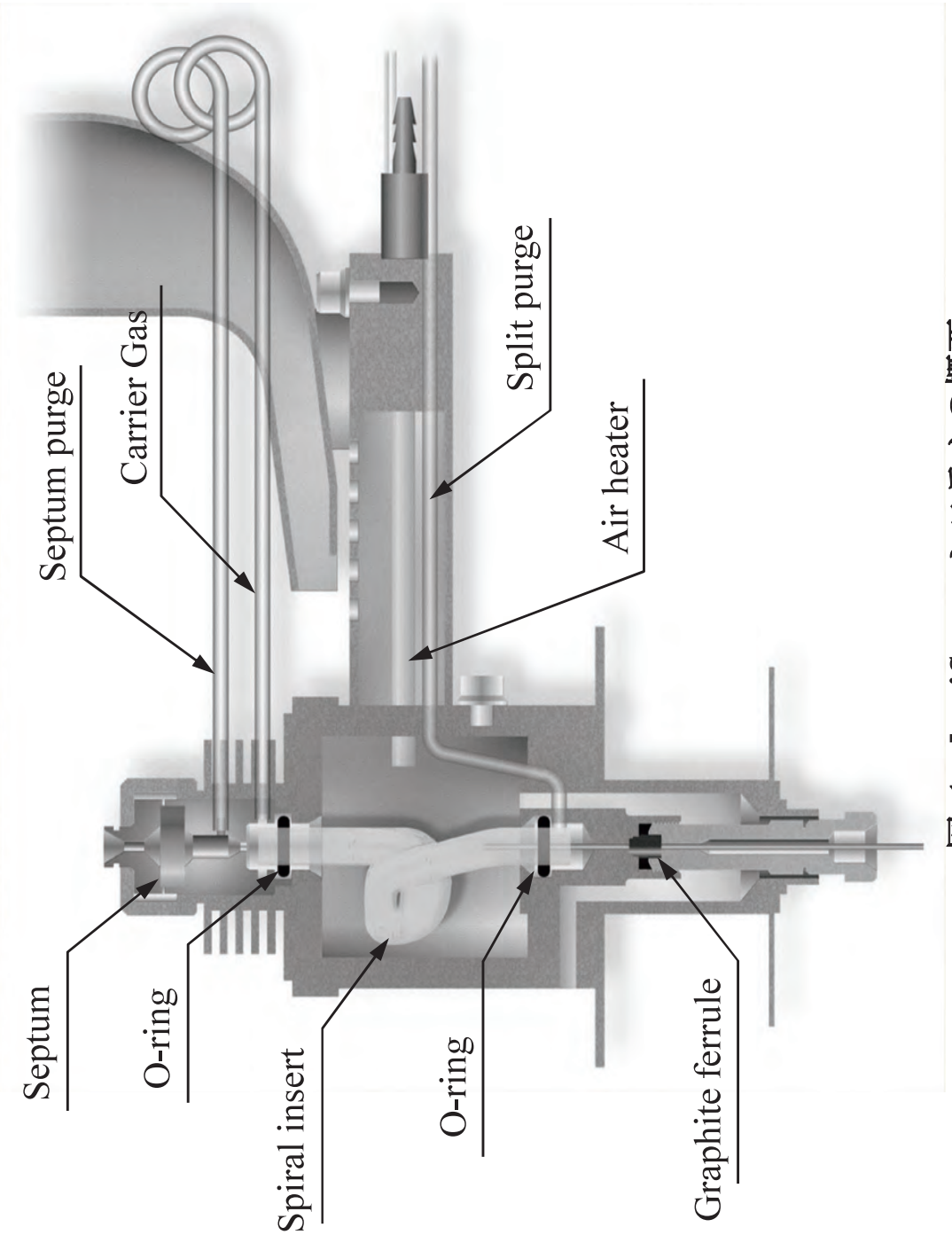


図１　LaviStoma システムの概要

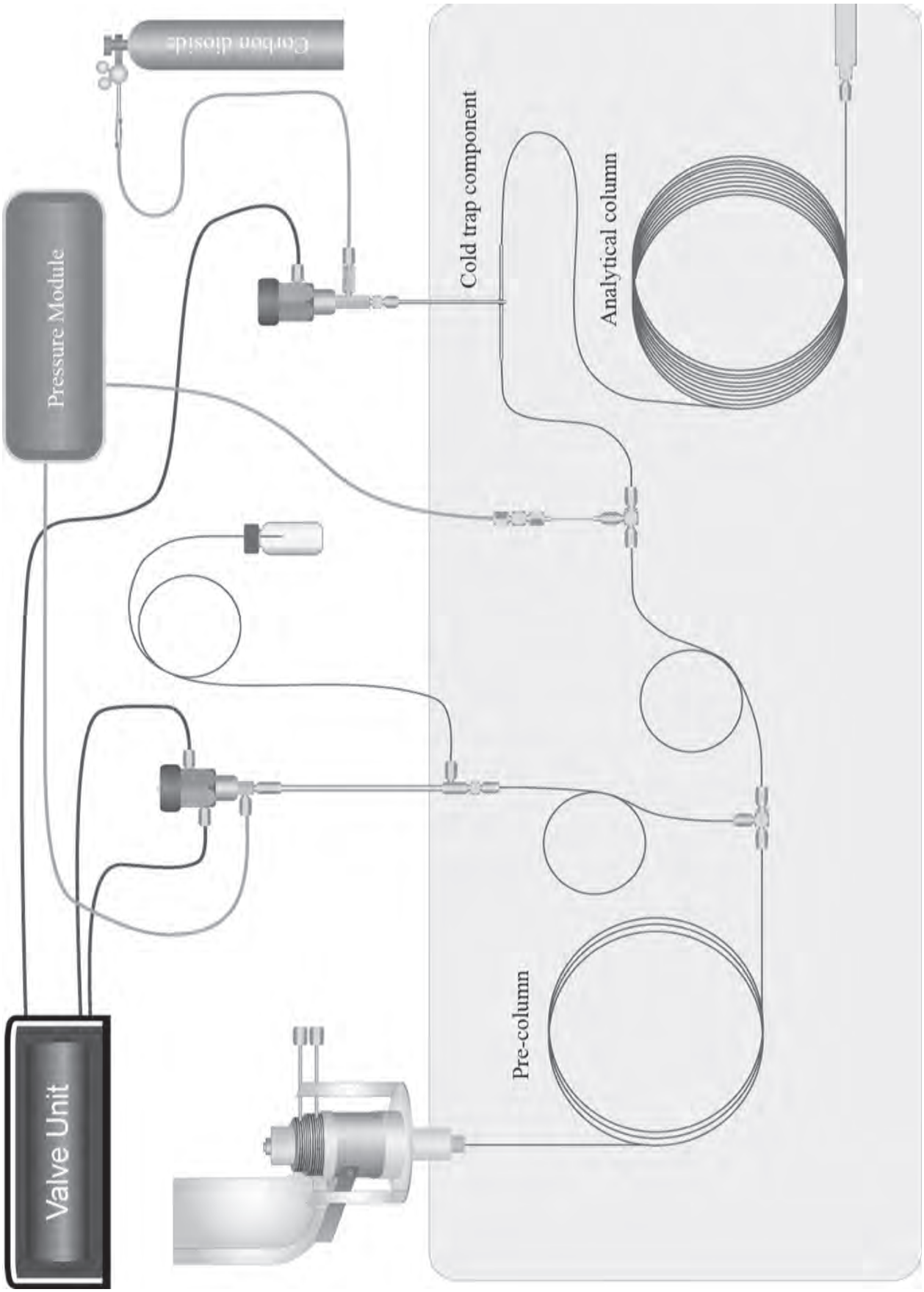


図２　大量注入装置（従来法）の概要

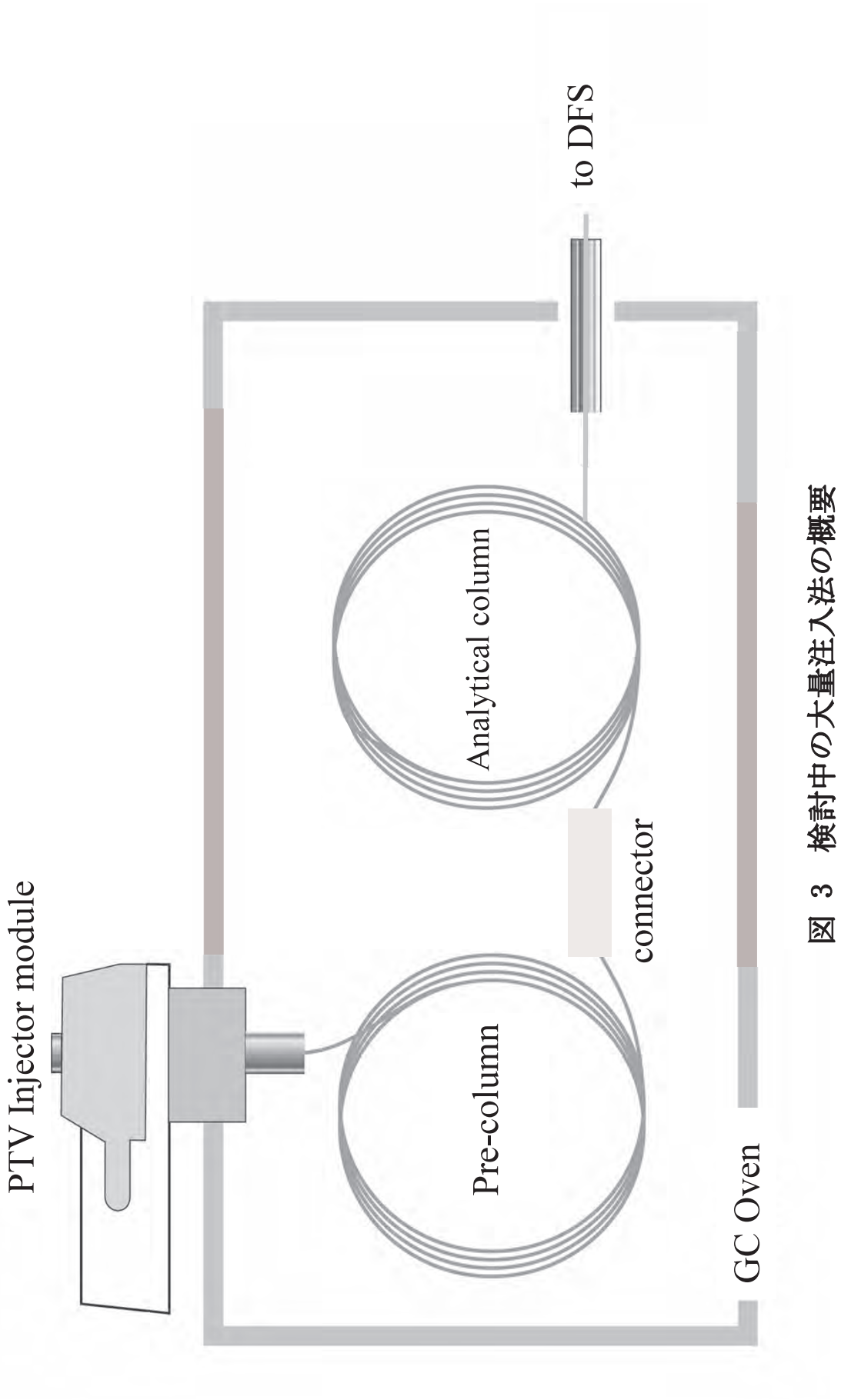


図 3　検討中の大量注入法の概要

分担研究報告書

油症曝露による女性特有の健康影響に関する研究

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
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　油症女性患者における月経異常と婦人科系疾患の有症率の経時的推移について検討した。油症女性患者における月経異常の有症率は年月が経過するとともに低下した。なかでも、油症発生当初の 1970 年調査では、月経不順は 58.0%、過多月経は 22.2%、過少月経は 29.7%に認められたが、油症発生後約 50 年経過した 2019 年調査では、これらの症状の有症率はそれぞれ 7.0%、4.9%、1.5%に低下した。婦人科系疾患の有症率は、調査年度による若干の違いがあるものの、良性疾患と悪性疾患ともにほとんど変化は認められなかった。ここ 50 年間の長期的なフォローアップでは、油症女性患者における月経異常の症状は改善し、また婦人科系疾患の頻度は増加しないことが示された。

A．研究目的

油症女性患者では、月経不順、過多月経、過少月経、月経困難症など女性特有の症状が高率に認められることが報告されている[1,2]。

本研究では、油症女性患者における月経異常や婦人科系疾患の有症率の経時的な推移を観察することによって、油症曝露による女性特有の健康影響を明らかにすることを目的とした。

B．研究方法

油症女性患者を対象として、油症治療研究班および厚生労働省により実施されたつぎの 4 つの調査結果をもとに、月経異常と婦人科系疾患の有症率について検討した。

1) 昭和 45 年(1970)に油症治療研究班により実施された九州大学病院油症外来に通院する女性患者の性機能に関する調査（九州大学油症外来女性患者調査）[1)]

2) 平成 17 年(2005)に油症治療研究班により実施された福岡県および長崎県の油症患者の婦人科疾患罹患実態に関するアンケート調査（婦人科疾患罹患実態調査）[3)]

3) 平成 20 年度(2008)に厚生労働省により実施されたカネミ油症患者の健康実態に関するアンケート調査（平成 20 年度健康実態調査）[4)]

4) 令和元年度(2019)に厚生労働省により実施されたカネミ油症患者の健康実態に関するアンケート調査（令和元年度健康実態調査）[5)]

これらの調査結果をもとに、「これまでにかかったことがある」月経異常として、月経不順、過多月経、過少月経、不正出血、月経困難症の有症率について検討した。また、「これまでにかかったことがある」婦人科系疾患としては、子宮内膜症、子宮筋腫、卵巣嚢腫、子宮がん、卵巣がんの有症率について検討した。

さらに、平成 22 年度に実施された一般成人を対象とした対照群健康実態調査結果[2)]をもとに、一般成人女性における「これまでにかかったことがある」月経異常と婦人科系疾患の有症率についても検討した。

（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．月経異常

油症女性患者における月経異常の有症率の経時的推移を表 1 に示す。月経不順、過多月経、過少月経、不正出血、月経困難症の有症率は、すべて年月が経過するとともに低下した。なかでも、油症発生当初の 1970 年調査では、油症発生後に月経不順は 58.0%、過多月経は 22.2%、過少月経は 29.7%に認められたが、油症発生後約 50 年経過した 2019 年調査では、これらの症状の有症率はそれぞれ 7.0%、4.9%、1.5%に低下した。

２．婦人科系疾患

油症女性患者における婦人科系疾患の有症率の経時的推移を表 2 に示す。油症発生当初のデータは観察できなかったが、2005 年調査以降は、婦人科疾患の有症率は、調査年度による若干の違いがあるものの、良性疾患（子宮内膜症、子宮筋腫、卵巣嚢腫）と悪性疾患（子宮がん、卵巣がん）ともに、ほとんど変化は認められなかった。

D．考察

今回、油症女性患者における月経異常と婦人科系疾患の有症率の経時的な推移について検討した。ここ 50 年間の長期フォローアップでは、油症女性患者における月経異常に関する症状の有症率は年月が経過するとともに低下した。また、婦人科系疾患の有症率は、調査年度による若干の違いがあるものの、良性疾患と悪性疾患ともにほとんど変化は認められなかった。

赤羽ら[2)]は、平成 20 年度油症患者健康実態調査結果と平成 22 年度に実施された一般成人を対象とした対照群健康実態調査結果とを比較し、油症女性患者における月経異常と婦人科系疾患のうち、過多月経、過少月経と月経困難症の有症率が一般成人女性群と比較して有意に高かったことを報告している。一方、令和元年度油症患者健康実態調査における過多月経、過少月経、月経困難症の有症率をみると、一般成人女性群の有症率よりすべて低くなっていた。これらの成績から、油症女性患者では、月経不順、過多月経、過少月経、月経困難症など月経異常が高率に認められるが、年月が経過するとともに改善すること、婦人科系疾患の頻度は増加しないことが示唆された。

E．結論

ここ 50 年間の長期的なフォローアップでは、油症女性患者における月経異常の症状は改善し、また婦人科系疾患の頻度は増加しないことが示された。

F．研究発表

１．論文発表

1) Furue M, Ishii Y, Tsukimori K, Tsuji G. Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin-Related Health Hazards-Lessons from Yusho. Int J Mol Sci. 12;22(2):E708,2021.

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) 楠田雅彦．油症と女性米糠油中毒症婦人の性機能に関する研究．産科と婦人科 38(8):1063-1072, 1971.
2) 赤羽学、松本伸哉、今村知明、神奈川芳行．一般成人を対象とした健康実態調査とカネミ油症患者実態調査との比較に関する研究．平成 23 年度分担研究報告書. pp30-63, 平成 24 年 3 月．
3) 中野仁雄、月森清巳、石丸忠之．油症患者における婦人科疾患の研究．平成 17 年度分担研究報告書．pp45-46, 平成 18 年 3 月．
4) 厚生労働省．油症患者に係る健康実態調査結果の報告．平成 22 年 3 月．https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenbu/0000047868.pdf
5) 厚生労働省．令和元年度 健康実態調査結果の報告．令和 2 年 1 月．https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000634100.pdf

表 1 油症女性患者における月経異常の有症率の経時的推移

調査年	報告者	月経異常				
		月経不順	過多月経	過少月経	不正出血	月経困難症
1970年	油症治療研究班： 九州大学油症外来女性患者調査[1)]	58.0% (47/81例)	22.2% (18/81例)	29.7% (24/81例)	―	―
2005年	油症治療研究班： 婦人科疾患罹患実態調査[3)]	23.0 % (70/305 例)	24.6 % (76/306 例)	6.5% (20/306 例)	―	46.4 % (140/302 例)
2008年	厚生労働省： 平成20年度健康実態調査[4)]	13.9% (81/581例)	14.1% (82/581例)	5.0% (29/581例)	9.0% (52/581例)	16.7% (97/581例)
2019年	厚生労働省： 令和元年度健康実態調査[5)]	7.0% (46/728例)	4.9% (32/728例)	1.5% (10/728例)	5.2% (34/728例)	6.4% (35/728例)

―；データなし

【参考】一般成人における有症率

2010年	油症治療研究班： 対照群健康実態調査[2)]	13.9% (81/581例)	5.8% (34/581例)	1.1% (6/581例)	6.9% (40/581例)	12.6% (73/581例)

表 2 油症女性患者における婦人科系疾患の有症率の経時的推移

調査年	報告者	婦人科系疾患				
		子宮内膜症	子宮筋腫	卵巣嚢腫	子宮がん	卵巣がん
1970年	油症治療研究班： 九州大学油症外来女性患者調査[1)]	―	―	―	―	―
2005年	油症治療研究班： 婦人科疾患罹患実態調査[3)]	4.3% (14/327例)	11.9% (39/327例)	3.1% (10/327 例)	1.2% (4/327例)	0.6% (2/327例)
2008年	厚生労働省： 平成20年度健康実態調査[4)]	5.7% (33/581例)	15.5% (90/581例)	3.8% (22/581例)	1.5% (9/581例)	0.3% (2/581例)
2019年	厚生労働省： 令和元年度健康実態調査[5)]	5.3% (35/728例)	17.8% (117/728例)	6.3% (41/728例)	0.7% (5/703例)	―

―；データなし

【参考】一般成人における有症率

2010年	油症治療研究班： 対照群健康実態調査[2)]	5.5% (32/581例)	16.4% (95/581例)	3.2% (19/581例)	1.9% (11/581例)	0.1% (1/581例)

分担研究報告書

油症患者における体脂肪率推定式の作成、体内負荷量に基づく半減期の再検証とアンケート調査による意識調査・テキスト分析

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
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　ダイオキシン類は脂溶性であるため、体内のダイオキシン総量は、脂質当たりの濃度と体脂肪量を掛け合わせて推定する。一般的に体脂肪量の推定に用いられた式は３０年近く前に作成された。この式の作成の際には、油症患者のような後期高齢者が含まれていなかった。今回、油症一斉検診における体脂肪率の測定値をもとに体脂肪率を推定する式を作成した。女性は６０代後半、男性は７０代半ばまで体脂肪率が増加していくが、その後は減少する傾向がみられた。そして、この体脂肪率を推定する式を用いて今までに発表した半減期の二つの論文の検証を行った。一つ目の論文は、今までに報告されている１０年程度のグループと、ほとんど排出されない半減期無限大のグループの存在を報告した。二つ目の論文は、一つ目の論文と時期をずらして同じように行ったところ、１０年程度のグループの人数が減少して、半減期無限大のグループの人数が増加していることを報告した。今回作成した体脂肪率を推定する式を用いて、論文と同様なことを行ったところ、若干の違いは見られたが同様の結論が得られた。

これらに加えて、油症患者に係る健康実態調査における自由記載結果と比較する目的で一般対象者へのウェブアンケート調査を実施した。テキスト分析等を行ったところ、一般対象者の自由記載では、「油」や「黒い」等の単語は上位にはランクされておらず、これらの単語は油症群の自由記載結果に特徴的な単語であることが分かった。また、今回の新型コロナウイルス感染症の拡大による不安、検診受診控えの傾向も明らかとなった。新型コロナウイルス感染症拡大下において油症検診を実施する上で、感染対策を十分に取り、検診受診者の不安をできる限り軽減する対策が必要であると考えられる。

Ａ．研究目的

我々が油症研究班に参加して約 10 年が経過するが、これまでの研究成果を検証することを目的とし､今年度は２つの研究を実施した。

そこで本年度の報告書として、研究１「ダイオキシン類半減期の再検証」と研究２「アンケート調査による意識調査･テキスト分析」の項に分けて研究成果を報告する。

【研究 1】
ダイオキシン類半減期の再検証

Ａ．１．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。また、ダイオキシン類は選択的に排出されない。このため、排出速度は半減期として評価される。当初の研究では、半減期は１０年程度と推定されていた。我々のグループは、油症患者の半減期について研究を行い、油症患者においてはほ

とんど排出されない、つまり半減期が無限大の患者が多くいることを示した。[１，２]

ダイオキシン類は体内の総量（体内負荷量）を測定することはできないが、血液中の濃度を測定することができる。全身の脂質に万遍なく分布していると仮定し、血中の脂質当たり濃度と脂質の量の積により体内負荷量を推定することができる。これまで用いられてきた体脂肪率を推定する式は、Deurenberg らによって提案されたものである[３]。彼らは、ある程度の年齢幅をもった人々を元にして推定式を作成しているが、油症患者に多い後期高齢者は含まれていなかった。

最近の油症一斉検診においては、体脂肪率を計測している。そこで本研究では、油症検診の体脂肪率計測結果をもとに、油症患者にあった体脂肪率推定式を作成し、この推定式を用いた場合に、これまでに我々が報告した研究結果がどのように変化するかを検証することを目的とした。

Ｂ．研究方法

Ｂ．１．体脂肪率推定式の作成

Ｂ．１．１．対象患者

２０１６年度の油症一斉検診において、体脂肪率を測定した患者５７０名（男性２７１名、女性２９９名）を対象とした。年齢別の分布を図１に示す。

Ｂ．１．２．解析方法

Deurenberg が作成した推定式と同じ変数を用いた推定式と同じ変数を出発点として、年齢による変化の複雑度を増やして、４パターンの推定式を作成した。

推定式①

Deurenberg と同様に、性・年齢・BMI による体脂肪率推定式を作成する。Deurenberg と同じ変数を用いることで、差を把握する。

推定式②

年齢の変動に対してどのように影響を検討するため、最も単純な二次の項目を加えて推定式を作成した。

推定式③

男女別に年齢の影響を把握するため、男女別に年齢を区分的に線形の推定式を作成した。

推定式④

二次式では急激な変化を表現できないので、二次式の次に上に凸な形状を示す四次式を用いて推定式を作成した。

Ｂ．２．個人の半減期の分布

Ｂ．２．１．対象患者

２００１年から２００６年までの間に３回以上ダイオキシン類測定を行った患者を対象とした。濃度別の人数の分布を表１に示す。

Ｂ．２．２．解析方法

①濃度、②４次推定式による推定体内負荷量、③Deurenberg による推定体内負荷量に対して対数をとり線形回帰に行うことで各患者の半減期を求める。その分布を確認した。また、男女別、年齢別で分布を確認した。

Ｂ．３．半減期の変化

Ｂ．３．１．対象患者

２の「個人の半減期の分布」の患者を前期とし、後期として、２００２年から２０１０年までの間に３回以上ダイオキシン類測定を行い、最初の測定から最後の測定まで３年以上の患者を対象とした。濃度別の分布を表２に示す。

Ｂ．３．２．解析方法

２の「個人の半減期の分布」と同様に、①濃度、②４次推定式による推定体内負荷量、③Deurenberg による推定体内負荷量に対して対数をとり線形回帰に行うことで各患者の半減期を求めた。前期と後期の分布形状の比較を行った。

Ｃ．研究結果

Ｃ．１．体脂肪推定式の作成

Ｃ．１．１．推定式①

Deurenberg と同じ変数を用いると、次の式が作成された。

$$BF\% = 1.45 \times BMI + 0.0223 \times 年齢 - 7.82 \times 性 - 3.37$$

式１

結果の統計量を表３に示す。

年齢のＰ値が 0.11 を超えており変数として使用すべきではないという結果が出た。Deurenburg の作成した式と異なる結果となった。

Ｃ．１．２．推定式②

年齢による影響が線形でない可能性を考慮し、年齢の二次の項を含めて体脂肪率の推定式は次のようになった。

$$BF\% = 1.42 \times BMI + 0.497 \times 年齢 - 0.00382 \times 年齢^2 - 7.79 \times 性 - 16.9$$

式２

結果の統計量を表４に示す。すべての変数で P 値が 0.001 未満となっており、影響があると判定された。年齢の二乗の係数が負であり、上に凸な形状、つまり、年齢とともに体脂肪は上昇するがある年齢から減少することを示している。

Ｃ．１．３．推定式③

年齢を「60 歳未満」「60 歳以上 75 歳未満」「75 歳以上の」の３区分に分割した。各区分における患者の分布を図１に示す。年齢別・性別で作成された推定式の係数を表５に示す。BMI を２２に固定し、それぞれの回帰直線を描いたグラフを図２に示す。男性が青系統、女性が赤系統で描いている。年齢が若いほうが明るい色で描いている。推定の基準となった年齢範囲では直線で、対象範囲から逸脱した年齢範囲では破線で描いている。

男女で傾きや傾きが変化する年齢が異なるので、男女別に推定式を作成したほうがよい。若いうちの増加速度とその後の減少速度が異なるので、二次式での推定では難しく、次に下に凸な形状を示す四次式にしたほうがよい。

Ｃ．１．４．推定式④

高次式で回帰を行う場合には、独立変数の平均が０からずれていることで、各次数の評価に影響を与えることがある。今回は、いったん四次までの項をすべて投入し、三次の項がキャンセルされるように年齢をスライドすることにした。

男性患者の体脂肪率の推定式は次のようになった。

$$BF\% = 1.41 \times BMI + 0.127 \times (年齢 - 50.68) - 2.29 \times 10^{-6} \times (年齢 - 50.68)^4 - 10.0$$

式３

年齢二次の項は P 値が大きくなったため除外した。各係数の統計量を表６に示す。

女性患者の体脂肪率の推定式は次のようになった。

$$BF\% = 1.47 \times BMI + 0.113 \times (年齢 - 42.36) - 2.1 \times 10^{-6} \times (年齢 - 42.36)^4 - 3.27$$

式４

年齢二次の項は P 値が大きくなったため除外した。各係数の統計量を表７に示す。

作成された推定式を用いて、BMI を２２に固定して、体脂肪率の年齢での推移を図３にグラフ化した。

Ｃ．２．個人の半減期の分布

図４に個人の半減期の分布を示す。1 段目に濃度、２段目に四次の体脂肪率推定式を用いた体内負荷量、三段目に Deurenberg の体脂肪率推定式を用いた体内負荷量を用いて半減期を計算した。左から 23478-PeCDF の濃度が 500pg/g

以上、200 以上 500pg/g 未満、100 以上 200pg/g 未満、50 以上 100pg/g 未満の患者グループの半減期の結果を示す。

濃度の半減期では、100pg/g～200pg/g の患者で、半減期 10 年程度のグループと半減期無限大のグループが存在した。今回作成した体脂肪率推定式による体内負荷量の半減期では、200pg/g～500pg/g の範囲の患者で、半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。Deurenburg の体脂肪率推定式を用いた体内負荷量の半減期の推定では、200pg/g～500pg/g の範囲で、半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。

図５に男女別の半減期の分布を示す。濃度の半減期では、半減期無限大は女性が主体であった。100pg/g～200pg/g で、男性で半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。今回作成した体脂肪率推定式による体内負荷量の半減期では、半減期無限大は女性が主体であった。200pg/g～500pg/g の範囲では女性で半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。

図６に年齢別の半減期の分布を示す。青色棒が高齢患者で、オレンジ棒は非高齢患者を示す。濃度の半減期では、100pg/g～200pg/g の範囲で、若年群で、半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。今回の体脂肪率推定式による体内負荷量の半減期では、高齢、非高齢のグループそれぞれで、200pg/g～500pg/g の範囲で半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。Deurenburg の体脂肪率推定式による体内負荷量の半減期では、高齢・非高齢のグループそれぞれで、200pg/g～500pg/g の範囲で半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。

C．３．個人の半減期の変化

図７に後期における個人の半減期を示す。1 段目に濃度、２段目に四次の体脂肪率推定式を用いた体内負荷量、三段目に Deurenburg の体脂肪率推定式を用いた体内負荷量を用いて半減期を計算した。左から 23478-PeCDF の濃度が 500pg/g 以上、200 以上 500pg/g 未満、100 以上 200pg/g 未満、50 以上 100pg/g 未満の患者グループの半減期の結果を示す。

濃度の半減期、今回の体脂肪率推定式による体内負荷量の半減期、Deurenberg の推定式による体内負荷量の半減期、それぞれで、半減期無限大に近い患者が多く、半減期 10 年という患者のグループは存在しなかった。

図８に前期と後期の比較を示す。前期では、二つのグループが存在した。しかし、後期の半減期は、濃度、今回の体脂肪率推定式、Deurenberg の推定式すべてにおいて、論文②の対象患者・期間においては、半減期の 10 年の患者のグループが消えていた。

D．考察

本年度研究の研究 1「ダイオキシン類半減期の再検証」として、油症一斉検診における体脂肪率の測定値をもとに体脂肪率を推定する式を作成し、我々がこれまでに発表した半減期に関する二つの論文の検証を行った。

Deurenberg と同様の変数を用いた体脂肪率の推定式①では、年齢の P 値が１０％を超えており、年齢と体脂肪率と関係がない（線形の関係がない）という結果が得られた。年齢の二次の変数を投入すると、上に凸な形状であることが得られた。さらに、推定式④のように年齢の 4 次の変数を投入したら非常に良好なモデルが得られた。これを BMI を２２に固定した体脂肪率の推定値のグラフ（図３）をみると、６０歳程度まで、男女が並行してほぼ直線的に上昇

している。６０歳以下の人たちを対象に、体脂肪率の推定式を作成した場合には、Deurenberg らのような変数に到達することになると考えられ、Deurenberg らの推定式と矛盾するものではないと考えられる。

前期の患者・期間では、「濃度」「今回の体脂肪率推定式による体内負荷量」「Deurenberg の推定式による体内負荷量」における半減期推定の結果、半減期 10 年程度のグループが存在した。体脂肪率の推定式によらず、同様の結果が得られた。後期の患者・期間では、「濃度」「今回の体脂肪率推定式による体内負荷量」「Deurenberg の推定式による体内負荷量」における半減期推定の結果、半減期 10 年程度のグループは存在しなかった。体脂肪率の推定式によらず、同様の結果が得られた。体脂肪率推定の方法によらず、後期の患者では半減期 10 年程度の群が存在せず、半減期は伸びていると考えられる。

【研究２】

アンケート調査による意識調査・テキスト分析

Ａ．１．目的

我々は既存研究として、油症患者に係る健康実態調査[４]における自由記載欄（健康に対する意識等）に対するテキスト分析を行い班会議で報告した。過年度に、油症患者群の調査結果と比較するための対照群として、一般対象者にウェブアンケート調査を実施したが、今回は新型コロナウイルス感染症（COVID-19）拡大に関連して、健康に対する意識や検診受診に対する意識を調査する目的で追加調査を実施した。

これら調査の分析結果を比較し、油症患者に特徴的な記載内容が何かを明らかにするとともに、現在感染が拡大している新型コロナウイルス感染症下において、油症検診を実施する際に参考になる留意点を検討した。

Ｂ．研究方法

Ｂ．１．１．調査と対象者

油症患者群の健康に対する意識の分析として、「油症患者に係る健康実態調査」（実態調査）の調査結果［４］における自由記載内容を分析した。

油症患者の記載内容と比較するために、一般対象者に対して同様のアンケート調査をウェブ上で実施（過年度、今年度）した結果を分析対象とした。

一般対象者の調査においては、インターネット調査会社（マクロミル）の登録モニター（パネル）を活用し、20 歳代から 70 歳代までの男女に対して健康に対する意識を調査した。本年度調査ではこれらに加えて、一般的な検診の受診に対する意識やコロナ禍における受診の際の心配事、ダイオキシン類のリスクに関する意識、油症の認知度等も併せて調査を実施した。

Ｂ．１．２．解析方法

「油症患者に係る健康実態調査」における「お子さん」の健康上の問題に関する自由記載内容に関して、KH Coder３を用いて[５]テキスト分析を行った。我々が実施したウェブアンケート調査では、同様に「お子さん」の健康上の問題に関する事柄を自由記載してもらい、同様にテキスト分析を行った。それぞれの調査における頻出語、共起ネットワーク図、対応分析を行い、健康上の問題や心配事に関する調査間（調査対象者間）の違いなどを比較した。

一般的な検診の受診に対する意識やコロナ禍における受診の際の心配事、ダイオキシン類のリスクに関する意識、油症の認知度等に関しては、素集計を行った。

Ｃ．研究結果

Ｃ．１．今年度実施のウェブアンケート調査の結果

回答者は 1236 名で男性が 50％を占

めており、居住地域は関東地方が38.1％、近畿地方 19.1％、中部地方17.8％であり、九州地方は7.8％を占めていた。回答者における子どもの有無は、子供有：59.5％であり、既婚が63.9％であった。

Ｃ．２．実態調査におけるテキスト分析結果

全体での頻出語として、「元気」「皮膚」「アトピー」「油」「鼻炎」「黒い」が上位にランクされた。「黒い」は、認定・未認定患者間で出現順位に差がみられた。認定群においては、頻出語の上位として、１：元気、２：油、３：病院、４：黒い、５：体であったが、未認定群においては、１：皮膚、２：出る、３：アトピー、４：元気、5：弱い、であった。共起ネットワーク図でみると、認定群においては、「黒い」は「赤ちゃん」や「歯茎」「続く」と関連が高く（図９）、未認定群においては、「皮膚」は「アトピー」、「弱い」は「体」と関連が大きかった（図１０）。

Ｃ．３．ウェブアンケート調査結果におけるテキスト分析結果と比較

過年度に一般対象者に実施したウェブ調査における健康上の問題や心配事に関する自由記載のテキスト分析では、「健康」「心配」「病気」「自分」「子ども」が上位にランクされていた。本年度に同様に実施したウェブ調査では、「感染」「コロナ」「心配」「ウイルス」「新型」が上位にランクされた。

対応分析によって一般対象者（過年度調査分）では、「特に」と「無い」の2つが原点から離れており、特徴的であった。油症患者群では「油」や「黒い」等が特徴的に上位にランクされていたが、一般対象者に対するウェブアンケート調査ではいずれの調査でも上位にはランクされていなかった。

また、本年度実施のウェブ調査では、新型コロナウイルス感染症発生前には「健康」「病気」が心配事として上位であったが、新型コロナウイルス感染症発生後の意識としては「感染」「コロナ」が頻出語となり、明らかに傾向が異なっていた。

Ｃ．４．検診受診に関する心配事およびリスク感

本年度実施の一般対象者に対する調査では、新型コロナウイルス感染症拡大下における一般的な病院や検診の受診時に心配する事柄（自由記載回答）として、「感染」「コロナ」「病院」「人」「心配」「対策」「待合室」という単語が上位にランクされた。共起ネットワーク図でみると、「感染」は「コロナ」「対策」「病院」と関連が強く、「人」は「接触」「多い」、「待合室」は「混雑」「待ち時間」との関連が強く見られた。また、「行く」が「検診」「怖い」と関連していた。

新型コロナウイルス感染症拡大下において、検診を受診する際に不安を感じる人の割合は 66.1％であった。検診受診時に気にかかる事柄として、待ち時間（78.2％）、ウイルス感染対策（77.5％）、混雑具合（83.8％）を回答する人が多かった。さらに、「検診の受診をキャンセルしたい」と 35.7％の人が回答し、医療機関への通院方法を「オンライン診療で受診する」に変更したいと希望する人の割合も 40.8％に達しており、検診や病院への受診において人との接触を避けたいと考える傾向がみられた。

