令和４年度厚生労働行政推進調査事業費
食品の安全確保推進研究事業

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

令和４年度　　総括・分担研究報告書

研究代表者　辻　学

令和５（2023）年５月

令和４年度　　総括・分担研究報告書

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

令和４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

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　病院准教授）

太田　千穂　　（中村学園大学栄養科学部　准教授）

緒方　英紀　　（九州大学病脳神経内科　助教）

岡本　勇　　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　教授）

小野塚大介　　（大阪大学大学院医学系研究科口腔内微生物制御学　特任准教授）

貝沼茂三郎　　（富山大学附属病院和漢診療科　特命教授）

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）

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）

戸髙　尊　　（公益財団法人北九州生活科学センター　課長）

友清　淳　　（九州大学病院　歯内治療科　講師）

鳥巣　剛弘　　（九州大学病態機能内科　講師）

中原　剛士　　（九州大学大学大学院医学研究院皮膚科学分野　教授）

冬野　洋子　　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　助教）

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）

（五十音順）

研究協力者

芦田　美輪　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　助教）

池田　光政　（公益財団法人北九州生活科学センター　理事長）

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）

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）

熊谷　博史　（福岡県保健環境研究所企画情報管理課　課長）

古賀　信幸　（中村学園大学　名誉教授）

小木曽俊孝　（福岡県保健環境研究所計測技術課　主任技師）

佐藤　環　（福岡県保健環境研究所生活化学課　主任技師）

重富　敬太　（福岡県保健環境研究所生活化学課　技師）

新谷　依子　（福岡県保健環境研究所計測技術課　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　専門研究員）

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）

坪内　和哉　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教）

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）

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　主任技師）

堀　　就英　（福岡県保健環境研究所生活化学課　課長）

宮崎　昭行　（医療法人山内診療所　診療所長）

宮脇　崇　（北九州市立大学エネルギー循環化学科　准教授）

吉冨　泉　（諫早総合病院歯科口腔外科　医長）

吉村　惠　（医療法人社団温故会直方中村病院　病院長）

（五十音順）

目　　次

I. 令和４年度総括研究報告書

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

II. 令和４年度分担研究報告書

01. 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..... 7
研究分担者　香月　進
研究協力者　堀　就英，飛石　和大，佐藤　環，古谷　貴志，重富　敬太，
新谷　依子，小木曽　俊孝，平川　周作，戸髙　尊，広瀬　勇気，
宮脇　崇

02. 油症患者の血液中ポリ塩化ビフェニール異性体分析における分析条件の検討..... 18
研究分担者　戸髙　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

03. 油症検診データを用いた基礎的解析 22
研究分担者　香月　進
研究協力者　高尾　佳子，熊谷　博史

04. 油症患者の追跡調査 28
研究分担者　小野塚　大介
研究協力者　中村　優子，辻　学，中原　剛士

05. 油症認定患者の各種症状に対する桂枝茯苓丸の有効性に関する検討..... 30
研究分担者　貝沼　茂三郎

06. 油症検診における眼病変の追跡調査 34
研究分担者　園田　康平

07. 油症検診受診者における角膜内皮細胞 35
研究分担者　上松　聖典
研究協力者　北岡　隆

08. 長崎県油症地区における顎関節症に関する研究 37
研究分担者　川崎　五郎
研究協力者　吉冨　泉

09. 油症における末梢血 CD4 陽性 CD25 陽性細胞の検討 ……40
研究分担者　辻　博

10. 油症患者における皮膚ガス分析の追加検証 ……45
研究分担者　室田　浩之
研究協力者　芦田　美輪

11. 油症患者の関節症状に関する研究 ―関節炎におけるキヌレニン経路の影響 ―……50
研究分担者　津嶋　秀俊

12. カネミ油症患者における末梢神経障害のパターンに関する文献的考察と
他の中毒性疾患による神経障害との差異の研究……54
研究分担者　緒方　英紀

13. ダイオキシン類による気道傷害に対する
肺サーファクタント蛋白(SP-D)の上皮保護作用の研究……57
研究分担者　岡本　勇
研究協力者　鈴木　邦裕，坪内　和哉

14. 行動量計と分子生物学的手法を用いたベンゾピレン投与ラットに対する
ケイヒの中枢神経系での効果検討……62
研究分担者　申　敏哲
研究協力者　吉村　惠

15. Ah リガンドが腸上皮に与える影響……69
研究分担者　鳥巣　剛弘

16. 2,4,6-三塩素置換型 PCB119 の動物肝ミクロゾーム(Ms)による代謝研究……74
研究分担者　太田　千穂
研究協力者　古賀　信幸

17. 皮膚の慢性炎症・色素沈着におけるエンドセリン-1 と AHR の相互作用 ……82
研究分担者　中原　剛士

18. 膠原病の皮疹形成機序における AHR の役割に関する研究……84
研究分担者　冬野　洋子

19. 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……85
研究分担者　石井　祐次

20. ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質 1 (SELENBP1)：
ヒト由来細胞を用いた検討……100
研究分担者　石井　祐次

21. AhR シグナルの活性化によるヒト歯根膜細胞の
骨芽細胞分化抑制メカニズムの解析……110
研究分担者　前田　英史

22. AhR シグナルの活性化はヒト歯根膜細胞の MMP 発現に
どのような変化を及ぼすか.....112
研究分担者　友清　淳

III.　研究成果の刊行に関する一覧表 114

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3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油症認定患者の長期死亡リスクについて再評価を行っている。追跡調査期間を55年に延長し、油症認定患者の生存・死亡情報を更新した。

（２）臨床的追跡調査・疫学研究

①2021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1名と未認定者92名について結果集計を行った。認定患者の2,3,4,7,8-PeCDF濃度は66 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）濃度は57 pg TEQ/g-fatであった。未認定者の2,3,4,7,8-PeCDF濃度は平均8.5 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は13 pg TEQ/g-fatであった。

②ヒト体内で最も高濃度に検出される2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl（CB153）とヒトチトクロームP450（CYP）2A6組換え酵素をin vitro系で反応させ、生成した水酸化PCBをHRGC/HRMSで分析した。その結果、生成した水酸化PCB異性体は4'-OH-CB101と推定され、さらにin silico解析によるドッキング様式のシミュレーション結果を考慮すると、CB153は脱塩素化を伴う反応で4'-OH-CB101に代謝されると推測した。

③新しい分析カラムによるPCB異性体の分析を行ったところ、条件検討により20分の短縮が可能となった。またヘリウムガスの使用量が減少した。

④油症女性患者の閉経年齢と血中ダイオキシン類濃度との関連について追加検討をしている。

⑤カネミ油症患者に対する桂枝茯苓丸の臨床研究を後方視的に有効群と無効群で比較検討したところ、桂枝茯苓丸はカネミ油症患者の倦怠感に有効である可能性が示唆された。

（３）基礎的研究
①ヒトClub細胞株NCI-H441細胞に対してBenzo[a]pyrene(BaP)を投与すると、apoptosisや goblet cell differentiationを認める。これらの変化はヒトリコンビナントSP-Dの投与により抑制された。
②2,4,6-三塩素置換型PCB（246型PCB）の１つの2,4,6,3’,4’,5’-hexachlorobiphenyl（PCB119)につき、ラット・ヒト肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を解析した。
③紫外線照射モデルを用いてメラニン関連遺伝子とAHRの相互作用について検討した。
④実験動物を用い、AHRが欠損すると精巣の重量が減量する機序として、線維芽細胞成長因子の機能不全の可能性を示した。また、ダイオキシン誘導性蛋白質であるSelenbp1は癌抑制効果を発揮する可能性を示した。
⑤油症患者と健常者の皮膚ガスを採取、成分解析し、採取環境の影響について検討した。
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およびヒト歯根膜幹細胞株のMMP12が増加することが分かった。
⑦腸上皮細胞をAHRの作用物質で刺激したところ､NRF2をはじめとする抗酸化遺伝子の発現が誘導されることを確認した。
⑧AHRに作用するキヌレイン経路で産生されるキヌレン酸という物質が関節内の軟骨変性を誘導する可能性が示唆された。
⑨油症患者の血液細胞を分析したところ、油症患者において制御性T細胞の比率・細胞数は、対象者の間に明らかな差は認めなかった。

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55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。
４．油症ダイオキシン研究診療センターとの協力体制の充実
油症ダイオキシン研究診療センターを中心に、九州大学病院の各診療科（医科・歯科）油症診療ネットワークを構築している。診療科の担当医師について確認を行なった。
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．各疾患バイオマーカー値の測定および保存血清バンクの充実
基礎研究・臨床研究の結果に基づいて、油症の疾患活動性に相関する有用なバイオマーカーとなりうるかを評価するため、保存血清を保存する。
５.油症の継世代に及ぼす影響に関する検討を行うため、コホートの作成に取り掛かる。
６．PCBやダイオキシン類の体内動態を明らかにする。
７．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。

４．ダイオキシン毒性を軽減するための食事・運動・漢方セミナーや講演会の実施
コロナウイルス感染症の状況から、オンラインセミナーを行った。具体的には、漢方セミナー（漢方薬による治療について）の動画を油症ダイオキシン研究診療センターの HP に令和 4 年 3 月 16 日に公開した。

５．油症対策委員会の開催
厚生労働省、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。加えて油症次世代の健康状況の調査の中間報告・調査状況、令和 5 年度の調査計画・方法について検討を行なった。

６．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 55 年間の追跡調査を実施した。

７．油症２世、３世を対象とした次世代の健康調査
次世代の調査対象者 421 人に個人票・次世代調査票・同意書を送付した。これら全てを回収できた人数は 290 人であった。さらに、検診を受診し、医師による問診・血液検査まで完了した人数は、183 人であった。今後は、これらのデータに基づき、健康状態に関する統計学的解析を進める。

８．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、装置が簡素化され再現性が高いこと、測定時間が短縮されたことが優れていたが、ダイオキシン類各異性体の S/N 比が従来方と比較して、相対的に低下しており、更なる条件検討が必要と考えられる。

II. 臨床的追跡調査・疫学研究

１． 油症検診の追跡調査

１）油症検診データ管理システムの改修
検診票の変更については、これまで生化学検査や免疫学的検査等の検査項目について追加や削除など軽微な変更があり、その都度対応している。