自身が罹患する可能性のある疾患等のリスク感として、「ダイオキシン中毒に自分がなる」と考えている人の割合は11.1％であり、「ウイルス性肝炎」や「アルコール性肝障害」に自分がなると考えている割合よりも低い値であった。「カネミ油症」を聞いたことがある人の割合は、38.5％であり、本調査におけるロコモティブシンドロームの認知

度（35.1%）とほぼ同じ割合であった。健康被害のリスク感としては、ダイオキシン中毒に対しては 46.8%の人が健康に対するリスクを感じていたが、遺伝子組み換え食品の摂取（46.3%）に対するものとほぼ同じ割合であった。

D．考察

本年度の研究２として、アンケート調査による意識調査と自由記載回答のテキスト分析の比較を行った。

アンケート調査における自由記載のテキスト分析では、油症患者群において特徴的な単語が頻出語として上位にランクされる傾向が強く、一般対象者に対するウェブ調査から得られた結果と比較しても油症患者の特徴がテキスト分析結果にも表れていた。なお、同一回答者が複数の子どもに対して似た内容のコメントを記載することもあり、結果に影響している可能性はある。

今回の新型コロナウイルス感染症の拡大による一般的な「検診への受診控え」の傾向も明らかとなった。新型コロナウイルス感染症下において油症検診を実施するためには、感染対策等を十分に取り、検診受診者の不安をできる限り軽減する対策が必要であると考えられる。さらに、今後発生する可能性がある他の感染症によるパンデミック時に一斉検診をどのように実施できるかを事前に検討しておくことも必要と考えられた。

E. 参考文献

1) Matsumoto, S., Akahane, M., Kanagawa, Y., Koike, S., Yoshimura, T., Mitoma, C., ... & Imamura, T. (2009). Variation in half-life of penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) blood level among Yusho patients. Chemosphere, 77(5), 658-662.
2) Matsumoto, S., Akahane, M., Kanagawa, Y., Kajiwara, J., Mitoma, C., Uchi, H., ... & Imamura, T. (2015). Unexpectedly long half-lives of blood 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) levels in Yusho patients. Environmental Health, 14(1), 76.
3) Deurenberg, Paul, Jan A. Weststrate, and Jaap C. Seidell. “Body mass index as a measure of body fatness: age-and sex-specific prediction formulas.” British journal of nutrition 65.2 (1991): 105-114.
4) 油症患者に係る健康実態調査結果の報告（平成 22 年 3 月）https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r98520000005hks-img/2r98520000005hp7.pdf
5) KH Coder https://khcoder.net/

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２　半減期の分布：濃度別対象患者の分布

	濃度範囲	患者数
1	500pg/g 以上	22
2	200≦x＜500	63
3	100≦x＜200	40
4	50≦x＜100	36
5	20≦x＜50	65
6	20pg/g 未満	98
	総計	324

表２　分析３　半減期の変化：対象患者濃度別の分布

	濃度範囲	前期	後期
1	500pg/g 以上	22	18
2	200≦x＜500	63	61
3	100≦x＜200	40	44
4	50≦x＜100	36	42
5	20≦x＜50	65	83
6	20pg/g 未満	98	151
	総計	324	399

表3　推定式①の統計量

	係数	標準誤差	t	P-値
切片	-3.37	1.4934	-2.2595	0.024
BMI	1.45	0.0492	29.4556	<0.001
性	-7.82	0.3645	-21.4543	<0.001
年齢	0.0223	0.0142	1.5691	0.117

表４　推定式②の統計量

	係数	標準誤差	t	P-値
切片	-16.9	2.9430	-5.7360	<0.001
BMI	1.42	0.0483	29.4686	<0.001
性別	-7.79	0.3563	-21.857	<0.001
年齢	0.497	0.0908	5.4682	<0.001
年齢^2	-0.00382	0.0007	-5.2847	<0.001

表５　推定式③年齢別・性別の BMI と年齢による推定式

		1：60 歳未満	2：60～75	3：75 歳以上
切片	女性	−10.8	−1.2	31.7
	男性	−21.8	−17.5	6.3
BMI	女性	1.60	1.39	1.44
	男性	1.50	1.32	1.49
年齢	女性	0.108	0.025	−0.428
	男性	0.192	0.169	−0.202

表６　推定式④男性患者の四次回帰式の統計量

	係数	t	P−値
切片	−10.0	−4.5161	<0.001
BMI	1.41	15.6567	<0.001
年齢−50.68	0.127	4.3105	<0.001
(年齢−50.68)^4	-2.29×10^{-6}	−2.8983	0.004

表７　推定式④女性患者の四次回帰式の統計量

	係数	t	P−値
切片	−3.27	−2.8101	<0.001
BMI	1.47	31.1651	<0.001
年齢**−42.36**	0.113	4.7226	<0.001
(年齢**−42.36**) ^{4}	-2.1×10^{-6}	−7.4959	<0.001

図１　体脂肪推定式作成用患者の年齢区分ごとの患者の分布

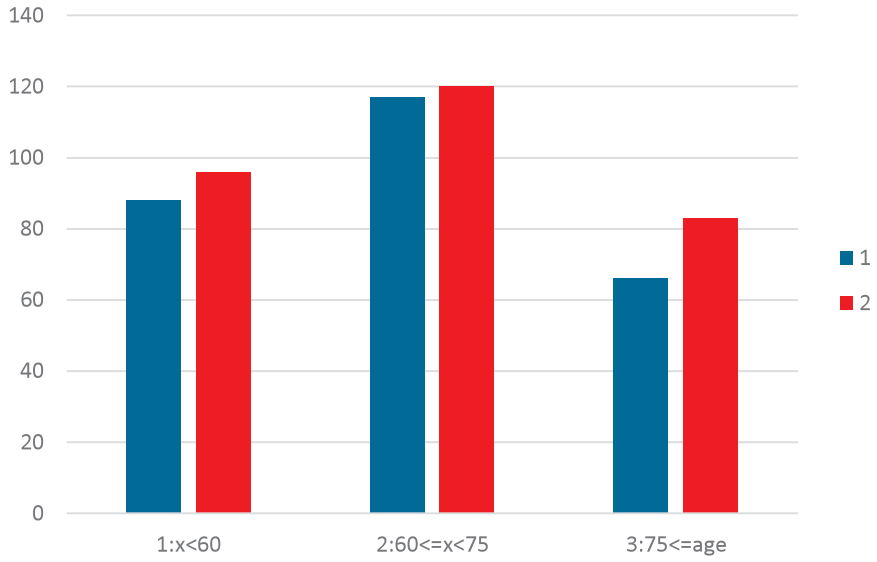


図２　年齢別・性別の推定結果（BMI=22 に固定）

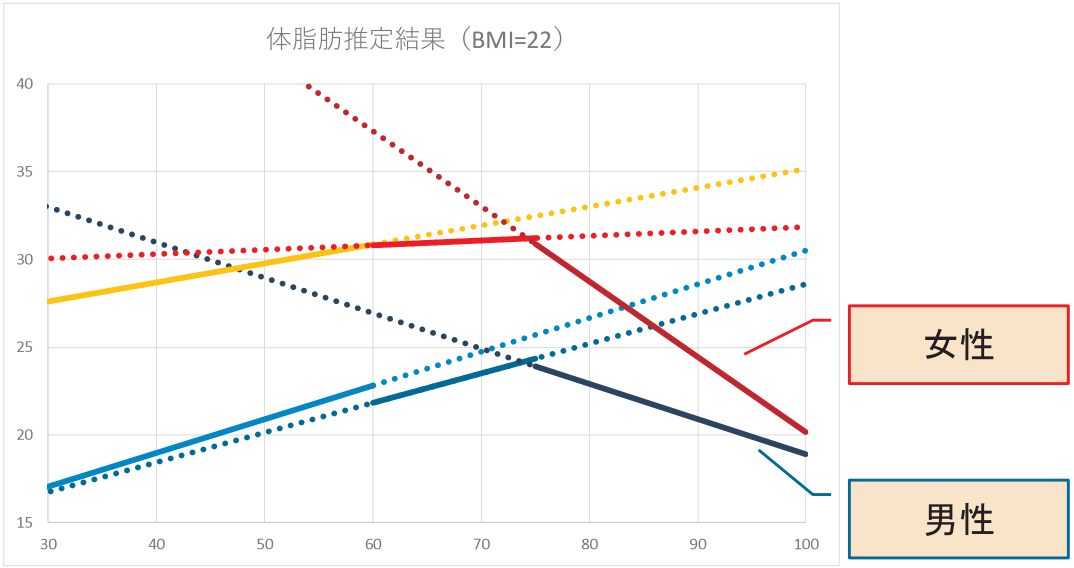


図3　四次の体脂肪率推定式（BMI=22）に固定

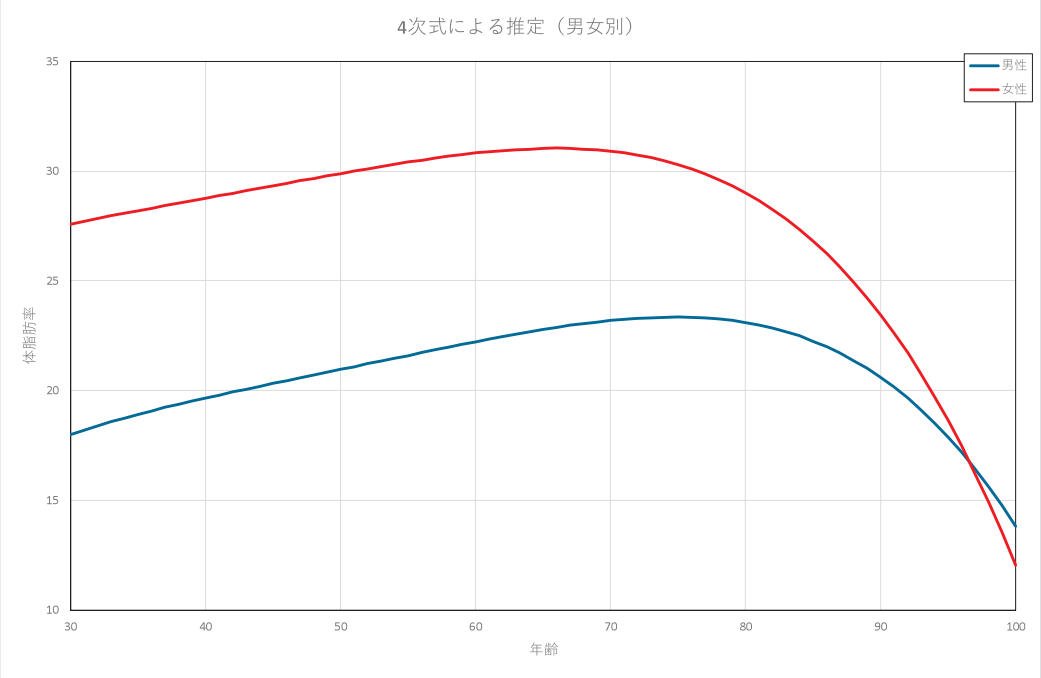


図4　半減期の分布

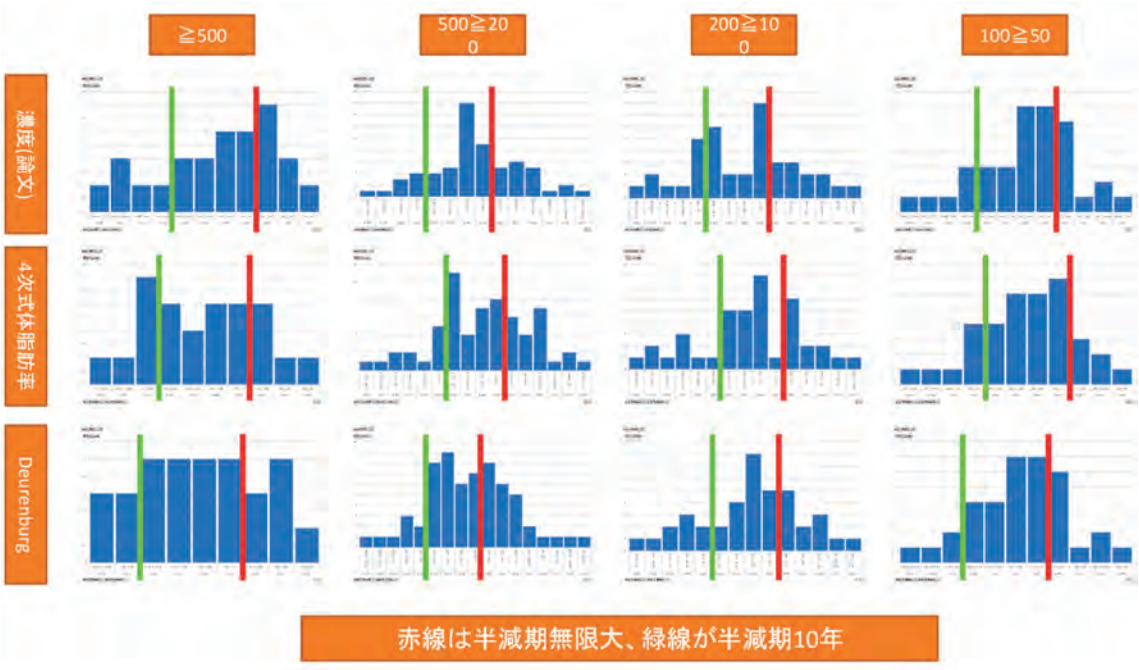


図5　男女別半減期の分布

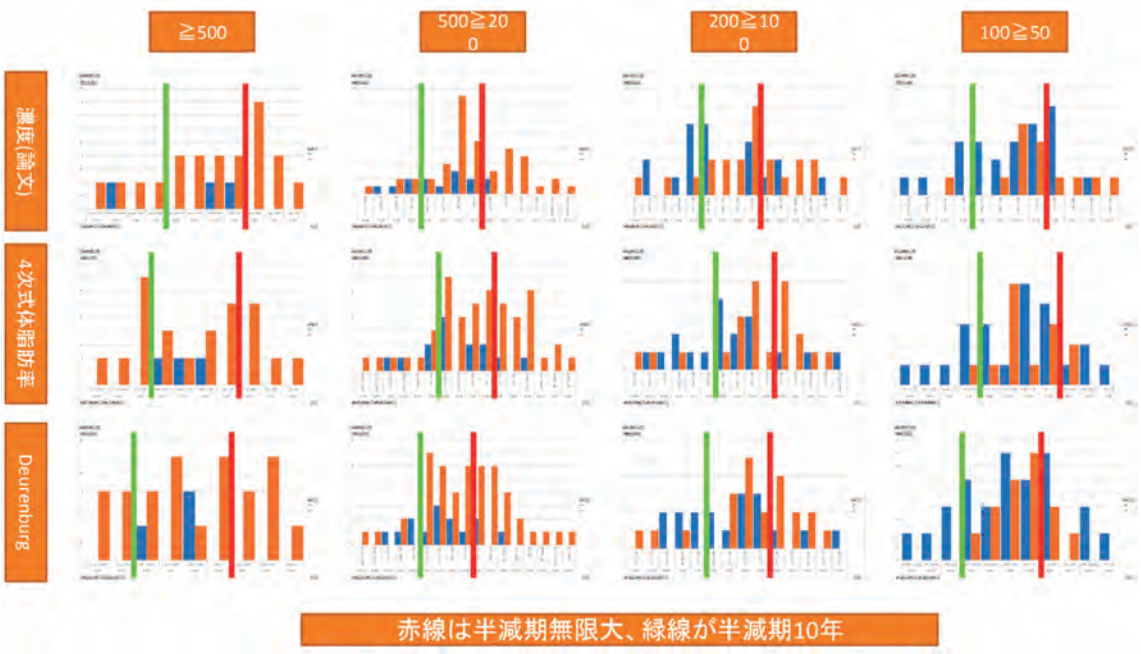


図6　年齢別半減期の分布

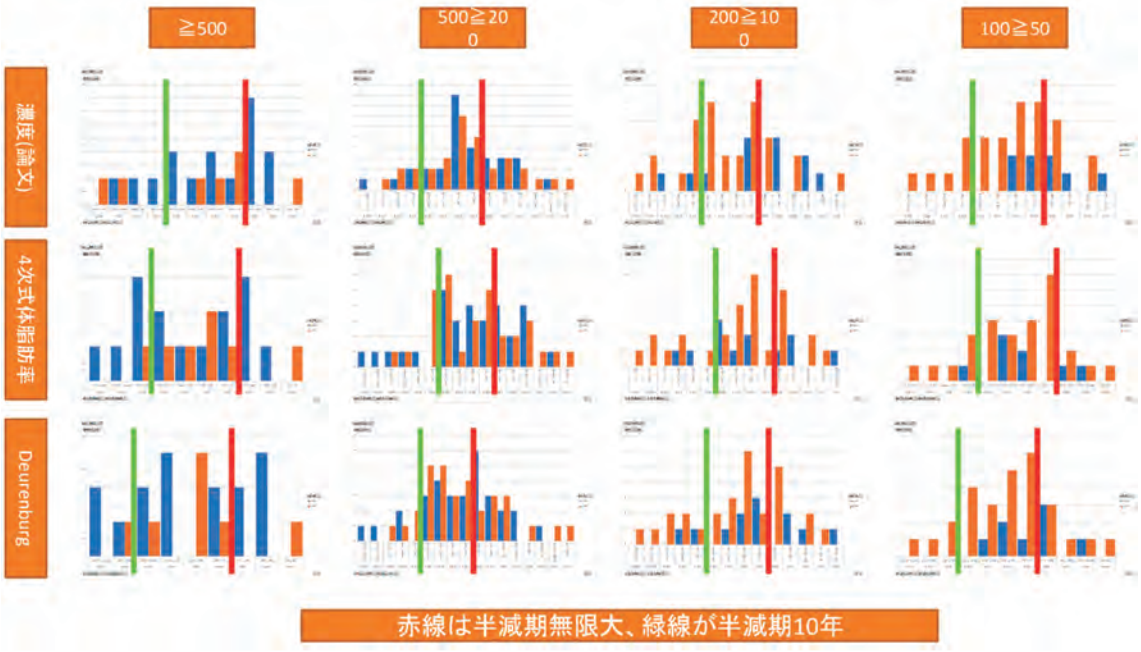


図7　個人の半減期の変化

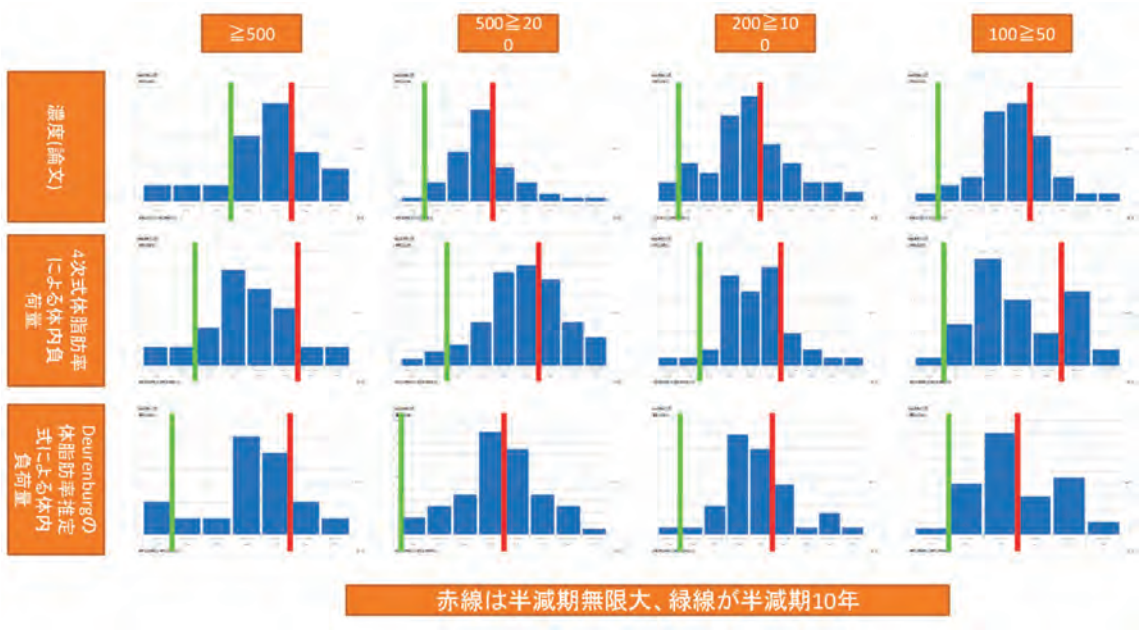


図8　個人の半減期の変化（前期と後期の比較）

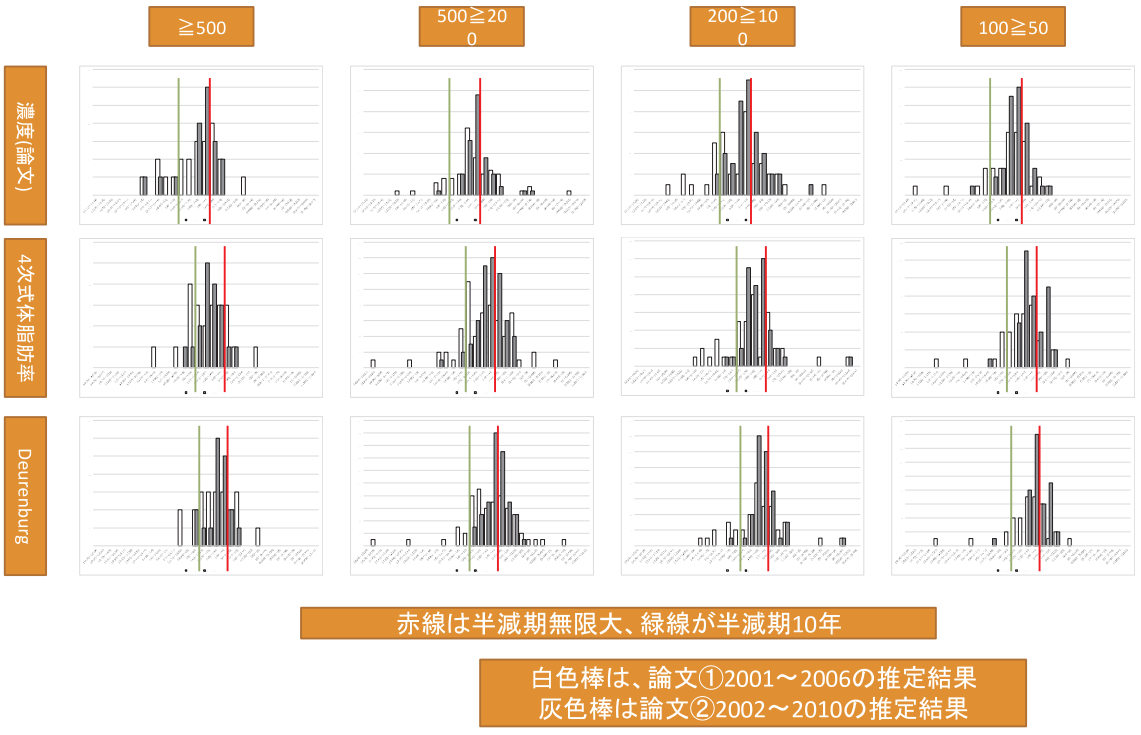


図9　認定群における単語の関連

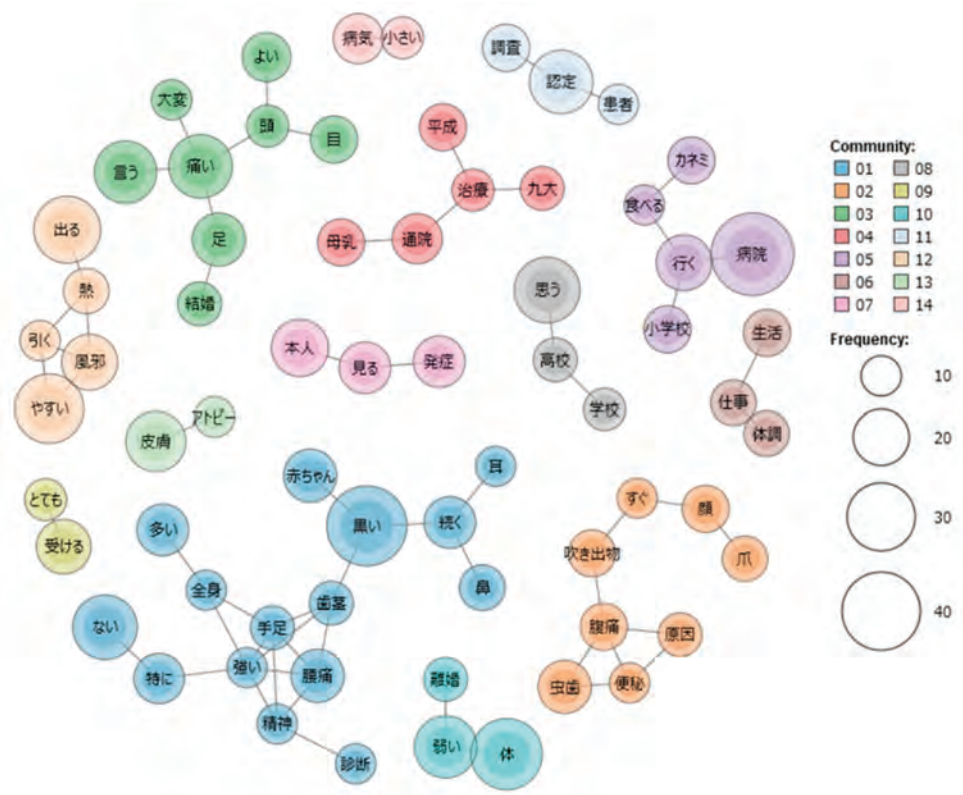
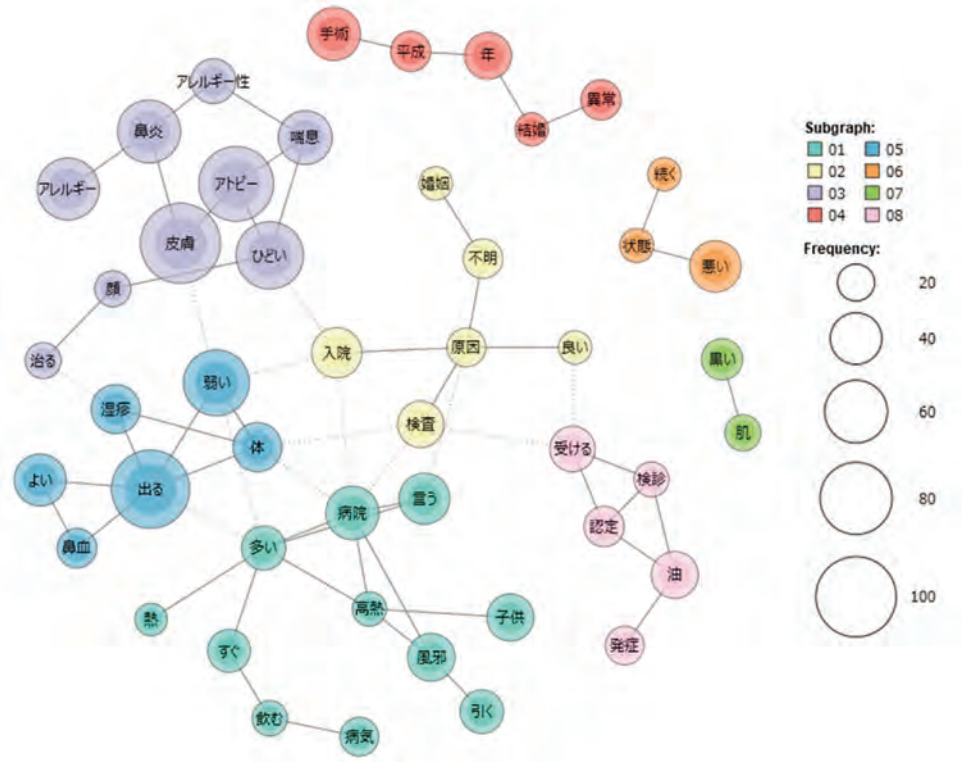


図10　未認定群における単語の関連



分担研究報告書

食品を介したダイオキシン類等の人体眼部への影響に関する研究

研究分担者　園田　康平　九州大学大学院医学研究院眼科学分野　教授

研究要旨　令和２年度油症患者の眼症状の検討を試みた。

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２年度の油症検診が下記の通り行われた。

９月 12 日福岡会場 ５名。

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項目を検討することを計画していたが、新型コロナウイルス肺炎の流行に伴い３密を避ける目的で眼科学的診察は行われなかった。

Ｃ．研究結果

今年の受診者は５名であり、前年度よりも 207 名少なかった。大幅に参加者が減少しているのは新型コロナウイルス肺炎の影響であると考えられ、感染対策の一環として今年は眼科学的診察は行わなかったため、参加者の所見は不明である。

Ｄ・Ｅ．考察・結論

これまで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傾向にあった。今後も同様の傾向が続くことが想定されるが加齢に伴う未知の晩期合併症の出現などがないかも注目しながら観察していく必要がある。

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角膜内皮細胞

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：角膜内皮細胞の減少は難治疾患である水疱性角膜症の原因となる。油症における角膜内皮細胞密度の変化を調査し、油症および血中 PCB、PCQ、PeCDF 濃度の関連を調査する予定であったが、新型コロナウイルスの影響で調査できなかった。

A. 研究目的

角膜の内側は 1 層の角膜内皮細胞層で覆われている。角膜内皮細胞には Na/K ポンプが存在し、房水が角膜に浸透し浮腫を生じるのを抑えている。しかしその機能が損なわれると、水疱性角膜症を生じ、角膜移植が必要となる。今回の研究では油症検診受診者における角膜内皮細胞密度を調査し、ダイオキシン類と角膜内皮細胞数の関連を検討する。

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 2020 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スペキュラーマイクロスコープによる角膜内皮細胞密度の測定が可能であった油症認定患者を対象とし、角膜内皮細胞密度と CB、PCQ、PeCDF 濃度の関連を調査する予定であった。

（倫理面への配慮）

本研究のデータ解析においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C. 研究結果

新型コロナウイルスの影響で検診を行うことができず、調査を行うことができなかった。

D. 考察

結膜色素沈着やマイボーム腺に変化を認める油症患者では、涙液層が角膜の正常形態・代謝維持に影響している可能性もある。油症により角膜内皮細胞数が減少するのか、来年度以降に調査を行いたい。

E. 結論

油症における角膜内皮細胞密度の変化を調査し、油症および血中ダイオキシン類の関連を調査する予定であったが、新型コロナウイルスの影響で調査できなかった。

F. 研究発表　なし

G. 知的財産権の出願・登録状況　なし

分担研究報告書

油症患者における口腔粘膜色素沈着に関する文献的研究

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
研究協力者　　吉冨　泉　　諫早総合病院歯科口腔外科

研究要旨　油症患者において口腔粘膜色素沈着は現在でもよくみられる症状のひとつである。今回、2000 年以降の論文を検索し得られた和文 4 編および英文 4 編について検討を行った。2000 年以降の論文でも口腔粘膜色素沈着の発現者は多く認められており、経年的に若干の軽減はみられる傾向にはあるが依然高い発現率が報告されていた。部位別では歯肉に最も多く色素沈着が認められ、次いで頬粘膜に発現が認められていた。PCB、ダイオキシン類や残存歯数と口腔粘膜色素沈着との関係については十分な検討がなされておらず、今後の検討が必要と思われた。

A．研究目的

油症患者における口腔領域の症状としては、口腔粘膜色素沈着、歯周疾患、口腔乾燥症、顎関節症および口腔不定愁訴などが挙げられている。これまでに、年 1 回の油症検診において歯科検診を行ってきており、歯科検査項目としては一般的な歯の検診、口腔粘膜色素沈着、歯周炎などの検査を重点的に行っている。特に口腔粘膜色素沈着については、歯肉、頬粘膜、上下唇粘膜、口蓋粘膜の各部位にわけて、色素沈着の有無、色調、形態について精査している。

油症発症以来 50 年以上経過し、血中の PCB、ダイオキシン類の濃度は減少しており、それに伴い色素沈着は軽減傾向にあると思われるが、いまだに油症患者においては高い頻度で口腔粘膜色素沈着が認められる。

これまで、口腔粘膜色素沈着に関する研究については和文および英文で複数の報告がなされている。今回は、特に、比較的最近報告された文献に基づいて検討を行い、油症発症後年数の経過した時点での病態変化について調べることを目的として研究を行った。

B．研究方法

2000 年以降の医学中央雑誌および PubMed で、油症（Yusho）、PCB、口腔粘膜色素沈着症（oral pigmentation）をキーワードとして検索を行い、論文として報告されているものについて検討を行った。論文に記載のある色素沈着の発現率および部位について検討し、経年的変化についても検討した。

（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

口腔粘膜色素沈着について検討がなされている論文は和文 4 編、英文 4 編の計 8 編[1-8]であった。そのうち、福岡地区の油症患者について検討しているものが 6 編[1-6]、長崎地区の油症患者について検討しているものが 2 編[7,8]であった。

歯科検診を受診し検査の対象となった認定患者数は、72－155 名（福岡地区：76－155 名、長崎地区：72－121 名）であった。色素沈着の認められた油症患者数は 24－91 名で、色素沈着の発現率は、論文

報告年別では、福岡地区を対象とした分で、2001 年[1]が 60.5%、2003 年[2]が 62%、2007 年[4]が 52.6%、2009 年[5]が 58.7%および 2011 年[6]が 51.6%であった。一方長崎地区の報告では、2013 年[7]が 33.3%で、2019 年[8]が 25.7%であった。部位別では、福岡地区の2001年から2011年までの報告では、すべての論文において歯肉に最も高く発現が認めら、ついで頬粘膜が多いと報告されていた。長崎地区の報告では、2013 年の論文[7]では頬粘膜が最も多く、ついで歯肉が最も多かったが、2019 年の論文[8]では歯肉が最も多く、次いで頬粘膜に多く認められていた。性別では、記載のあるもので、男性に多い傾向があったとするものが多かった[1,2,4,6,8]。

D．考察

油症発症当時、さまざまな口腔領域の症状が報告されているが、特に口腔粘膜色素沈着は顕著に認められた症状のひとつであった。油症発症以来 50 年を経過した現在でも、数多くの油症患者に口腔粘膜色素沈着が認められる。検索した論文では、福岡地区と長崎地区でデータに若干の違いがあったが、検診が行われる環境の違いがあり、色素沈着の程度は視診所見であるためにそのような違いがあった可能性がある。しかしながら、今回調べた近年の調査結果でも福岡では 2011 年の論文[6]でも発現率 50%以上であり、長崎の結果[7,8]でも 25%を超えており、油症発生より経年的に色素沈着は軽減傾向にあるものの、依然口腔粘膜の色素沈着は高い発現があると言える。

部位別では歯肉の発現率が高いのは、地区や報告年を問わず一致していた。ほとんどの論文で歯肉に次いで多いのは頬粘膜であったが、頬粘膜での発現率は長崎地区で高い傾向がみられた[7]。地区別で発現部位や発現率に若干の差がみられるのは、検診場所による環境の違い(検診場におけるデンタルチェアーの有無など)、検診対象者の年齢や地域性などが影響している可能性がある。また、長崎地区では口唇の発現率も比較的高いが、口唇粘膜は他の口腔粘膜に比較して紫外線の影響を受けやすく、長崎の検診対象者が離島在住での漁業関係者が多いことなどを鑑みると、日常生活の差が影響していることは否定できない。

歯肉に色素沈着が多い原因は明らかにされていない。橋口ら[9]は、60 歳以上の患者では歯肉色素沈着が減少していることとから、残存歯数の減少との因果関係がある可能性を示唆している。

我々は、平成 30 年度の油症検診結果を基に口腔粘膜色素沈着の有無と義歯装着の有無との関係について検討した（平成 30 年度油症研究報告集)。その結果、両者に統計学的有意差は認められなかったが、部分床義歯を有する場合、無歯部には色素沈着が認められない結果を得た。さらに総義歯の患者においては、頬粘膜や口唇に色素沈着がみられる場合はあったが、義歯で覆われる部位の粘膜部には色素沈着が認められなかった。歯の喪失によって歯肉の色素沈着が減少する可能性はあると思われるが、今後の検討が必要と思われる。

血中の PCB やダイオキシン類と色素沈着の関係について報告している論文は少ない。2005 年の Hashiguchi et al.[3]の論文では上顎歯肉の色素沈着と血中 PCDF 濃度との間に相関性があったとし、2013 年の Kawasaki et al.[7] の論文の結果では、色素沈着の有無と血中 PCB 濃度との相関性を認めている。今後、さらに血中の PCB、ダイオキシン類との関係についても検討が必要と思われた。

E．結論

油症患者における口腔粘膜色素沈着について文献的研究を行った。油症患者においてはいまだ高い発現がみられ、特に歯肉

に発現が多く認められていた。

Ｆ．参考文献

1) 橋口　勇, 山座孝義, 小石裕子, 後藤康治,吉嶺嘉人,赤峰昭文,福山　宏, 奥村英彦:油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学調査(第四報). 福岡医誌 92: 115-119, 2001.
2) Hashiguchi, I, Yoshimine Y, Gotou, Y, Maeda H, Wada N, Akamine A, Fukuyama H and Okumura H: An Epidemiologic Examination on the Prevalence of the Periodol Diseases and Oral Pigmentation in Yusho Patients in 2002. Fukuoka Acta Med. 94: 81-86, 2003.
3) Hashiguchi I, Akamine A: Oral mucosa and dental findings in Yusho. J Dermatol Sci Supl 1: S56-S72, 2005.
4) 橋口　勇, 吉嶺嘉人, 前田英史, 後藤康治,石河真幸,藤井慎介,友清　淳, 福山　宏, 奥村英彦, 赤峰昭文 : 油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学調査（第六報）. 福岡医誌 98: 170-175, 2007.
5) 橋口　勇, 吉嶺嘉人, 前田英史, 後藤康治,藤井慎介,友清　淳,吉田桐枝, 西垣奏一郎, 門野内　聡, 堀　清美, 奥村英彦, 赤峰昭文 : 油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学調査(第七報). 福岡医誌 100: 111-117, 2009.
6) 橋口　勇, 吉嶺嘉人, 前田英史, 後藤康治,和田尚久,藤井慎介,友清　淳, 齋藤桐枝, 門野内　聡, 河野清美, 奥村英彦, 赤峰昭文 : 油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学調査（第八報）. 福岡医誌 102: 75-80, 2011.
7) Kawasaki G., Yoshitomi I, Yanamoto S, Yamada S, Mizuno A, Umeda M: Pigmentation of the oral mucosa by PCB poisoning in Yusho patients. Arch Oral Biol 58: 1260-1264, 2013.
8) Kawasaki G, Yoshitomi I: Effect of dioxin-related compounds on oral pigmentation in patients affected by the Yusho incident. Arch Oral Biol 102: 244-248, 2019.
9) 橋口　勇, 古川和洋, 赤峰昭文, 福山　宏, 奥村英彦 : 油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学調査（第三報）. 福岡医誌 90: 150-153, 1999.