２）油症患者血液中の PCDF 類実態調査
全国油症一斉検診の受診者について血液中の PCDF 等（ダイオキシン類）の濃度を継続的に測定している。2021 年度の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。2021 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 1 名と未認定者 92 名について結果集計を行った。認定患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 66 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）濃度は 57 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は平均 8.5 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 13 pg TEQ/g-fat であった。2021 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結果、当所を含む国内 5 機関の定量値は概ね一致しており、各機関で血液中 PCB の定量分析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。

4. 油症における末梢血 T 細胞に関する検討
油症患者における制御性 T 細胞の比率・細胞数について検討したが、対象者との有意な差は認めなかった。今後はダイオキシン類の濃度との相関を検討する予定である。

５．油症患者における皮膚ガス分析
皮膚ガスの成分は、採取環境に依存する可能性があり、追加解析を行なっている。

６．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他の中毒性疾患による神経障害との差異の研究
油症患者における末梢神経障害は、パターン化した解析によって評価できる可能性が示唆された。

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検討した。前回は、自然閉経の年齢を検討し、PeCDF 濃度との間には有意な相関は認めなかったため、PCB・PCQ との相関を検討中である。

III.基礎的研究
１． ダイオキシン類による気道上皮傷害における肺サーファクタント蛋白に関する検討
ヒト Club 細胞株 NCI-H441 細胞に Benzo[a]pyrene(BaP)を投与し、ヒトリコンビナント SP-D の投与によって CYP１A1 の発現が抑制されるか検討したが、明らかな抑制効果は認められなかった。

２.感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するβ-NMN の効果検討
ベンゾピレンを投与したラットにおける自発行動に対する効果を評価した。ベンゾピレン投与は末梢神経と中枢神経内で AHR を活性化させ、その毒性により神経系が影響を受けることで自発運動量が低下した可能性が示唆された。

３． 皮膚の慢性炎症におけるエンドセリン-1 と AHR の相互作用
紫外線照射により、メラニン産生酵素の誘導を認めたが、それに対するAHRリガンドの影響は見られなかった

４． 膠原病の皮疹形成機序におけるAHRの役割に関する研究
抗酸化作用を有する薬剤GSK 2795039がヒト表皮角化細胞において、AHRを活性化させ、膠原病の治療薬であるヒドロキシクロロキンの効果を増強させる可能性が示唆された。

５． PCB異性体の蓄積パターン、代謝経路について
PCB異性体のヒトチトクロームP450 (CYP) 分子種による分解過程を研究し、油症患者におけるPCB異性体の特徴的な蓄積パターンに影響を与える要因を解析した。PCB119の分解経路を検討したところ、PCB119はラットおよびヒト肝において、比較的容易に3-OH体へと代謝されること、また、CYP2B1およびヒトCYP2B6が強く関与することが示唆された。

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 が欠損すると精巣重量が低下する機序として、線維芽細胞成長因子の機能不全に伴うシグナル伝達経路の不活性化が関与する可能性が示唆された。

７．
ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質１(SELENBP1)：ヒト由来細胞を用いた検討

ダイオキシン誘導性の Selenbp1 の昨日解析を行っている。今回は、がん由来細胞を用いて行い、Selenbp1 はがん抑制的な働きを持つ可能性が考えられた。

８．Ah リガンドの消化管上皮に対する作用
腸上皮細胞に AHR リガンドを投与し、NRF2 の核内移行を確認した。AHR が活性酸素に対して防御的に働くことが腸管でも想定される。

９．ヒト歯根膜細胞における AhR シグナルの活性化に関する研究
ヒト歯根膜細胞・ヒト歯根膜幹細胞株に対して、ベンゾピレンを投与して解析を行なった。ベンゾピレンは、MMP12 の発現を増加させる可能性が示唆された。

また、ベンゾピレンを投与したヒト歯根膜幹細胞では、Tenascin-C の発現を抑制することで歯槽骨修復能を低下させ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 ―キヌレニン経路の関節炎への影響 ―
油症患者の関節症状に関する研究では、キヌレン酸という物質が関節内の軟骨破壊を誘導する可能性が示唆された。

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。特に、今年度からは、油症２世・３世における健康調査を開始し、ダイオキシン類の世代に渡る慢性影響についての研究に着手した。このダイオキシン類による継世代の健康状況の解析を行う研究は、人類のダイオキシン類の影響を解明するために非常に重要な研究結果となりうる可能性が高い。
基礎的研究においては、ダイオキシン類の受容体である AHR の働きに着目し、培養細胞・動物実験を用いた実験を継続して行っている。最近では、九州大学病院油症ダイオキシンセンターの研究業績に基づき、AHR の働きを調節して疾患を治療するというコンセプトに基づいた新しい薬剤（治療用 AHR 調節薬: Therapeutic AHR-Moduating Agent, TAMA）が開発された。現在、Tapinarof という化合物を含む外用薬が、炎症性皮膚疾患の治療薬として臨床試験が行われている。米国では 2022 年 5 月に使用が認可された。さらに最近では、Tapinarof が IL-37 という抗炎症作用を発揮するサイトカインの産生を誘導することを明らかとした。IL-37 によって油症の症状が寛解するか、検討していく方針である。

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・協力者の先生方に厚く御礼を申し上げます。

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
	飛石　和大	福岡県保健環境研究所	生活化学課　専門研究員
	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　主任技師
	重富　敬太	福岡県保健環境研究所	生活化学課　技師
	新谷　依子	福岡県保健環境研究所	計測技術課　研究員
	小木曽　俊孝	福岡県保健環境研究所	計測技術課　主任技師
	平川　周作	福岡県保健環境研究所	水質課　研究員
	戸髙　尊	公益財団法人北九州生活科学センター	課長
	広瀬　勇気	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員
	宮脇　崇	北九州市立大学エネルギー循環化学科	准教授

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。2021 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 1 名と未認定者 92 名について結果集計を行った。認定患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 66 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）濃度は 57 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は平均 8.5 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 13 pg TEQ/g-fat であった。

血液中ダイオキシン類の微量分析技術を用いて 2021 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 5 機関の定量値は概ね一致しており、各機関で血液中 PCB の定量分析が適切に実施されていることが分かった。

ヒト体内で最も高濃度に検出される 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl（CB153）とヒトチトクローム P450（CYP）2A6 組換え酵素を *in vitro* 系で反応させ、生成した水酸化 PCB を HRGC/HRMS で分析した。その結果、生成した水酸化 PCB 異性体は 4'-OH-CB101 と推定され、さらに *in silico* 解析によるドッキング様式のシミュレーション結果を考慮すると、CB153 は脱塩素化を伴う反応で 4'-OH-CB101 に代謝されると推測した。

現在、2022 年度の全国油症一斉検診の受診者のうち 436 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、2021 年度現在の認定患者数は 2,367 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活用されている。

本年度は以下の 3 項目について検討した。

（１）2021 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 93 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 濃度について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）ヒト体内で最も高濃度に検出される 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB153) とヒトチトクローム P450 (CYP) 2A6 組換え酵素を *in vitro* 系で反応させ生成する水酸化 PCB を分析した。また、*in silico* 解析によるドッキング様式のシミュレーション結果と統合することで代謝経路を推測した。

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ながら現在に至っている。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。

2021 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 1 名及び未認定者 92 名から得られた血液を対象に測定を実施した。血液はヘパリン入り真空採血管に採取され、測定まで 4℃以下で冷蔵保存された。

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 2021 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（4 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 5 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．ヒト CYP2A6 組換え酵素を用いた CB153 の *in vitro* 代謝試験

市販されているヒト CYP2A6 組換え酵素（Human CYP2A6 + P450 Reductase + Cytochrome b5, CORNING）及び CB153（AccuStandard Inc.）を用いて、*in vitro* 系で代謝試験を実施し、生成した水酸化 PCB を HRGC/HRMS で分析した。代謝試験及び水酸化 PCB の測定は、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」との共同研究により愛媛大学にて実施した。また、これまでに実施した *in silico* 解析によるドッキング様式のシミュレーション結果に基づき、生成した水酸化 PCB の代謝経路を推測した。

（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（許可番号 R 第 3-7 及び-8 号、2021 年 12 月 3 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．微量測定技術の確立

血液中の微量ダイオキシン類を高感度に検出、定量するために表 1 に示す機器分析条件を確立し、以降の測定を実施した。本条件によって得られたダイオキシン類標準品の測定クロマトグラムを図 1 に示した。

１－２．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。

１－３．外部精度管理

5 機関（A～E）の血液中 PCB 濃度の測定結果（全血重量あたり）を表 2 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 FBCC2101 の血液中 PCB 濃度の総和（Total PCB）は平均 700 pg/g-wet（範囲：610－750 pg/g-wet）となり、CV は 7.7%と良好な結果であった（表 2(1)）。また図 2-A 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 FBCC2102 の Total PCB は平均 380 pg/g-wet（範囲：330－400

pg/g-wet）であり、CV は 8.0%と良好な結果であった（表 2(2)）。Z スコアが±2 を超えた機関は無かった（図 2-B)。

２．2021 年度油症一斉検診受診者の血液中ダイオキシン類濃度

2021 年度の血液中ダイオキシン類測定対象者は 93 名（内訳：認定患者 1 名及び未認定者 92 名）であった。2020 年度の 80 名に比べて 13 名増加したが、2019 年度以前が 200 名以上で推移していたことを考えると、新型コロナウイルス感染症拡大のため全国的に健診の規模が縮小された影響が続いており、受診者数は回復していない。また、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。2021 年度はそのピークの前年に当たっていたこと、未認定者の受診者減少には 2012 年 12 月に油症診断基準に同居家族条項が追加され、一部の未認定者が同居家族条件による認定を受けたことが要因として含まれる。

表 3 に 2021 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（1 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 66 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濃度（Total TEQ)は 57 pg TEQ/g-fat であった。未認定者 92 名の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 8.5 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 13 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の 2,3,4,7,8-PeCDF 平均濃度を対照群の一般住民と比較すると、同等もしくはやや低い濃度であった。

表 4 は未認定者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の度数分布を示した。未認定者の多くは一般人と同等の 30 pg TEQ/g-fat 未満に分布していたが、油症診断基準で「高い濃度」の区分とされる 50 pg/g-fat 以上の受診者が 1 名認められた（98 pg TEQ/g-fat)。