Ｇ．研究発表

なし

Ｈ．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

油症における末梢血ヘルパー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217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2,3,4,7,8-PeCDF濃度との関連について検討した。血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度とTh0細胞、Th1細胞あるいはTh2細胞との間に相関をみなかった。Th2細胞は2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群では 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ上昇を認めたが、Th0細胞およびTh1細胞は両群間に差をみなかった。血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度が高値の油症患者では Th2 細胞の上昇を認め、Th2 細胞の上昇に対する2,3,4,7,8-PeCDFの慢性的影響が示唆された。

A．研究目的

1968年4月頃よりポリ塩化ビフェニル（PCB）混入ライスオイル摂取により北部九州を中心に発生した油症では、原因油の分析から油症の原因物質としてポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）の毒性影響が大きいと考えられる[1)2)]。PCDFは、狭義のダイオキシンであるポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン（PCDD）およびコプラナーPCBとともにダイオキシン類と総称され、これらの物質の毒性は細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体（Ah 受容体）を介すると考えられているが、その機構の詳細は未だ不明である[3)]。油症発生以来50年以上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、油症原因物質である PCDF の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、血中2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran(PeCDF)濃度の研究目的の使用に同意が得られた217例を対象者とした。

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 interleukin（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。

2,3,4,7,8-PeCDF の測定は福岡県保健環境研究所で行なった。血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 2019 年度福岡県油症一斉検診に最も近い時期に測定した 2016 年度 20 例、2017 年度 59 例、2018 年度 66 例、2019 年度 72 例の計 217 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および血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の研究目的の使用に同意が得られた 217 例の内訳は女性 125 例、男性 92 例で、平均年齢は 65.2±13.2（16－92）歳であり、油症患者 161 例、油症患者（同居家族）25 例、未認定患者 31 例であった。血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と年齢の間に有意の正の相関（r=0.434, P＜0.001）を認めた。

2019 年度福岡県油症一斉検診の受診者 217 例について血中 2,3,4,7,8-PeCDF 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 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と Th0 細胞、Th1 細胞あるいは Th2 細胞の間に関連をみなかった。

福岡県油症一斉検診受診者217例について血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度上位25％を2,3,4,7,8-PeCDF高濃度群、下位25％を2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群として両群間のTh0細胞、Th1細胞およびTh2細胞について検討した（表 2)。2,3,4,7,8-PeCDF高濃度群 54 例の血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 66.22 pg/g lipids 以上、平均血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 205.36±129.69 pg/g lipidsであり、油症患者54例であった。2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群54例の血中PCB濃度は8.45 pg/g lipids以下、平均血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 5.80±1.61 pg/g lipidsであり、油症患者29例、油症患者（同居家族）9例、未認定患者16例であった。Th0細胞は2,3,4,7,8-PeCDF高濃度群1.9±2.0％、2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群1.3±0.9％、Th1細胞は2,3,4,7,8-PeCDF高濃度群23.8±10.7％、2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群22.7±9.7％であり、両群間に差をみなかった。Th2細胞は2,3,4,7,8-PeCDF高濃度群2.8±2.0％と2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群1.3±0.9％に比べ有意の上昇を認めた（P＜0.01)。

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-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 陽性細胞数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 陽性細胞の増加が認められ、細胞性免疫に対する 2,3,4,7,8-PeCDF の慢性的影響が示唆された。

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 217 例について血中 2,3,4,7,8-PeCDF 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 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と Th0 細胞、Th1 細胞あるいは Th2 細胞の間に関連をみなかった。しかし、2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群では 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ Th2 細胞の上昇が認められた。血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者に認められる Th2 細胞の上昇がこれまで報告されてきた油症における 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も考えられる。

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 細胞の細胞内サイトカインの検討において血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者に Th2 細胞の上昇が認められた。2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度油症患者における Th2 細胞に対する慢性的影響の機序は不明であるが、Th2 細胞の上昇に 2,3,4,7,8-PeCDF 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。

E．結論

油症発生 51 年後の 2019 年度福岡県油症一斉検診受診者 217 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

2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群では2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群に比べTh2細胞の上昇を認めた。Th2細胞の上昇に対する2,3,4,7,8-PeCDF 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, 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 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と Th0, Th1 および Th2 細胞の関連

	r
Th0 細胞	0.109
Th1 細胞	0.024
Th2 細胞	0.063

表２　血中 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群および低濃度群における Th0, Th1 および Th2 細胞

		2,3,4,7,8-PeCDF 濃度	
		≧66.22 pg/g lipids	≦8.45 pg/g lipids
No.		54	54
Th0 細胞	(%)	1.9±2.0	1.3±0.9
Th1 細胞	(%)	23.8±10.7	22.7±9.7
Th2 細胞	(%)	2.8±2.0*	2.0±0.8

*P<0.01 vs. blood 2,3,4,7,8-PeCDF concentration ≦8.45 pg/g lipids.

分担研究報告書

長崎県油症認定患者における神経栄養因子の血中濃度評価と考察

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　村山　直也　九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　助教

研究要旨

平成 29 年より油症患者を対象に皮膚末梢神経に影響を与える因子の病態への関与を検討してきた。その成果の一つとして油症患者において皮膚温熱知覚の鈍麻が確認された。この皮膚感覚異常は痺れなどの神経学的自覚症状に関わると考えられ、メカニズム解明が症状軽減の治療に貢献すると考えられる。そこで触覚や皮膚侵害受容の閾値に影響を与える因子の発現を血清学的、病理学的に調査している。本年度は神経栄養因子である artemin の油症患者血中濃度を中心に検討を行った。artemin は発生の際に交感神経を末梢まで伸長させる軸索ガイダンス因子としてクローニングされ神経障害の回復に関わるほか、artemin を介したシグナル活性の低下は温熱や触覚の閾値を上昇させ、皮膚の感覚鈍麻を誘導することが知られている。まず油症患者と健常人の血液中 artemin 濃度を検討したところ、油症患者は健常人と血液中 artemin 濃度が同程度であった。一方で、artemin の血中濃度は血中 PCQ 濃度と正の相関を示した。以上より、油症患者に artemin を介した皮膚感覚知覚異常が存在すると仮定した場合、血中ダイオキシン濃度と相関した知覚過敏を生じるか、またはその受容体下流のシグナルの変調から知覚鈍麻を生じている可能性が示唆された。

A. 研究目的

油症発生当初より、油症患者は四肢のしびれや感覚低下などの末梢神経症状を呈することが知られているが、半世紀経過した今でもその有病率は正常群より高い。我々は、平成 29 年より油症患者を対象に皮膚末梢神経に影響を与える因子の病態への関与を検討している。

Von frey フィラメントと温熱計を用いた皮膚感覚異常の検討では、油症患者に触覚閾値と冷覚閾値が低下した症例が確認された。有意差はないものの、冷覚閾値が低下した症例では血中ダイオキシン濃度が高い傾向にあり、温度覚へ影響している可能性が考えられた。

神経栄養因子である artemin は、発生の際に交感神経を末梢まで伸長させる軸索ガイダンス因子としてクローニングされたタンパクである。神経障害の回復に関わるほか、artemin を介したシグナル活性の低下は温熱や触覚の閾値を上昇させ、皮膚の感覚鈍麻を誘導することが知られている。[1]。

そこで今回は、皮膚感覚が低下している傾向にある油症患者の血液中の artemin 濃度を健常者と比較検討した。また、油症患者の血液中には高濃度のダイオキシン類が残留しており[2]、油症患者血液中の PCB、PCQ、PCDF と artemin との相関性について検討した。

B. 研究方法

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

②artemin の測定:ヒト artemin ELISA キット(Ray Biotech 社製)を用いてサンプル血清中の artemin を測定した。

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

④統計処理:油症認定患者と健常人における artemin 値の比較にはMann-Whitney のU検定を、油症認定患者におけるダイオキシン濃度と artemin 値の相関には Spearman の順位相関係数の検定を用いた。$p<0.05$ を統計学的有意とした。

C. 研究結果

長崎県の油症認定患者 (Pt) 31 名、および健常人 (CON) 31 名の平均年齢はそれぞれ 72.0±8.6 歳、および 67.9±11 歳で有意差は認めなかった。

それぞれの群における血清中 artemin の比較を図１に示す。油症患者と健常人とに有意な差は認めなかった(P=0.7523)。また、認定患者における artemin 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、PCQ と弱い相関 (P=0.049、r=0.469) を認めた(図 2)。PCB、PCDF とは有意な相関を認めなかった。

D. 考察

油症患者では皮膚の感覚異常を認めることがあるが、その発症機序については明らかになっていない。令和元年度の研究で我々は自覚症状のない油症患者のなかに、触覚や冷覚の閾値が低下した患者がいることを報告した。

artemin はグリア細胞由来神経栄養因子(glial cell-derived neurotrophic factor; GDNF)ファミリーの一つで、GDNF ファミリー受容体 α3 に結合することにより、ニューロンの生存、増殖、および神経突起の伸長を促進する[3]。artemin には温熱や触覚の閾値を低下させる作用や、皮膚の感覚過敏を誘導する機能があり[1]、さらに触覚や冷覚の閾値が低下している油症患者が存在していることから油症患者の血清中 artemin 濃度が低下していると予想した。しかしながら、油症患者と健常人の血清中の artemin 濃度は同程度であった。また、artemin と油症患者の血中ダイオキシン濃度の比較では PCB、PCDF との相関性は認めなかったが。PCQ では弱いながらも正の相関を認めていた。

このことから、神経栄養因子 artemin を介して皮膚感覚知覚鈍麻が生じる機序を想定する場合、血中ダイオキシン濃度と相関した知覚過敏を生じるか、または artemin 受容体から下流に何らかの異常を生じている可能性が示唆された。

E. 結論

油症患者における artemin とダイオキシンとの関連については、これまでに詳細な報告はなく、今回の結果が油症患者の皮膚感覚異常における病態解明の発展の一助となることを期待する。

謝辞

これまでの油症研究にお力添え頂いた関係者の皆様、快くご協力いただいた油症患者の皆様に深謝致します。

参考文献

1. Murota H, Izumi M, Abd El-Latif MI, Nishioka M, Terao M, Tani M, Matsui S, Sano S, Katayama I: Artemin causes hypersensitivity to warm sensation, mimicking warmth-provoked pruritus in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012, 130(3):671-682 e674.
2. Aoki Y: Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters--what we have learned from Yusho disease. *Environ Res* 2001, 86(1):2-11.
3. Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM, Jr., Milbrandt J: Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* 1998, 21(6):1291-1302.

Ｆ．研究発表

なし

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

なし

図1

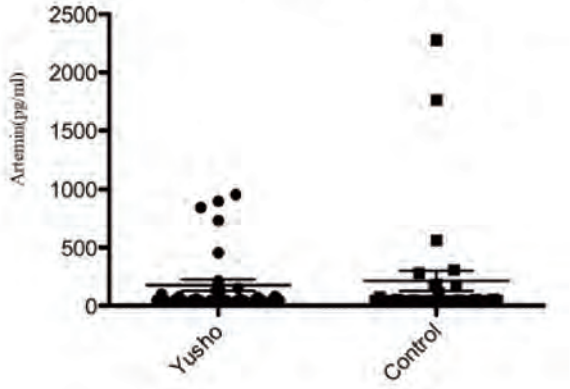


図１：油症患者と対照群の血中 artemin 測定
油症患者と対照群では血中 artemin 濃度に有意差を認めなかった。

図2

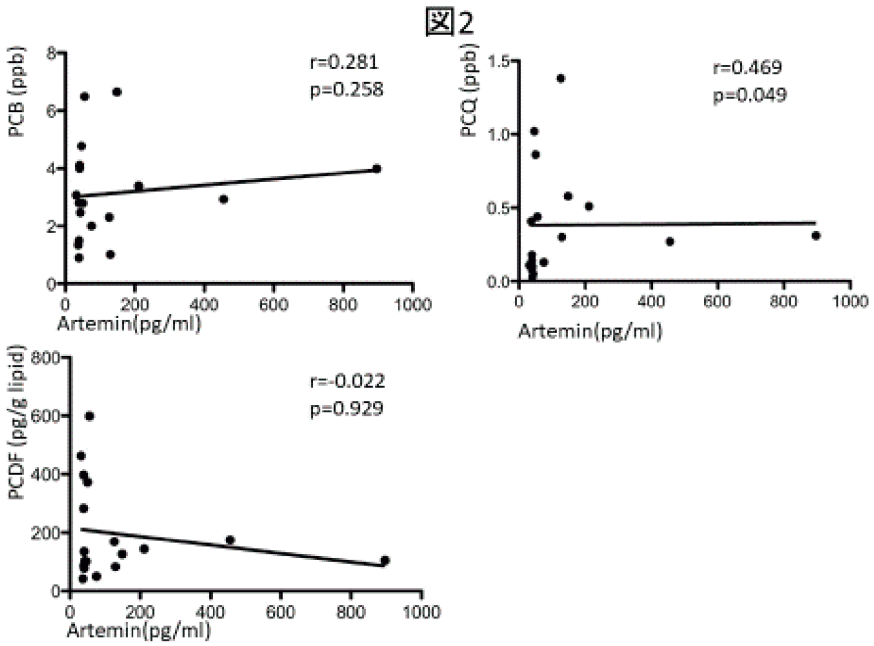


図２：油症患者の血中 artemin 測定値と各種ダイオキシン濃度との相関
血中 artemin 値と血中ダイオキシン濃度はPCQのみ弱い正の相関を認めた。PCB、PCDF との相関性は認めなかった。

分担研究報告書

カネミ油症患者における中枢･末梢神経障害の文献的考察と安静時機能的 MRI による神経可塑性の神経基盤の研究

研究分担者　　山下　謙一郎　九州大学臨床神経生理学　助教

研究要旨　カネミ油症患者に生じる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/末梢神経障害が評価されていない可能性も考えられた。

A．研究目的

カネミ油症患者では四肢異常感覚を多く認め、発症後長期間経過した後でも症状が残存していることが多い。また当科では令和 1 年度に文献的検討を行い、PCB/dioxin による中毒症状の中での中枢神経障害の頻度を報告した。

今年度の研究では、最新の研究によるカネミ油症患者での中枢/末梢神経障害の特徴を抽出するため PCB(polychlorinated biphenyl),PCDF(polychlorinated dibenzofuran)と dioxin における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、neuropathy をキーワードとして検索を実施した。令和 1 年以降のヒト対象の研究の発表年、中毒経路、中枢/末梢神経障害に関しての要点を検証した。

（倫理面への配慮）
個人情報は原則的に検証の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、neuropathy をキーワードとした文献検索では、令和 1 年以降で PCDF と eccephalopathy/neuropathy で文献はなく、dioxin/PCB と neuropathy でも文献なし。

PCB と encephalopathy で 4 文献[1)-4)]が抽出され、dioxin と encephalopathy で 1 文献が抽出された[5)]。日本からの報告は 1 報[5)]であった。全てヒトが暴露されることによって生じた神経障害に関する報告であった。

D．考察

PCB、PCDF、dioxin、myelopathy、encephalopathy、neuropathy をキーワードとした文献の中でヒトを対象とした報告は令和 1 年度の報告と同様少なかった。

平成 21 年以降では、Dioxin/PCB と intoxication を検索した場合は 10 件以上の文献が検索されることを考えると、臨床症状としての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。

尚画像研究については準備中であり今後実施を検討する。

Ｅ．結論

今年度の研究では画像研究を実施することはできなかったため次年度以降の実施を検討する。文献研究では PCB、PCDF、dioxin による myelopathy 、encephalopathy、neuropathy の報告は令和 1 年度同様に減少傾向であることが判明した。

Ｆ．研究発表

なし

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

なし

３．その他

特記事項なし

1)
Medehouenou TCM et al.,Exposure to polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides and risk of
dementia, Alzheimer’s disease and cognitive decline in an older population:a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging.
Environ Health. 2019;18: 57.

2)
Rude KM et al., The role of the gut microbiome in mediating neurotoxic outcomes to PCB
exposure .
Neurotoxicology. 2019 ;75:30-40.

3)
Bohler S et al., Genes associated with Parkinson’s disease respond to increasing
polychlorinated biphenyl levels in the blood of healthy females.
Environmental Pollusions. 2019：250：107-17.

4)
Lenters V et al., Early-life exposure to persistent organic pollutants (OCPs,PBDEs,PCBs,PFASs) and attention-deficit/hyperactivity disorder: A multi-pollutant
analysis of a Norwegian birth cohort.
Environmental International. 2019：125：33-42.

5)
Reis J et al., Environmental challenges for the nervous system and the brain in Japan.
Revue neurologique. 2019;175:693-7.

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 AhR 発現への影響

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　Benzo[a]pyrene(BaP)を経気道的に投与すると、気管支上皮細胞中で、Arylhydrocarbon receptor(AhR)の核内移行が観察され、SP-D ノックアウトマウスに BaP を投与すると、野生型マウスに比してこの所見は増強した。SP-D の有無が AhR の動態に関与する可能性が考えられた。

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。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、AhR に対する免疫染色(蛍光および DAB 基質) を施行した。

C．研究結果

前回の報告で、BaP 経気管投与後、投与 7 日後に肺を取り出して HE 染色、免疫染色 (CC10 、 SP-A) にて検討した結果、SP-D(-/-)マウスに BaP を投与すると、気道の傷害が増強される可能性が考えられた。今回、AhR に対する免疫染色を施行し、終末細気管支付近(Club 細胞主体の気管

支上皮)の観察を行った。
まず、anti-AhR-antibody-FITC を用いた蛍光免疫染色で、各群の AhR の蛋白発現レベルを確認した。WT-TR 群(control 群)において、気管支上皮(主に Club 細胞)での AhR の発現が確認された(Fig.1a)。WT-BaP 群では刺激により、AhR の発現が増強した。また、一部の肺胞上皮(I 型、II 型でも AhR の発現を認た(Fig.1b)。SP-D(-/-)-TR 群において、WT-TR 群と比すると気管支上皮での AhR の発現は若干増強していた(Fig.1c)。SP-D(-/-)-BaP 群において、AhR の発現は著名に増強しており、前回の報告でみとめた、SP-D の欠損による BaP による気管支上皮傷害の増強と矛盾しない結果だった。(Fig.1d)。
次に、DAB 基質を用いた免疫染色を行った。WT-TR 群において、気管支上皮が淡く染色され、(Fig.2a)。強拡大すると、気管支上皮細胞の細胞質全体が淡く染色されていることがわかる(Fig.3a)。WT-BaP 群においては、BaP の投与による刺激により、気管支上皮の細胞内の染色部位が変化し、部分的に濃染された (Fig.2b)。強拡大で観察すると、核が染色されていることが分かる (Fig.3b)。これは、我々が作成した油症マウスモデル群(WT-BaP 群)においてにおいて、BaP 投与により細胞質中にあった AhR がリガンドである BaP の結合により、核内以降を起こしていることと合致する。SP-D(-/-)マウスにおいて、溶媒のみ投与した群：SP-D(-/-)-TR 群においても、核の染色が確認された (Fig.2c、Fig.3c)。SP-D(-/-)-BaP 群において、WT-TR および SP-D(-/-)-TR 群よりも、核がより強く染色された (Fig.2d、Fig.3d)。

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]。我々は前回の報告で、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、気道傷害が増強されたことから、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を考えたが、その機序は明らかにできなかった。今回、ダイオキシン類のレセプターである、芳香族炭化水素受容体(AhR:Arylhydrocarbon Receptor) に着目して、研究を行ったところ、我々の作成した、BaP 投与油症マウスモデルにおいて、AhR の核内移行が観察され、BaP の経気道投与による肺内の細胞への影響が動物実験レベルで確認された。また、SP-D ノックアウトにおいても、核内の AhR が染色されることが観察された。これは、SP-D が生体内での AhR の動態に関与することを示唆さた。更に、BaP を投与することにより、核内の AhR は著明に増強した。このことから、AhR 系に、ポジティブフィードバ

ックが作用し、かつ、SP-D の欠損がこれを強めている可能性が考えられた。

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。令和元年および今年度の報告で示したとおり、動物実験で得られた着目点を元に、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、今後は、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 SP-D が AhR の体内動態に関与している可能性が考えられた。

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

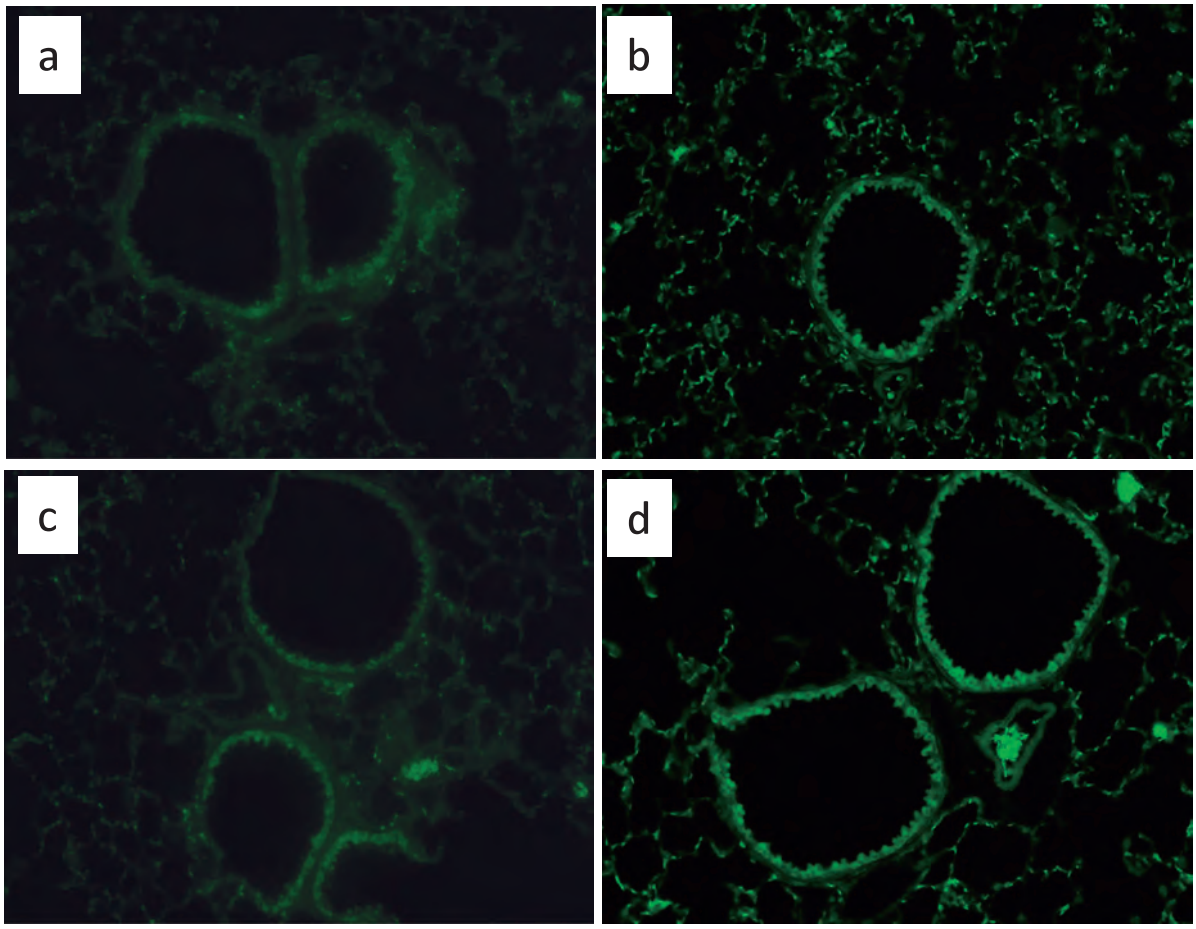
G．知的財産権の出願・登録状況

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): 19906-19915.
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.

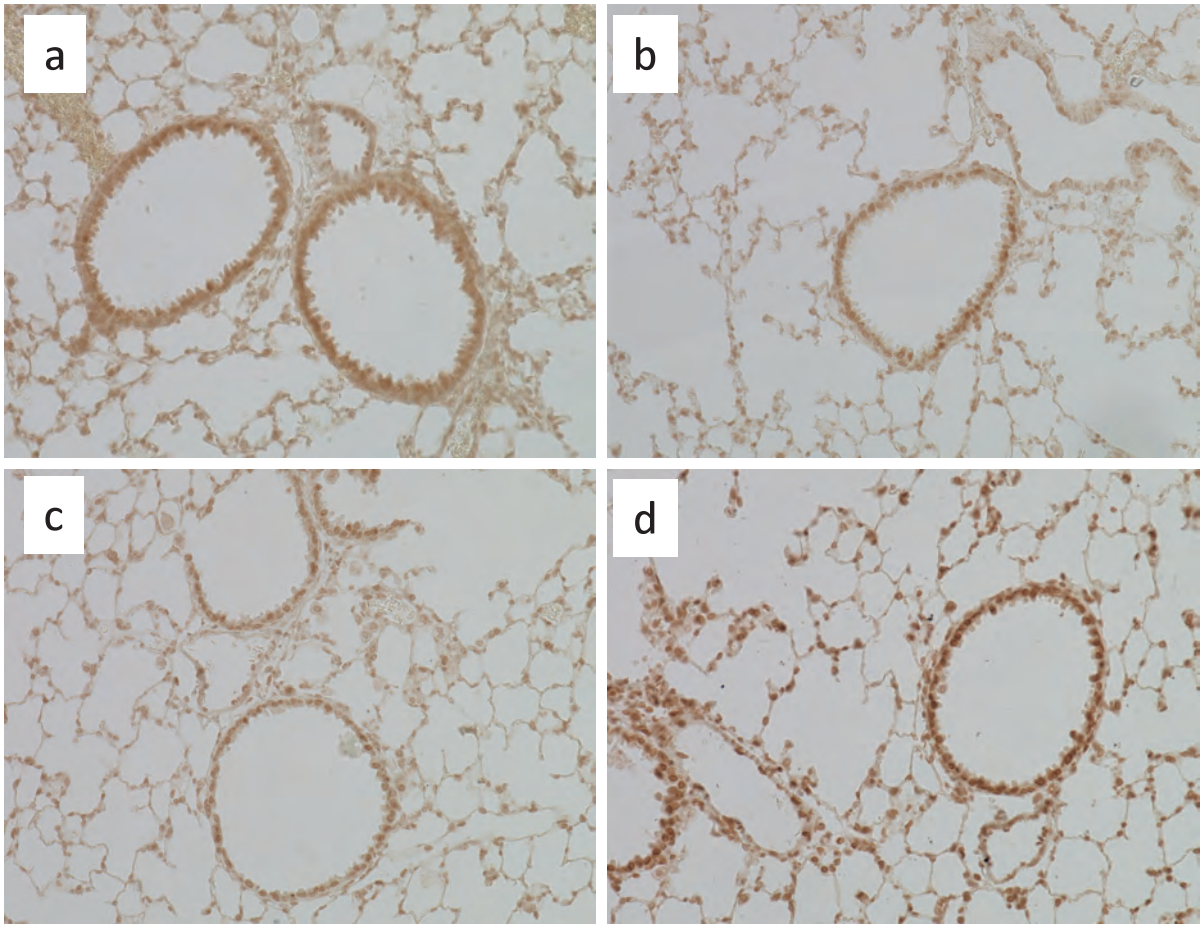
Fig1　AhR蛍光免疫染色



a. Wild type-Tricaprylin群(WT-TR)
b. Wild type-Benzo[a]pyrene群(WT-BaP)
c. SP-D kockout-Tricaprylin群(SP-D(-/-)-TR)
d. SP-D knockout-Benzo[a]pyrene群(SP-D(-/-)-BaP)

anti-AhR-antibody-FITCで蛍光免疫染色を行うと、
WT-TR群において、気管支上皮でのAhRの発現している。(a)
WT-BaP群では刺激により、AhRが発現が増強している。
また、一部の肺胞上皮(I型、II型でもAhRの発現を認る(b)。
SP-D(-/-)-TR群において、WT-TR群と比すると気管支上皮での
AhRの発現は若干強く見える(c)。SP-D(-/-)-BaP群において、
AhRの発現は著明に増強している(d)。

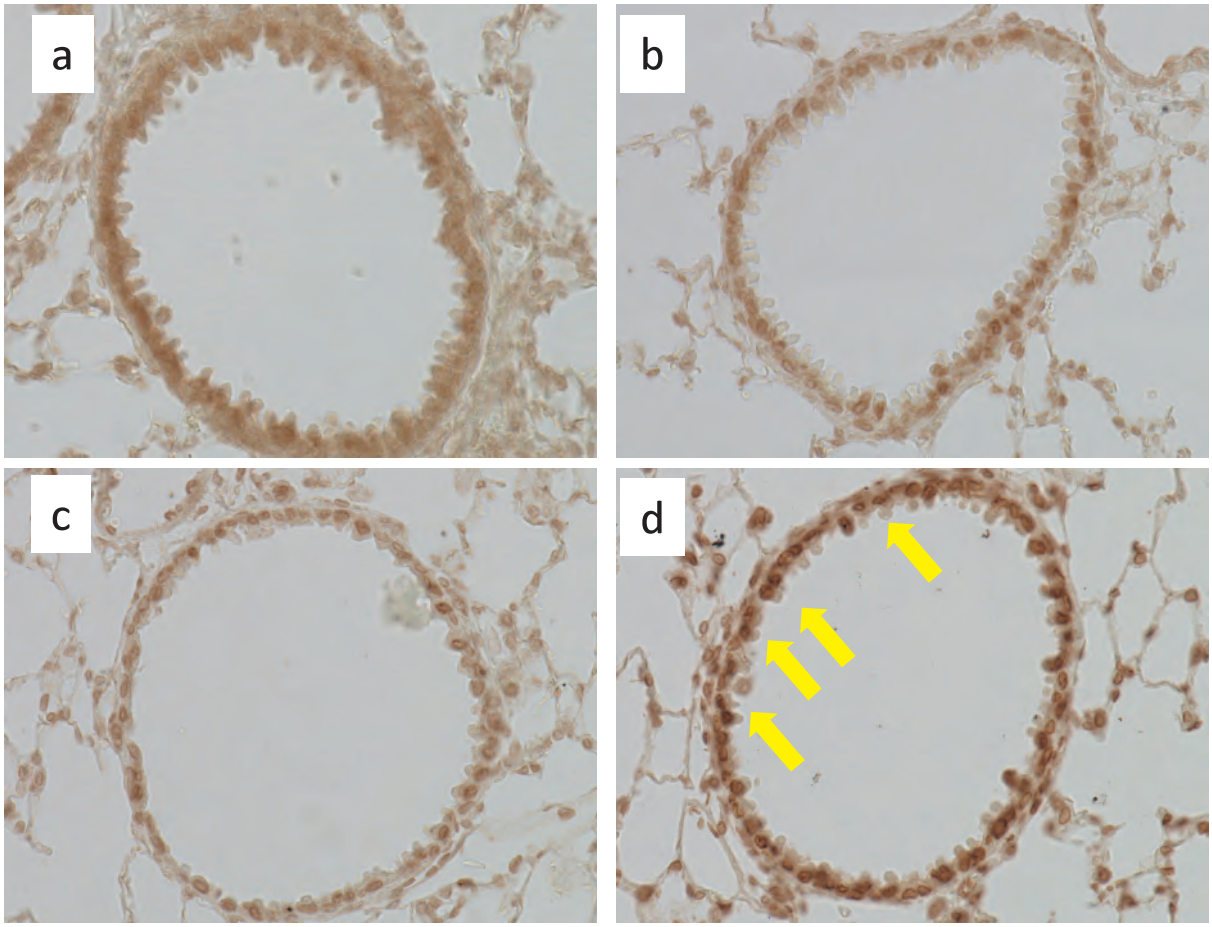
Fig2　AhR免疫染色（DAB基質）



a. Wild type-Tricaprylin群(WT-TR)
b. Wild type-Benzo[a]pyrene群(WT-BaP)
c. SP-D kockout-Tricaprylin群(SP-D(-/-)-TR)
d. SP-D knockout-Benzo[a]pyrene群(SP-D(-/-)-BaP)

control群(WT-TR)において、気管支上皮が淡く染色される。(a)
Bap投与により気管支上皮の細胞内の染色部位が変化し、
部分的に濃染される。(b)
SP-D(-/-)-TRにおいても、染色部位の変化を認める。(c)
SP-D(-/-)-BaP群では、より強く濃染される。(d)

Fig3　AhR免疫染色（DAB基質　強拡大）



a. Wild type-Tricaprylin群(WT-TR)
b. Wild type-Benzo[a]pyrene群(WT-BaP)
c. SP-D kockout-Tricaprylin群(SP-D(-/-)-TR)
d. SP-D knockout-Benzo[a]pyrene群(SP-D(-/-)-BaP)

強拡大すると、control群(WT-TR)において、気管支上皮細胞の
細胞質全体が淡く染色される。(a)
Bap投与により細胞内の染色部位が変化し、核が染色される。(b)
SP-D(-/-)-TRにおいても、淡く核が染色される。(c)
SP-D(-/-)-BaP群では、核が強く染色される(↑)。(d)

分担研究報告書

継続的なベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討

研究分担者　申　敏哲　　熊本保健科学大学　リハビリテーション学科　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　継続的なベンゾピレン暴露により発生する神経異常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 法で検討した。その結果、ベンゾピレン単回投与時と同様な結果が得られ、5、250Hz の電気刺激周波数においては、各群有意な閾値の変化はみられなかった。また、2000Hz の電気刺激周波数ではベンゾピレン 2 週間投与群で単回投与時より 1.2 倍程度の感覚閾値の有意な上昇がみられた。先行研究においてベンゾピレン単回投与時には有効であった 3mg/kg ケイヒの投与によって若干の閾値上昇の抑制がみられたものの、有意差は認められなかった。酸化ストレス度、myelin basic protein (MBP)、cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1)、myelin-associated glycoprotein (MAG)の発現に対するケイヒの効果検討でも、ベンゾピレン単回投与時に有効であった 3mg/kg ケイヒの濃度では、若干の改善傾向がみられたものの、有意な効果は認められなかった。本研究の結果から、ベンゾピレン単回投与の様にダイオキシン類の急性中毒では、抗酸化作用と AHR 活性化阻害作用があるケイヒなどの生薬が短時間の服用で有効であるが、継続的な暴露については、更なる服用濃度や期間の検討が必要と考えられる。これらの結果は、抗酸化作用や AHR 活性化阻害作用があるケイヒなどの生薬を日頃服用することで、ダイオキシン類の急性暴露による体内の作用を抑制させることができる可能性を示唆する。

A．研究目的

近年、ダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを用いた動物実験で、ベンゾピレン投与がラットの Aβ神経線維の伝導速度を低下させる可能性が報告されている。Aβ線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感などに関与することが報告されている[1)]。これらの結果は、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の後遺症の一つである感覚鈍麻やしびれ感等の末梢神経および中枢神経障害等の症状と関連があると考えられる[2-5)]。ダイオキシン類の毒性は芳香族炭化水素受容体（Arylhydrocarbon receptor、以下 AHR）を介して発揮されるが、様々な植物成分や生薬が AHR の活性を抑制させると報告されている[6)]。最近、生薬の一つであるケイヒを用いてベンゾピレン単回投与ラットに対する効果を検討した結果、ケイヒの投与がベンゾピレン投与により発生する感覚異常を改善させることが確認できた。しかし、ベンゾピレンの単回投与による急性暴露に対するケイヒの効果は確認できたが、継続的なベンゾピレン投与により発生する神経異常に対するケイヒの効果はまだ明らかではない。そこで本実験では、2 週間継続的にベンゾピレンに暴露させた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連続的なベンゾピレン暴露により発生する感覚異常に対するケイヒの効果を検討した。

Ｂ．研究方法

5 週齢の Wistar 系雄性ラット(SLC㈱、静岡)を用いて、Corn-oil2 週間連続投与後蒸留水投与群（Con)、ベンゾピレン 2 週間連続投与後蒸留水投与群 (Ben)、ベンゾピレン 2 週間連続投与後ケイヒ投与群（BeCNM) に分けた。Corn-oil 投与群では Corn-oil を、ベンゾピレン投与群では 30mg/kg ベンゾピレンを経口投与器でそれぞれのラットに 2 週間 、一回 500μℓずつ胃に直接に投与した。2 週間のベンゾピレン投与後から Corn-oil 投与群とベンゾピレン投与群には蒸留水、ケイヒ投与群には 3mg/kg のケイヒを、それぞれ経口投与器を用いて 500μℓ ずつ、4 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

電気刺激による感覚閾値の経時的変化をベンゾピレンの経口投与前、投与 2 週間、そして蒸留水又はケイヒ経口投与 4 週間まで小動物用電気刺激装置を用いて測定した。その結果、5Hz の電気刺激周波数による感覚閾値評価では、Corn-oil2 週間投与後蒸留水投与群（Con）に対し、2 週間ベンゾピレン投与後蒸留水を投与した群（Ben）で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、ベンゾピレンを 2 週間投与した後にケイヒを投与した群（BeCNM）でも Ben 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評価でも、Con 群に対し、Ben 群、BeCNM 群で若干感覚閾値の変化がみられたが群間の有意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評価では、Con 群に対し、Ben 群でベンゾピレン 2 週間連続投与後に感覚閾値の有意な上昇がみられ、蒸留水投与 4 週間後でも有意な感覚閾値の上昇がみられた。BeCNM 群では、ベンゾピレン 2 週間連続投与により上昇した感覚閾値がケイヒの投

与４週後、若干感覚閾値の上昇抑制がみられたが、有意差は認められなかった（Fig.1C）。

酸化ストレス度に対する影響の検討では、Con 群に対し、Ben 群で酸化ストレスの有意な上昇がみられたが、BeCNM 群では若干酸化ストレスの抑制傾向がみられたものの、有意差は認められなかった（Fig.2A）。抗酸化力に関しては、Con 群に対し、Ben 群で抗酸化力低下がみられた。BeCNM 群では、Ben 群に対し、若干の抗酸化力の上昇傾向がみられたものの、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。酸化ストレス度については、 Ben 群で Con 群に対し、酸化ストレス状態であり、BeCNM 群では Ben 群に対し、若干の酸化ストレス状態の改善が見られたが、有意差はみられなかった。

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 CYP1A1（Fig.3A）、MAG（Fig.3B） MBP（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、 Ben 群で Con 群と比較し CYP1A1 タンパク質の有意な発現増加がみられたが、ケイヒ投与した BeCNM 群においては、若干の発現増加の抑制傾向がみられたものの、有意差は認められなかった。MAG タンパク質においては、Ben 群で Con 群より発現の有意な低下がみられ、BeCNM 群においてその低下の若干の抑制がみられたものの、有意差は認められなかった。MBP タンパク質に関しては、各群間に有意差はみられなかった。

D．考察

ダイオキシン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、発症時から 30 年経過した近年でも多くの患者から感覚異常が報告されている[7]。これは、ダイオキシン類の長期暴露による慢性中毒の症状と考えられる。最近、私たちの実験において、生薬の一つであるケイヒがベンゾピレン単回投与により発生した急性中毒による感覚異常を改善させることを確認した。しかし、ベンゾピレンの慢性中毒に対するケイヒの効果は未だ明らかではない。従って、本実験では、ベンゾピレンを２週間連続暴露させた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評価した。その結果、5Hz と 250Hz の電気刺激を用いた感覚閾値では２週間 Corn-oil 投与後 4 週間蒸留水を投与したラット群（Con）に対し、2 週間ベンゾピレン投与後４週間蒸留水を投与したラット群（Ben 群）及び２週間ベンゾピレン投与後４週間ケイヒを投与したラット群（BeCNM 群）共に若干の感覚閾値の変化はみられたが有意差は認められなかった。また、2000Hz の電気刺激では、Con 群に対し、Ben 群で感覚閾値の有意な上昇がみられたが、BeCNM 群ではその感覚閾値上昇の若干の抑制がみられたものの、有意差は認められなかった。

末梢のしびれ感は、Aβ神経線維と関係があり、Aβ線維の伝導速度の緩徐化が原因である。Aβ神経線維は、実験的に 2000Hz の電気刺激で選択的に刺激することが出来ると報告されており[8,9]、本研究においても、2000Hz の電気刺激で 2 週間連続ベンゾピレンを投与したラットで感覚閾値の上昇がみられ、その上昇はベンゾピレン単回投与ラットより 1.2 倍程度であった。これらの結果は、ベンゾピレン単回投与による急性中毒と比較して 2 週間継続して投与した方がより毒性が強かった可能性が示唆された。ダイオキシン類の毒性は AHR を介して発揮されると報告され、AHR の活性化は CYP1A1 タンパク質の発現で確認できる[6]。本実験での CYP1A1 タン

パク質の発現検討結果でも、ベンゾピレン単回投与による急性中毒ラットより 2 週間連続投与を行ったラットで有意な発現増加がみられたことから毒性が強かった可能性が示唆されている。

また、感覚閾値の上昇と脱ミエリンとの関係を検討するために行った MBP、MAG タンパク質の発現検討では、ベンゾピレン 2 週間投与ラットで MAG タンパク質の有意な発現低下、MBP タンパク質の発現低下傾向がみられ、ベンゾピレン単回投与時より有意な発現低下を示した。脱髄疾患は、神経を覆っているミエリンが脱ミエリン化し、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 [10,11]。また、Pronker ら [12] 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、ベンゾピレンの 2 週間連続投与は単回投与による急性中毒よりミエリンを損傷させることで感覚閾値上昇などの神経症状を起こした可能性が考えられる。

本研究で行った、ベンゾピレン 2 週間投与ラットに対するケイヒの効果検討では、感覚閾値の上昇抑制傾向、酸化ストレス度の改善傾向、CYP1A1 の発現増加抑制傾向、MAG タンパク質の発現低下抑制傾向がみられたが、有意差は認められなかった。これらの結果は、3mg/kg ケイヒはベンゾピレン単回投与による急性中毒時よりその効果が乏しかったことを示す。ケイヒは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]。前回の私たちの実験の結果でも、3mg/kg ケイヒはベンゾピレ単回投与による急性中毒での神経症状に改善効果があることが確認されたことから、AHR の活性化抑制と抗酸化ストレス作用を持つケイヒは、ベンゾピレ単回投与後の急性中毒により発生する AHR の活性化や酸化ストレスを抑制させることで、ベンゾピレンの毒性による脱髄を抑制させ、神経異常を改善させるが、2 週間連続して投与したことにより蓄積されたベンゾピレンの毒性によって発生する神経症状についてはその改善効果が十分では無いことが示唆された。ケイヒなどの生薬は、その効果が出るまで服用期間が長いことが多く、症状の程度に合わせて服用量を決めることが一般的である。従って、ベンゾピレンの暴露期間、症状の程度に合わせてケイヒの投与濃度や期間を検討する必要があると考えられる。

本研究の結果から、ベンゾピレンの 2 週間連続投与は単回投与による急性中毒よりもその毒性が触・圧覚を伝える Aβ線維に強く作用し、脱髄（脱ミエリン）を起こすことで、感覚異常等を発生させる可能性が示唆された。また、その作用はベンゾピレン単回投与時に有効であった 3mg/kg ケイヒの濃度では症状改善に有効ではないことが示唆された。

E．結論

本研究の結果から、ダイオキシン類による急性中毒に有効である抗酸化作用と AHR 活性阻害作用を持つケイヒ等の植物成分や生薬でもダイオキシン類の暴露期間や症状により、その濃度や服用期間を検討する必要が示唆された。また、ダイオキシン類の中毒に有効性があるケイヒなどの生薬を日頃服用することで、ダイオキシン類の急性暴露による体内の作用を抑制させることができる可能性を示唆する。今後、更なる研究を通して、ダイオキシン類の慢性中毒に対するケイヒの効果的な濃度や服用期間を検討する必要がある。

引用文献

1) 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.

2) 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.

3) 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.

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) 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.

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) 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.

11) 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.

12) 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

① **申敏哲**, 行平崇, 小牧龍二, 福永貴之, 土井篤, 吉村惠. ベンゾピレン投与ラットでの生薬の効果検討. 第 71 回西日本生理学会. 2020 年 11 月 7 日.

② **申敏哲**, 吉村惠, 行平崇, 小牧龍二, 福永貴之, 田中哲子, 土井篤. ベンゾピレン投与ラットでの生薬の検討. 第 73 回 日本薬理学会西南部会. 2020 年 11 月 21 日.

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得

無し

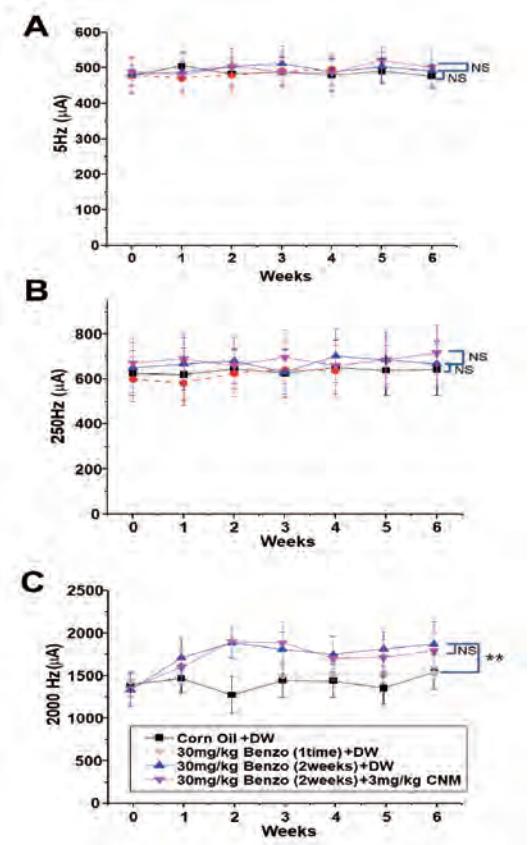
２．実用新案登録

無し

３．その他

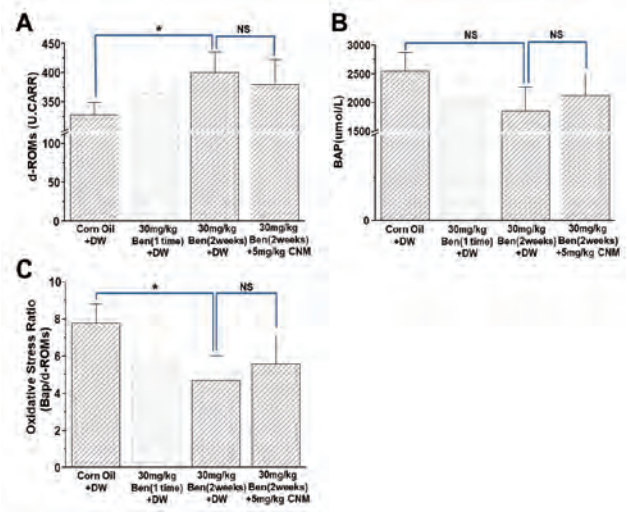
無し

Fig 1. ベンゾピレン 2 週間投与後蒸留水投与又はベンゾピレン 2 週間投与後ケイヒを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。



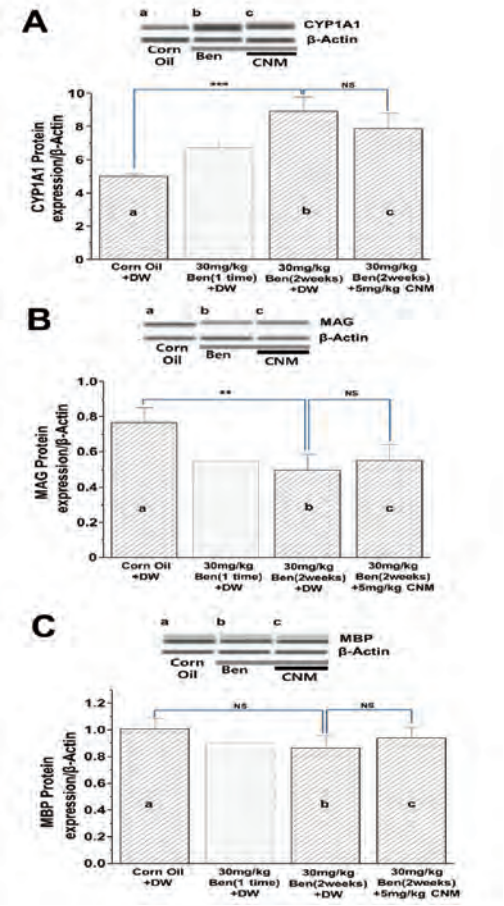
A, 5 Hz 電気刺激周波数. B, 250 Hz 電気刺激周波数. C, 2000 Hz 電気刺激周波数. DW, 蒸留水; Ben, ベンゾピレン ; CNM, ケイヒ ; NS, no significant ; **, P<0.01; Mean±S.D. n=10.

Fig 2. ベンゾピレン 2 週間投与後蒸留水投与又はベンゾピレン 2 週間投与後ケイヒを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. DW, 蒸留水; Ben, ベンゾピレン ; CNM, ケイヒ ; NS, no significant ; *, P<0.05; Mean±S.E. n=10.

Fig3. ベンゾピレン 2 週間投与後蒸留水投与又はベンゾピレン 2 週間投与後ケイヒを投与が CYP1A1、MAG、MBP タンパク質の変化に及ぼす影響。



A, cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1). B, myelin-associated glycoprotein (MAG). C, myelin basic protein (MBP). DW, 蒸留水; Ben, ベンゾピレン ; CNM, ケイヒ ; NS, no significant ; **, P<0.01; ***, P<0.001;Mean±S.E. n=10.

分担研究報告書

芳香族炭化水素受容体による皮膚アレルギーの制御機構に関する研究

研究分担者　　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　ダイオキシン類中毒は塩素痤瘡を発生させ、実験動物の皮膚炎の増悪を来す。これまでの我々の研究から、ダイオキシン受容体である芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor; AHR)の活性化は皮膚バリア機能調節に欠かせない調節軸であることが明らかになった。しかしながら、AHR、皮膚バリア機能調節、皮膚炎、塩素痤瘡を関連させながら、その発症病態を説明しうる病態概念がいまのところ存在しない。本研究ではさまざまな文献を調査集積し、酸化ストレスに関する実験も行い、最終的に皮膚バリア機能は、AHR 軸（バリア亢進）と IL-13/IL-4- JAK-STAT6/STAT3 軸（バリア抑制）がちょうどシーソーのように競合しあって調節されているという概念に到達した。また塩素痤瘡は、表皮細胞とりわけ脂腺細胞の AHR がダイオキシン類によって過剰に活性化され、表皮細胞化生が起こり、脂腺が消失することによって発生すると考えられた。このような概念の提示は、皮膚炎や塩素痤瘡の今後の治療薬の開発に寄与すると考えた。

A．研究目的

皮膚アレルギーすなわち皮膚炎の発症には皮膚バリア機能障害が重要である。芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor; AHR)はダイオキシン受容体とも呼ばれ、ダイオキシン類が結合すると塩素痤瘡や色素沈着を引き起こし、マウスの研究では皮膚炎を増悪させる可能性が示唆されている。一方、AHR の活性化は皮膚バリア機能を亢進させることを我々は報告してきた。すなわち、ダイオキシンによる過剰な AHR 活性化は強い酸化ストレスとバリア破綻を引き起こすが、抗酸化性 AHR リガンドなどは AHR を適度に活性化させ皮膚バリア機能を適度に亢進させ、抗酸化作用を示すと考えられる。AHR のこの２面性は油症の発症とその治療を考えるうえで、極めて重要な点である。しかしながらこの２面性を詳述した報告は少ない。本研究では、我々の様々な研究に加えこれまでの文献報告を調査集積し、皮膚バリア調節機構加えて塩素痤瘡の発症機構を説明しうる概念を創出することを目的とした。加えて、その概念を説明する上で、不確かと思われる現象については実験を行い確証を得ることとした。

B．研究方法

最近の皮膚バリア機構と AHR に関する研究の多くは我々の研究成果であった。ダイオキシンに皮膚角化促進に関する報告の端緒は、Loertscher らの 2002 年にさかのぼり、Kennedy ら 2013 年の秀逸な報告によって詳述されていた。

さてバリア機能障害を来す皮膚炎でその病態解明が進んでいるのはアトピー性皮膚炎である。アトピー性皮膚炎では IL-13/IL-4 シグナル軸が過剰となりバリア障害が発生する。そこでアトピー性皮膚炎の病態に関する文献も調査集積した。

IL-13/IL-4 シグナルが表皮細胞に酸化ストレスを引き起こすかどうかの研究報告は見当たらなかったので、培養表

皮細胞に IL-13/IL-4 を作用させ、reactive oxygen species の産生を確認した。

C．研究結果

我々および他の研究室の報告から、AHR を活性化すると皮膚バリア蛋白群の産生が亢進し皮膚バリア機能が上昇することが明らかになった。
一方、IL-13/IL-4 は JAK-STAT6/STAT3 経路を活性化し、皮膚バリア蛋白群の産生を抑制し皮膚バリア機能障害を起こすことが明らかになった。加えて、本研究の実験結果から、IL-13/IL-4 は表皮細胞の ROS 産生を著明に惹起することも明らかになった。

アトピー性皮膚炎の治療薬として古くから臨床応用されてきたコールタールやグリテールは AHR を活性化しバリア機能を亢進させ、また NRF2 と呼ばれる転写因子も活性化させ抗酸化機能を発揮することも明らかになった。

以上のことから、皮膚バリア機能は、AHR 軸（バリア亢進）と IL-13/IL-4- JAK-STAT6/STAT3 軸（バリア抑制）がちょうどシーソーのように競合するように互いに調節しあっているという概念に到達した。

IL-13/IL-4- JAK-STAT6/STAT3 軸はバリア障害のみならず、酸化ストレスも惹起している。AHR 軸そのものは抗酸化作用を直接的に持ち合わせていない。そのため、NRF2 も同時に活性化する抗酸化性 AHR リガンドのみが IL-13/IL-4- JAK-STAT6/STAT3 軸を総合的に抑制し皮膚炎の治療薬としての活性を持つと考えるに至った。

塩素痤瘡は代謝分解されづらいダイオキシン類が AHR 軸を過剰に活性化するために表皮細胞の角化が異常に亢進することで発生すると考えられる。特に脂腺細胞の AHR が過剰に活性化されると、皮脂分泌能が消失し、脂腺細胞が表皮細胞化生してしまう。そのため毛嚢の脂腺が消失するため、毛嚢が嚢腫化する。これが塩素痤瘡の発症病態の根幹と考えられる。

D．考察

本研究によって、皮膚バリア機能は、AHR 軸（バリア亢進）と IL-13/IL-4- JAK-STAT6/STAT3 軸（バリア抑制）がちょうどシーソーのように競合するように互いに調節しあっているという新規の概念に到達しえた。

E．結論

皮膚バリア機能は、AHR 軸（バリア亢進）と IL-13/IL-4- JAK-STAT6/STAT3 軸（バリア抑制）によって競合的に調節されるという概念は、皮膚炎の新規治療薬の開発に画期的な進歩をもたらすと考える。

F．研究発表

１．論文発表

古江増隆、アトピー性皮膚炎の発症機序；AHR 軸と IL-13/IL-4-JAK-STAT6/STAT3 軸による競合的皮膚バリア調節機構、日皮会誌、印刷中

古江増隆、油症における塩素痤瘡と色素沈着の発症機序とその対策　－aryl hydrocarbon receptor の役割―、福岡医誌　印刷中

G．知的財産権の出願・登録状況

とくに無し。

分担研究報告書

ベンゾピレンによる皮膚障害に対する生薬成分バイカレインの効果の検討

研究分担者　古江　増隆　九州大学大学院医学研究院皮膚科学　教授
研究協力者　田中　由香　九州大学大学院医学研究院皮膚科学　学術研究員

研究要旨　環境汚染物質の多くはダイオキシン受容体 AhR を介して皮膚細胞を障害する。生薬黄芩の有効成分バイカレインは AhR リガンドの作用に拮抗することから、本研究では環境汚染物質・ベンゾピレンの障害に対するバイカレインの影響の評価と、その作用機序の解明を目的とした。表皮細胞の解析により、バイカレインが Src リン酸化の抑制を介した AHR 経路阻害と NRF2-HMOX1 抗酸化経路活性化により、ベンゾピレンによる炎症・酸化ストレスから皮膚を保護することを明らかにした。またバイカレインを含む方剤も同様の作用を示したことから、炎症初見の強い油症患者に対してはバイカレインを含む黄連解毒湯とシンナムアルデヒドを含む桂枝茯苓丸を組み合わせることで、より大きな効果が得られる可能性が示唆された。

A．研究目的

ダイオキシン類を含む環境汚染物質の多くは、ダイオキシン受容体 AhR を介して毒性を発揮することが知られており、AhR を阻害することでその障害を緩和できる可能性がある。生薬黄芩の有効成分であるバイカレインは、AhR リガンドの作用に拮抗することから、本研究では環境汚染物質ベンゾピレンの障害に対するバイカレインの影響の評価と、その作用機序の解明を目的とした。

B．研究方法

培養ヒト表皮細胞にベンゾピレンを作用させ、CYP1A1 発現、炎症性サイトカイン(IL-1A、IL-1B)発現、Src リン酸化、抗酸化酵素 HMOX1 発現、NRF2 核内移行、活性酸素種(ROS)産生、AhR 核内移行、に対するバイカレインの影響を定量 RT-PCR、ウエスタンブロット、フローサイトメトリー、蛍光免疫染色法を用いて評価した。

また、バイカレインを含有する生薬(黄芩)と漢方薬(黄連解毒湯)にも、ベンゾピレンの作用を抑制する効果があるか検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、研究目的での使用に関して同意を得て販売されている培養ヒト表皮細胞を使用しており、倫理面の問題はないと判断した。

C．研究結果

ベンゾピレンの作用に対するバイカレインの影響を評価するため、培養ヒト表皮細胞(NHEK、HaCaT)を用いてベンゾピレン及びバイカレインの添加培養を行い、CYP1A1 及び炎症性サイトカインの発現を評価した。その結果、バイカレインは培養ヒト表皮細胞においてベンゾピレン誘導性の CYP1A1 発現を抑制しており(図 1A、B)、バイカレインを含有する黄芩と黄連解毒湯も、バイカレイン同様の効果を示した(図 1C)。またバイカレインは、ベンゾピレン誘導性の IL-1A・IL-1B の発現も有意に抑制した(図 1D-I)。

次に、抗酸化経路に対するバイカレインの効果を評価した。その結果、表皮細胞にバイカレインを作用させることで抗酸化

遺伝子を誘導する転写因子であるNRF2の核内移行が誘導され(図2A、B)、NRF2下流の抗酸化酵素 HMOX1 の発現が誘導された(図2C、D)。この結果と一致して、バイカレインを添加することでベンゾピレン誘導性のROS産生が有意に抑制された(図3A、B)。

バイカレインが AhR リガンドの作用に拮抗する作用機序を明らかにするため、AhRと複合体を形成しAhRの核内移行に関与するタンパク質 Src のリン酸化状態を評価したところ、バイカレインはベンゾピレンによるSrcリン酸化を抑制しており、それに伴って AhR の核内移行が抑制されていることが明らかになった(図4A-C)。

以上の結果から、バイカレインは Src リン酸化の抑制を介して AhR 経路を阻害するとともに、NRF2-HMOX1 抗酸化経路を活性化することで、ベンゾピレンの作用を阻害し、ベンゾピレンが引き起こす障害から皮膚細胞を保護することが示唆された。

D．考察

ダイオキシン類を含む環境汚染物質の多くはAhRを介して毒性を発揮するため、AhR を阻害することでその障害を緩和できる可能性がある。これまでにも、植物・生薬由来の成分がAhRを阻害し、ベンゾピレンの作用を阻害することが明らかにされている。

本研究では、生薬黄芩の主要な有効成分バイカレインが AhR 経路と抗酸化経路の両者に作用することで、ベンゾピレンによる障害を抑えることを明らかにした。通常 AhR は複数のタンパク質と複合体を形成し細胞質に留まるが、AhR リガンドの刺激を受けることで複合体から切り離されて核内へ移行し、CYP1A1 など薬物代謝酵素の転写を誘導する。この複合体を構成するタンパク質のうち、Src のリン酸化を阻害すると AhR の核内移行が抑制されることが知られている。バイカレインはベンゾピレによって誘導された Src のリン酸化を抑制していたことから、Src の阻害を介してAhRの核内移行を妨げ、ベンゾピレンの作用を減弱させた可能性が示唆される。

また、これまでの研究において、桂皮の香り成分であるシンナムアルデヒドがベンゾピレンの作用に拮抗し、シンナムアルデヒドを含有する桂枝茯苓丸が油症患者において皮膚症状を緩和することを明らかにしてきたことから、炎症初見の強い油症患者に対しては、バイカレインを含む黄連解毒湯とシンナムアルデヒドを含む桂枝茯苓丸を組み合わせることで、より大きな効果が得られると期待される。

E．結論

バイカレインがSrcを介したAHR経路の阻害と、NRF2-HMOX1 抗酸化経路の活性化によって、ベンゾピレンによる炎症・酸化ストレスから皮膚細胞を保護し得ることを明らかにし、バイカレインを含む黄連解毒湯が油症の症状を緩和する可能性が示唆された。

F．研究発表

１．論文発表

Baicalein inhibits benzo[a]pyrene-induced toxic response by downregulating Src phosphorylation and by upregulating NRF2-HMOX1 system.

Antioxidants, 9:507, 2020.

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

図１

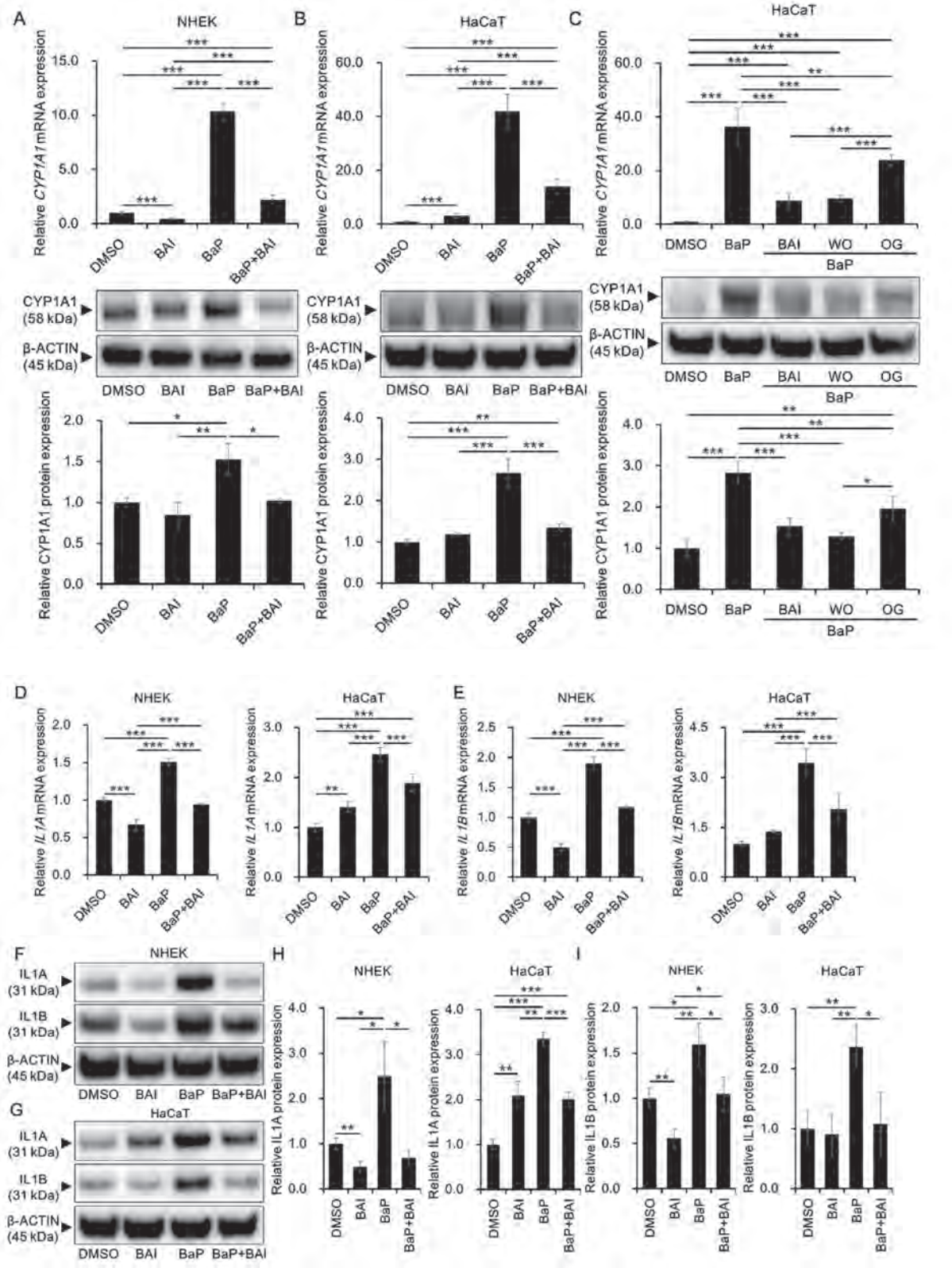


図１　バイカレインはベンゾピレン誘導性の CYP1A1、及び炎症性サイトカインの発現を抑制する
(BAI：バイカレイン、BaP：ベンゾピレン、WO：黄芩、OG：黄連解毒湯。$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$、$^{***}P < 0.001$)

図 2

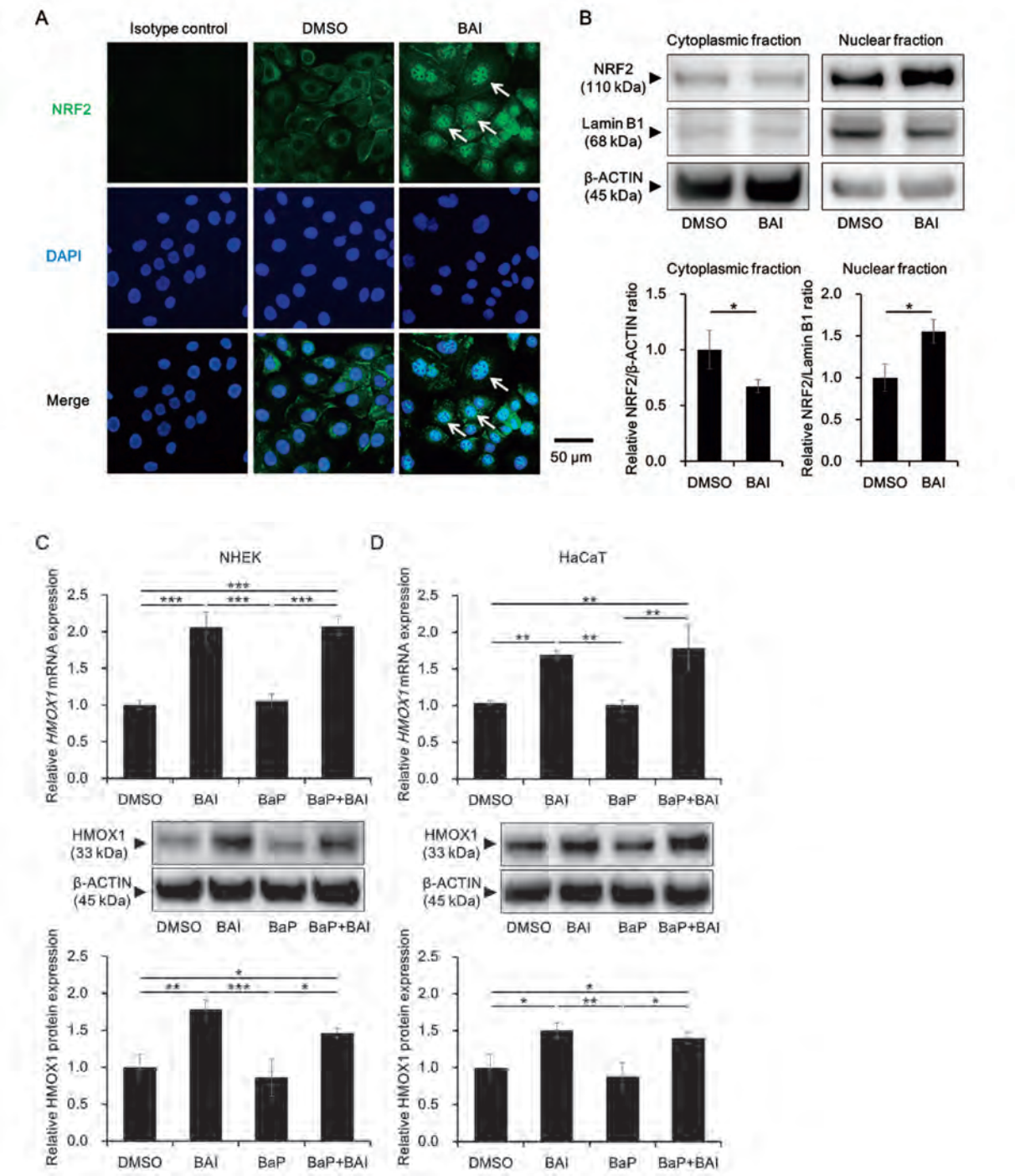


図 2　バイカレインは NRF2 の核内移行を誘導し、抗酸化酵素 HMOX1 の発現を誘導する
（矢印：核内移行した NRF2、BAI：バイカレイン、BaP：ベンゾピレン。$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$、$^{***}P < 0.001$）

図 3

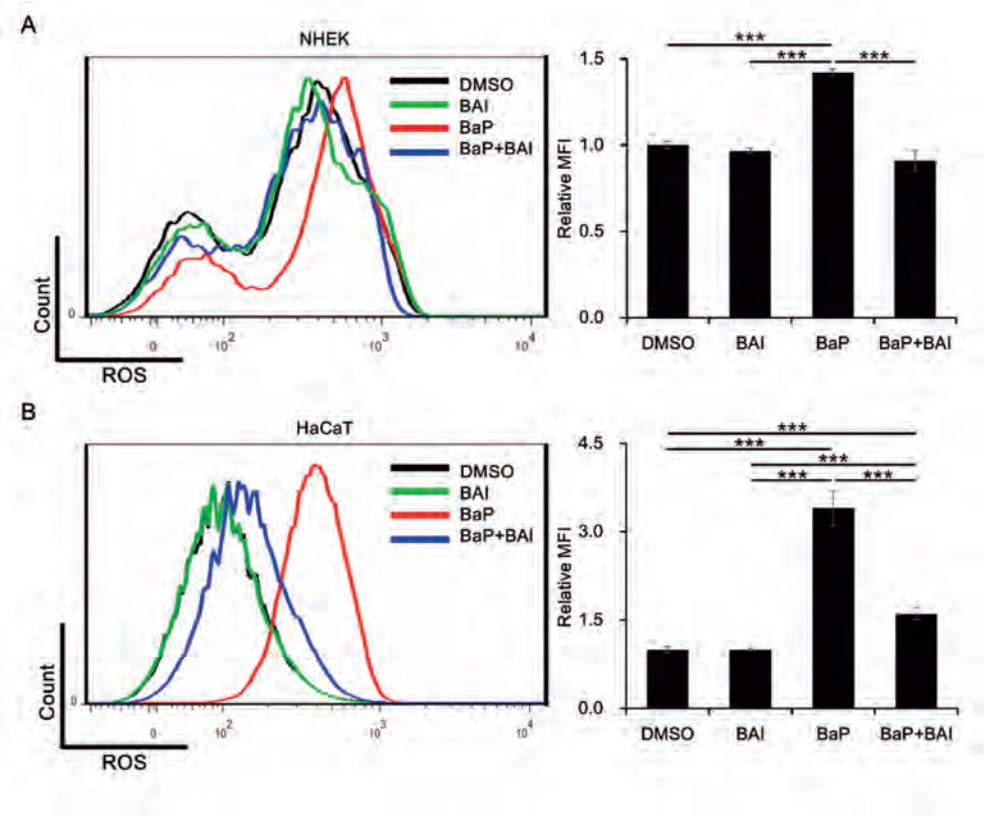


図 3　バイカレインはベンゾピレン誘導性の ROS 産生を抑制する

(BAI：バイカレイン、BaP：ベンゾピレン。$^{***}P < 0.001$)