2020 年度現在の同居家族認定者 306 名のうち血液中ダイオキシン類濃度の測定歴がある 205 名について測定結果を集計したところ、2,3,4,7,8-pentaCDF 平均濃度は 24 pg/g-fat（範囲 2.8～440 pg /g-fat）であった。油症診断基準で「高い濃度」の区分に属する 50 pg /g-fat 以上を示した患者数は 15 名であった。

３．ヒト CYP2A6 による CB153 の代謝

ヒト CYP2A6 組換え酵素と CB153 を使用した *in vitro* 代謝試験を実施し、生成した水酸化 PCB 異性体の測定結果を図 3 に示す。標準品と比較したところ、5 塩素化体の 4'-OH-CB101 であると推定された。また、CB153 は 6 塩素化体の PCB であるが、6 塩素化体の水酸化 PCB の生成は認められなかった。

また、ヒト CYP2A6 と CB153 の *in silico* 解析によるドッキング様式のシミュレーション結果に基づき、予測された代謝標的部位を考慮すると、CB153 の 3 位を標的とした 3,4-epoxide 体の生成に続き脱塩素されて 4'-OH-CB101 に代謝されたものと推測された（図 4)。

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。

2021年度の血液中ダイオキシン類濃度測定対象は、認定患者1名と未認定者92名であった。認定患者の2,3,4,7,8-PeCDF濃度は66 pg/g-fat 、Total TEQ濃度は57 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の2,3,4,7,8-PeCDF平均濃度は8.5 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 13 pg TEQ/g-fatであった。多くの未認定者で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」に該当する受診者が1名認められた。2001年度から 20 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 6030 件となった。2021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。

ヒト体内で最も高濃度に検出されるCB153とヒトCYP2A6組換え酵素を*in vitro*系で反応させ、生成した水酸化PCBの分析を実施した。また、*in silico* 解析によるドッキング様式のシミュレーション結果と統合することにより、脱塩素化を伴う反応で4'-OH-CB101を生成する代謝経路を示すことができた。このように、*in silico* 解析によるシミュレーション及び*in vitro*試験を統合した解析手法は、解明が困難な生体内で起こっているCYP分子種とPCBの代謝反応を把握する技術として有用と考えられる。

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F．研究発表

１．論文発表　　なし

２．学会発表

1）堀就英、新谷依子、飛石和大、佐藤環、古谷貴志、戸高尊、広瀬勇気、辻　学、油症発生から50年－患者血液中のダイオキシン類及びPCB濃度の現状－．第55回日本薬剤師会学術大会、2022 年 10 月 9-10日、仙台市.

2）新谷依子、堀就英、古谷貴志、飛石和大、平川博仙、香月進、辻学、血液中PCB濃度分析のクロスチェック（2021年度）．環境化学物質3学会合同大会（第30回環境化学討論会)、2022年6月13-16日、富山市.

3）平川周作、堀就英、香月進、宮脇崇、平野将司、岩田久人、辻学、油症患者におけるダイオキシン類の蓄積特性とin *silico* ドッキングシミュレーションによるチトクロームP450を介した代謝予測．環境化学物質3学会合同大会（第30回環境化学討論会)、2022年6月13-16日、富山市.

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）

GC conditions		
GC	Thermo Fisher Scientific TRACE 1310	
Column type	BPX-5 (TRAJAN, 0.25mm×5m, 0.25 μm)	
	BPX-DIOX-1 (TRAJAN, 0.15mm×30m)	
Injection	Splitless	
Injection volume	2 μL	
Injector temperature	300 ℃	
Carrier gas（Flow rate）	He (0.6 mL/min)	
Oven temperature program	160 ℃（1 min）– 30 ℃/min – 210 ℃	
	– 5 ℃/min – 300 ℃（14.3 min）	
MS conditions		
MS	Thermo Fisher Scientific Double Focusing Sector Mass Spectrometer	
Ionization mode	EI positive	
Electron energy	45 eV	
Source temperature	280 ℃	
Resolution	10,000	
Target masses		
	$^{12}C_{12}$-	$^{13}C_{12}$-
TetraCB	289.9224, 291.9194	303.9597
PentaCB	325.8804, 327.8776	337.9207
HexaCB	359.8415, 361.8385	371.8817
TetraCDF	303.9016, 305.8987	317.9389
PentaCDF	339.8597, 341.8568	351.9000
HexaCDF	373.8208, 375.8178	385.8610
HeptaCDF	407.7818, 409.7789	419.8220
OctaCDF	441.7428, 443.7399	455.7801
TetraCDD	319.8965, 321.8936	333.9339
PentaCDD	353.8576, 355.8546	367.8949
HexaCDD	389.8157, 391.8127	401.8559
HeptaCDD	423.7766, 425.7737	435.8169
OctaCDD	457.7377, 459.7348	471.7750

図１　ダイオキシン類標準溶液の測定クロマトグラム例

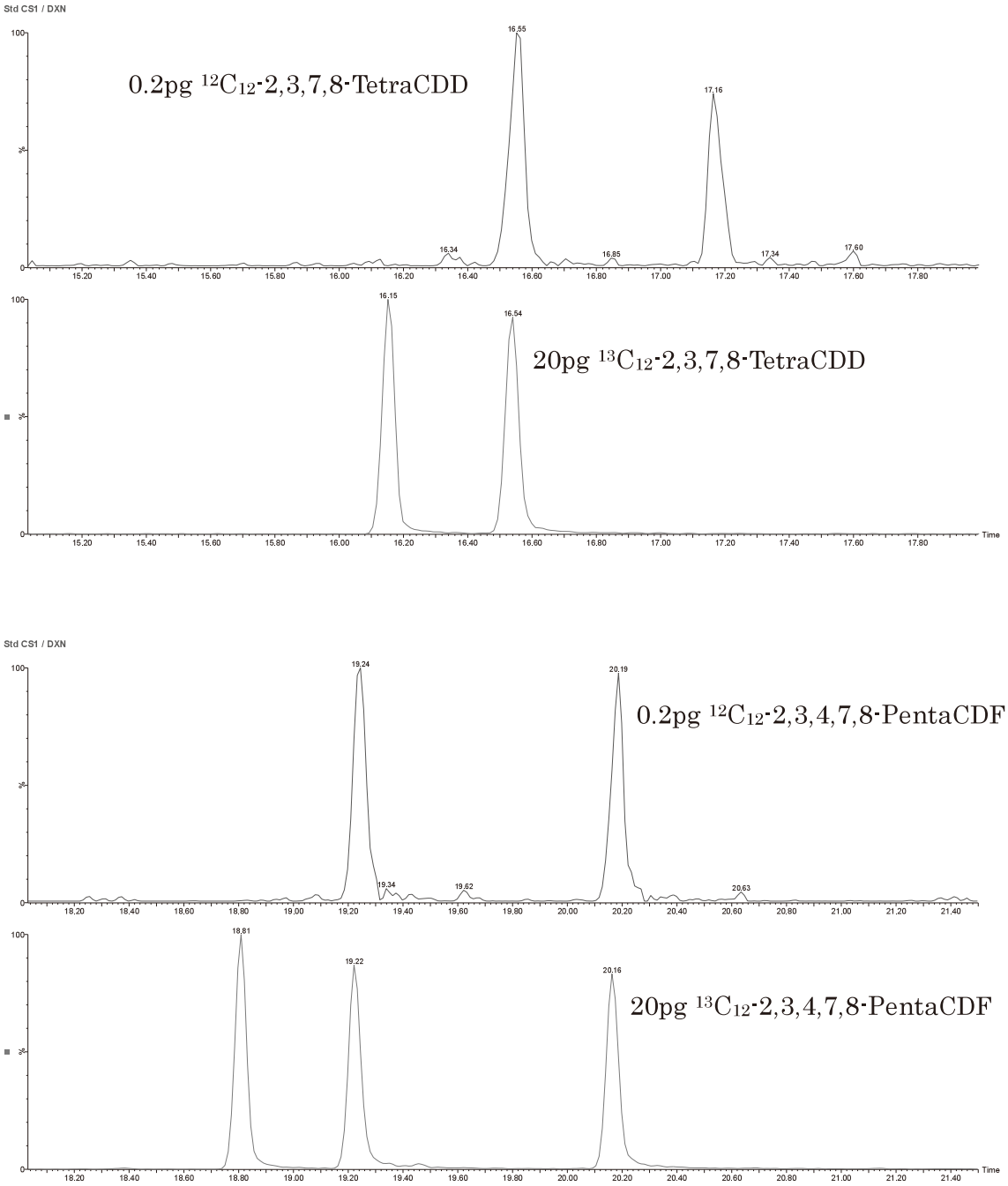


表２　共通血液試料中の PCB 測定結果（単位：pg/g-wet）

（１）試料名　FBCC2101

化合物名	分析機関					Mean	CV%
	A	B	C	D	E		
Total MoCBs	2.8	3.7	2.7	—	—	3.0	—
Total DiCBs	0	2.6	2.0	—	—	1.5	—
Total TriCBs	1.2	3.8	2.0	1.5	0.45	1.8	70
Total TeCBs	12	16	14	11	13	13	15
Total PeCBs	34	42	35	31	41	37	13
Total HxCBs	330	310	300	280	330	310	6.7
Total HpCBs	280	240	290	230	280	270	11
Total OcCBs	66	62	53	56	70	61	12
Total NoCBs	5.8	6.5	5.9	4.5	7.6	6.1	19
DeCB	2.0	2.4	2.4	1.9	4.1	2.6	34
Total PCBs	730	690	710	610	750	700	7.7

（２）試料名　FBCC2102

化合物名	分析機関					Mean	CV%
	A	B	C	D	E		
Total MoCBs	0	0.9	0.7	—	—	0.53	—
Total DiCBs	0	1.6	0.9	—	—	0.84	—
Total TriCBs	0	6.0	1.5	0.94	0	1.7	150
Total TeCBs	7.0	12	8.8	7.5	10	9.1	21
Total PeCBs	25	30	25	23	27	26	10
Total HxCBs	200	170	190	160	180	180	7.2
Total HpCBs	140	120	150	110	130	130	13
Total OcCBs	30	29	24	24	26	27	10
Total NoCBs	2.5	3.1	3.0	2.2	3.5	2.9	18
DeCB	1.0	1.3	1.2	1.0	1.4	1.2	15
Total PCBs	400	380	400	330	380	380	8.0