図 4

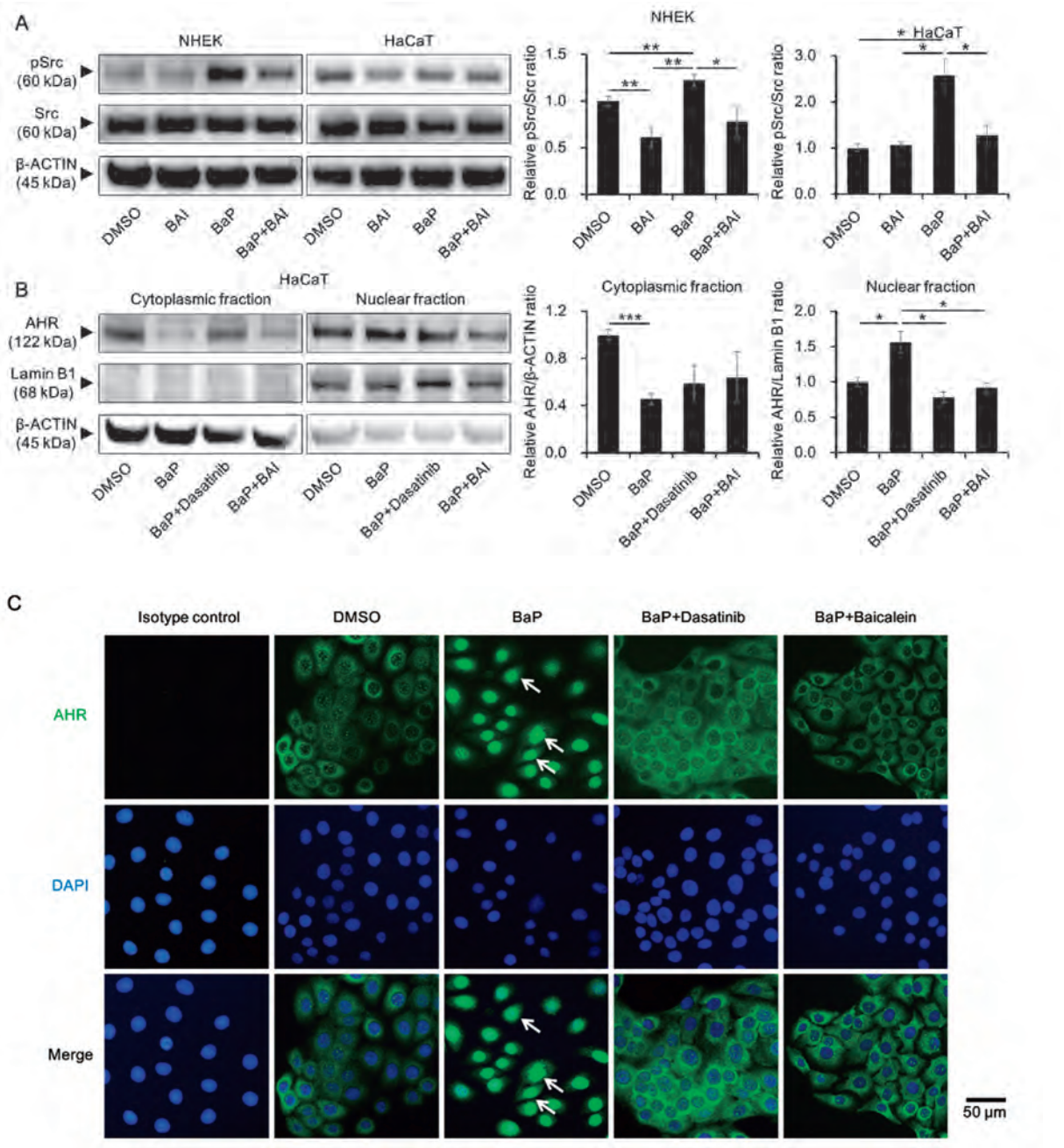


図 4　バイカレインは Src リン酸化の抑制によりベンゾピレン誘導性の AhR 核内移行を阻害する
（矢印：核内移行した AhR、BAI：バイカレイン、BaP：ベンゾピレン。$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$）

分担研究報告書

2,4,6-三塩素置換PCB異性体PCB154の動物肝ミクロゾームによる代謝

研究分担者　古賀　信幸　　中村学園大学栄養科学部　教授
研究協力者　太田　千穂　　中村学園大学栄養科学部　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 2,4,5,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB154)につき、今年度はラット肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べ、PCB153 および PCB155 の代謝パターンと比較した。まず、phenobarbital (PB)前処理 Ms により生成される代謝物を GC-MS で調べたところ、2 つの代謝物（M1、M2）の生成が確認された。M1 が主代謝物で、M2 は微量代謝物であった。両代謝物（メチル化体）は、いずれも PCB154 より m/z 30 大きく、分子量 388 であることから、一水酸化(OH)体（メチル化体）であることが明らかになった。次に主代謝物 M1(メチル化体) の GC-MS における保持時間およびマスフラグメンテーションを、別途合成した 3'-MeO-PCB154 と比較したところ、ほぼ完全に一致した。さらに、主代謝物 M1 の生成活性を調べたところ、その活性は PB および dexamethazone (DEX)前処理 Ms で、それぞれ 556 および 62 pmol/hr/mg protein であった。未処理および 3-methylcholanthrene (MC)前処理の場合には、M1 の生成は全く見られなかった。以上の結果から、①PCB154 は、2,4,6-三塩素置換ベンゼン側の *meta* 位が主に水酸化されること、②M1 の生成には PB 誘導性の CYP2B1 が強く関与すること、③3-あるいは 3'-OH 体の生成され易さは、PCB155>>PCB154>PCB153 であることが明らかになった。

A. 研究目的

周知の通り、PCB異性体のうち、2,4,5-三塩素置換ベンゼンあるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有するもの（以下、245型および2345型とする）は、ヒト血液中や肝臓中で高濃度残留している。Todakaらは、油症患者および健常者のいずれでも、特に、2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (hexaCB) (PCB153) 、 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (heptaCB) (PCB180)および2,2',3,4,4',5'-hexaCB (PCB138)が最も多いこと、また、これらは油症患者で健常者の1.6～2.2倍多いこと、を報告した。

一方、当研究室ではこれまでに、2345型で2,4,6-三塩素置換ベンゼン（246型）から成るPCB182の代謝を、ラットおよびモルモット肝ミクロゾーム(Ms)を用いて調べ、その結果、いずれの動物肝Msも代謝物M1（3'-OH体）を生成すること、さらに、phenobarbital (PB)前処理ラットでは、245型のheptaCB (PCB180、PCB183、PCB187)に比べ、10～50倍もの高い活性でM1を生成することを明らかにした。さらに、246型のPCB188についても検討し、その結果、PCB182と同様に比較的容易にM1（3'-OH体）へと代謝されることを明らかにした。

ところで、246型のPCB異性体(PCB155、PCB182、PCB188)はヒト組織中からほとんど検出されていない。これらが、なぜ低残留性であるかという大きな理由は代謝されやすさにあると思われる。本研究では、この点をさらに確かめるため、245型と246型の両方の型であるPCB154についてラット肝Msによる代謝パターンを調べ、245型のPCB153および246型のPCB155と比較した(Fig. 1)。

B. 研究方法

① PCB154 合成：2,4,5-trichloroaniline および 1,3,5-trichlorobenzene を、tetrachloroethylene に溶解し、isopentyl nitrite を添加後、110℃で 24 時間反応させた。反応液を

chloroform で抽出後、アルミナカラムおよびシリカゲルカラムにかけ、最終的に分取用 HPLC で精製した。HPLC の分析条件は以下の通りである。収量は 140 mg で純度は 95.5% (GC-ECD による)であった。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 予想代謝物 3'-MeO-PCB154 の合成：2,4,5-trichloroaniline および 2,4,6-trichloroanisole を合成原料とし、以下、PCB154 合成と同様に行った。③ ラット肝 Ms の調製：Wistar 系雄性ラット（体重約 220g）を各群 4 匹ずつ合計 16 匹用いた。ラット肝 Ms は、未処理群、PB 前処理群（80 mg/kg 体重 × 3 日間）、3-methylcholanthrene (MC) 前処理群（20 mg/kg 体重 × 3 日間）および dexamethazone (DEX)前処理群（100 mg/kg 体重 × 3 日間）のラットから、常法により調製した。④ 肝 Ms による PCB154 代謝：40 μM PCB154 を NADPH 生成系(0.33 mM NADP、5 mM glucose-6-phosphate、glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.0 unit)、6 mM $MgCl_2$、ラット肝 Ms (1 mg protein)および 100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)とともに合計 1.0 mL として、37℃で 60 min インキュベート後、反応液に chloroform-methanol (2:1) 1 mL と n-hexane 3 mL を加えボルテックスで振とう抽出した。抽出は 2 回行い、有機層を合わせて濃縮後、diazomethane でメチル化し、GC-ECD で代謝物の定量を行った。GC-ECD の測定条件は以下の通りである。分析機器、GC-ECD7890B（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、高純度 N_2 (6.5 mL/min)；カラム温度、210℃；注入口温度、250℃；検出器温度、300℃。また、一部を分子量測定のため GC-MS に付した。GC-MS の測定条件は次の通りである。分析機器、GCMS-QP2010（島津製）；カラム、DB-1 フューズドキャピラリーカラム（30 m × 0.25 mm i.d.、0.25 μm フィルム厚、J&W Scientific 製）；キャリアーガス、He (1 mL/min)；カラム温度、70℃ (1.5 min) - 20℃/min - 230℃ (0.5 min) - 4℃/min - 280℃ (5 min)；注入口温度、250℃；検出器温度、230℃。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

ラット肝 Ms により生成された代謝物の化学構造：PCB154 を、NADPH 存在下、好気的にラット肝 Ms とともに、37℃、60 min 反応させた。Fig. 2 には、PB 前処理ラット肝 Ms により生成された PCB154 代謝物（メチル化体）の GC-MS による分析結果を示す。PCB154（保持時間 12.68 min）に続き、2 つの代謝物ピークが保持時間 14.33 min および 14.46 min に検出された。主代謝物である後者を M1 とし、前者を M2 とした。両代謝物（メチル化体）は、いずれも分子量 388 であり、PCB154 の分子量より m/z 30 大きいことから、いずれも一水酸化体（メチル化体）であることが明らかになった。

次に、PCB154 代謝物の GC-MS の結果を Table 1 に示す。主代謝物 M1 は、保持時間およびフラグメンテーションが、別途合成した 3'-MeO-PCB154 と、ほぼ完全に一致した。これらの結果から、M1 は 3'-OH 体であると推定された。一方、M2 については、3-OH 体であると考えられるが、現在のところ、不明である。

ラット肝MsのPCB154代謝活性：4種類のラット肝Ms によるPCB154代謝活性をTable 2に示す。なお、主代謝物M1につき、PCB154 の検量線を用いて定量した。PBおよびDEX前処理Msでのみ、M1が生成され、その生成活性は、それぞれ556および62 pmol/hr/mg proteinであった。一方、未処理およびMC前処理Msでは代謝物は全く生成されなかった。なお、M2に

ついてはPB前処理Msでのみ生成が確認されたが極微量のため定量には至らなかった。

D. 考察

今回、ラット肝 Ms を用いて PCB154 代謝を調べたところ、PCB154 は PB および DEX 前処理 Ms により、比較的容易に代謝され、2 種類の一水酸化体（M1, M2）に変換されることが明らかになった。このうち、主代謝物の M1 は、合成標品との比較により、3'-OH-PCB154 であることが判明した(Fig. 3)。微量代謝物の M2 は、恐らく、3-OH 体と考えられる。これらの結果を、既報の PCB153 および PCB155 の結果と比較すると、M1 の生成量は、PCB155>>PCB154 > PCB153 の順であった (Table 2)。

これらの結果から、PCB154 代謝には、PB 前処理により顕著に誘導されるラット CYP2B1 が関与すること、また、この CYP は 2,4,5-三塩素置換ベンゼン側の *meta* 位よりも 2,4,6-三塩素置換ベンゼン側の *meta* 位に対し、より強い水酸化活性を有していることが示唆された。しかしながら、246 型 PCB 異性体では、なぜ 245 型 PCB 異性体に比べ、10 倍以上も代謝され易くなるのかという点は不明である。なお、PCB153、PCB154 および PCB155 の *ortho* 位における置換塩素数が、それぞれ 2 個、3 個および 4 個であることを考えると、2 つのベンゼン環が回転して、より立体的になった方が CYP2B1 にとっては良い基質になるのかもしれない。

E. 結論

PCB154は、PB誘導性のラットCYP2B1により、2種類の一水酸化体（3'-OH体>>3-OH体）へと代謝されること、また、CYP2B1は、245型PCB異性体よりも、246型PCB異性体の*meta*位をより強く水酸化することが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1．論文発表

1) Y. Fujii, K. Harada, T. Nakamura, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, A. Koizumi and K. Haraguchi, Perfluorinated carboxylic acids in edible clams: A possible exposure source of perfluorooctanoic acid for Japanese population. Environ. Pollut., **263**, in press (2020).

2) O. Kimura, Y. Fujii, K. Haraguchi, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga and T. Endo, Effects of perfluoroalkyl carboxylic acids on the uptake of sulfobromophthalein via organic anion transporting polypeptides in human intestinal Caco-2 cells. Biochem. Biophys. Rep., doi: 10.1016/j.bbrep.2020. 100807 (2020).

2．学会発表

1) 太田千穂，山本健太，木村　治，藤井由希子，原口浩一，加藤善久，古賀信幸，Quercetin pentamethylether のラット、モルモットおよびヒト肝酵素による代謝．　第 74 回日本栄養・食糧学会大会（東北大学川内北キャンパス、仙台），講演要旨集 p. 262. 令和 2 年 5 月 15-17 日．（5/17, 3B-07a）

2) 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酵素による in vitro 代謝および抗酸化特性. 令和 2 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会（崇城大学、熊本）A-13，令和 2 年 11 月 28, 29 日（オンライン口演発表）．

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

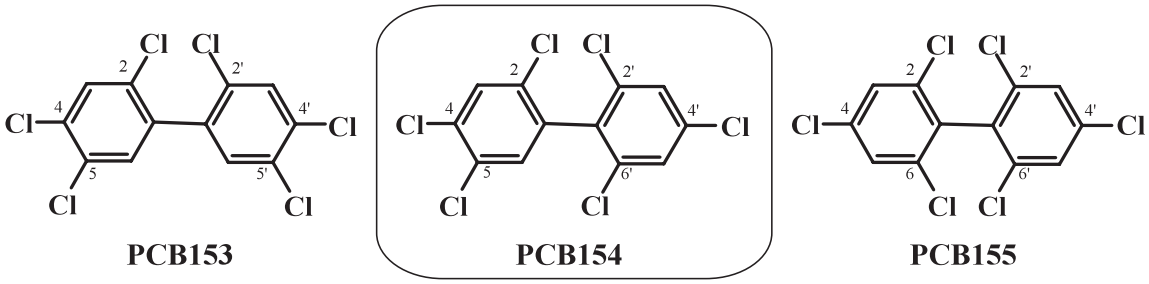
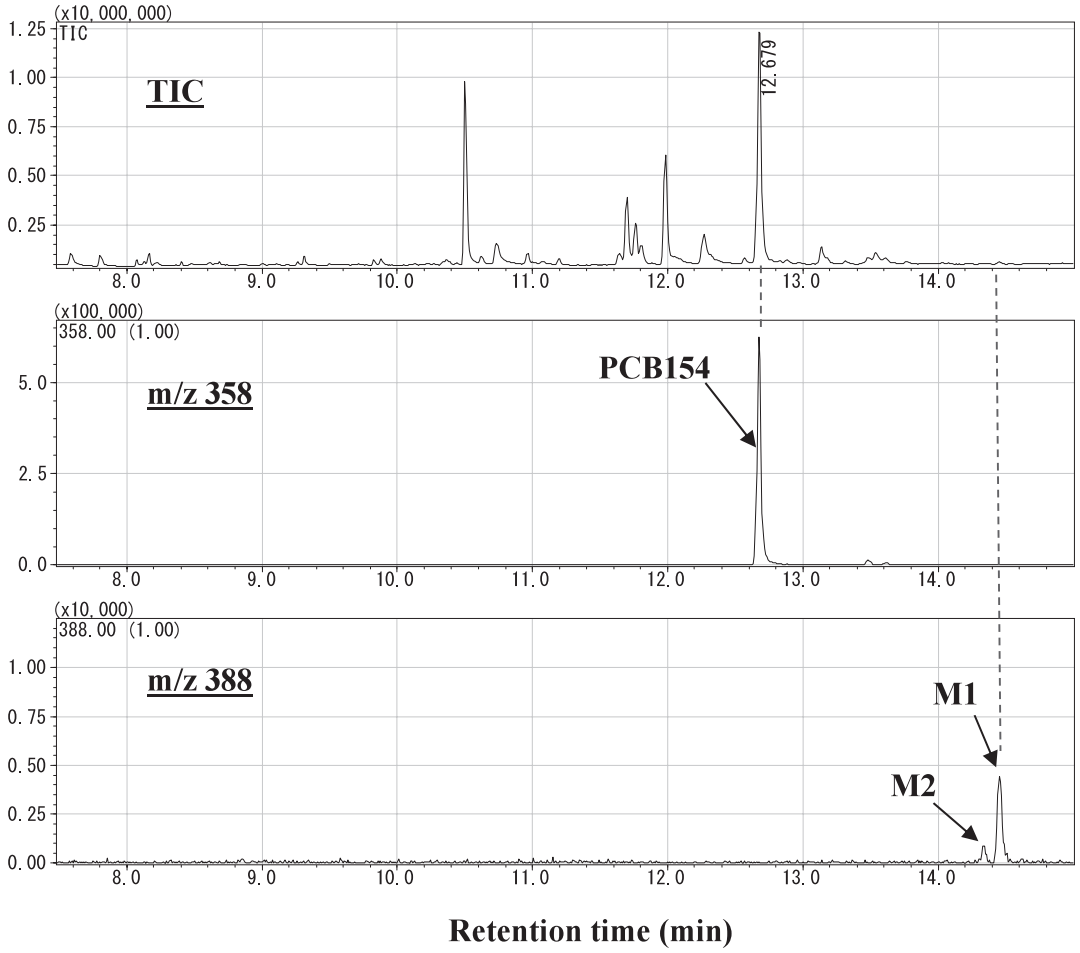


Fig. 1　Chemical structures of PCB153, PCB154 and PCB155

(A) Mass chromatograms



(B) Mass spectra of M1 and M2

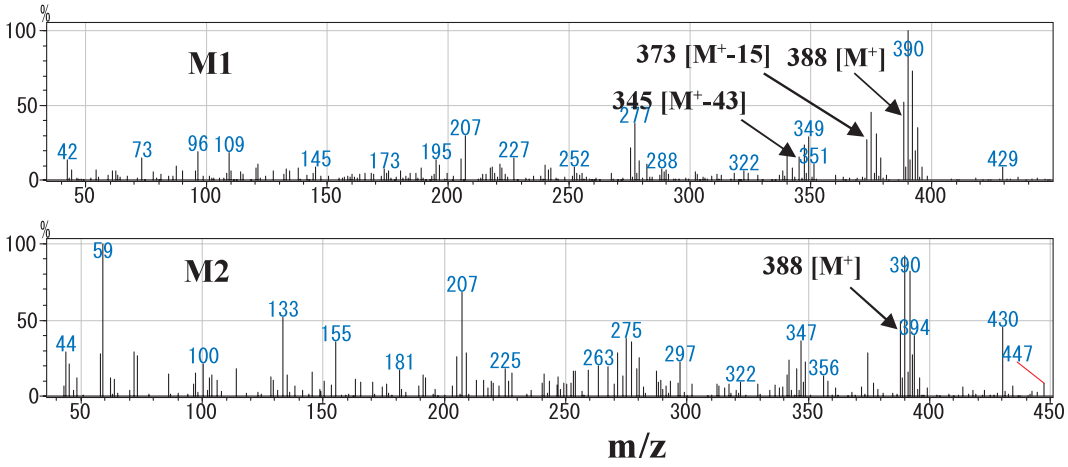


Fig. 2 GC-MS analysis of the methylated derivatives of two PCB154 metabolites formed by liver microsomes of PB-treated rats
(A) Mass chromatograms (B) Mass spectra of M1 and M2

Table 1　Mass spectral data and retention times of PCB154 and the methylated derivatives of M1 and M2

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min) in GC-MS
		$[M^+]$	$[M^+-15]$	$[M^+-35]$	$[M^+-43]$	$[M^+-50]$	$[M^+-70]$	
PCB154	358	100	-	5	-	-	74	12.68
M2	388	100	13	-	36	-	-	14.33
M1	388	100	53	-	31	-	-	14.46
3’-MeO-PCB154	388	100	51	-	30	-	-	14.46

-, not detected.

Table 2　Metabolism of PCB153, PCB154 and PCB155 by liver microsomes of untreated, PB-treated, MC-treated and DEX-treated rats

	M1 formed (pmol/hr/mg protein)		
Treatment	PCB153	PCB154	PCB155
None	N.D.	N.D.	N.D.
PB-treated	N.D.	556 ± 139	4,662 ± 201
MC-treated	N.D.	N.D.	N.D.
DEX-treated	N.D.	62 ± 23	321 ± 23

N.D., not detected.　M1 means 3’-OH-PCB154 and 3-OH-PCB155.
Each value represents the mean ± S.D. of four rats.

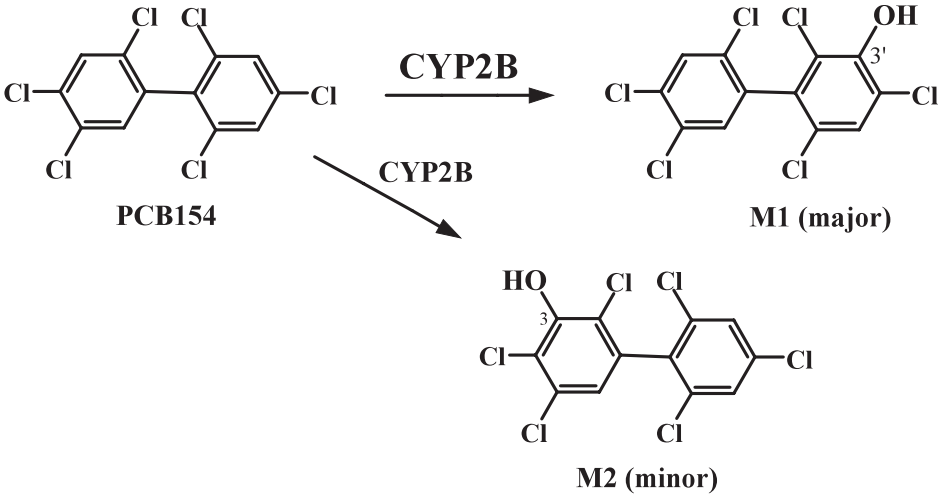


Fig. 3　Postulated metabolic pathways of PCB154 in rat liver

分担研究報告書

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析：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、AHR には、脳の性分化が起こる周産期及び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。 そこで、さらに、ダイオキシンによる出生児性未成熟の機構における AHR の役割を明らかにするため、ダイオキシン暴露しない AHR 欠損ラットを調べ、脳の雄優位の性的二型核 (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, SDN-POA)の体積が AHR 欠損雄児において有意に小さいことが分かった。次いで、思春期の血中 testosterone 低下の機構を調べるために、精巣における testosterone 合成酵素と testosterone 代謝酵素の発現レベルを調べた。合成酵素に関しては、有意な変動はなかったものの、cytochrome P450 17 (CYP17)に減少傾向があった。これは、testosterone の低下と同じ方向性のものである。一方、代謝酵素では、検討したいずれの酵素にも AHR 欠損による著しい発現変動は認められなかった。そこで、精巣重量に着目したところ、AHR 欠損ラットにおいて、思春期の精巣サイズが小さい可能性が浮上した。精巣のサイズに関係する遺伝子について、線維芽細胞成長因子 fibroblast growth factor (FGF)および FGF 受容体 (FGFR)の発現レベルが有意に増加していることが明らかになった。これらのことから、AHR は FGF および FGFR を直接あるいは間接的に調節している可能性がある。このように、AHR の脳性分化と性腺成熟における重要性が示されつつある。

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。平成 30 年度および令和元年度の検討により、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。一方、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。このように、AHR には臨界期及び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。

そこで、本研究では、AHR 欠損が脳の雄優位の性的二型核(sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, SDN-POA)の体積へ及ぼす影響を調べ、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、testosterone 低下の機構について検証した。当研究室の先行研究 (15)および平成 30 年度、令和元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２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^{TM} 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。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 週齢及び 8 週齢にて実験に供した。生後 (PND) 28 、4 週齢の雄児はパラホルムアルデヒド (4% in 0.1 M PBS) にて灌流固定した。4˚C の パラホルムアルデヒド (4% in 0.1 M PBS) 中で 1 ~ 2 日浸したのち、10 - 30% の スクロース溶液 (in 0.1 M PBS) で置換したのち、脳を OCT compound で包埋し、-80˚C にて凍結保存した。

2. 免疫染色

(1) 脳切片の作製

脳の凍結ブロックを背側から腹側に向かって冠状面を削り出したのち、50 μm 厚に連続して薄切した。脳切片は適切な大きさのプレート内に一枚ずついれ、各穴に 50 mM PBS を 1 mL 入れたのち、室温に出し不要な OCT compound を溶かした。

(2) Calbindin 染色

(1) によって得られた脳切片は、0.1 M PBS で 15 分間× 3 回洗浄したのち、10% HS 中で 37°C 30 分間静置した。次に、0.1 M PBS で 5 分間× 3 回洗浄し、一次抗体液中で 4°C 60 時間静置した。その後、0.1 M PBS で 10 分間× 3 回洗浄し、ビオチン化二次抗体液中で 25°C 1 時間静置した。再度、0.1 M PBS で 10 分間× 3 回洗浄したのち、ストレプトアビジン溶液中で 25℃、1 時間静置した。再度、0.1 M PBS で 10 分間 ×3 回洗浄したのち、脳切片をスライドガラスに貼りつけた。作製したスライドガラスを共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いて 20 倍レンズで Zstack (ピッチ: 4.0 μm) 撮影を行い観察した。画像取得のためのソフトウェアは ZEN 2011 Black edition (Carl Zeiss) を用いた。使用した抗体の希釈倍率は以下の通りである。

10% HS (10% donor horse serum, 0.05% triton X-100, 10 mM NaN_3, PBS)

1% HS (1% donor horse serum, 0.05% triton X-100, 10 mM NaN_3, PBS)

一次抗体 : Anti-Calbindin antibody 原液を 1% HS にて 1,000 倍希釈した。

ビオチン化二次抗体 : Biotinylated anti-mouse IgG (H+L) antibody 原液を 1% HS にて 250 倍希釈した。

ストレプトアビジン液 : 使用時に Streptavidin Alexa Fluor® 488 conjugated 原液を 1% HS にて 500 倍希釈した。

3. 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 : A30-106 及び A20-060。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 及び 1-9)。

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 欠損が出生児に与える影響を調べた。AHR 欠損により、神経レベルで脳の性分化に障害を及ぼすか否かを検証するため、視床下部に存在する雄優位の性的二型核である SDN-POA 体積を定量した。成熟ニューロンマーカーである calbindin の抗体を用いて脳切片 (50 μm 厚) を染色したのち、共焦点顕微鏡を用いて観察した。神経成熟が完成する時期である PND28 の雄児について解析した。その結果、SDN-POA の体積は AHR 欠損により有意に縮小した (Fig. 1)。したがって、AHR は神経レベルで脳の性分化に寄与することが示唆された。

平成 31 年度及び令和元年度の研究により AHR 欠損により testosterone レベルの低下と精子数の減少が観察された 8 週齢において、AHR の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、testosterone 低下の機構について検証した。男性の性ステロイドである testosterone は、下垂体ゴナドトロピン LH の制御下にある精巣ライディッヒ細胞の cholesterol から合成される (17)。そのため、cholesterol を出発物質として合成される testosterone の合成及び代謝に関与する各酵素の精巣における mRNA レベルの解析を行った。合成酵素に関しては, シトクロム P450 11A1 (CYP11A1) が AHR-KO ラットにおいて増加傾向、CYP17 が AHR-KO ラットにおいて減少傾向を示し、StAR, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD, Hsd3b1), 17β-HSD (Hsd17b1, Hsd17b3) においては AHR-KO による影響はほとんど見られなかった (Fig. 2)。また、代謝酵素に関しては、5-alpha-reductase (type I, Srd5a1; type II, Srd5a2; type III, Srd5a3) 及び aldo-keto reductase1d1 (Akr1d1)いずれにおいてもほとんど変動は見られなかった (Fig. 3)。これらのことから、有意ではないものの、AHR-KO ラットにおける testosterone 合成酵素としての CYP17 の減少傾向は testosterone レベルの低下と符合すること、また、精巣における testosterone の代謝には AHR 欠損の影響は大きくないことが分かった。

次に、AHR-KO ラットの精巣重量について、更なる検討を行ったところ、8 週齢の KO ラットの精巣の重量は WT と比べ減少が示唆されたため (Fig. 4)、精巣重量に影響を及ぼす可能性のある遺伝子について検討した。線維芽細胞成長因子 fibroblast growth factor (FGF) は、発生、細胞増殖、代謝調節、創傷治癒および修復など、複数の生物学的機能を有していることが報告されている (18)。FGF は精巣での発現が確認されており (18)、FGF はその受容体である FGF 受容体 (FGFR) に作用して効果を発揮する (19)。このため、FGF 及び FGFR の発現への AHR-KO の影響を調べた。その結果、精巣に発現する FGF1, FGF2, FGFR1 及び FGFR3 すべてにおいて AHR-KO ラットで有意に増加することが明らかになった (Fig. 5)。

D. 考察

本研究では、AHR 欠損による脳の性分化への影響を神経レベルで明らかにするために、脳の性分化の中心を担う雄優位な神経核である SDN-POA 体積を測定した。その結果、AHR 欠損により、PND28 の雄児における SDN-POA 体積の縮小が明らかになった (Fig. 1)。性的に未経験な雄ラットの SDN-POA を破壊すると、雄性行動の発現が遅くなり、その頻度も低下すること (20) から、AHR 欠損による SDN-POA 縮小が引き金となって、成長後の交尾行動障害を引き起こしたことが示唆された。しかし、本研究で、 SDN-POA 縮小時期の解析は PND28 のみに止まっており、この縮小開始の時期は未解明であ

る。そのため、AHR 欠損による SDN-POA 縮小時期を明らかにすることで、脳の性分化へのさらなる機構解明へと繋げていくことが重要である。SDN-POA の体積が雄優位であるのは、発達期にアポトーシスを起こして死んでいく細胞が、雌に比べて雄では少ないからである (21-23)。アポトーシスの分子機構は複雑であるが、B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) ファミリーに属する Bcl-2 はアポトーシスを誘導する cytochrome c の放出を抑制して、細胞死を防ぐことが報告されている (22)。反対に、Blc-2 associated X protein (Bax) は cytochrome c 放出を促進して、アポトーシスの誘導を促進する (23)。また、発達期におけるラットの SDN-POA で、Bcl-2 と Bax の発現に性差がある (Bcl-2; 雄＞雌、Bax; 雄＜雌) (21)。この事実から AHR 欠損により SDN-POA における Bcl-2, Bax 発現に影響が及んだ可能性が考えられる。また、雄児 SDN-POA 体積増加は出生前後の性ステロイド刺激による (24, 25)。その性ステロイドに関連して、AHR は転写因子としてだけではなく、ユビキチンリガーゼとして働き、性ステロイド受容体である ERα および、androgen receptor (AR) の働きを負に制御することが報告されている (26, 27)。SDN-POA 縮小の原因として、性ステロイドのみにとどまらず、それら受容体に着目した検証も必要である。

次に、平成 30 年度及び令和元年度の検討により 8 週齢 AHR-KO ラットにおいては testosterone レベルの低下と精子数の減少を伴うことが明らかになった。男性ホルモンである testosterone は、下垂体ゴナドトロピン LH の制御下にある精巣ライディッヒ細胞の cholesterol から合成される (17)。そのため、cholesterol を出発物質として合成される testosterone の合成及び代謝に関与する各酵素の精巣における mRNA レベルの解析を行った。Testosterone 合成酵素に関しては，CYP11A1 が、AHR-KO ラットにおいて増加傾向、CYP17 が、AHR- KO ラットにおいて減少傾向を示したものの、StAR, Hsd3b1, Hsd17b1, Hsd17b3 については、AHR-KO による影響はほとんど見られなかった。CYP11A1 は cholesterol から pregnenolone の生成を担い (28)、CYP11A1 の発現に増加傾向があることは、testosterone 減少による正のフィードバックが起こったのではないかとも推察されるが、令和元年度の結果から、8 週齢において下垂体の LHβは僅かながら有意に減少している。従って、この CYP11A1 の増加傾向の理由は脳下垂体への影響ではない可能性もあるが、現時点では原因は明らかではない。また CYP17 には減少傾向があり、これは、前述の令和元年度に得た、AHR-KO による下垂体の LHβ の低下と符合する。先行研究において、AHR-KO により、胎児期に LH 低下が引き起こされることが分かっており (29)、これとも矛盾しない。また、testosterone 合成過程での中間生成物である dehydroepiandrosterone や androstenedione は主に副腎において生成されるため (30), 副腎でのこれらのステロイド合成に関わる酵素の発現を調べることも必要であろう。

Testosterone は、SF-1 (Steroidogenic factor-1) と相互作用することにより LHβ サブユニットの転写を抑制し、下垂体での LH の合成を減少させることが分かっている (31)。また testosterone は、下垂体を刺激して LH の合成および放出をするシグナルである視床下部 gonadotropin releasing hormone (GnRH) の放出も調節できると考えられている (32)。平成 30 年度及び令和元年度の検討では、GnRH の増加はなく、また、LHβはむしろ低下することが示唆されており、testosterone 減少による正常なフィードバックが起こっていな

いことが推定される。このため、視床下部-下垂体-性腺のフィードバック軸、下垂体での SF-1 などの因子の発現や、これらの制御機構への影響についての検討が必要であろう。

Testosterone の代謝酵素に関しては、精巣の Srd5a1,Srd5a2,Srd5a3,Akr1d1 のいずれにおいても AHR-KO における影響は見られなかった (Fig. 3)。精巣における代謝酵素の発現には変動が見られなかったが、testosterone の代謝には前立腺も重要であり、男性ホルモン受容体 (androgen receptor, AR) シグナル伝達の重要な酵素である Srd5 は testosterone をより強力な dihydrotestosterone に代謝する (33)ため、前立腺における Srd5 発現についての検討も課題である。

本研究では、AHR-KO による精巣重量の低下が示唆された (Fig. 4)。そこで、精巣重量に影響を及ぼす因子として、FGF と FGFR に着目した。FGF は、発生、細胞増殖、代謝調節、創傷治癒および修復など、複数の生物学的機能を有していることが報告されている。8 週齢 AHR-KO ラット精巣において、FGF1, FGF2, FGFR1 及び FGFR3 の発現が有意に増加することが分かった (Fig. 5)。FGF は、精巣重量を増加させる働きがあることを考えると、AHR-KO ラットで FGF 及び FGFR が増加したにも関わらず精巣重量は減少していることから、この FGF 及び FGFR の増加は、精巣重量の低下に対する応答の可能性がある。また、FGF 及び FGF 増加は精巣の重量増加に寄与できていないと推定された。FGF が効果を発揮するには細胞表面受容体の一つである、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(Hspg)が重要である (34)ことから、今後は Hspg の発現についても検討する必要があろう。

また、FGF は幹ライデッヒ細胞の増殖を促進する働きを有している。(35)。Testosterone の合成及び分泌の機能を有するライデッヒ細胞は、その分化発育過程で 4 つの異なる過程（ライデッヒ幹細胞、ライデッヒ前駆細胞、ライデッヒ未成熟細胞、ライデッヒ成熟細胞）があり、ライデッヒ成熟細胞が testosterone の合成を担う。このことから testosterone の減少には、FGF による幹細胞の分化の抑制や、分化を誘導する因子への影響の可能性が考えられる。幹細胞の分化にはレチノイン酸（RA）が必要であることが知られており (36)、3 つの RA 受容体アイソタイプのうち、レチノイン酸受容体 γ(RARG) がこのプロセスに特異的に寄与することが報告されている (29)。そのため、これらの発現の検討が望まれる。

また、FGF 及び FGFR の増加はライデッヒ幹細胞の増殖を促す FGF へのポジティブフィードバックだと考えることもできるため、このフィードバック機構における AHR の役割を調べることが重要であろう。

以上の結果から、1) AHR 欠損が PND28 の性的二型核の体積低下を引き起こすことから、AHR が脳の性分化に重要な働きを果たすこと、ならびに 2) 思春期である 8 週齢では、testosterone の減少と精子数の減少だけでなく、精巣重量の減少が伴うことから、これらの制御に AHR が重要であることが示唆された。また、精巣重量低下への応答として FGF 及び FGFR の発現が増加す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、脳の性分化に欠くことが出来ない働きを有することが支持された。AHR の欠損は、思春期 8 週齢の精巣重量低下させた。これが testosterone 低下、精子数の減少と関係する可能性がある。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. フォーラム 2020:衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋、2020 年 9 月 4 日 -5 日, オンライン)

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).
17) Eacker SM, Agrawal N, Qian K, Dichek HL, Gong EY, Lee K, Braun RB. Hormonal Regulation of Testicular Steroid and Cholesterol Homeostasis. *Mol Endocrinol*, **22**: 623-635 (2008)
18) Nies VJM, Sancar G, Liu W, Zutphen TV, Struik D,Yu RT, Atkins AR, Evans RM, Jonker JW, Downes MR. Fibroblast Growth Factor Signaling in Metabolic Regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **6**: 193 (2015)
19) Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J.

Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**: 139–49 (2005)

20) De Jonge FH, Louwerse AL, Ooms MP, Evers P, Endert E, Van De Poll NE. Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male wistar rats. *Brain Res Bull*, **23**: 483-492 (1989)

21) Tsukahara S, Kakeyama M, Toyofuku Y. Sex differences in the level of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activation in the sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats. *J Neurobiol*, **66**: 1411-1419 (2006)

22) Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl- 2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**: 1132-1136 (1997)

23) Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR, Newmeyer DD. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, **111**: 331-342 (2002)

24) Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res*, **148**: 333-346 (1978)

25) Dohler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, Gorski RA. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is determined by the perinatal hormone environment. *Neurosci Lett*, **33**: 295-298 (1982)

26) 佐久間 康夫.『脳の性分化』*日生誌*, **68**: 355-367 (2006)

27) Wilson JD, George FW, Griffin JE. The hormonal control of sexual development. *Science*, **211**: 1278-1284 (1981)

28) Zirkin BR Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod*, **99**: 101-111 (2018)

29) Gely-Pernot A, Raverdeau M, Célébi C, Dennefeld C, Feret B, Klopfenstein M, Yoshida S, Ghyselinck NB, Mark M. Spermatogonia differentiation requires retinoic acid receptor γ. *Endocrinology*, **153**: 438-439 (2012)

30) Turcu A, Smith JM, Auchus R, Rainey WE. Adrenal androgens and androgen precursors-definition, synthesis, regulation and physiologic actions. *Compr Physiol*, **4**: 1369-1381 (2014)

31) Jorgensen JS, Nilson JH. AR suppresses transcription of the LHβ subunit by interacting with steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol*, **15**: 1505–1516 (2001)

32) Tilbrook AJ, Clarke IJ. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod*, **64**: 735–742 (2001)

33) Zhu YS, Imperato-McGinley JL. 5α-Reductase isozymes and androgen actions in the prostate. *Ann N Y Acad Sci*, **1155**: 43–56 (2009)

34) Laslett AL, McFarlane JR, Risbridger GP. Developmental response by Leydig cells to acidic and basic fibroblast growth factor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **60**: 171-179 (1997)

35) Chen L, Li X, Wang Y, Song T, Li H, Xie L, Li L, Chen X, Ma L, Chen Y, Lv Y, Li X, Ge RS. Fibroblast Growth Factor 1 Promotes Rat Stem Leydig Cell Development. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **10**: 118 (2019)

36) Hogarth CA, Amory JK, Griswold MD. Inhibiting vitamin A metabolism as an approach to male contraception. *Trends*

Endocrinol Metab, **22**: 136-144 (2011)

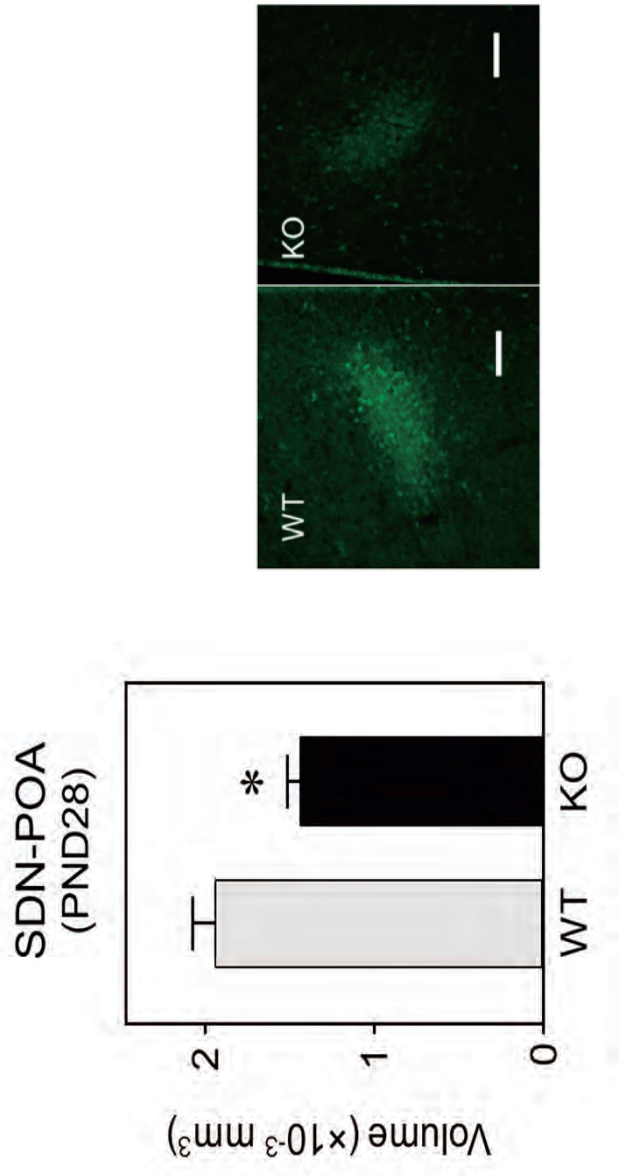


Fig. 1. Effect of AHR ablation on the volume of SDN-POA in the male offspring at PND28. The SDN-POA was detected using anti-calbindin antibody (green), and observed with a confocal microscope (×10). Each bar represents the mean ±S.E.M. of 3-4 offspring. Significantly different from the control: *$p<0.05$. Scale bar: 100 μm.

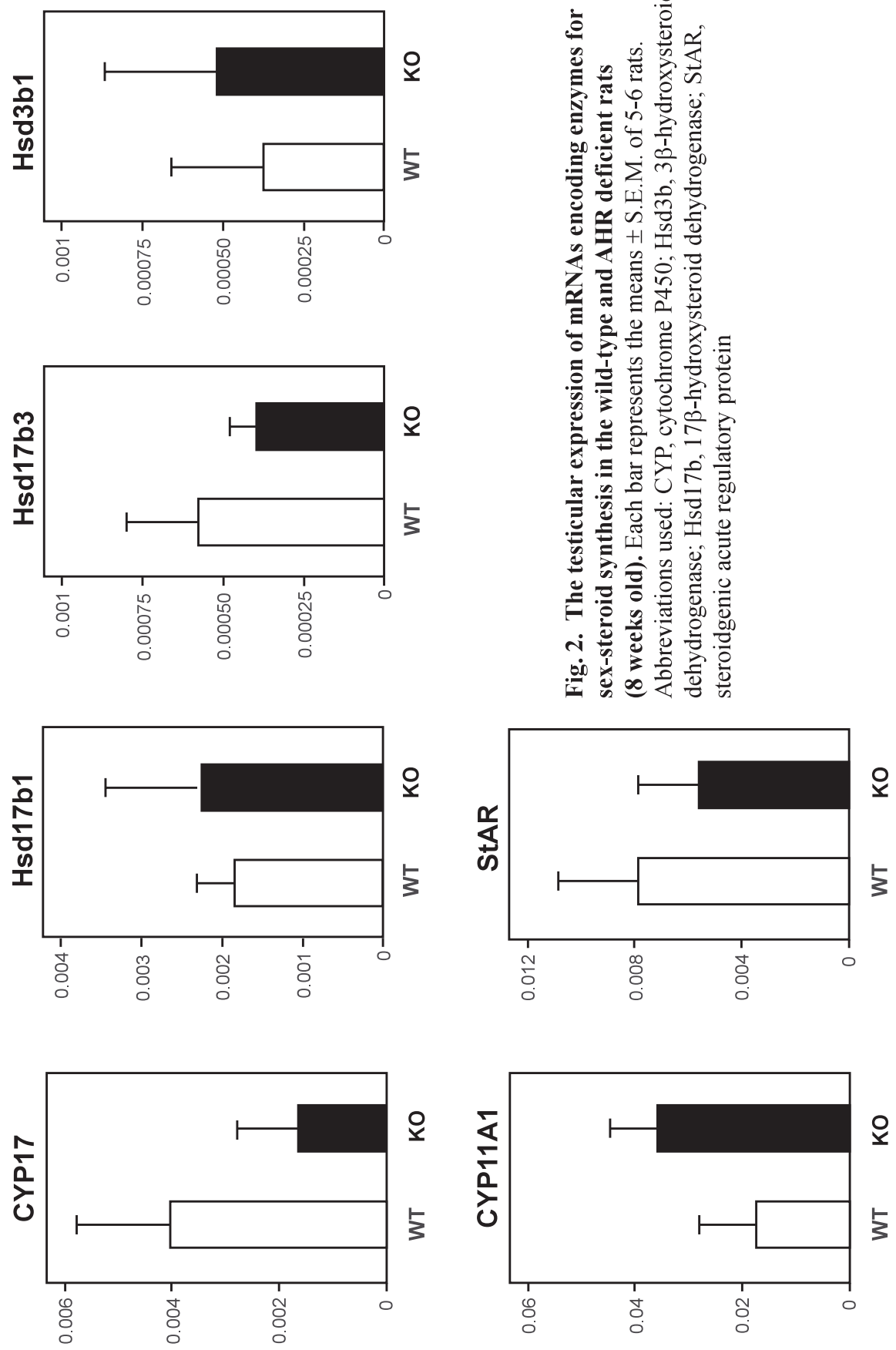


Fig. 2. The testicular expression of mRNAs encoding enzymes for sex-steroid synthesis in the wild-type and AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 5-6 rats. Abbreviations used: CYP, cytochrome P450; Hsd3b, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase; Hsd17b, 17β-hydroxysteroid dehydrogenase; StAR, steroidgenic acute regulatory protein

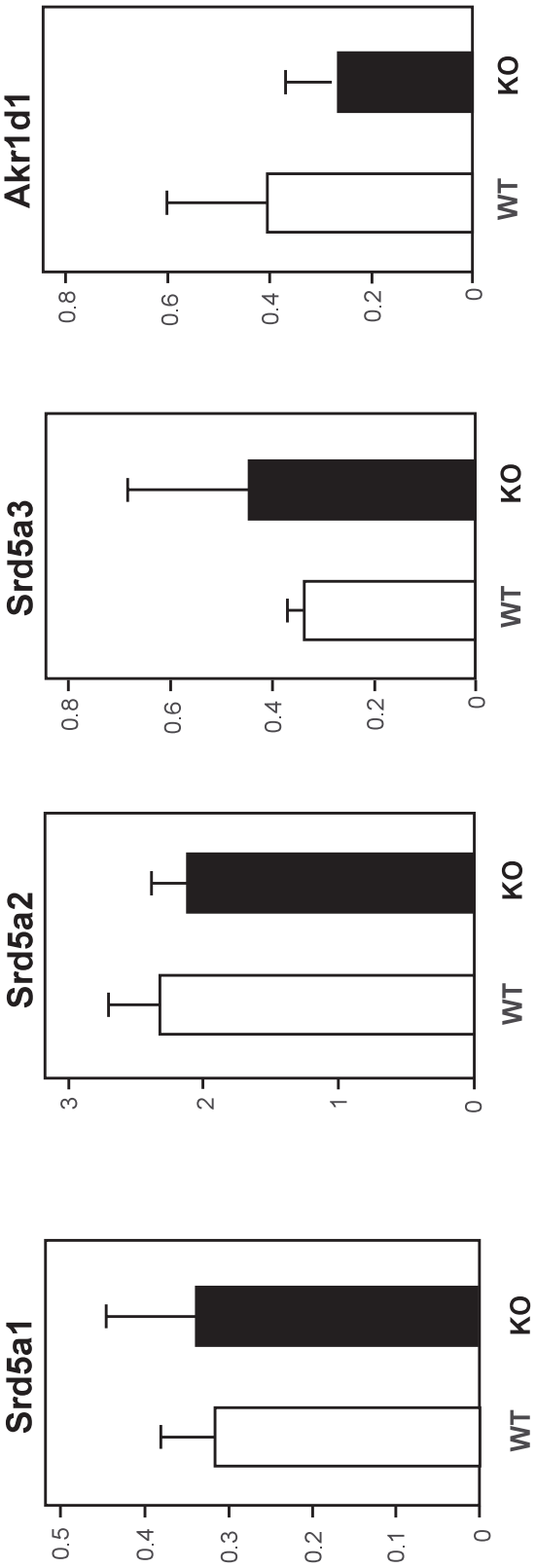


Fig. 3. The testicular expression of mRNA encoding enzymes for metabolism of sex steroids in the wild-type and AHR deficient rats (8 weeks old).

Each bar represents the means ± S.E.M. of 5-6 rats. Abbreviations used: 5α-reductase (type I, Sr5a1; type II, Sr5a2; type III, Sr5a3); Akr1d1, aldo-keto reductase 1d1.

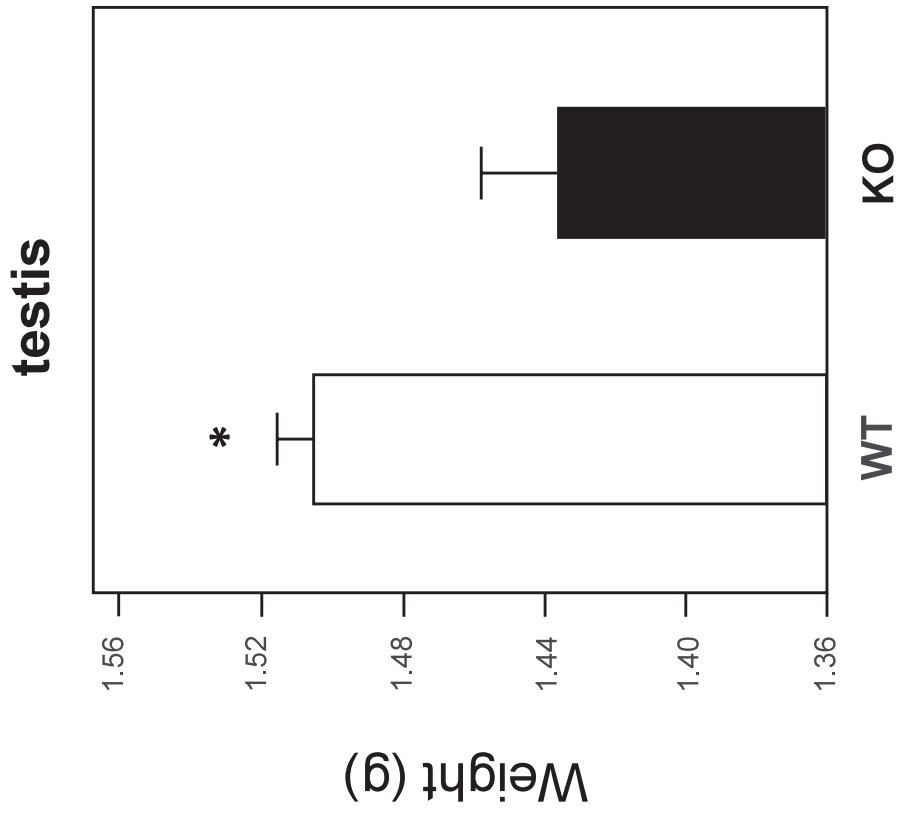


Fig. 4. The comparison of testis weight between the wild-type and AHR-deficient rats (8 weeks old).
Each bar represents the means ± S.E.M. of 6 rats. Significantly different from the control: $*p<0.05$,.

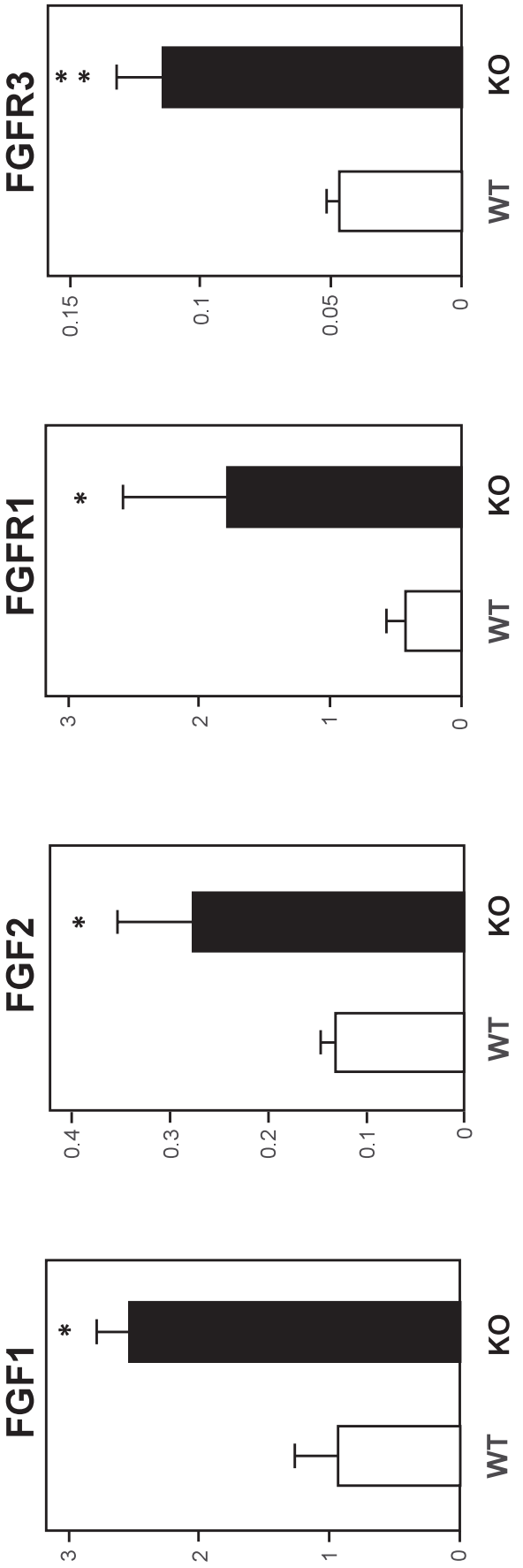


Fig. 5. The testicular expression of mRNA encoding fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor in the wild-type and AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: *$p<0.05$, **$p<0.01$. Abbreviations used: FGF, fibroblast growth factor; FGFR, FGF receptor

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: 脂質代謝の制御とストレス応答との関連性の検討

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。肝臓及び腎臓における SelenBP1 及び SelenBP2 の発現に関しては、mRNA レベルで明らかにされているものの、未だタンパク質発現レベルでの検証は十分にはされていない。本研究では、野生型 C57BL/6J と SelenBP1 欠損マウスの肝臓と腎臓をウェスタンブロッティングにより比較することにより検証した。非絶食と 20 時間絶食した 8 週齢の野生型 C57BL/6J 及び SelenBP1 欠損マウスにおいて肝臓及び腎臓 S9 画分をウェスタンブロッティングで調べたところ、野生型の SelenBP は、絶食によって有意に低下した。SelenBP1 欠損マウス肝臓では、絶食の影響を受けなかった。腎臓においては、野生型にある抗 SelenBP1 抗体に認識されるバンドが、SelenBP1 欠損マウスでは存在しないことが明らかになり、このバンドが SelenBP1 であると考えられた。また、このバンドの強度は野生型の腎臓では絶食の影響を受けなかった。SelenBP1 欠損マウスの腎臓では、絶食でも同様にバンドは検出されなかった。これらのことから、肝臓には SelenBP1 だけでなく SelenBP2 が高発現していることがタンパク質レベルで確認された。これらのことから、SelenBP1 タンパク質は絶食時も必要で、重要な機能をもつタンパク質であると考えられた。肝臓では SelenBP2 タンパク質レベルが高く、ダイオキシンによる SelenBP1 の誘導の意義を理解するのは難しいことが改めて確認された。一方、腎臓では、SelenBP1 のみが機能すると考えられ、かつ、SelenBP1 は絶食条件下でも重要な役割をもつと推定されるため、絶食条件下で得た腎臓を用いることで、SelenBP1 の役割を解明することが期待された。腎ホモジネートの Sod 活性を測定したところ、前年度までの mRNA 検討結果に符合して、Sod 活性は、SelenBP1 欠損マウスで野生型の C57BL/6J に比べて有意に低下していた。過酸化水素は、Sod によってスーパーオキシドアニオンから不均化反応によって生成することが知られているため、腎臓組織中の過酸化水素量を調べたところ、SelenBP1 欠損マウスでは過酸化水素含量が低かった一方で、脂質過酸化の指標であるチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS)量は増加傾向が認められた。腎と血清セレン含量に変動がないことも分かった。これらのことから、SelenBP1 は、酸化ストレス低減作用を有する可能性が浮上した。

Ａ．研究目的

セレン結合性タンパク質 (SelenBP1) は、肝臓、腎臓、性腺などに多く発現するサイトゾルタンパク質の一つである (1)。SelenBP1 は、生体内においてセレンとの結合能を有し、セレンの生理的役割に関わるものと推定されている。これまでに、抗酸化的作用 (2)、増殖抑制作用 (3)、ゴルジ層板間のタンパク質構成因子 (4) 等の機能が報告されているものの、これらは、いずれも決定的とは言い難く、その生理的機能は十分に理解されているとは言い難い。

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

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

最近、当研究室では、絶食により肝臓及び腎臓において、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。肝臓及び腎臓における SelenBP1 及び SelenBP2 の発現に関しては、mRNA レベルで明らかにされているものの、未だタンパク質発現レベルでは検証されていない。本研究では、野生型 C57BL/6J と SelenBP1 欠損マウスの肝臓と腎臓をウェスタンブロッティングにより比較することにより検証した。

平成 30 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。令和元年度は、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。平成 30 年度及び令和元年度の検討において 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。さらに、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。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。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。そこで、本年度は、これらの検討をさらに発展させ Sod 活性、過酸化水素生成量、腎臓及び血中のセレン含量についても検討を行った。

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. SelenBP タンパク質発現

マウス肝臓中の SelenBP 発現量は, イムノブロット法にて解析した. また, loading control として β-actin のタンパク質を同時に ECL 法にて検出した. ChemiDoc XRS Plus (日本バイオラッド)にて撮影し, バンド強度を定量した. また、Cyp2e1 の発現も検討した。

抗体：抗ヒト SelenBP1 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社、Rabbit anti-CYP2E1 antibody は Abnova 社、抗 β-actin 抗体は

Biovision 社、 Enhanced chemiluminescence (ECL)用の Horseradish Peroxidase 標識二次抗体は GE Healthcare 社、ECL 用の基質 Clarity™ Western ECL Substrate は日本バイオラッドの市販品を購入して使用した。

3. 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 (15)。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。

4. Sod 活性及び過酸化水素量

マウス腎ホモジネートの Sod 活性は、SOD assay kit-WST (Dojindo)を用いて測定した。マウス腎ホモジネートの過酸化水素量は、Pierce™ Quantitative Peroxide assay (Thermo)のキットを用いて測定した。

5. チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS)

Ohkawa らの方法 (16)に従って測定した。

6. 腎臓及び血清中セレン含量の測定

いであ株式会社　食品・生命科学研究所 (大阪)にて受託測定した。野生型及び SelenBP1-KO 各々3 個体の腎臓及び血清を Agilent Technologies ICP-MS 7700x を用いた方法により測定した。組織に対しては、組織を精密天秤で秤量し、テフロン製容器に入れ、硝酸にて湿式分解を行った. 内標準物質としてイットリウムを加えて定容したのち、ICP-MS で測定した。血清サンプルの場合は、検体を 0.1 mL 分取し、内標準物質としてイットリウムを加えて界面活性剤入り溶液で定容したのち、同様に ICP-MS で測定した。

(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 及び A20-061。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

非絶食と 20 時間絶食した 8 週齢の野生型 C57BL/6J 及び SelenBP1 欠損マウスにおいて肝臓及び腎臓 S9 画分をウェスタンブロッティングで調べたところ、野生型では SelenBP は、絶食によって有意に低下した (Fig. 1)。SelenBP1 欠損マウス肝臓では、絶食の影響を受けなかった。腎臓においては、野生型にある抗 SelenBP1 抗体に認識されるバンドが、SelenBP1 欠損マウスでは存在しないことが明らかになり、このバンドが SelenBP1 であると考えられた (Fig. 2)。また、このバンドの強度は野生型の腎臓では絶食の影響を受けなかった。SelenBP1 欠損マウスの腎臓では、絶食でも同様にバンドは検出されなかった。これらのことから、肝臓には SelenBP1 だけでなく SelenBP2 が高発現していることがタンパク質レベルで確認された。これらのことから、SelenBP1 タンパク質は絶食時も必要で、重要な機能をもつタンパク質であると考えられた。

また、エタノール誘導性でアセトアミノフェンやアルコールを酸化的に代謝する酵素である CYP2E1 は (17, 18)、絶食によっても誘導されることが知られている (19)。これは、mRNA レベルの増加を伴わないタンパク質レベルの増加であることが知られている (20)。そこで、適切に絶食が行われ、Cyp2e1 の発現量が増加して

いることを確認すべく、採取した雄マウスのS9分画を、抗CYP2E1抗体を一次抗体としたウェスタンブロッティングにより解析した。Cyp2e1 のタンパク質発現量はβ-actin で補正して算出した (Fig. 3)。CYP2E1抗体で認識されるバンドは2本あったが、いずれも Cyp2e1 として総和で量を比較した。その結果、雄性マウスの、SelenBP1(+/+)マウスおよび(-/-)マウスのいずれにおいても、絶食により Cyp2e1 の発現量が有意に増加していることが確認された (Fig. 3)。

次に、ダイオキシン誘導性SelenBP1生理的機能を明らかにする目的で、ダイオキシン非処理条件下の SelenBP1-KO が腎臓の活性酸素消去系に及ぼす影響を調べた。絶食条件下で、腎臓の Sod1 および Sod2 について検討した。令和元年度の検討から、これらはいずれも SelenBP1-KO により mRNA レベルで有意に低下することが示唆されていた (Fig. 4)(21,令和元年度報告書より引用)。本年度は、腎臓における Sod 活性について検討したところ、mRNA レベルの変化に符合して Sod 活性は有意に低下した (Fig. 5A)。Sod は不均化酵素であり、2分子のスーパーオキシドアニオンから過酸化水素と水を生成する。そこで、続いて、腎臓組織中の過酸化水素濃度を測定した所、Sod 活性の低下に合致して、SelenBP1-KO マウス腎臓の過酸化水素濃度は有意に低かった (Fig. 5B)。この結果は酸化ストレスの増加作用であるのか否か調べるために、TBARS を調べた所、SelenBP1-KO において有意ではないものの増加傾向が見られた (Fig. 5C)。また、SelenBP1-KO による腎臓のセレン含量への影響を調べた所、野生型動物との間に差は認められなかった。同様に、血清のセレン含量にも差はなかった。

D. 考察

本研究では、SelenBP1-KO 動物における SelenBP1 及び SelenBP2 タンパク質レベルについて初めて解析し、特に絶食が及ぼす影響について明らかにした。腎臓には SelenBP1 のみ発現していること、これには絶食の影響がないことから、20 時間の絶食を行うことで、野生型の肝臓 SelenBP2 はタンパク質レベルでも発現が減少すると考えられた。しかし、SelenBP のタンパク質レベルでの減少は有意であるものの、先行研究で観察された mRNA の減少量ほどの減少は見られなかった (Fig. 1)。SelenBP1-KO マウス肝臓でみられる、抗 SelenBP1 抗体を一次抗体とするウェスタンブロッティングで認められるバンドは SelenBP2 であると考えられるが、これは絶食により減少せず、SelenBP1 欠損時は代償的に SelenBP2 はタンパク質レベルで高発現が維持された可能性がある。これには、何らかのタンパク質安定化機構が存在することが想起された。これらのことから、肝臓では SelenBP2 タンパク質レベルが高く、ダイオキシンによる SelenBP1 の誘導の意義を理解するのは難しいことが改めて確認された。一方、腎臓では、SelenBP1 のみが機能すると考えられ、かつ、SelenBP1 は絶食条件下でも重要な役割をもつと推定されるため、絶食条件下で得た腎臓を用いることで、SelenBP1 の役割を解明することが期待された。

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、平成30年度にまず、腎臓のメタボローム解析を行った。以下、平成30 年度と令和元年度の報告内容を参照しつつ、本年度の研究を考察する。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（22-24）、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、平成 30 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。令和元年度は、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 (21, 令和元年度報告書参照)。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、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 (21)。また、Rxra の発現も低下していた (21)。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 (25, 26)。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。平成 30 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 (27)の発現も有意に低下していた (21)。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 (24)。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。平成 30 年度行ったマイクロアレイの結果に加え、令和元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 (Fig. 4)、

それに符合して Sod 活性も低下した (Fig. 5A)。また、腎臓組織中の過酸化水素は低下し (Fig. 5B)、TBARS は有意ではないものの増加傾向があった (Fig. 5C)。尚、注視すべきは、この過酸化水素濃度は、凍結組織を融解し、ホモジナイズ後、タンパク質を定量して、量を整えてから測定したものである点である。これらのことを総合すると、SelenBP1-KO による過酸化水素の低下は、Sod 活性低下による過酸化水素生成量の低下を反映していると思われ、TBARS が増加傾向であったことより、スーパーオキシドアニオンが増加していることも推定される。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、生理的条件下で SelenBP1 には、酸化ストレス軽減作用があると推定される。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。但し、ダイオキシンによる SelenBP1 誘導は著しいものであり、欠損条件下で観察された現象のみでの考察には制約もあるだろう。SelenBP1 欠損がどのような機構で Ppara 及び Rxra 発現を低下させたのかは、まだ十分明らかではない。今後は、この点と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) タンパク質レベルでの検討により腎臓には SelenBP1 のみが発現し SelenBP2 が発現していないこと、SelenBP1 は絶食により影響受けないことから、絶食条件下の腎臓がダイオキシンによる SelenBP1 の誘導の意義を理解するのに適していることが改めて確認された。2) 活性酸素消去系酵素 Sod1 および Sod2 の発現が低下し、その活性も低下していた。過酸化水素含量も低下し、TBARS も増加傾向にあった。これらのことから、SelenBP1 は生理的条件下に酸化ストレス軽減作用があると推定される。

F. 研究発表

1. フォーラム 2020:衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋、2020 年 9 月 4 日 -5 日, オンライン)

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) 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).
16) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi N. *Anal Biochem* **95:** 351-358 (1979).
17) Lee SS, Buters JT, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ. *J Biol Chem,* **271**: 12063-12067 (1996).
18) Patten CJ, Thomas PE, Guy RL, Lee M, Gonzalez FJ, Guengerich FP Yang CS. *Chem Res Toxicol,* **6**: 511-518 (1993).
19) Hong J. Y., Pan J. M., Gonzalez F. J., Gelboin H. V. and Yang C. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **142**: 1077-1083 (1897).
20) Johansson I., Lindros K. O., Eriksson H. and Ingelman-Sundberg M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**: 31-38 (1990).
21) 令和元年度分担研究報告書 (石井祐次)
22) Hatsumura M, Ishida T, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H. *Fukuoka Acta Medica*, **86:** 135-143 (1995).
23) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K. *Chem Res Toxicol*, **12**: 1158-1165 (1999).
24) 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).
25) Chambon P. *FASEB J*, **10**: 940-954 (1996).
26) Leid M, Kastner P, Chambon P. *Trends Biochem Sci*, **17**: 427-433 (1992).
27) Westin MA, Hunt MC, Alexson SE. *J Biol Chem*, **282**: 26707-26716 (2007).
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)

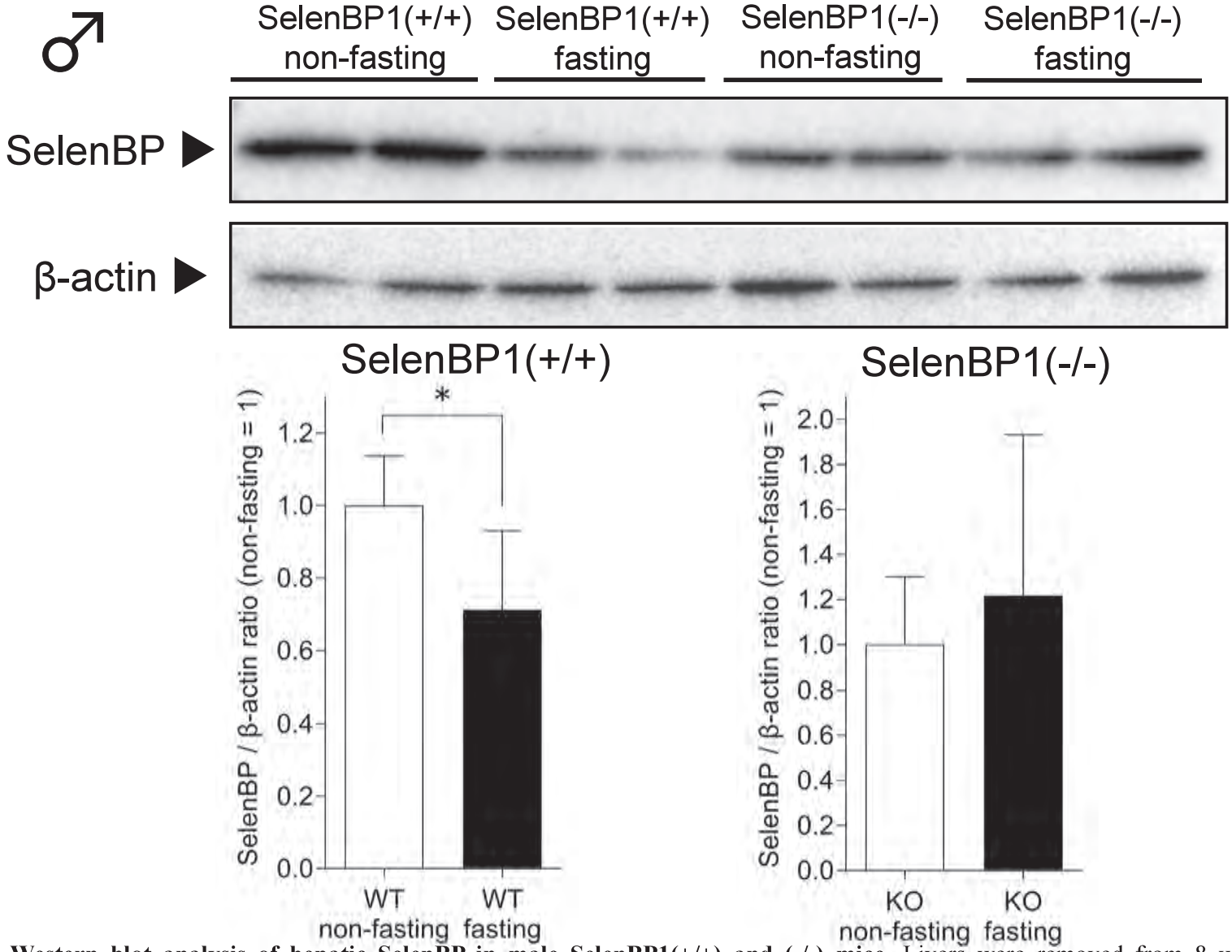


Fig. 1 Western blot analysis of hepatic SelenBP in male SelenBP1(+/+) and (-/-) mice. Livers were removed from 8 weeks-old male SelenBP1(+/+) and (-/-) mice. Individual liver S9-fractions (10 μg protein) prepared from SelenBP1(+/+) and (-/-) mice were subjected to SDS-PAGE (10% separation gel). SelenBP was detected by mouse anti-human SelenBP1 antibody. β-actin was detected by mouse anti-β-actin antibody. Lanes 1-2, SelenBP1(+/+) non-fasting; 3-4, SelenBP1(+/+) fasting; 5-6, SelenBP1(-/-) non-fasting; 7-8, SelenBP1(-/-) fasting. Representative data are shown. Randomly selected two of five samples were subjected. n=5, *p<0.05.

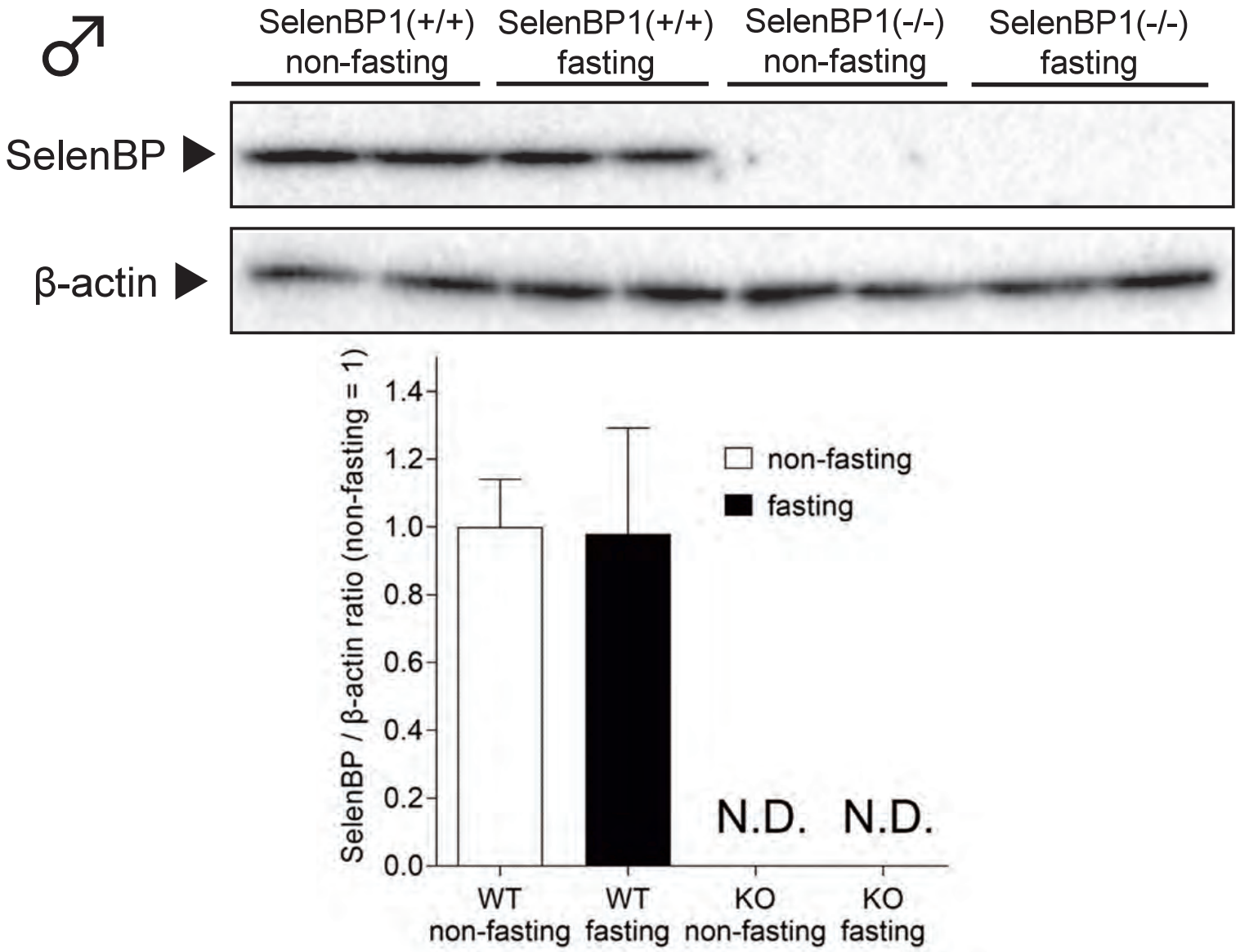


Fig. 2 Western blot analysis of nephric SelenBP in male SelenBP1(+/+) and (-/-) mice. Kidneys were removed from 8 weeks-old male SelenBP1(+/+) and (-/-) mice. Individual kidney S9-fractions (20 μg protein) prepared from SelenBP1(+/+) and (-/-) mice were subjected to SDS-PAGE (10% separation gel). SelenBP was detected by mouse anti-human SelenBP1 antibody. β-actin was detected by mouse anti-β-actin antibody. Lanes 1-2, SelenBP1(+/+) non-fasting; 3-4, SelenBP1(+/+) fasting; 5-6, SelenBP1(-/-) non-fasting; 7-8, SelenBP1(-/-) fasting. Representative data are shown. Randomly selected two of five samples were subjected. *n*=5, N.D., not detectable.

令和２年度厚生労働行政推進調査事業費補助金

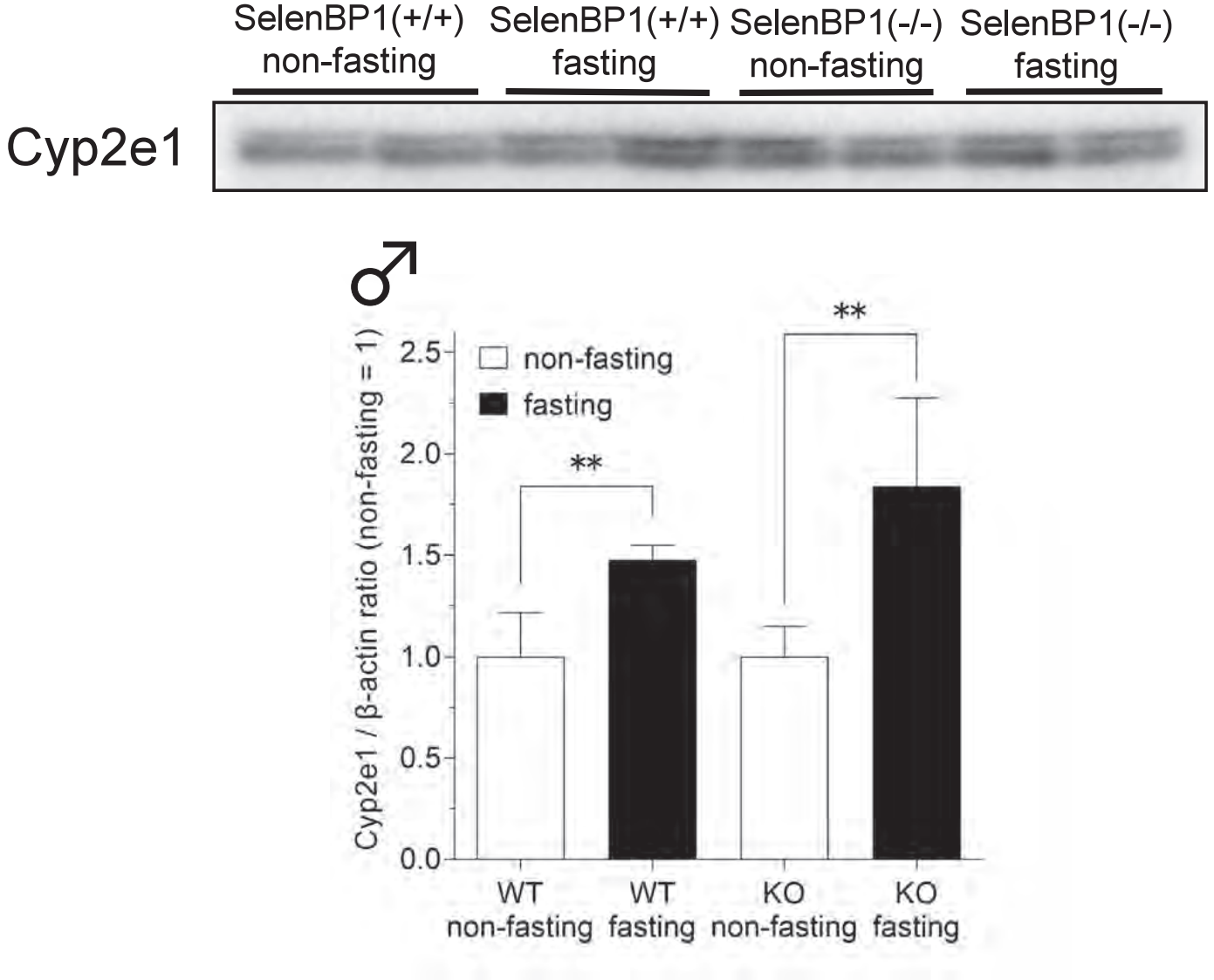


Fig. 3 Western blot analysis of hepatic Cyp2e1 in male mice. Livers were removed from 8 weeks-old male and female mice. Individual liver S9-fractions (10 μg protein) prepared from male and female mice were subjected to SDS-PAGE (10% separation gel). Cyp2e1 was detected by rabbit anti-CYP2E1 antibody. Lanes 1-2, SelenBP1(+/+) non-fasting; 3-4, SelenBP1(+/+) fasting; 5-6, SelenBP1(-/-) non-fasting; 7-8, SelenBP1(-/-) fasting. Representative data are shown. Randomly selected two of five samples were subjected. n=5, **p<0.01.

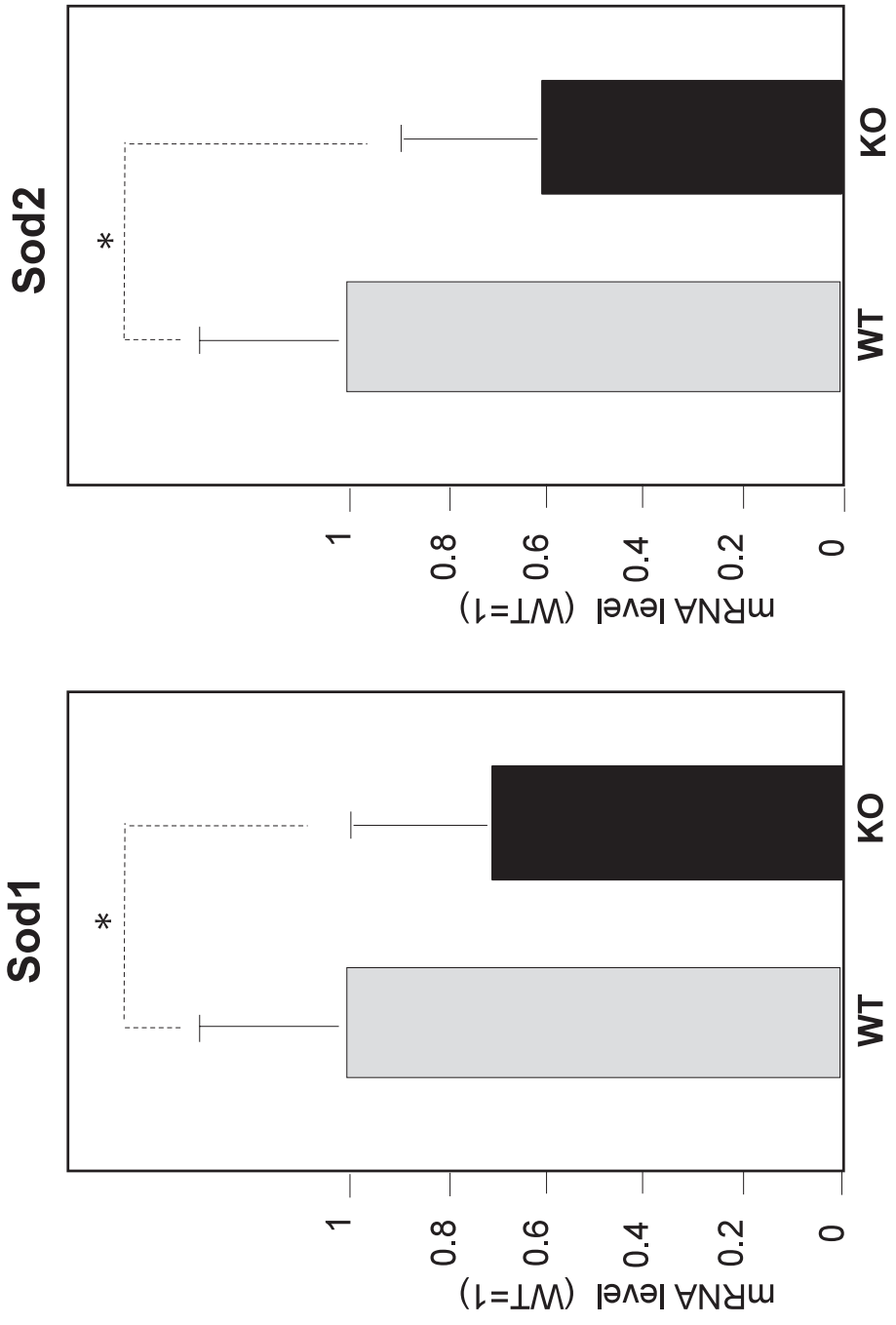


Fig. 4. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Sod1 and Sod2 mRNA in 8-week old male mice which treated with 20 hr fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 mice. *$p<0.05$. β-actin was used as an internal control.
(令和元年度報告書より引用)

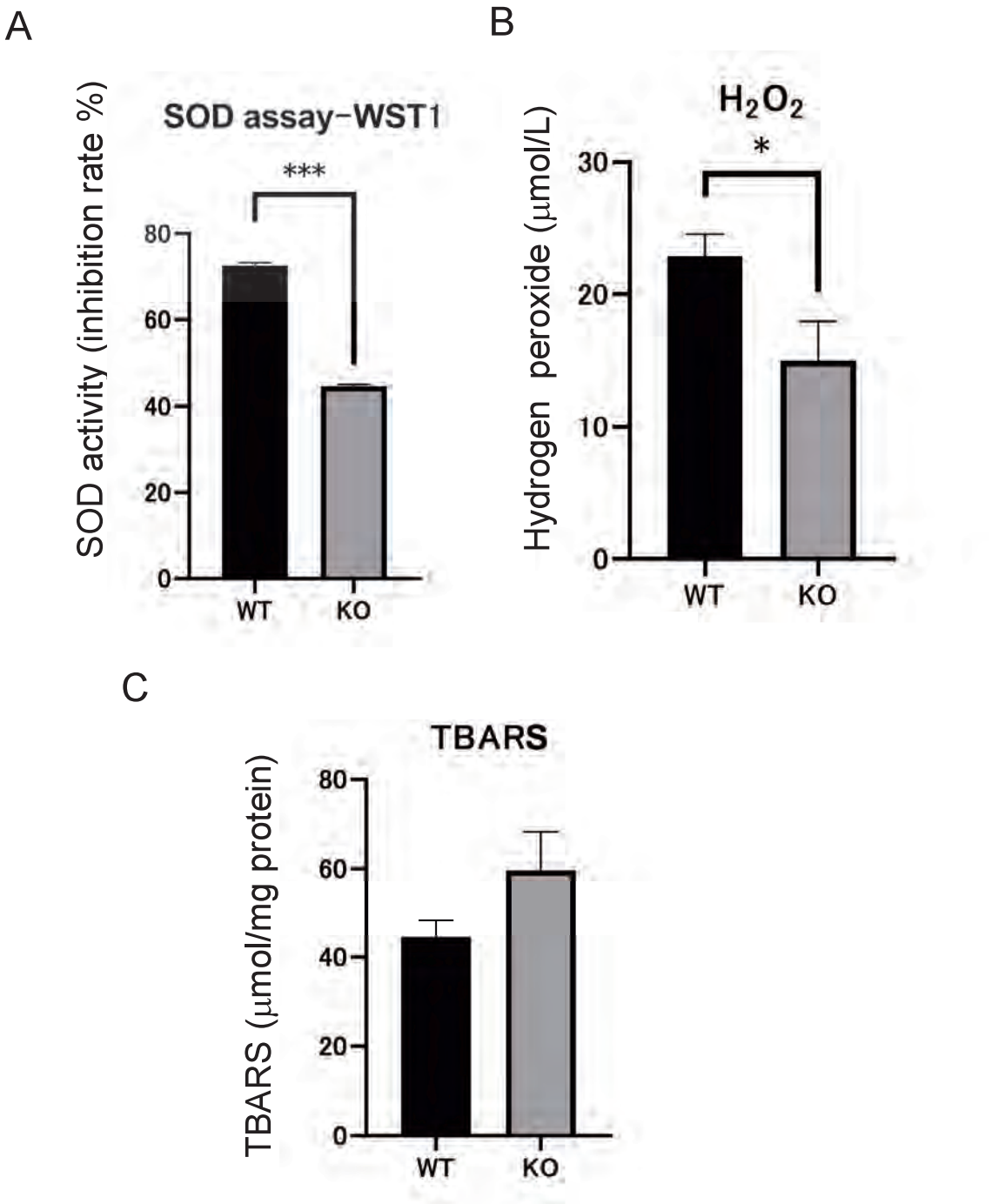


Figure 5. Manifestation and influence in renal redox reaction caused by SelenBP1 deletion.
A、B. Significance change of SOD activity assay and hydrogen peroxide concentration in mice kidney by Quantitative peroxide assay detection. The kidney were collected from 8-week old male mice which treated with 20 hr fasting. Each bar represents the mean ± S.E.M of 5 mice. *p<0.05. **C**. Effect on lipid peroxidation in the kidney of SelenBP1deficient mice as the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) . Each bar represents the mean ± S.E.M of 10 mice.

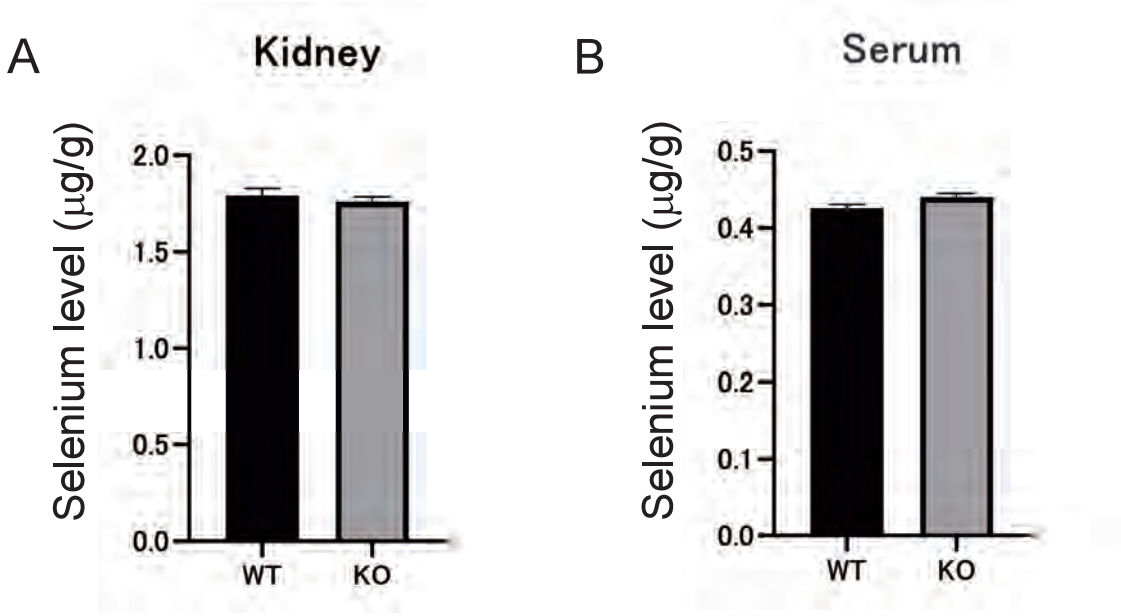


Figure 6. Levels of selenium (μg/g) **in kidney and serum of Selenbp1-KO and C57BL/6J mice by Agilent Technologies ICP-MS 7700x detection.** Each bar represents the mean ± S.E.M of 3 mice each by 3 times detection. **A**: kidney. **B**. serum.

分担研究報告書

Ah 受容体とアルギニン代謝を介した活性酸ストレスと腸炎の研究

研究分担者　　鳥巣　剛弘　九州大学病態機能内科　講師

研究要旨　油症の消化器症状として腹痛や吐き気、下痢などの消化器症状が報告されてきた。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、ダイオキシン類は Ah 受容体を介したメカニズムが中心的な役割を果たすと考えられている。Ah 受容体はアルギナーゼの活性に影響がある。今回アルギナーゼ-2 の欠損マウスは DSS 腸炎モデルにおいて腸炎が重症となる

A. 研究目的

ダイオキシン類による中毒である油症が発生し 50 年以上経過した。油症に関連する消化器症状として腹痛や下痢などは約半数と高頻度に報告されてきた。一般住民と比較しても油症患者は明らかに消化器症状が多い。また長期経過した後において消化器症状は改善するものの、約 3 分の 1 の患者に下痢症状が持続することも報告されている (1)。

ダイオキシン類による中毒である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)を介し、特に免疫系の細胞に影響があ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。Ah 受容体欠損マウスはアルギナーゼの活性亢進などにより NO 産生低下、IL-6 や IL-12 などの炎症性サイトカインの産生亢進、IL-10 なの抗炎症性サイトカイン産生低下を示す(2)。そこで Ah 受容体のシグナルと活性酸素の両者に関係するアルギンとその分解酵素であるアルギナーゼ-2 に着目した。アルギナーゼ-2 はアルギニンを尿素に分解する酵素で、NO の産生材料となるアルギニンを低下させることにより活性酸素の低下に働くとされている。そのためマクロファージでは抗炎症性マクロファージのマーカーであり、T 細胞では T 細胞の生存に関わり、炎症の持続や腫瘍免疫にかかわる(3)。またアルギナーゼ-1 とアルギナーゼ-2 は細胞内局在や生体内での局在が異なり、アルギナーゼ-2 は消化管に多く活性酸素の産生の中心であるミトコンドリアにおけるアルギニン代謝の中心を司る。アルギナーゼ-2 割損マウスの腸炎における機能を明らすることで Ah 受容体の作

用とその下流のあたるアルギナーゼさらに活性酸素が腸炎や消化器症状に与える影響を明らかにすることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

2 か月齢の野生型マウス(WT)とアルギナーゼ 2 欠損(Arg2KO)マウスに対してデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)2.5%を自由飲水 5 日間行い、急性大腸炎モデルを作成した。5 日間の回復期間を置いたのち腸炎の重症度を肉眼的、病理学的に解析をおこなった。また骨髄より M-CSF 添加条件で培養しマクロファージを分化させ、LPS(100ng/mL)で刺激し炎症性サイトカインの産生やシグナルを評価した。

C. 研究結果

2.5%DSS 腸炎モデルを作成した。体重減少は 7 日目で最も低下し、(Fig.1)となったが有意差はなかった。便の性状のうち出血スコアは有意差がなかったが Stool Consistency で評価ししたところ優位に Arg2KO 群で腸炎の示唆する便性状であった(Fig.2)。Arg2KO では腸管が短縮し(Fig3a)、病理学的にも腸炎の重症度が高かった(Fig3b,c)。炎症細胞が浸潤し (Fig3 d, Inflammation score, P=0.021)粘膜下層の浮腫、粘膜表面の剥離も病変範囲も有意に重症であった(各々Fig3 e,f,g)。以上より Arg2KO マウスでは NO の産生が亢進することで DSS 腸炎がより悪化することが示された。

そのメカニズムとして IL-1 のサイトカイン産生や、MCP-1 などのケモカイン亢進が示された。

D. 考察

DSS 腸炎モデルにおいてアルギナーゼ-2 の重要性を示した。アルギナーゼ-2 の欠損はマクロファージの集簇と腸炎の増悪を引き起こした。アルギナーゼ-2 の欠損はアルギニンの細胞濃度の増加を生じ NO 産生亢進やインフラマソームの亢進が作用機序として考えられた。

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。ダイオキシン類による毒性に Ah 受容体や活性酸素が大きな影響を与えている。Ah 受容体欠損マウスの結果からダイオキシン類による Ah 受容体の刺激はアルギナーゼの活性低下を引き起こすと予測される(2)。ダイオキシン類によるのアルギナーゼの活性低下はアルギナーゼ-2 欠損と同様のメカニスムで腸炎症状を引き起こすのかもしれない。また腸炎における活性酸素の産生源は多彩であるが、消化管において炎症に関わる血球

由来の NO は重要な位置を占める。NO の材料にあたるアルギニンの制御は油症の腸炎や消化器症状の改善につながる可能性がある。

E. 結論

ダイオキシン類の毒性に中心的役割を果たす Ah 受容体と活性酸素の両者に関与するアルギナーゼは腸炎に対して保護的に機能していることが示された。

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.

Samantha Climaco-Arvizu, Omar Domínguez-Acosta, María Asunción Cabañas-Cortés, Miriam Rodríguez-Sosa, Frank J Gonzalez, Libia Vega, Guillermo Elizondo. Aryl hydrocarbon receptor influences nitric oxide and arginine production and alters M1/M2 macrophage polarization. Life Sci . 2016 Jun 15;155:76-84.

Roger Geiger, Jan C Rieckmann, Tobias Wolf, Camilla Basso, Yuehan Feng, Tobias Fuhrer, Maria Kogadeeva, Paola Picotti, Felix Meissner, Matthias Mann, Nicola Zamboni, Federica Sallusto, Antonio Lanzavecchia. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. Cell. 2016 Oct 20;167(3):829-842.

Fig.1 DSS腸炎モデルの体重変化

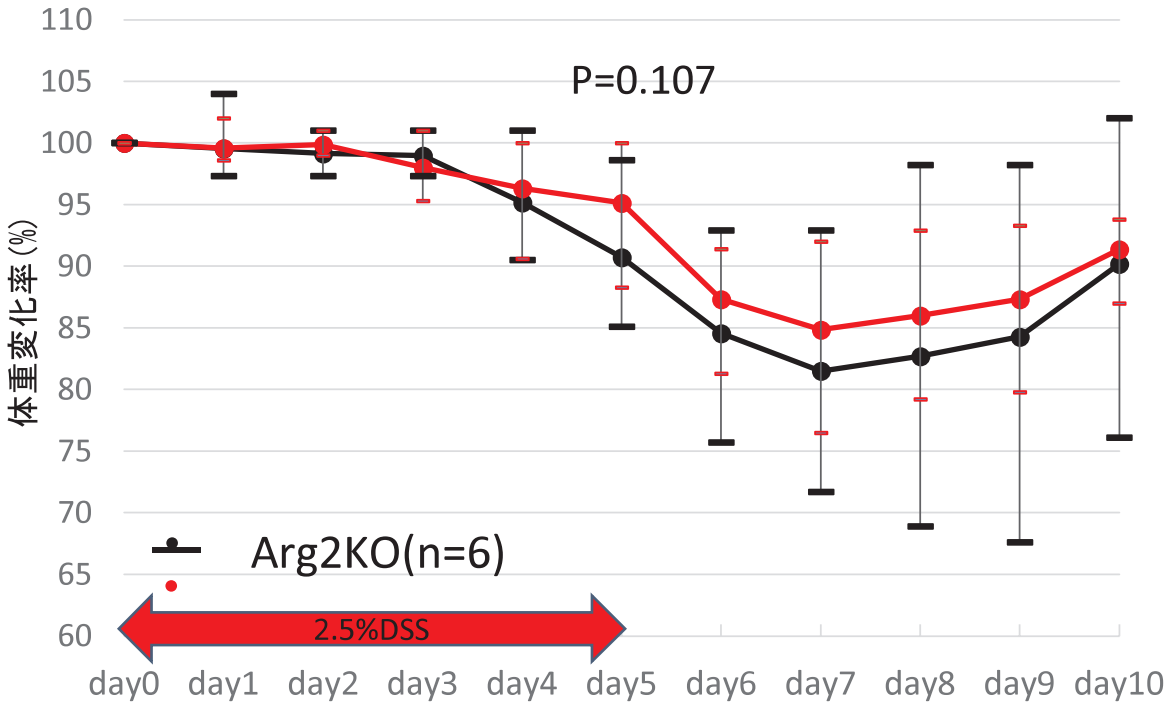


Fig.2　DSS腸炎モデルにおける症状

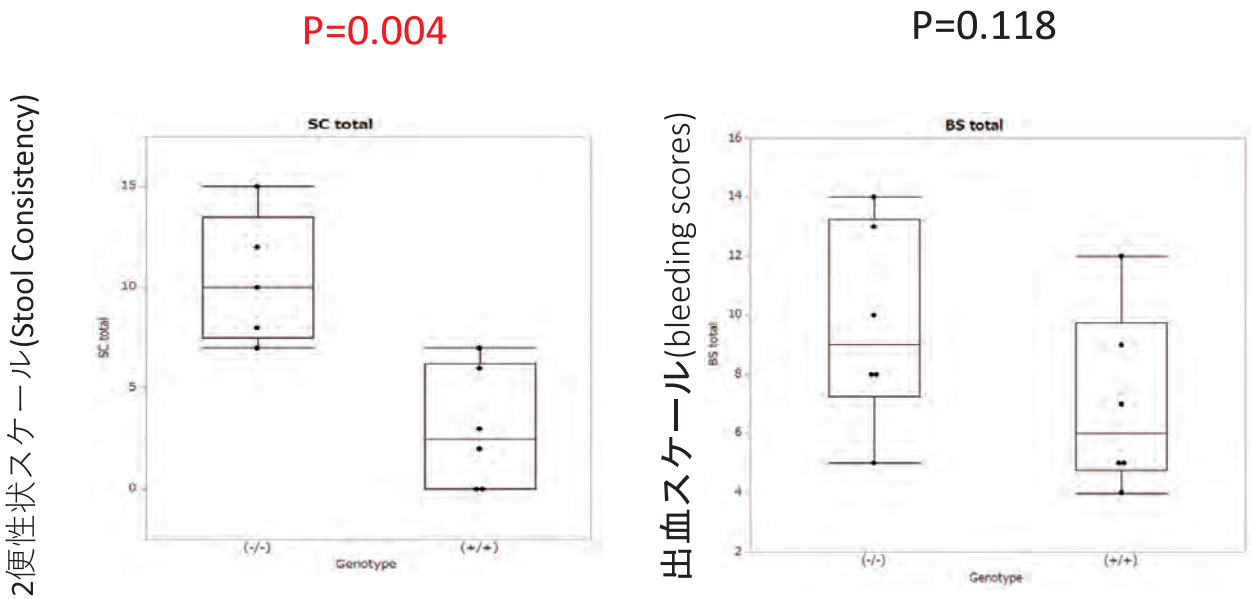
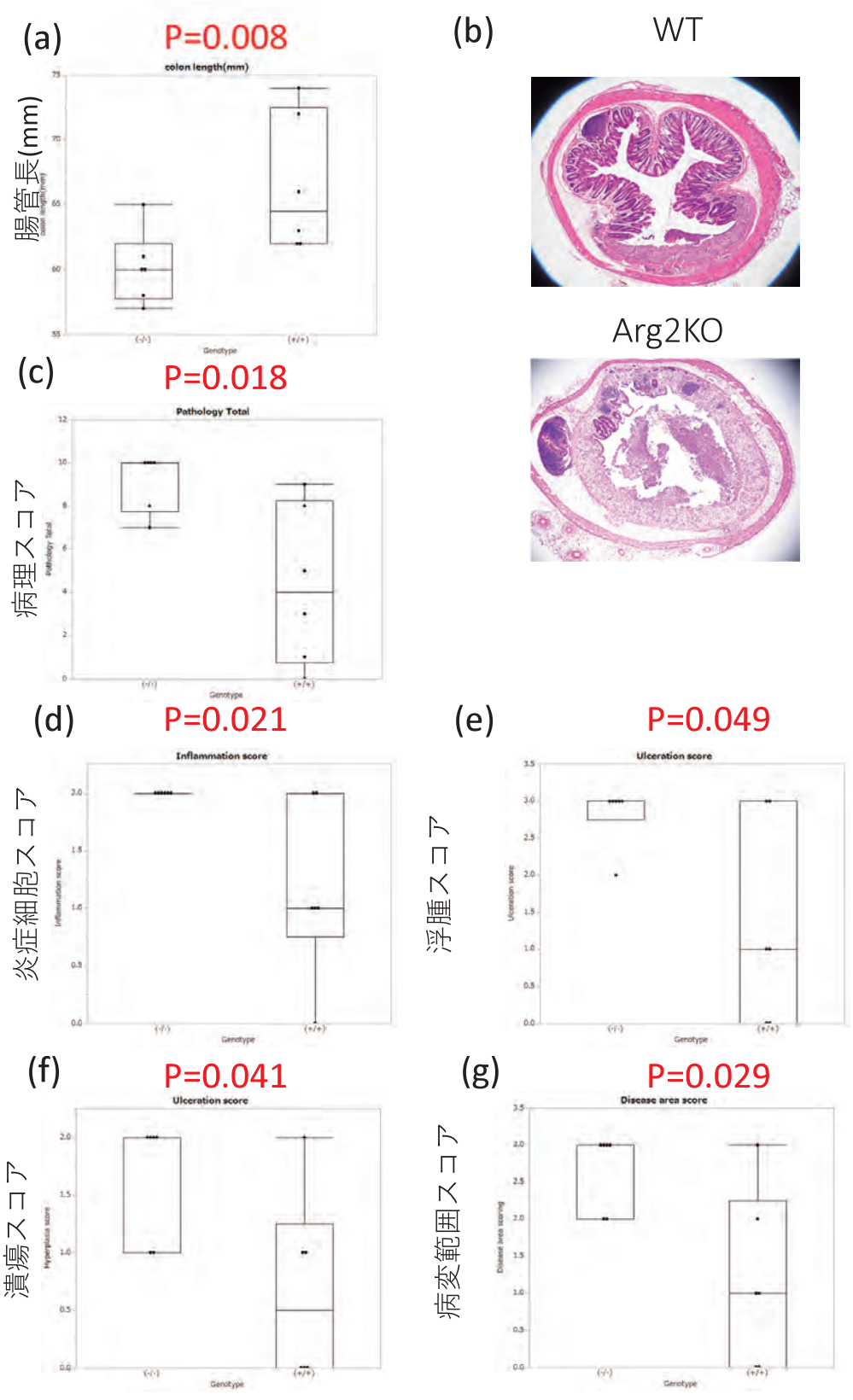


Fig.3　DSS腸炎モデルの病理学的評価



分担研究報告書

AhR シグナルの活性化が歯槽骨量へ及ぼす影響の解明に関する研究

研究分担者　　前田　英史　九州大学歯科保存学研究分野　教授
研究協力者　　友清　淳　　九州大学病院歯内治療科　講師

研究要旨　AhR シグナルの活性化により、ヒト歯根膜細胞の *Collagen type 3* および *Vascular-Endothelial Growth Factor* 遺伝子発現が抑制されることが明らかになった。

A．研究目的

油症患者における口腔内環境、特に歯槽骨の状態について検証し、AhR シグナルの活性化と、歯槽骨量の低下との関連性を明らかにする計画である。

B．研究方法

ヒト歯根膜より採取したヒト歯根膜細胞を、AhR シグナルのアクチベーターである 10 nM Benzo(a)pyrene (BaP) と共に７日間培養を行った。培養後に mRNA を回収したのち、逆転写酵素にて cDNA を作製した。この cDNA を用いて、RT-PCR 法を用い、無刺激のヒト歯根膜細胞との遺伝子発現量について比較を行った。

（倫理面への配慮）

ヒト歯根膜細胞の使用は、九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会へ申請を行ったのち、承認を得ている。またインフォームドコンセントを行い、患者からの同意を得たうえで実験に使用している。細胞には匿名化を行い、本人特定を不可としている。

C．研究結果

BaP 刺激群は無刺激群と比較して、*Collagen type 3 (COL3)* および *Vascular-Endothelial Growth Factor (VEGF)* 遺伝子の発現量が低下する傾向が認められた。

D．考察

COL3 は COL1 と同様に歯根膜を構成する主要なコラーゲンであることが知られている。我々は既に AhR シグナルの活性化により *COL1* の発現量が低下することを報告しており (Monnouchi et al. 2016)、本実験にてさらに AhR シグナルの活性化により、ヒト歯根膜組織におけるコラーゲン形成が抑制される可能性が強く示唆された。

また VEGF は、血管新生や脈管形成において重要な役割を果たす。血管は歯根膜組織における栄養供給に重要な役割を果たすことから、*VEGF* の発現量の低下は、歯根膜組織における恒常性の維持に影響を及ぼす可能性が示唆された。

E．結論

AhR シグナルの活性化は、ヒト歯根膜細胞の *COL3* および *VEGF* 遺伝子の発現量を低下させる。

F．研究発表

上記は次年度発表予定

分担研究報告書

油症患者の関節症状に関する研究
―Kynurenine pathway の関節炎への影響 ―

研究分担者　津嶋　秀俊　九州大学病院 整形外科　助教

研究要旨　油症患者が、発症初期より骨・関節症状を有することは報告されている。診断基準の参考所見より関節痛は含まれてはいないが、油症発症より 50 年が経過した現在においても、多くの油症患者が、骨・関節症状を訴えており、その病態を理解し、解決していくことが必要である。

A.研究目的

ダイオキシン類が運動器機能へ影響を及ぼすことは知られており、特に関節腫脹、関節痛は発症初期より発生する。2005 年の油症認定患者を対象に施行されたアンケート調査においては、72.5％の患者が何らかの関節痛を有していた。ダイオキシン類レベルと、関節痛特に膝関節痛との間には正の関連があると報告されている。ダイオキシン類の作用は aryl hydrocarbon receptor (AhR)を介して調節されている。ダイオキシン類を含む ligand が AhR に結合すると、核内に移行し、種々の因子が転写、産生されることになる。関節の腫脹や疼痛を惹起するのは滑膜の炎症であることが多いが、この関節内滑膜においても AhR が発現していることは知られている。AhR の ligand の一つにキヌレニン(KYN)がある。食事によって摂取された必須アミノ酸であるトリプトファン(Trp)の 99%は KYN に代謝される。この代謝経路はキヌレニン経路(Kynurenine Pathway: KP)とよばれ、Trp から KYN への代謝は、律速段階酵素であるインドレアミン 2,3-デオキシゲナーゼ (IDO) によって行われる。そして、IDO は炎症性サイトカインによって活性化されることが知られている。変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) や関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA) では IL-1β、TNF-α、TGF-β、IFN-γ、IL-6 など炎症促進性サイトカインが上昇し、関節内において IDO の活性化、つまり KP が活性化されていると推測される。しかし、OA や RA における KYN, KP の役割についてはまだ明らかでない。

OA や RA など関節炎において、AhR の endogeneous ligand である KYN, および KYN 経路、その代謝産物の役割を明らかにすることを通して、油症の関節症状の病態の理解を深めることが、この研究の目的である。KP の簡略図を Figure1 に示す。

B.研究計画・方法

KYN を中心としたトリプトファンの代謝産物の関節内における影響を in vitro もしくは ex vivo で検討する。マウス由来前駆軟骨細胞株 ATDC5 や、OA もしくは RA 患者もしくはマウスの関節軟骨および滑膜を採取し細胞を抽出し細胞培養するか organ culture を行い、KYN およびさらに下流の

代謝産物、代謝酵素の inhibitor を用いて刺激する。刺激後、軟骨変性の変化をサフラニンＯ染色で評価する。刺激を受けた滑膜細胞もしくは軟骨細胞軟骨細胞の合成因子(aggrecan, Col2 など)や軟骨変性因子(Col10 、 MMP1, MMP3 、 MMP13 、 ADAMTS5 など)の遺伝子発現変化を PCR にて、蛋白発現を免疫染色にて解析する。

C.研究結果

マウス由来前駆軟骨細胞株 ATDC5 に、KYN, Kynurenic Acid (KYNA), IDO inhibitor, KMO inhibitor で 48 時間刺激を行い回収し、軟骨基質の Acan, 基質分解酵素の１つである MMP13 の mRNA の発現をみたところ、KYN では Acan の発現が減少し、MMP13 の発現が上昇していた(Figure2)。IDO inhibitor 投与を行ったが、KYN と同様の結果となった。代謝産物の一つである KYNA を投与すると、KYN と反対に Acan mRNA 発現は軽度上昇を呈し、MMP13 mRNA 発現は抑制されていた。そこで、KMO inhibitor を投与し、KYNA の増加へと代謝を誘導すると KYNA 投与の結果と同様に Acan の発現は上昇し、MMP13 の発現は減少していた。

D．考察

AhR の endogeneous ligand として知られる KYN が軟骨細胞において、catabolic な作用を有している可能性が示された。

一方で、KP 代謝産物の一つである KYNA は anabolic な作用を有していた。ＫＹＮ pathway 内の代謝産物によって、関節における作用が異なることが示唆された。この増加した KYN を KYNA へと代謝できれば、軟骨保護作用へと変換できる可能性がある。

関節炎において、関節液は貯留することが多く、関節液内の代謝産物はその関節炎の状態や病態を探るための重要な材料となる。関節内代謝産物を分析するために、健常者の関節液および膝関節や足関節 OA 患者の関節液を採取し、メタボローム解析を行い比較した。ＯＡ関節液中には Trp と KYN が増加していたことが分かった。この増加した KYN およびキヌレニン経路の亢進が、関節内の滑膜や軟骨に対してどのような影響を及ぼすかを調べることは関節炎の病態解明につながると考える。

E.結論

KYN が関節内に過剰に増加することは、軟骨変性など負の影響を及ぼす可能性がある。

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

なし

Figure1

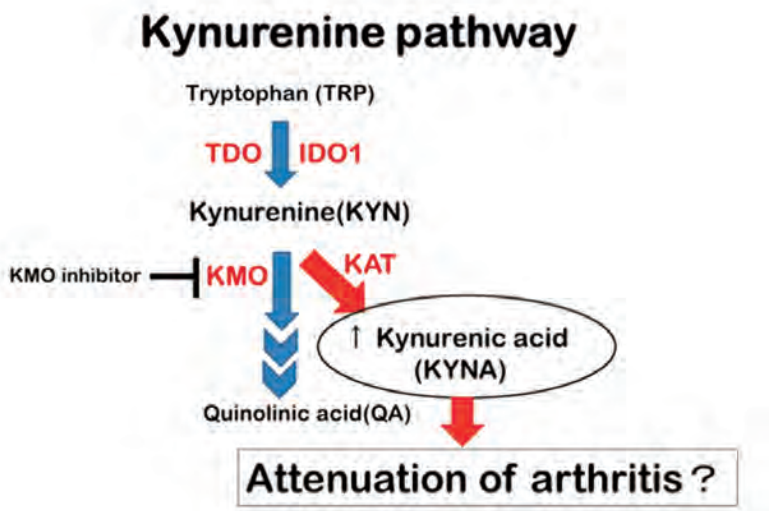
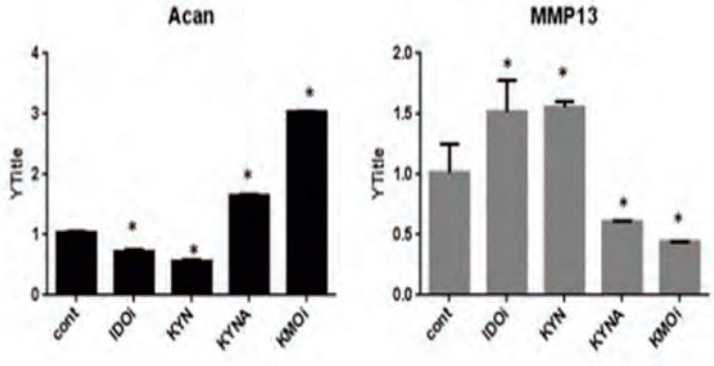


Figure2



厚生労働科学研究費の補助を受けたことが明記された書籍・雑誌

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
【厚生労働科学研究費により刊行】　なし

雑誌：発表者氏名，論文タイトル名，発表誌名，巻号，ページ，出版年，

【厚生労働科学研究費により刊行】
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，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.