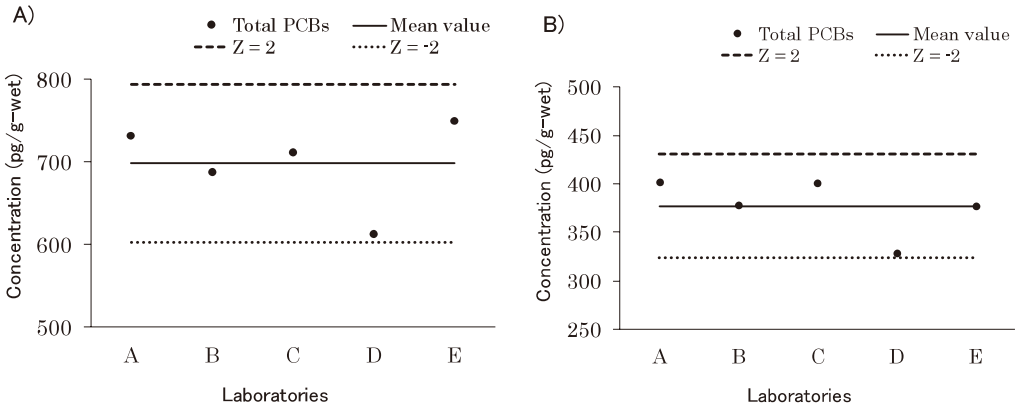


図２　機関別血液中 Total PCB 濃度の$\bar{X}$管理図（A：FBCC2101、B：FBCC2102）

表３　2021 年度血液中ダイオキシン類濃度調査結果（単位：pg/g-fat）

同族体名	認定者（1名）	未認定者(92名)				一般住民(127名)		
		平均	中央値	範囲		平均	範囲	
				最小	最大		最小	最大
2,3,7,8-TeCDD	2.0	0.73	0.50	0.50	3.3	1.9	0.50	4.3
1,2,3,7,8-PeCDD	9.1	2.8	2.1	0.50	16	9.0	3.2	20
1,2,3,4,7,8-HxCDD	3.1	1.3	1.0	1.0	6.0	3.6	0.50	13
1,2,3,6,7,8-HxCDD	47	8.7	6.5	1.0	51	28	7.3	70
1,2,3,7,8,9-HxCDD	4.6	1.4	1.0	1.0	10	4.5	0.50	16
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	13	10	7.9	2.0	83	78	18	470
OCDD	200	150	106	31	1881	1200	180	7600
2,3,7,8-TeCDF	2.0	0.64	0.50	0.5	2.8	1.0	0.50	4.5
1,2,3,7,8-PeCDF	ND	0.56	0.50	0.5	2.1	0.67	0.50	4.6
2,3,4,7,8-PeCDF	66	8.5	5.0	1.1	98	17	6.0	63
1,2,3,4,7,8-HxCDF	7.2	1.8	1.0	1.0	15	5.0	1.0	20
1,2,3,6,7,8-HxCDF	5.6	2.0	1.0	1.0	11	5.7	1.0	16
2,3,4,6,7,8-HxCDF	ND	1.0	1.0	1.0	2.9	1.2	1.0	5.2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	–	–	–	ND	–	–
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	ND	1.3	1.0	1.0	6.5	2.2	1.0	14
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	–	–	–	ND	–	–
OCDF	ND	ND	–	–	–	2.1	2.0	18
3,4,4',5-TeCB(PCB81)	ND	ND	–	–	–	5.6	ND	24
3,3',4,4'-TeCB(PCB77)	ND	6.0	5.0	ND	19	8.4	ND	31
3,3',4,4',5-PeCB(PCB126)	140	38	21	ND	190	110	17	520
3,3',4,4',5,5'-HxCB(PCB169)	150	47	27	5.0	300	64	16	190
Total PCDDs	280	170	130	42	2000	1300	210	8200
Total PCDFs	87	20	15	10	130	37	15	86
Total PCDD/PCDFs	370	190	140	53	2100	1300	220	8300
Total Non-*ortho* PCBs	300	96	62	20	510	190	59	740
Total Dioxins	670	290	210	73	2500	1500	280	9000
Total PCDDs-TEQ	17	4.8	3.8	1.3	27	16	5.1	35
Total PCDFs-TEQ	22	3.3	2.0	0.80	32	6.6	2.3	14
Total PCDDs/PCDFs-TEQ	38	8.1	5.7	2.2	41	22	7.4	50
Total Non-*ortho* PCBs-TEQ	19	5.2	3.2	0.65	27	13	2.6	58
Total TEQ	57	13	9.4	2.8	65	37	12	110

（ND:定量下限値未満）

表４　未認定者（92 名）の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度（単位：pg/g-fat）の度数分布

濃度範囲		未認定者(人)
以上	未満	
95	100	1
45	95	0
40	45	1
35	40	0
30	35	2
25	30	0
20	25	3
15	20	4
10	15	16
5	10	19
0	5	46
	人数計	92

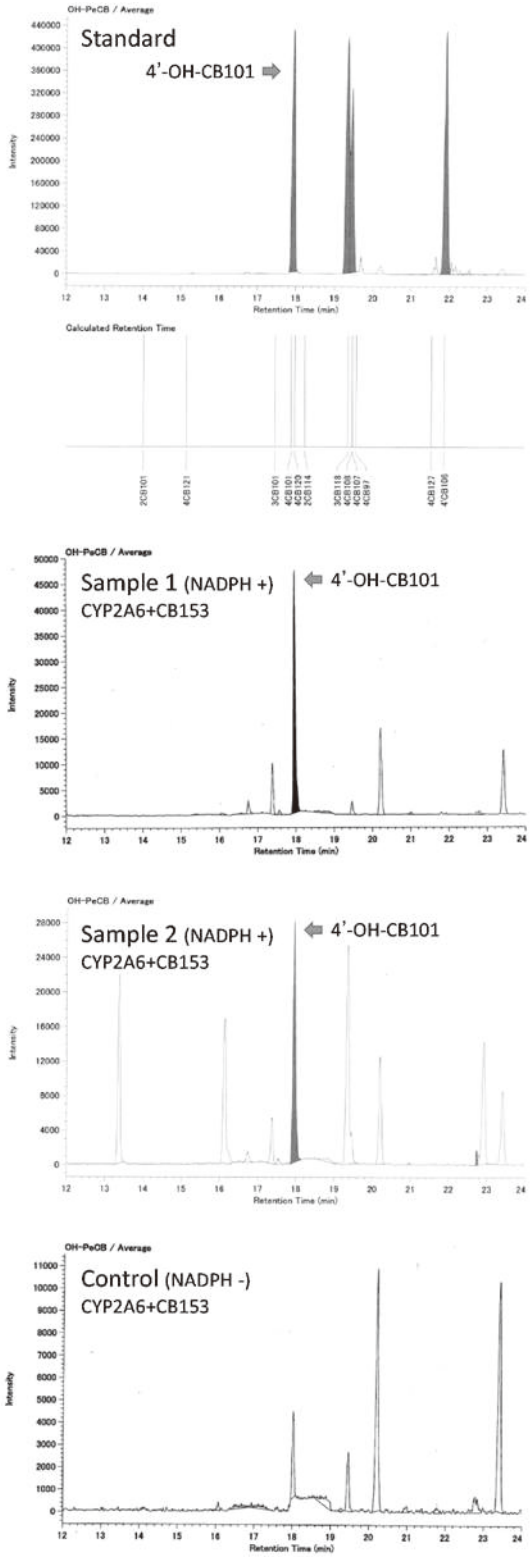


図３　ヒト CYP2A6-CB153 の *in vitro* 代謝試験において生成した５塩素化体代謝物の HRGC/HRMS 測定クロマトグラム

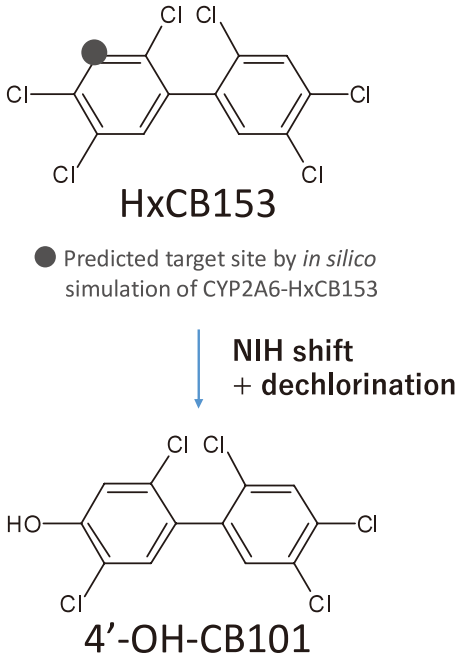


図４　*In vitro* 代謝試験及び *in silico* 解析から推測されたヒト CYP2A6 による CB153 の代謝経路

分担研究報告書

油症患者の血液中ポリ塩化ビフェニール異性体分析における分析条件の検討

研究分担者　戸髙　尊　　公益財団法人北九州生活科学センター　課長
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　HT-8 PCB カラムを用いてヒト血液中 PCB の異性体分析を行ってきたが、カラム固定相の原材料が製造中止となり、従来使用していたカラムでの分析が出来なくなった。その代わりとして、新しい新規ポリマーを固定相に配合したカラムが発売された。各異性体の分離に関しては、以前使用していたカラムより良好であったが、測定時間が約 60 分と長く従来法の 2 倍の時間を要する。今回、新たに発売された分析カラムを用いて、PCB 異性体の分離および測定時間の改善に関して検討を行った。その結果、各異性体の分離は、検討前の方法より良好で、分析時間も 40 分程度となり、20 分短縮可能となった。今後もヘリウムガスの供給が制限された場合、本法はヘリウムガスの消費を抑制できるので非常時の対策として有効である。

A．研究目的

Thermo Fisher Scientific 社の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ている。今年度も新型コロナ感染症の影響により、海外から検討に必要なパーツ類が十分に供給されないため、従来法よりも高感度かつ高精度な分析法を確立するまでには至っていない。従って、今年度の研究テーマを変更し、油症患者の血液中ポリ塩化ビフェニール異性体分析における分析条件の検討という内容で報告を行う。

ポリ塩化ビフェニール(PCB)は,塩素の置換数・位置により理論的に 209 種類の異性体が存在する。ヒト血液中では、約 70 種類の異性体を測定対象としている[1)]。従来使用していたカラムの固定相は、メタカルボラン骨格にフェニル基がついた構造を基本としていたが、カラム固定相の原材料が製造中止になり、従来使用していた分析カラムの供給が停止されたため、その代わりとして新しい新規ポリマーを固定相に配合したカラムが発売された。各異性体の分離に関しては、以前使用していたカラムより良好であったが、測定時間が約60分と長く従来法の2倍の時間を要する。従って、年間約 400 検体の測定を行う場合、この分析法での PCB 異性体分析は、効率的な方法ではない。

今回、この問題を解決するために、各異性体の分離を維持したまま、分析時間を可能な限り短縮できるように昇温時間の条件検討を行った。

B．研究方法

1．分析方法

高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置（GCMS）に関して、GC 部は Agilent 社製 HP-7890A、MS 部は Micromass 社製 AutoSpec Premier を用い，試料注入はオートサンプラー Combi-PAL (CTC Analytics 社製)を使用した。カラムは HT-8 PCB(Trajan 製、内径；0.25：長さ；60m)を用いた。昇温条件は、100℃で１分間保持、180℃まで 20℃/分で昇温、180℃で 0 分間保持、260℃まで 2℃/分で昇温、260℃で 0 分間保持、300℃まで 5℃/分で昇温、300℃で 0 分間保持、320℃まで 10℃/分で昇温、320℃で 5 分間保持の条件化で行った。イオン化法は、EI 法で、イオン源温度とインターフェイス温度は、それぞれ 280℃で、イオン化電圧、イオン化電流、および加速電圧は、それぞれ 40eV,750μA および 8000V に設定し、分解能 10000 に調整した。

（倫理面への配慮）

本研究の結果においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C．研究結果・考察

従来血液中 PCB の異性体分析に使用していた分析カラムは、PentaCB (#132)と PentaCB (#153)との分離の悪さが顕著に見られていたが、新しいタイプのカラムでは、良好な分離が得られている。各異性体の分離を維持したまま、分析時間を短縮できるように昇温時間の検討を行った。その結果、昇温条件を、130℃で 1 分間保持、220℃まで 20℃/分で昇温、220℃で 0 分間保持、280℃まで 2℃/分で昇温、280℃で 0 分間保持、320℃まで 20℃/分で昇温、320℃で 2.5 分間保持の条件化で行うと、検討前の方法よりも良好な分離が得られるとともに、分析時間が 20 分短縮可能となった。

令和 3 年および令和 4 年に油症検診を受診した未認定患者は、それぞれ 92 および 131 名であった。その両年度に受診を行った 27 名の未認定患者の血液中 PCB 異性体濃度分析を、従来法と検討した方法により行い各異性体濃度を比較した。令和 4 年度に検診を行った 27 名の未認定患者の血液中 PCB 異性体濃度を検討した方法により測定した結果、PentaCB (#118), HexaCB (#153), HexaCB (#156) および total PCB 濃度の各値は、令和 3 年度に従来法で測定した各値とほとんど同じ値であった（表 1)。さらに、令和 4 年度の PCB 異性体分析の結果を基に行った 27 名のパターン解析の判定結果を、令和 3 年度の結果と比較すると、すべて同じ判定結果が得られ、測定法の違いによる影響は認められなかった。

D．結論

近年、血液中 PCB の異性体分析に使用していた分析カラムの供給が停止されたため、従来法とは異なる新規ポリマーを固定相に配合した新しい分析カラムが発売された。PCB 各異性体の分離に関しては、従来使用していたカラムより良好な分離が得られたが、測定時間が約 60 分と長く、年間約 400 検体の測定を行う場合、キャリアーガスとして用いるヘリウムの消費量も多くなり効率的な方法ではない。今回、昇温時間の検討を行った結果、検討前の方法よりも良好な分離が得られるとともに、分析時間が 20 分短縮可能となった。

ヘリウムガスは世界的な需給の逼迫により、日本への供給が制限されている。ヘリウムガスをキャリアーガスとして用いる測定では、その対策として極力消費量を抑える、もしくは代替ガスへの変更などの対策が必要である。高分解能質量分析装置による PCB 異性体分析は、イオン源部内で、超高真空の条件下で PCB 異性体のイオン化を行っている。キャリア

ーガスとして水素ガスを用いた場合、ヘリウム使用時と同様な超高真空度が得られないので、PCB の異性体分析を行うのは不可能です。一方窒素ガスは安全性の高いガスですが、キャリアーガスとして用いた場合、PCB 異性体の検出感度が低下し、異性体の分離も良好でないため、これら代替ガスによるPCBの異性体分析は、極めて困難です。

今後もヘリウムガスの供給が制限された場合、今回行った血液中PCBの異性体分析法の検討は、測定時間を短縮でき、ヘリウムガスの消費を抑制できるので非常時の対策として有効である。

E．研究発表

１．論文発表

1) ○Sato T, Kogiso T, Kamiharaguchi N, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Kajiwara J, Katsuki S, Furue, M, Tsuji G. Polychlorinated quater-phenyl concentrations in the blood and their patterns in subjects examined for a possible diagnosis of Yusho from FY 2009 to 2019. Fukuoka Igaku Zasshi, 2021; 112(2): 90-98.

2) ○Shintani Y, Hori T, Tobiishi K, Hirakawa H, Sato T, Yasutake D, Todaka T, Kajiwara J, Katsuki S, Tsuji G, Furue M. Interlabora-tory cross-comparison study of dioxins and PCBs analysis in human blood samples (from FY 2016 to 2019). Fukuoka Igaku Zasshi, 2021; 112(2): 99-109.

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) Todaka T, *et al.* Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood oy Yusho patients over thirty-five years after the Yusho incident. Chemosphere, 2009;74:902-909.

表 1　令和3および令和4年の両年度に油症検診を受診した27名の血液中ポリ塩化ビフェニール濃度

	Concentration （ｐｇ/ｇ）							
	2021				2022			
	Mean	SD	Mimimum	Maximum	Mean	SD	Mimimum	Maximum
TriCB-29	0.033	0.043	0.015	0.155	0.034	0.039	0.015	0.163
TriCB-28	1.949	1.310	0.461	5.656	1.882	1.205	0.629	5.648
TriCB-37	0.015	0.000	0.015	0.015	0.015	0.000	0.015	0.015
TetraCB-52	0.819	0.955	0.015	3.581	0.763	0.911	0.136	3.356
TetraCB-49	0.198	0.178	0.015	0.921	0.218	0.177	0.015	0.851
TetraCB-47	0.556	0.305	0.269	1.577	0.606	0.328	0.311	1.582
TetraCB-44	0.255	0.117	0.015	0.653	0.212	0.152	0.015	0.676
TetraCB-71	0.039	0.033	0.015	0.134	0.027	0.019	0.015	0.076
TetraCB-63	0.129	0.141	0.015	0.526	0.134	0.151	0.015	0.614
TetraCB-74	15.318	28.421	1.150	141.239	15.015	25.167	1.408	121.567
TetraCB-70	0.207	0.098	0.079	0.499	0.159	0.065	0.042	0.285
TetraCB-66	1.672	1.466	0.208	6.034	1.762	1.530	0.413	6.788
TetraCBs-56/60	0.353	0.316	0.081	1.421	0.407	0.317	0.015	1.321
PentaCB-95	0.402	0.396	0.015	2.055	0.466	0.493	0.015	2.522
PentaCB-92	0.569	0.675	0.015	3.243	0.618	0.780	0.015	3.782
PentaCB-101	1.571	2.019	0.137	10.227	1.668	2.275	0.122	11.942
PentaCB-99	12.438	17.540	2.029	89.710	12.731	15.361	2.348	70.665
PentaCB-117	1.090	1.475	0.015	5.899	1.100	1.572	0.015	7.081
PentaCB-87	0.831	1.118	0.015	5.138	0.473	0.670	0.015	2.618
PentaCB-85	0.290	0.300	0.015	1.082	0.134	0.185	0.015	0.692
PentaCB-110	0.259	0.222	0.015	0.993	0.379	0.381	0.015	1.713
PentaCB-107	1.124	1.328	0.015	4.861	1.133	1.362	0.015	5.387
PentaCB-123	0.385	0.551	0.015	2.260	0.442	0.567	0.015	2.286
PentaCB-118	25.499	37.165	2.346	171.370	25.282	33.733	3.008	149.069
PentaCB-114	3.101	4.899	0.099	19.667	3.208	4.734	0.135	18.028
PentaCB-105	4.343	6.547	0.537	32.412	4.024	5.069	0.510	23.541
HexaCB-151	1.066	1.279	0.015	5.892	1.055	1.240	0.053	6.171
HexaCB-135	0.384	0.438	0.015	1.841	0.347	0.393	0.015	1.700
HexaCB-147	0.642	0.872	0.015	4.117	0.678	0.926	0.015	4.520
HexaCB-139	0.204	0.208	0.015	1.069	0.136	0.282	0.015	1.327
HexaCB-134	0.021	0.033	0.015	0.190	0.022	0.030	0.015	0.172
HexaCB-165	0.015	0.000	0.015	0.015	0.067	0.111	0.015	0.527
HexaCB-146	28.536	43.914	1.353	176.706	29.029	42.931	1.801	191.705
HexaCB-132	0.045	0.081	0.015	0.388	0.138	0.228	0.015	1.073
HexaCB-153	152.023	230.814	8.858	897.404	157.303	224.358	12.193	863.784
HexaCB-141	0.218	0.315	0.015	1.552	0.237	0.340	0.015	1.696
HexaCB-137	4.255	6.984	0.288	32.443	4.116	6.031	0.310	23.414
HexaCB-130	4.199	6.163	0.223	23.608	4.225	6.070	0.162	26.576
HexaCB-164	30.845	46.432	1.166	191.667	37.308	55.268	2.220	236.359
HexaCB-138	56.408	91.984	4.314	432.780	57.534	83.438	6.179	358.509
HexaCB-128	0.793	1.004	0.015	4.902	0.573	0.719	0.015	3.613
HexaCB-167	6.054	9.437	0.325	36.250	6.378	9.456	0.243	36.740
HexaCB-156	14.639	21.221	0.646	76.293	13.722	18.624	0.778	78.127
HexaCB-157	3.215	4.574	0.136	16.892	3.150	4.118	0.177	16.336
HeptaCB-179	0.185	0.208	0.015	1.056	0.168	0.245	0.015	1.213
HeptaCB-178	16.702	27.224	0.484	113.315	16.614	27.136	0.650	125.285
HeptaCB-182	68.708	114.995	2.058	453.108	66.470	110.663	2.460	497.755
HeptaCB-183	10.441	17.266	0.552	73.901	9.962	14.978	0.561	56.815
HeptaCB-181	0.111	0.279	0.015	1.431	0.087	0.181	0.015	0.801
HeptaCB-177	12.654	20.541	0.528	75.687	11.418	18.018	0.580	70.759
HeptaCB-172	8.005	13.240	0.185	53.014	7.723	12.930	0.235	58.614
HeptaCB-180	156.487	252.893	3.934	1010.223	163.194	265.972	5.419	1159.743
HeptaCB-191	1.129	1.696	0.015	5.762	1.232	1.751	0.038	6.539
HeptaCB-170	40.220	62.921	1.146	245.428	40.193	63.281	1.403	277.672
HeptaCB-189	2.496	3.721	0.015	15.634	2.557	3.850	0.015	16.914
OctaCB-202	9.758	15.747	0.248	63.788	7.728	13.018	0.070	57.562
OctaCB-200	0.814	1.511	0.015	7.170	0.564	0.970	0.015	4.449
OctaCB-201/198	29.315	48.544	0.452	202.618	28.030	46.787	0.500	209.775
OctaCB-203	14.353	22.921	0.189	90.444	13.092	21.710	0.402	99.987
OctaCB-195	3.718	5.918	0.097	22.344	3.506	5.613	0.015	24.856
OctaCB-194	26.554	43.450	0.441	187.688	27.157	46.943	0.463	217.591
OctaCB-205	0.557	0.846	0.015	3.455	0.445	0.928	0.015	4.376
NonaCB-208	1.220	1.711	0.015	7.300	1.290	1.908	0.037	8.930
NonaCB-207	0.435	0.533	0.015	2.014	0.381	0.512	0.015	2.300
NonaCB-206	3.736	5.178	0.104	22.041	3.659	5.134	0.130	23.731
DecaCB-209	2.530	2.574	0.139	10.668	2.627	2.799	0.211	11.841
Total TriCBs	1.997	1.317	0.491	5.827	1.930	1.199	0.659	5.678
Total TetraCBs	19.545	30.191	2.495	148.922	19.304	26.809	2.957	127.215
Total PentaCBs	51.902	71.471	5.796	330.972	51.658	64.267	6.673	271.425
Total HexaCBs	303.561	458.168	18.352	1778.600	316.018	448.327	24.678	1749.923
Total HeptaCBs	317.137	511.984	9.459	2014.129	319.617	515.972	11.619	2265.843
Total OctaCBs	85.069	138.152	1.528	573.818	80.521	135.059	1.613	616.787
Total NonaCBs	5.392	7.399	0.134	31.355	5.330	7.517	0.202	34.961
Total PCBs	787.133	1201.211	38.394	4437.238	797.007	1177.687	48.746	4943.647