近藤英明、三苫千景、前田隆浩、古江増隆．油症患者におけるダイオキシン類毒性と不眠：全国横断調査結果．福岡医誌，110(2)，97-108（2019).

辻　学、竹村正規、八谷顕子、古江増隆、中原剛士：上皮成長因子受容体阻害薬によって生じる芳香族炭化水素受容体の活性化について：ざ瘡様発疹の発症機序の可能性．福岡医誌，110(2)，113-121（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

【辻　学】

Furue M, Ishii Y, Tsukimori K, Tsuji G. Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin- Related Health Hazards-Lessons from Yusho. Int J Mol Sci. 2021 Jan 12;22(2):E708. doi: 10.3390/ijms22020708. PMID: 33445793.

Vu YH, Hashimoto-Hachiya A, Takemura M, Yumine A, Mitamura Y, Nakahara T, Furue M, Tsuji G. IL-24 Negatively Regulates Keratinocyte Differentiation Induced by Tapinarof, an Aryl Hydrocarbon Receptor Modulator: Implication in the Treatment of Atopic Dermatitis. Int J Mol Sci. 2020 Dec 10;21(24):9412. doi: 10.3390/ijms21249412. PMID: 33321923; PMCID: PMC7764126.

Onozuka D, Nakamura Y, Tsuji G, Furue M. Cancer- and noncancer-specific cumulative incidence of death after exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins: A competing risk analysis among Yusho patients. Environ Int. 2020 Dec 13;147:106320. doi: 10.1016/j.envint.2020.106320. Epub ahead of print. PMID: 33321390.

Onozuka D, Nakamura Y, Tsuji G, Furue M. Mortality in Yusho patients exposed to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans: a 50-year retrospective cohort study. Environ Health. 2020 Nov 23;19(1):119. doi: 10.1186/s12940-020-00680-0. PMID: 33228703; PMCID: PMC7685647.

Nakahara T, Kido-Nakahara M, Tsuji G, Furue M. Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. J Dermatol. 2020 Oct 29. doi: 10.1111/1346-8138.15664. Epub ahead of print. PMID: 33118662.

Mochizuki T, Tsuboi R, Iozumi K, Ishizaki S, Ushigami T, Ogawa Y, Kaneko T, Kawai M, Kitami Y, Kusuhara M, Kono T, Sato T, Sato T, Shimoyama H, Takenaka M, Tanabe H, Tsuji G, Tsunemi Y, Hata Y, Harada K, Fukuda T, Matsuda T, Maruyama R; Guidelines Committee of the Japanese Dermatological Association. Guidelines for the management of dermatomycosis (2019). J Dermatol. 2020 Dec;47(12):1343-1373. doi: 10.1111/1346-8138.15618. Epub 2020 Sep 25. PMID: 32978814.

Furue K, Ito T, Tsuji G, Nakahara T, Furue M. Scratch wound-induced CXCL8 upregulation is EGFR-dependent in keratinocytes. J Dermatol Sci. 2020 Sep;99(3):209-212. doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.07.002. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32690371.

Furue K, Ulzii D, Tanaka Y, Ito T, Tsuji G, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Furue M. Pathogenic implication of epidermal scratch injury in psoriasis and atopic dermatitis. J Dermatol. 2020 Sep;47(9):979-988. doi: 10.1111/1346-8138.15507. Epub 2020 Jul 16. PMID: 32677165.

Kido-Nakahara M, Wang B, Ohno F, Tsuji G, Ulzii D, Takemura M, Furue M, Nakahara T. Inhibition of mite-induced dermatitis, pruritus, and nerve sprouting in mice by the endothelin receptor antagonist bosentan. Allergy. 2021 Jan;76(1):291-301. doi: 10.1111/all.14451. Epub 2020 Jul 16. PMID: 32535962.

Nakahara T, Kido-Nakahara M, Ulzii D, Miake S, Fujishima K, Sakai S, Chiba T, Tsuji G, Furue M. Topical application of endothelin receptor an antagonist attenuates imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation. Sci Rep. 2020 Jun 11;10(1):9510. doi: 10.1038/s41598-020-66490-z. PMID: 32528072; PMCID: PMC7289852.

Tanaka Y, Ito T, Tsuji G, Furue M. Baicalein Inhibits Benzo[a]pyrene-Induced Toxic Response by Downregulating Src Phosphorylation and by Upregulating NRF2-HMOX1 System. Antioxidants (Basel). 2020 Jun 9;9(6):507. doi: 10.3390/antiox9060507. PMID: 32526964; PMCID: PMC7346154.

Yumine A, Tsuji G, Furue M. Selective PPARα agonist pemafibrate inhibits TNF-α-induced S100A7 upregulation in keratinocytes. J Dermatol Sci. 2020 Jul;99(1):69-72. doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.05.005. Epub 2020 May 19. PMID: 32507539.

Eto A, Nakahara T, Kido-Nakahara M, Tsuji G, Furue M. Acrosyringeal endothelin-1 expression: Potential for fostering melanocytes in volar sites. J Dermatol. 2020 Aug;47(8):924-925. doi: 10.1111/1346-8138.15404. Epub 2020 May 18. PMID: 32424933.

Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Yen VH, Miake S, Takemura M, Mitamura Y, Ito T, Murata M, Furue M, Nakahara T. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Downregulates IL-33 Expression in Keratinocytes via Ovo-Like 1. J Clin Med. 2020 Mar 24;9(3):891. doi: 10.3390/jcm9030891. PMID: 32214018; PMCID: PMC7141508.

Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Yen VH, Takemura M, Yumine A, Furue K, Furue M, Nakahara T. Metformin inhibits IL-1β secretion via impairment of NLRP3 inflammasome in keratinocytes: implications for preventing the development of psoriasis. Cell Death Discov. 2020 Mar 4;6:11. doi: 10.1038/s41420-020-0245-8. PMID: 32194991; PMCID: PMC7055596.

Furue M, Furue K, Tsuji G, Nakahara T. Interleukin-17A and Keratinocytes in Psoriasis. Int J Mol Sci. 2020 Feb 13;21(4):1275. doi: 10.3390/ijms21041275. PMID: 32070069; PMCID: PMC7072868.

Furue M, Ulzii D, Nakahara T, Tsuji G, Furue K, Hashimoto-Hachiya A, Kido- Nakahara M. Implications of IL-13Rα2 in atopic skin inflammation. Allergol Int. 2020 Jul;69(3):412-416. doi: 10.1016/j.alit.2020.01.005. Epub 2020 Feb 6. PMID: 32037147.

Furue K, Ito T, Tanaka Y, Hashimoto-Hachiya A, Takemura M, Murata M, Kido- Nakahara M, Tsuji G, Nakahara T, Furue M. The EGFR-ERK/JNK-CCL20 Pathway in Scratched Keratinocytes May Underpin Koebnerization in Psoriasis Patients. Int J Mol Sci. 2020 Jan 9;21(2):434. doi: 10.3390/ijms21020434. PMID: 31936670; PMCID: PMC7013594.

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):4864. doi: 10.3390/ijerph16234864. PMID: 31816860; PMCID: PMC6926551.

Furue K, Ito T, Tsuji G, Nakahara T, Furue M. The CCL20 and CCR6 axis in psoriasis. Scand J Immunol. 2020 Mar;91(3):e12846. doi: 10.1111/sji.12846. Epub 2019 Nov 24. PMID: 31692008.

Furue M, Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G. Aryl Hydrocarbon Receptor in Atopic Dermatitis and Psoriasis. Int J Mol Sci. 2019 Oct 31;20(21):5424. doi: 10.3390/ijms20215424. PMID: 31683543; PMCID: PMC6862295.

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. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.09.002. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31606066.

Furue K, Ito T, Tsuji G, Ulzii D, Vu YH, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Furue M. The IL-13-OVOL1-FLG axis in atopic dermatitis. Immunology. 2019 Dec;158(4):281-286. doi: 10.1111/imm.13120. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31509236; PMCID: PMC6856930.

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):4053. doi: 10.3390/ijms20164053. PMID: 31434203; PMCID: PMC6719908.

Peng F, Tsuji G, Zhang JZ, Chen Z, Furue M. Potential role of PM2.5 in melanogenesis. Environ Int. 2019 Nov;132:105063. doi: 10.1016/j.envint.2019.105063. Epub 2019 Aug 6. PMID: 31394397.

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. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.07.005. Epub 2019 Jul 24. PMID: 31378660.

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. doi: 10.1111/1346-8138.15011. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31294475.

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):3324. doi: 10.3390/ijms20133324. PMID: 31284553; PMCID: PMC6651282.

Shibuya S, Watanabe K, Tsuji G, Ichihashi M, Shimizu T. Platinum and palladium nanoparticle-containing mixture, PAPLAL, does not induce palladium allergy. Exp Dermatol. 2019 Sep;28(9):1025-1028. doi: 10.1111/exd.13996. Epub 2019 Jul 31. PMID: 31260134.

Furue M, Ulzii D, Vu YH, Tsuji G, Kido-Nakahara M, Nakahara T. Pathogenesis of Atopic Dermatitis: Current Paradigm. Iran J Immunol. 2019 Jun;16(2):97-107. doi: 10.22034/IJI.2019.80253. PMID: 31182684.

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. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.04.002. Epub 2019 Apr 13. PMID: 31010609.

Furue K, Ito T, Tsuji G, Kadono T, Furue M. Psoriasis and the TNF/IL23/IL17 axis. G Ital Dermatol Venereol. 2019 Aug;154(4):418-424. doi: 10.23736/S0392-0488.18.06202-8. Epub 2019 Jan 15. PMID: 30648836.

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. doi: 10.1111/1346-8138.14681. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30353917.

Furue M, Uchi H, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Tanaka Y, Ito T, Tsuji G. Implications of tryptophan photoproduct FICZ in oxidative stress and terminal differentiation of keratinocytes. G Ital Dermatol Venereol. 2019 Feb;154(1):37-41. doi: 10.23736/S0392-0488.18.06132-1. Epub 2018 Jul 20. PMID: 30035475.

Furue M, Fuyuno Y, Mitoma C, Uchi H, Tsuji G. Therapeutic Agents with AHR Inhibiting and NRF2 Activating Activity for Managing Chloracne. Antioxidants (Basel). 2018 Jul 13;7(7):90. doi: 10.3390/antiox7070090. PMID: 30011787; PMCID: PMC6071176.

Furue M, Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G. Antioxidative Phytochemicals Accelerate Epidermal Terminal Differentiation via the AHR-OVOL1 Pathway: Implications for Atopic Dermatitis. Acta Derm Venereol. 2018 Nov 5;98(10):918-923. doi: 10.2340/00015555-3003. PMID: 29972223.

Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G, Murai M, Yan X, Furue M. Upregulation of FLG, LOR, and IVL Expression by Rhodiola crenulata Root Extract via Aryl Hydrocarbon Receptor: Differential Involvement of OVOL1. Int J Mol Sci. 2018 Jun 4;19(6):1654. doi: 10.3390/ijms19061654. PMID: 29866992; PMCID: PMC6032276.

Murai M, Yamamura K, Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G, Furue M, Mitoma C. Tryptophan photo-product FICZ upregulates AHR/MEK/ERK-mediated MMP1 expression: Implications in anti-fibrotic phototherapy. J Dermatol Sci. 2018 Jul;91(1):97-103. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.04.010. Epub 2018 Apr 21. PMID: 29703420.

Takemura M, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Furue M, Tsuji G. Glyteer, Soybean Tar, Impairs IL-4/Stat6 Signaling in Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells: The Basis of Its Therapeutic Effect on Atopic Dermatitis. Int J Mol Sci. 2018 Apr 12;19(4):1169. doi: 10.3390/ijms19041169. PMID: 29649105; PMCID: PMC5979322.

Tsuji G, Ito T, Chiba T, Mitoma C, Nakahara T, Uchi H, Furue M. The role of the OVOL1-OVOL2 axis in normal and diseased human skin. J Dermatol Sci. 2018 Jun;90(3):227-231. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.02.005. Epub 2018 Feb 12. PMID: 29454536.

Furue K, Ito T, Tsuji G, Kadono T, Nakahara T, Furue M. Autoimmunity and autoimmune co-morbidities in psoriasis. Immunology. 2018 May;154(1):21-27. doi: 10.1111/imm.12891. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29315555; PMCID: PMC5904708.

Kaku-Ito Y, Ito T, Tsuji G, Nakahara T, Hagihara A, Furue M, Uchi H. Evaluation of mapping biopsies for extramammary Paget disease: A retrospective study. J Am Acad Dermatol. 2018 Jun;78(6):1171-1177.e4. doi: 10.1016/j.jaad.2017.12.040. Epub 2017 Dec 23. PMID: 29277730.

Furue K, Yamamura K, Tsuji G, Mitoma C, Uchi H, Nakahara T, Kido-Nakahara M, Kadono T, Furue M. Highlighting Interleukin-36 Signalling in Plaque Psoriasis and Pustular Psoriasis. Acta Derm Venereol. 2018 Jan 12;98(1):5-13. doi: 10.2340/00015555-2808. PMID: 28967976.

【古江増隆】

Kido-Nakahara M, Nakahara T, Yasukochi Y, Ulzii D, Furue M. Patient-Oriented Eczema Measure score : A Useful Tool for Web-Based Surveys in Patients with Atopic Dermatitis. Acta Derm Venereol. 2020 May 28;100(10):adv00159. doi:10.2340/00015555-3530. PMID： 32449786. In press.

Kido-Nakahara M, Wang B, Ohno F, Tsuji G, Ulzii D, Takemura M, Furue M, Nakahara T. Inhibition of mite-induced dermatitis, pruritus, and nerve sprouting in mice by the endothelin receptor antagonist bosentan. Allergy. 2020 Jun 14. doi：10.1111/all.14451. Epub ahead of print. PMID：32535962. In press.

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. Epub ahead of print. PMID：30903995. In press.

Sagata N, Kano SI, Ohgidani M, Inamine S, Sakai Y, Kato H, Masuda K, Nakahara T, Nakahara-Kido M, Ohga S, Furue M, Sawa A, Kanba S, Kato TA. Forskolin rapidly enhances neuron-like morphological change of directly induced-neuronal cells from neurofibromatosis type 1 patients. Neuropsychopharmacol Rep. 2020 Oct 10. doi：10.1002/npr2.12144. Epub ahead of print. PMID：33037790. In press.

Asahina R, Ueda K, Oshima Y, Kanei T, Kato M, Furue M, Tsukui T, Nagata M, Maeda S. Serum canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) concentrations correlate with disease severity and therapeutic responses in dogs with atopic dermatitis. Vet Dermatol. 2020 Sep 17. doi：10.1111/vde.12894. Epub ahead of print. PMID：32945018. In press.

Sato S, Chiba T, Nakahara T, Furue M. Upregulation of IL-36 cytokines in folliculitis and eosinophilic pustular folliculitis. Australas J Dermatol. 2020 Feb；61(1)：e39-e45.

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. 2020 Jan ; 44(1) : 87-97.

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. 2020 Feb ; 47(2) : 128-132.

Ichiki T, Sugita K, Furue M, Yamamoto O. An Intimate Relationship Between Intralesional Depigmentation and Peripheral Nervous System in Lichen Simplex Chronicus. Acta Derm Venereol. 2020 Jan 30 ; 100(1) : adv00042. doi : 10.2340/00015555-3390. PMID : 31821517.

Leshem YA, Chalmers JR, Apfelbacher C, Furue M, Gerbens LAA, Prinsen CAC, Schmitt J, Spuls PI, Thomas KS, Williams HC, Simpson EL. Harmonising Outcome Measures for Eczema (HOME) initiative. Measuring atopic eczema symptoms in clinical practice : The first consensus statement from the Harmonising Outcome Measures for Eczema in clinical practice initiative. J Am Acad Dermatol. 2020 May ; 82(5) : 1181-1186.

Furue K, Ito T, Tanaka Y, Hashimoto-Hachiya A, Takemura M, Murata M, Kido- Nakahara M, Tsuji G, Nakahara T, Furue M. The EGFR-ERK/JNK-CCL20 Pathway in Scratched Keratinocytes May Underpin Koebnerization in Psoriasis Patients. Int J Mol Sci. 2020 Jan 9 ; 21(2) : 434.

Murata M, Ito T, Tanaka Y, Yamamura K, Furue K, Furue M. OVOL2-Mediated ZEB1 Downregulation May Prevent Promotion of Actinic Keratosis to Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. J Clin Med. 2020 Feb 25 ; 9(3) : 618.

Ito T, Kaku-Ito Y, Murata M, Furue K, Shen CH, Oda Y, Furue M. Immunohistochemical BRAF V600E Expression and Intratumor BRAF V600E Heterogeneity in Acral Melanoma : Implication in Melanoma-Specific Survival. J Clin Med. 2020 Mar 4 ; 9(3) : 690.

Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Yen VH, Takemura M, Yumine A, Furue K, Furue M, Nakahara T. Metformin inhibits IL-1 β secretion via impairment of NLRP3 inflammasome in keratinocytes : implications for preventing the development of psoriasis. Cell Death Discov. 2020 Mar 4 ; 6 : 11.

Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Yen VH, Miake S, Takemura M, Mitamura Y, Ito T, Murata M, Furue M, Nakahara T. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Downregulates IL-33 Expression in Keratinocytes via Ovo-Like 1. J Clin Med. 2020 Mar 24 ; 9(3) : 891.

Kamio Y, Gunge Y, Koike Y, Kuwatsuka Y, Tsuruta K, Yanagihara K, Furue M, Murota H. Insight into innate immune response in " Yusho" : The impact of natural killer cell and regulatory T cell on inflammatory prone diathesis of Yusho patients. Environ Res. 2020 Jun ; 185 : 109415.

Tanaka Y, Ito T, Tsuji G, Furue M. Baicalein Inhibits Benzo[a] pyrene-Induced Toxic Response by Downregulating Src Phosphorylation and by Upregulating NRF2-HMOX1 System. Antioxidants (Basel). 2020 Jun 9；9(6)：507.

Nakahara T, Kido-Nakahara M, Ulzii D, Miake S, Fujishima K, Sakai S, Chiba T, Tsuji G, Furue M. Topical application of endothelin receptor a antagonist attenuates imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation. Sci Rep. 2020 Jun 11；10(1)：9510.

Eto A, Nakahara T, Kido-Nakahara M, Tsuji G, Furue M. Acrosyringeal endothelin-1 expression：Potential for fostering melanocytes in volar sites. J Dermatol. 2020 Aug；47 (8)：924-925.

Yumine A, Tsuji G, Furue M. Selective PPAR α agonist pemafibrate inhibits TNF- α -induced S100A7 upregulation in keratinocytes. J Dermatol Sci. 2020 Jul；99(1)：69-72.

Furue K, Ito T, Tsuji G, Nakahara T, Furue M. Scratch wound-induced CXCL8 upregulation is EGFR-dependent in keratinocytes. J Dermatol Sci. 2020 Sep；99 (3)：209-212.

Ito T, Kaku-Ito Y, Wada-Ohno M, Furue M. Narrow-Margin Excision for Invasive Acral Melanoma：Is It Acceptable? J Clin Med. 2020 Jul 16；9(7)：2266.

Murata M, Ito T, Tanaka Y, Kaku-Ito Y, Furue M. NECTIN4 Expression in Extramammary Paget's Disease：Implication of a New Therapeutic Target. Int J Mol Sci. 2020 Aug 16；21(16)：5891.

Nakahara T, Izuhara K, Onozuka D, Nunomura S, Tamagawa-Mineoka R, Masuda K, Ichiyama S, Saeki H, Kabata Y, Abe R, Ohtsuki M, Kamiya K, Okano T, Miyagaki T, Ishiuji Y, Asahina A, Kawasaki H, Tanese K, Mitsui H, Kawamura T, Takeichi T, Akiyama M,

Nishida E, Morita A, Tonomura K, Nakagawa Y, Sugawara K, Tateishi C, Kataoka Y, Fujimoto R, Kaneko S, Morita E, Tanaka A, Hide M, Aoki N, Sano S, Matsuda-Hirose H, Hatano Y, Takenaka M, Murota H, Katoh N, Furue M. Exploration of biomarkers to predict clinical improvement of atopic dermatitis in patients treated with dupilumab：A study protocol. Medicine (Baltimore). 2020 Sep 18；99(38)：e22043.

Kinoshita I, Yamada Y, Kohashi K, Yamamoto H, Iwasaki T, Ishihara S, Toda YU, Ito Y, Susuki Y, Kawaguchi K, Ichiki T, Sato Y, Furue M, Nakashima Y, Oda Y. Frequent MN1 Gene Mutations in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. Anticancer Res. 2020 Nov； 40(11)：6221-6228.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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) : 169.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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)：3324.

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.

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.

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.

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 Ccl17 and Ccl 22 Production in Dendritic Cells：Implications for Atopic Dermatitis. Int J Mol Sci. 2019 Aug 20；20(16)：4053.

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.

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.

Tanaka Y, Uchi H, Furue M. Antioxidant cinnamaldehyde attenuates UVB-induced photoaging. J Dermatol Sci. 2019 Dec；96(3)：151-158. doi：10.1016/j.jdermsci.2019.11.001. Epub 2019 Nov 6. PMID：31735467.
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.

Ito T, Kaku-Ito Y, Murata M, Ichiki T, Kuma Y, Tanaka Y, Ide T, Ohno F, Wada-Ohno M, Yamada Y, Oda Y, Furue M. Intra- and Inter-Tumor BRAF Heterogeneity in Acral Melanoma：An Immunohistochemical Analysis. Int J Mol Sci. 2019 Dec 8；20(24)：6191.

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

Yamada Y, Kinoshita I, Kenichi K, Yamamoto H, Iwasaki T, Otsuka H, Yoshimoto M, Ishihara S, Toda Y, Kuma Y, Setsu N, Koga Y, Honda Y, Inoue T, Yanai H, Yamashita K, Ito I, Takahashi M, Ohga S, Furue M, Nakashima Y, Oda Y. Histopathological and genetic review of phosphaturic mesenchymal tumours, mixed connective tissue variant. Histopathology. 2018 Feb；72(3)：460-471.

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

Nakahara T, Kido-Nakahara M, Ohno F, Ulzii D, Chiba T, Tsuji G, Furue M. The pruritogenic mediator endothelin-1 shifts the dendritic cell-T-cell response toward Th17/Th1 polarization. Allergy. 2018 Feb；73(2)：511-515.

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

Takeuchi S, Oba J, Esaki H, Furue M. Non-corticosteroid adherence and itch severity influence perception of itch in atopic dermatitis. J Dermatol. 2018 Feb；45(2)：158-164.

Chiba T, Ishida N, Kohda F, Furue M. Air exposure may be associated with the histological differentiation of a cultured epidermal autograft (JACE). Australas J Dermatol. 2018 Aug；59(3)：e244-e246.

Mitoma C, Furue M. Overexpression of S100A7 protein is an integral part of abnormal epidermal differentiation in cornoid lamella of porokeratosis. Int J Dermatol. 2018 Feb；57 (2)：e7-e9.

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.

Kaku-Ito Y, Ito T, Tsuji G, Nakahara T, Hagihara A, Furue M, Uchi H. Evaluation of mapping biopsies for extramammary Paget disease：A retrospective study. J Am Acad Dermatol. 2018 Jun；78(6)：1171-1177.

Chiba T, Koga H, Kimura N, Murata M, Jinnai S, Suenaga A, Kohda F, Furue M. Clinical Condition and Management of 114 Mamushi (Gloydius blomhoffii) Bites in a General Hospital in Japan. Intern Med. 2018 Apr 15；57(8)：1075-1080.

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

Mitamura Y, Nunomura S, Nanri Y, Ogawa M, Yoshihara T, Masuoka M, Tsuji G, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Conway SJ, Furue M, Izuhara K. The IL-13/periostin/IL-24 pathway causes epidermal barrier dysfunction in allergic skin inflammation. Allergy. 2018 Sep；73(9)：1881-1891.

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

Takemura M, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Furue M, Tsuji G. Glyteer, Soybean Tar, Impairs IL-4/Stat6 Signaling in Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells：The Basis of Its Therapeutic Effect on Atopic Dermatitis. Int J Mol Sci. 2018 Apr 12；19(4)：1169.

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

Grinich EE, Schmitt J, Küster D, Spuls PI, Williams HC, Chalmers JR, Thomas KS, Apfelbacher C, Prinsen CAC, Furue M, Stuart B, Carter B, Simpson EL. Standardized reporting of the Eczema Area and Severity Index (EASI) and the Patient-Oriented Eczema Measure (POEM)：a recommendation by the Harmonising Outcome Measures for Eczema (HOME) Initiative. Br J Dermatol. 2018 Aug；179(2)：540-541.

Kabashima K, Furue M, Hanifin JM, Pulka G, Wollenberg A, Galus R, Etoh T, Mihara R, Nakano M, Ruzicka T. Nemolizumab in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis：Randomized, phase II, long-term extension study. J Allergy Clin Immunol. 2018 Oct；142(4)：1121-1130.

Chiba T, Nakahara T, Fujishima K, Hashimoto-Hachiya A, Furue M. Epidermal barrier disruption by 9-hydroxy-10E, 12Z-octadecadienoic acid in human keratinocytes. J Dermatol. 2018 Jun；45(6)：746-747.

Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G, Murai M, Yan X, Furue M. Upregulation of FLG, LOR, and IVL Expression by Rhodiola crenulata Root Extract via Aryl Hydrocarbon Receptor： Differential Involvement of OVOL1. Int J Mol Sci. 2018 Jun 4；19(6)：1654.

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

Furue M, Iida K, Imaji M, Nakahara T. Microbiome analysis of forehead skin in patients with atopic dermatitis and healthy subjects：Implication of Staphylococcus and Corynebacterium. J Dermatol. 2018 Jul；45(7)：876-877.

Maehara E, Kido-Nakahara M, Ito T, Uchi H, Furue M. Darier's sign in urticaria pigmentosa-significance of perivascular eosinophilic infiltration. Allergol Int. 2018 Oct；67 (4)：532-534.

Mitamura Y, Nunomura S, Nanri Y, Arima K, Yoshihara T, Komiya K, Fukuda S, Takatori H, Nakajima H, Furue M, Izuhara K. Hierarchical control of interleukin 13 (IL-13) signals in lung fibroblasts by STAT6 and SOX11. J Biol Chem. 2018 Sep 21；293(38)：14646-14658.

Mitamura Y, Murai M, Mitoma C, Furue M. NRF2 Activation Inhibits Both TGF- β 1- and IL-13-Mediated Periostin Expression in Fibroblasts：Benefit of Cinnamaldehyde for Antifibrotic Treatment. Oxid Med Cell Longev. 2018 Aug 7；2018：2475047.

Nagae K, Uchi H, Morino-Koga S, Tanaka Y, Oda M, Furue M. Glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide facilitates wound healing by activating PI3K/Akt pathway in keratinocytes. Diabetes Res Clin Pract. 2018 Dec；146：155-161.

Tanaka Y, Uchi H, Hashimoto-Hachiya A, Furue M. Tryptophan Photoproduct FICZ Upregulates IL1A, IL1B, and IL6 Expression via Oxidative Stress in Keratinocytes. Oxid Med Cell Longev. 2018 Nov 25；2018：9298052.

【石井祐次】

Furue M, Ishii Y, Tsukimori K, Tsuji G. Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin-Related Health Hazards-Lessons from Yusho. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(2): 708 (2021)

Takeda T., Fujii M., Izumoto W., Hattori Y., Matsushita T., Yamada H., Ishii Y., Gestational dioxin exposure suppresses prolactin-stimulated nursing in lactating dam rats to impair development of postnatal offspring. *Biochem. Pharmacol.* 178: 114106 (2020)

Hattori Y.*, Takeda T.*, Nakamura A., Nishida K., Shioji Y., Fukumitsu H., Yamada H., Ishii Y., The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. *Biochem. Pharmacol.*, 154: 213-221 (2018). *Equally contributed to this work

【申　敏哲】

Doi A, Sakasaki J, Tokunaga C, Sugita F, Kasae S, Nishimura K, Sato Y, Kuratsu T, Hashiguchi S, Shin MC, Yoshimura M. Both ipsilateral and contralateral, localized vibratory stimulations modulated pain-related sensory thresholds on the foot in mice and humans.　Journal of Pain Research (11),pp.1645-1657, 2018.

Shin MC, Nonaka K, Yamaga T, Wakita　M, Akaike H, Akaike N.　Calcium channel subtypes on glutamatergic mossy fiber terminals synapsing onto rat hippocampal CA3 neurons.　Journal of Neurophysiology 120(3),pp.1264-1273, 2018.

坂本勝哉, 田中哲子, 行平崇, 土井篤, 申敏哲. 骨格筋収縮への A2 型ボツリヌス毒素(A2NTX)の抑制効果. Journal of Kumamoto Health Science University (15),53-61, 2018.

Nonaka K, Kotani N, Akaike H, Shin MC, Yamaga T, Nagami H, Akaike N. Xenon modulates synaptic transmission to rat hippocampal CA3 neurons at both pre- and postsynaptic sites. 597(24), pp.5915-5933, 2019.

Torii Y, Sasaki M, Shin MC, Akaike N, Kaji R. Comparison of efficacy and toxicity between botulinum toxin subtypes A1 and A2 in cynomolgus macaques. Toxicon 153,pp.114-119, 2019.

申 敏哲，原野智樹，西山叶真，田中哲子，福永貴之，行平崇，土井篤．ラットの脳神経損傷に対する黒酢の有効性の検討．保健科学研究誌 (16),49-57, 2019.

行平崇，小牧龍二，福永貴之，田中哲子，申敏哲．舌への痛覚，温・冷覚刺激がラットの記憶力と学習能力に及ぼす影響. Journal of Kumamoto Health Science University (17), 49-58, 2020.

【香月　進】

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.

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.(2019)

Ionic liquid extraction for the determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in soil and sediment. Organohalogen Compounds, 2018. 80. 129-132.

Miyawaki, T., Sugihara, M., Hirakawa, S., Hori, T., Kajiwara, J., Katsuki, S., Mitoma, C., Furue, M. Compound-specific isotopic and congener-specific analyses of polychlorinated biphenyl in the heat medium and rice oil of the Yusho incident. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25, 16464-16471.

Hirakawa, S., Miyawaki, T., Hori, T., Kajiwara, J., Katsuki, S., Hirano, M., Yoshinouchi, Y., Iwata, H., Mitoma, C., Furue, M. Accumulation properties of polychlorinated biphenyl congeners in Yusho patients and prediction of their cytochrome P450-dependent metabolism by *in silico* analysis.　Environmental Science and Pollution Research, 2018. 25. 16455-16463.

【古賀信幸】

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**, 107-114 (2020).

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: 97-105, 2020.

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

太田千穂，山本健太，徳富美沙紀，加藤善久，古賀信幸．　3,7,3',4'-Tetramethoxyflavone (FTM)のラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝．中村学園研究紀要 51: 89-96, 2019.

【月森清巳】
Furue M, Ishii Y, Tsukimori K, Tsuji G. Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin- Related Health Hazards-Lessons from Yusho. Int J Mol Sci. 12;22(2):E708,2021.

Mitoma C, Uchi H, Tsukimori K, Todaka T, Kajiwara J, Shimose T, Akahane M, Imamura T, Furue M.　Current state of yusho and prospects for therapeutic strategies.
Environ Sci Pollut Res Int. 2018;25(17):16472-16480. doi: 10.1007/s11356-017-0833-1.

【戸高　尊】

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): 15-23.

Hori T, Yasutake D, Hirakawa H, Todaka T, Hirose Y, Shintani Y, Kajiwara J, Katsuki S, Mitoma C, Furue M. Blood dioxin concentrations and their tendencies examined in 2001-2017 annual inspections for Yusho. Fukuoka Igaku Zasshi, 2019 May; 110(2): 3-8.

【小野塚大介】

Onozuka D, Nakamura Y, Tsuji G, Furue M. Mortality in Yusho patients exposed to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans: a 50-year retrospective cohort study. Environmental Health. 2020;19(1):119.

【津嶋秀俊】

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.

【室田浩之】

Kamio Y, Gunge Y, Koike Y, Kuwatsuka Y, Tsuruta K, Yanagihara K, Furue M, Murota H
Insight into innate immune response in "Yusho": The impact of natural killer cell and regulatory T cell on inflammatory prone diathesis of Yusho patients.　*Environ Res* 185: 109415, 2020.10.1016/j.envres.2020.109415