ND: less than the detection limit.
SD: standard deviation.
CB: chlorinated biphenyl.

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　専門研究員
　　熊谷　博史　福岡県保健環境研究所　　企画情報管理課　課長

研究要旨　2021 年度の全国油症一斉検診は、新型コロナウイルス感染拡大防止のため、対象者や検診項目を減らし規模や時間を縮小して実施された。2021 年度の受診者数は 111 人で、同じく規模を縮小した 2020 年度（102 人）と同程度だった。

A．研究目的

カネミ油症事件発生から 50 年以上経過した現在も全国油症一斉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

１．検診情報の収集及び管理

1986 年以降の検診情報を収集・整理し、一元管理している。全国 11 追跡調査班（関東以北班、千葉県班、愛知県班、大阪府班、島根県班、広島県班、山口県班、高知県班、福岡県班、長崎県班、鹿児島県班）において、例年 7 月から 11 月にかけて検診（内科検診、小児科検診、皮膚科検診、眼科検診、歯科検診、血液特殊検査、尿検査、血液学的検査、生化学的検査、免疫学的検査、内分泌学的検査、骨密度測定）が実施される。この検診票の写しを、追跡調査班の協力を得て収集し、電子化する。その後、記入内容を点検し、疑義照会により修正を行い、データを確定する。確定したデータは検診情報一元管理システムへ追加登録する。

検診受診者の情報は、受診者区分（認定、同居家族認定、未認定）や氏名、住所等、検診を受診した後に変更になるものがある。これら変更情報は、油症事務局、油症ダイオキシン研究診療センター及び追跡調査班から提供があるため、適宜更新を行う。

２．検診情報の提供

血液中ダイオキシン類の測定は、認定者は 4 年に 1 度実施する。このため、検診現場で測定対象者を判断できるよう測定実績を提供する。また、研究班長の指示のもと研究者へデータ提供を行う。

３．検診票改訂に伴う対応

検診票の見直しにより、項目の追加や削除、選択肢の変更等の改訂が行われ、昨年度の検診から新たな検診票を用いている。この変更に伴い、データの管理や追跡調査班への情報提供方法の変更を行ったため、その影響を検討する。

（倫理面への配慮）

本研究は「福岡県保健環境研究所疫学研究倫理審査委員会要綱」に基づき、審査を受け承認されたものである（受付番号第 R3-7 令和 3 年 10 月 1 日承認）。

C．研究結果

１．検診情報の収集・整理

2021 年度の検診は、2020 年度に続き新型コロナウイルス感染拡大防止を念頭に、対象者及び検診項目を減らし、規模を縮小し、7 月から 10 月に行われた。

検診後、検診票写しの集約を 2 月に、電子化を 3 月に実施した。その後、記入内容の点検を行い、疑義照会後、今年度 5 月にデータを確定し検診情報一元管理システムへ登録した。

2021 年度検診の集計結果を表に示す。集計の所見区分は表 1、受診者の内訳は表 2、各検診の有所見率は表 3〜6 に示す。検診受診者は 111 人だった。なお、歯科検診受診者は全員が認定者だったため、表 6 では未認定項目は除外した。

２．検診情報の提供

検診現場において血液中ダイオキシン類の測定対象者を把握するため、直近の測定情報を追跡調査班へ送付した。また、研究班長の指示のもと、研究者が指定する条件に従いデータを抽出し匿名化を行い提供した。

３．検診票変更に伴う対応

昨年度、検診票改訂に伴い検診情報一元管理システム及び油症検診データベースの改修が必要となったが、利用状況と改修費用を勘案し、データ管理基盤である検診情報一元管理システムの改修のみに留めた。このため、追跡調査班への油症検診データベースの提供を終了し、一部情報を表形式で提供した。

D．考察

新型コロナウイルスが世界で報告される以前は、例年 600 人ほどが検診を受診していたが、報告後は感染拡大防止のため油症検診は規模を縮小して実施された。このため、2021 年度の受診者は 111 人で、2020 年度の 102 人と同様に大幅に減少した。また、主に未認定を対象として実施されたため、未認定者が 8 割を超えていた。

検診内容は、血液中のダイオキシン類や PCB、PCQ 濃度の測定を優先して行われたが、採血のみ行った班、以前と同様の検診を実施した班、検診を実施しなかった班等様々だった。

検診票改訂に伴う対応としては、追跡調査班への情報提供方法を変更した。これまで、油症検診データベースとして検索機能や経年表示機能も含め 1986 年以降の検診情報を提供していた。その代替として、一部情報を抽出し表形式で提供したが、受診者の多い追跡調査班からは、検診に係る事務作業や検診時の経過確認において過去の検診内容を確認するため、これまで通り 1986 年以降のすべての検診情報の提供が必要との意見が寄せられた。このため、必要となる場面や要望、改修等運用に伴う費用、今後のデータ管理方法など総合的に検討を進めていきたい。

E．結論

2021 年度の検診は、2020 年度に続き新型コロナウイルス感染拡大防止のため、対象者等を限定して実施された。このため、受診者数は 111 人と例年に比べ大幅に少なく、受診者の 8 割以上が未認定者だった。

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　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、上唇粘膜と下唇粘膜を唇粘膜とした。

表2　2021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	111	100.0	45	100.0	66	100.0
0 - 29 歳	7	6.3	2	4.4	5	7.6
30 - 39 歳	8	7.2	1	2.2	7	10.6
40 - 49 歳	19	17.1	7	15.6	12	18.2
50 - 59 歳	19	17.1	7	15.6	12	18.2
60 - 69 歳	24	21.6	11	24.4	13	19.7
70 - 79 歳	23	20.7	13	28.9	10	15.2
80 歳以上	11	9.9	4	8.9	7	10.6
認定	19	100.0	8	100.0	11	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	0	0.0	0	0.0	0	0.0
50 - 59 歳	2	10.5	2	25.0	0	0.0
60 - 69 歳	9	47.4	4	50.0	5	45.5
70 - 79 歳	4	21.1	2	25.0	2	18.2
80 歳以上	4	21.1	0	0.0	4	36.4
未認定	92	100.0	37	100.0	55	100.0
0 - 29 歳	7	7.6	2	5.4	5	9.1
30 - 39 歳	8	8.7	1	2.7	7	12.7
40 - 49 歳	19	20.7	7	18.9	12	21.8
50 - 59 歳	17	18.5	5	13.5	12	21.8
60 - 69 歳	15	16.3	7	18.9	8	14.5
70 - 79 歳	19	20.7	11	29.7	8	14.5
80 歳以上	7	7.6	4	10.8	3	5.5

表3　2021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	52.6%	(10/19)	50.0%	(4/8)	54.5%	(6/11)
頭重・頭痛	42.1%	(8/19)	25.0%	(2/8)	54.5%	(6/11)
咳嗽	42.1%	(8/19)	50.0%	(4/8)	36.4%	(4/11)
喀痰	42.1%	(8/19)	50.0%	(4/8)	36.4%	(4/11)
腹痛	31.6%	(6/19)	12.5%	(1/8)	45.5%	(5/11)
下痢	21.1%	(4/19)	12.5%	(1/8)	27.3%	(3/11)
便秘	42.1%	(8/19)	25.0%	(2/8)	54.5%	(6/11)
しびれ感	31.6%	(6/19)	25.0%	(2/8)	36.4%	(4/11)
関節痛	47.4%	(9/19)	50.0%	(4/8)	45.5%	(5/11)
月経異常	0.0%	(0/1)	.	.	0.0%	(0/1)
他覚所見						
心音	0.0%	(0/19)	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/11)
呼吸音	5.3%	(1/19)	0.0%	(0/8)	9.1%	(1/11)
肝腫	0.0%	(0/19)	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/11)
脾腫	0.0%	(0/19)	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/11)
浮腫	10.5%	(2/19)	25.0%	(2/8)	0.0%	(0/11)
リンパ節腫大	5.3%	(1/19)	0.0%	(0/8)	9.1%	(1/11)
四肢けん反射	5.3%	(1/19)	0.0%	(0/8)	9.1%	(1/11)
感覚障害	21.1%	(4/19)	25.0%	(2/8)	18.2%	(2/11)
胸部レ線	5.3%	(1/19)	0.0%	(0/8)	9.1%	(1/11)
心電図	15.8%	(3/19)	12.5%	(1/8)	18.2%	(2/11)
未認定						
自覚症状						
全身倦怠感	71.7%	(33/46)	56.5%	(13/23)	87.0%	(20/23)
頭重・頭痛	55.6%	(25/45)	36.4%	(8/22)	73.9%	(17/23)
咳嗽	41.3%	(19/46)	39.1%	(9/23)	43.5%	(10/23)
喀痰	43.5%	(20/46)	47.8%	(11/23)	39.1%	(9/23)
腹痛	34.8%	(16/46)	34.8%	(8/23)	34.8%	(8/23)
下痢	37.0%	(17/46)	26.1%	(6/23)	47.8%	(11/23)
便秘	43.5%	(20/46)	26.1%	(6/23)	60.9%	(14/23)
しびれ感	54.3%	(25/46)	39.1%	(9/23)	69.6%	(16/23)
関節痛	67.4%	(31/46)	65.2%	(15/23)	69.6%	(16/23)
月経異常	21.7%	(5/23)	.	.	21.7%	(5/23)
他覚所見						
心音	20.0%	(1/5)	0.0%	(0/4)	100.0%	(1/1)
呼吸音	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/1)
肝腫	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/1)
脾腫	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/1)
浮腫	20.0%	(1/5)	0.0%	(0/4)	100.0%	(1/1)
リンパ節腫大	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/1)
四肢けん反射	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/1)
感覚障害	60.0%	(3/5)	75.0%	(3/4)	0.0%	(0/1)
胸部レ線	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-
心電図	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-

表4　2021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	10.5%	(2/19)	12.5%	(1/8)	9.1%	(1/11)
最近の粉りゅう再発傾向	0.0%	(0/19)	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/11)
他覚所見						
黒色面皰	26.3%	(5/19)	37.5%	(3/8)	18.2%	(2/11)
ざ瘡様皮疹	10.5%	(2/19)	12.5%	(1/8)	9.1%	(1/11)
瘢痕化	47.4%	(9/19)	62.5%	(5/8)	36.4%	(4/11)
色素沈着	42.1%	(8/19)	50.0%	(4/8)	36.4%	(4/11)
未認定						
問診						
最近の化膿傾向	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-
最近の粉りゅう再発傾向	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-
他覚所見						
黒色面皰	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-
ざ瘡様皮疹	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-
瘢痕化	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-
色素沈着	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-

表5　2021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	0.0%	(0/19)	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/11)
他覚所見						
眼瞼浮腫	0.0%	(0/19)	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/11)
眼瞼結膜色素沈着	0.0%	(0/19)	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/11)
瞼板腺嚢胞形成	0.0%	(0/19)	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/11)
瞼板腺チーズ様分泌物圧出	0.0%	(0/19)	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/11)
未認定						
主訴						
眼脂過多	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-
他覚所見						
眼瞼浮腫	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-
眼瞼結膜色素沈着	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-
瞼板腺嚢胞形成	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-
瞼板腺チーズ様分泌物圧出	0.0%	(0/1)	0.0%	(0/1)	-	-

表6　2021年度歯科検診の有所見率

	全体		男性		女性	
認定						
主訴	50.0%	(4/8)	75.0%	(3/4)	25.0%	(1/4)
歯周病	50.0%	(4/8)	50.0%	(2/4)	50.0%	(2/4)
色素沈着所見						
歯肉	37.5%	(3/8)	0.0%	(0/4)	75.0%	(3/4)
頬粘膜	12.5%	(1/8)	25.0%	(1/4)	0.0%	(0/4)
口蓋粘膜	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/4)
唇粘膜	0.0%	(0/8)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/4)

分担研究報告書

油症患者の追跡調査

研究分担者　小野塚　大介　大阪大学大学院医学系研究科口腔内微生物制御学　特任准教授
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
中原　剛士　九州大学大学院医学研究院皮膚科学　教授

研究要旨　油症認定患者の長期死亡リスクについて再評価を行うことを目的として、追跡調査を 55 年間に延長し、油症認定患者の生存・死亡情報をアップデートした。その結果、追跡対象者 1,664 名のうち、2022 年 12 月 31 日時点で生存の確認ができた者が 617 名(37.1%)、死亡の確認ができた者が 707 名(42.5%)、生死の確認ができていない者が 340 名(20.4%)であった。

A．研究目的

我々はこれまで、油症患者を対象とした追跡調査を実施してきた。40 年間の追跡調査の結果、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明らかにした(Onozuka et al., Am J Epidemiol, 2009)。また、追跡期間を 50 年間に延長して死亡リスクを再評価した結果、男性の油症患者では全がんと肺がんの死亡率が高いこと、女性の油症患者では、肝がんの死亡率が高いことを明らかにした(Onozuka et al., Environ Health, 2020)。さらに、がんの 50 年間累積死亡率を検証した結果、男性では 16.8% (95% CI: 14.5-19.5)、女性では 8.8% (95% CI: 7.0-10.9) であった(Onozuka et al., Environ Int, 2021)。今後、追跡期間をさらに延長し、油症認定患者の長期死亡リスクについて検証を進めていくことが重要であると考えられる。

そこで本研究は、追跡期間を 55 年間に延長するとともに、油症認定患者における死亡リスクを再評価することを目的として実施した。

B．研究方法

前回の 50 年間追跡調査の対象者 1,664 名について、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、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。当該死亡票の使用については、これまでに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、承認を得ている(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)。なお、これまでの調査で死因が不明である油症認定患者については、厚生労働省政策統括官付参事官付審査解析室に新たに申請を行う予定である。

(倫理面への配慮)

本研究は、九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会「カネミ油症の実態調査」(許可番号 30-384) の審査を経て実施した。

Ｃ．研究結果

追跡対象者 1,664 名のうち、2022 年 12 月 31 日時点で生存の確認ができた者が 617 名(37.1%)、死亡の確認ができた者が 707 名(42.5%)、生死の確認ができていない者が 340 名(20.4%)であった。

ただし、これらの情報のすべてが、住民票抄本等の公文書によって確認できたものではないことから、暫定的な結果である。

Ｄ．考察

今回、行政機関、油症センター、油症相談員等の関係者に対する調査を実施し、油症認定患者の追跡情報をアップデートした。しかし、新型コロナウイルス感染症の拡大による感染防止の観点から、検診の実施体制が縮小していること等の影響から、油症認定患者の生存確認が十分にできていない状況である。今後も、関係者による情報収集や公的情報をもとにした生存確認を継続していく予定である。

また、死因の特定に必要な人口動態調査（基幹統計調査)の死亡票の使用については、厚生労働省審査解析室に再度申請を行う予定である。今後、死亡票の使用が許可された場合は、死因が特定されていなかった死亡患者について、死亡票と照合させることで死因の特定を行い、50 年間追跡調査以降の長期死亡リスクの解析を行う予定である。

Ｅ．結論

油症認定患者の追跡調査を 55 年間に延長し、油症認定患者の生存・死亡情報をアップデートした。その結果、追跡対象者 1,664 名のうち、2022 年 12 月 31 日時点で生存の確認ができた者が 617 名(37.1%)、死亡の確認ができた者が 707 名(42.5%)、生死の確認ができていない者が 340 名(20.4%)であった。

なお、追跡調査は継続中であり、あくまでも暫定的な結果であることから、今後も公的情報等よる追跡調査を継続するとともに、主要死因別における長期死亡リスクの再評価を進めていく予定である。

（謝辞）

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

Ｆ．研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

なし

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

なし

３．その他

なし

分担研究報告書

油症認定患者の各種症状に対する桂枝茯苓丸の有効性に関する検討

研究分担者　　貝沼　茂三郎　富山大学附属病院和漢診療科　特命教授

研究要旨 カネミ油症患者に対する桂枝茯苓丸の臨床研究を後方視的に有効群（27 例）、無効群（15 例）の 2 群に分けて比較検討を行った。その結果、有効群では全身倦怠感、皮膚症状ならびに呼吸器症状に関して 3 ヶ月後に無効群と比較して有意な改善が認められた。QOL に関しても有効群において心の健康に関する項目が有意に上昇していた。また実態調査においても桂枝茯苓丸が倦怠感に有効だったと答えた回答が単独投与群で 5/11（45.5%）であったことから、カネミ油症患者の倦怠感に桂枝茯苓丸は検討すべき方剤になるのではないかと考えられた。

A．研究目的

1968 年にダイオキシン類が混入した食用油を摂取した住民に様々な症状が出現した（油症事件、以下油症）。患者は塩素痤瘡や色素沈着などの皮膚症状、痰や咳などの呼吸器症状、しびれや頭重などの神経症状、全身倦怠感など多彩な症状を発症した。油症の様々な症状には、これまでに多くの対症療法が行われてきたが、明確な有効性が証明されたものはない。また油症発生以来すでに 50 年以上経過したが、いまだに患者のダイオキシン類血中濃度は一般住民より高値で、患者は様々な症状に苦しんでいる。患者に残存する症状の多くがダイオキシン類、とくに 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF)の血液中濃度と相関を示すが、ダイオキシン類の排泄を促進させるために、高脂血症剤であるコレスチミドや食物繊維などが投与されてきた。しかし症状の改善にはいたらず、現在まで治療薬として確立したものはない。ダイオキシン類の毒性は主にアリル炭化水素受容体（AhR）を介して発揮され、慢性の曝露で患者体内は酸化ストレス状態にあると考えられる。それに対して桂枝茯苓丸の構成生薬の一つである桂皮、およびその主成分が AhR 活性を阻害し、抗酸化ストレス作用を有する知見が報告されている（Uchi H, et al.,2017)。そのデータを背景に三苫らは桂枝茯苓丸の油症患者に対する治療効果の研究を行い、桂枝茯苓丸が症状軽減の治療薬の一つになり得ると報告した（Mitoma C, et al.,2018)。そこで今回我々はその先行研究で2015年7月22日から2015年12月11日までに登録された患者の中で桂枝茯苓丸の効果判定ができた認定油症患者を対象に桂枝茯苓丸の更なる有効性を検討することを目的に後方視的な研究を行うこととする。また平成２５年度と令和２年度のカネミ油症患者健康実態調査結果を比較すると、漢方薬内服中の患者が 129/1443(8.94%) から 180/1362(13.2%)まで増加し、先述の三苫らの報告もあり、特に桂枝茯苓丸内服患者が増加していた。そこで令和 4 年度は実態調査のアンケート項目に桂枝茯苓丸を含めて漢方薬内服に関する項目を追加し、その有用性に関してさらに検証することとする。

B．研究方法

油症認定患者の各種症状に対する桂枝茯苓丸の治療効果に関する検討で、2015 年 7 月 22 日から 2015 年 12 月 11 日までに登録された全症例（52 例）のうち、桂枝茯苓丸の効果判定をできた 42 例を対象として検討を行う。

桂枝茯苓丸の効果判定は油症認定患者の種々の症状に対して問診から症状の改善が得られたものを有効と判定し、それ以外を無効とした。有効群、無効群の２群に分けて背景因子、主要評価項目および副次的評価項目について比較検討を行う。

（主要評価項目）：末梢神経、皮膚、呼吸器症状、全身倦怠感に関するVAS値

（副次的評価項目）：SF-36 により定量的に評価されたQOL（Quality Of Life）、血液中酸化ストレスおよび抗酸化ストレスマーカー値

統計解析方法：2群間の比較には統計解析ソフトJMP ver16を用いて共分散分析を行う。

また令和 4 年度は実態調査のアンケート項目に漢方薬内服に関する項目を追加し（表１）、その結果からカネミ油症患者に対する漢方治療の有用性に関して検証する。

（倫理面への配慮）

この臨床研究は富山大学附属病院倫理委員会の承認を得て行った。

Ｃ．研究結果

１）．桂枝茯苓丸の有効性に関する後ろ向き研究

油症認定患者の各種症状に対する桂枝茯苓丸の治療効果に関する検討で2015年7月22日から2015年12月11日までに登録された全症例（52 例）のうち、桂枝茯苓丸の効果判定ができた42例の中で問診から有効群（27例）、無効群（15例）とした。また有効群では全例が３ヶ月の観察期間終了後も桂枝茯苓丸の内服を継続していた。また、有効群、無効群の２群間では背景因子（年齢、性別、BMIおよび直近の2,3,4,7,8-PeCDF値）に関して差は認められなかった（表２）。主要評価項目におけるVASの変化量は全身倦怠感、皮膚症状ならびに呼吸器症状に関して 3 ヶ月後に無効群と比較して有効群で有意な改善が認められた（表３）。また副次的評価項目であるSF36によるQOL評価では８つの下位尺度の中で活力に関する項目で 1 ヶ月後に有効群で無効群と比較して有意な上昇が認められた。また心の健康に関する項目では１ヶ月、3ヶ月ともに有効群で無効群と比較して有意な改善が認められた（表４）。

一方で、血液中酸化ストレスおよび抗酸化ストレスマーカー値に関しては両群間に差は認められなかった。

２）漢方薬の有用性に関する実態調査

令和 4 年度実態調査の結果、全回答 1314 名中 220 名がなんらかの形で漢方薬を服用していた（16.7%）。服用していた漢方薬は多い順に芍薬甘草湯、大建中湯、桂枝茯苓丸、葛根湯、八味地黄丸/牛車腎気丸の順であった。芍薬甘草湯は60人が服用し、単独服用は40名だった。単独服用40名中31名がこむら返り、9名が手足のしびれに有効とのことだった。大建中湯は21名が服用し、単独服用は13名だった。13名中10名が便秘、5名が腹痛に有効とのことだった。また桂枝茯苓丸は20名が服用し、単独服用は11名だった。11名中5名が倦怠感に有効とのことだった。

漢方薬の服用により改善した症状としてはこむら返り（64名）、便秘（42名）、倦怠感（37名）、手足のしびれ（33名）、痛み（31名）、冷え（23名）、咳（18名）などであった。しかし前述した芍薬甘草湯、大建中湯、桂枝茯苓丸以外にそれぞれの症状改善に特に有用な処方は認められなかった。

Ｄ．考察

今回の後方視的検討でアンケート結果から何らかの症状が改善した症例が27例（64.3%）と高い結果であり、QOL評価の下位尺度において、特に心の健康に関する項目が 1 か月後から有効群で無効群と比較して有意に改善していた。また我々はこ

れまでにカネミ油症患者を対象として行った舌診の研究で全員に舌裏静脈の怒張が認められたことを報告している（Kainuma M, et al., 2021）。舌裏静脈怒張は漢方医学的には瘀血を示唆する重要な所見の一つである。本研究で桂枝茯苓丸の有効例が多かったことと併せてカネミ油症患者の漢方医学的病態としては瘀血の病態が中心ではないかと考えられた。桂枝茯苓丸投与で改善がみられた心の健康や全身倦怠感は漢方医学的にはまず気の異常（気とは目に見えないが生命活動を営む根源的なエネルギーと定義）を考えるが、本年度行った実態調査の結果でも桂枝茯苓丸単独内服中の患者で約 46%（5/11）の患者で倦怠感が軽減していることから油症患者が訴える全身倦怠感に対しては瘀血の病態と考えて桂枝茯苓丸を第一選択薬としてよいのではないかと考えられた。

また桂枝茯苓丸はカネミ油症患者の手足のしびれ、痛みには効果が低いこともわかった。一方で、今回の実態調査結果から、こむら返りに最も使用されている芍薬甘草湯が単独投与されていた 40 名のうち 9 名（22.5%）で手足のしびれ、痛みに効果があったと回答していたことから油症患者の手足のしびれ、痛みに芍薬甘草湯が有用である可能性が考えられた。芍薬甘草湯はこれまでしびれ・痛みに有用であることが報告されている（山本, 2001; 山口, 他. 2003）。そこで桂枝茯苓丸がしびれ・痛みに効果がなかった場合、芍薬甘草湯を試してみる価値はあると考える。

また今回の実態調査の結果からこれまでの実態調査よりも漢方薬を服用している患者がさらに増加していることがわかった。しかし漢方薬を服用していない油症患者の中にも漢方治療が有用な患者がいると推測される。そこで今後漢方治療に対するより詳細な意識調査を行い、カネミ油症患者に対して漢方治療をより有効に活用するための検討課題を抽出し、分析していくことでより高いレベルで漢方薬を油症患者に役立てるための方略を検討していきたい。

我々の研究にはいくつかの limitation がある。研究対象の症例はいずれも研究観察期間中、桂枝茯苓丸以外の漢方薬の服薬もなく、全例でコンプライアンスも良好であった。また桂枝茯苓丸の効果判定として VAS や SF36 による QOL 評価といった客観的な指標を用いていたが、今回の研究が後方視的な研究であること、またレスポンダーの判定を自覚症状の改善で行ったことから客観性にかける部分がある。

E．結論

後方視的研究ならびに実態調査の結果からカネミ油症患者に対する桂枝茯苓丸の有用性を再確認できた。またカネミ油症患者に対して桂枝茯苓丸も含めて漢方治療の有用性についてさらなる研究を推進していきたい。

F．研究発表

１．論文発表

該当なし

２．学会発表

該当なし

G．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

１．特許取得

該当なし

２．実用新案登録

該当なし

３．その他

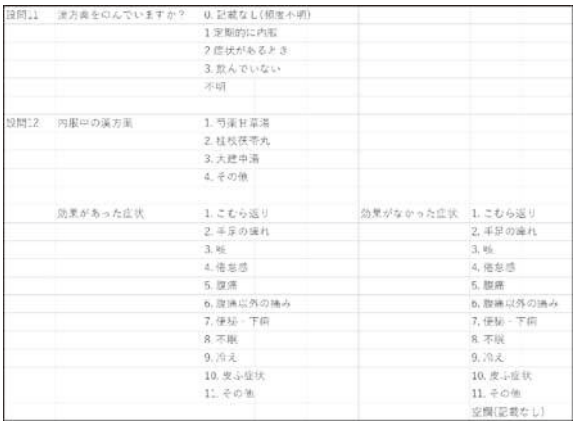
該当なし

参考文献

1.Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, et al.Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes.
J Dermatol Sci.2017;85:36-43.
2.Mitoma C, Uchi H, Tsukimori K, et al.Current state of yusho and prospects for therapeutic strategies.
Environ Sci Pollut Res Int.25.16472-80.

3.Kainuma M,MItoma C, Tsuji G, et al.The Association between Objective Tongue Color and the Static Blood Findings of Yusho Patients.
Asian J. Complementary Altern. Med.2021;9:89-97.
4.山本嘉一郎：しびれ・痛みに対する漢方薬の有用性.
Medical ASAHI.2001,30:73-74.
5.山口正明,増田周司,塚本久子,他.脳血管障害後遺症における疼痛，しびれ感に対する芍薬甘草湯の治療効果.
痛みと漢方.2003,13:103-107.

表１：令和４年度カネミ油症実態調
（漢方薬に関する追加質問）



設問2.1	漢方薬を飲んでいますか？	0.記載なし(回答不明)		
		1.定期的に内服		
		2.症状があるとき		
		3.飲んでいない		
		不明		
設問2.2	内服中の漢方薬	1.芍薬甘草湯		
		2.桂枝茯苓丸		
		3.大建中湯		
		4.その他		
	効果があった症状	1.こむら返り	効果がなかった症状	1.こむら返り
		2.手足の痺れ		2.手足の痺れ
		3.吐		3.吐
		4.倦怠感		4.倦怠感
		5.腹痛		5.腹痛
		6.腹痛以外の痛み		6.腹痛以外の痛み
		7.便秘・下痢		7.便秘・下痢
		8.不眠		8.不眠
		9.冷え		9.冷え
		10.皮ふ症状		10.皮ふ症状
		11.その他		11.その他
				空欄(記載なし)

表２：患者背景

患者背景		
	有効群（27例）	無効群（15例）
性別（男/女）	10/17	10/5
年齢（歳）	66.9±10.4	68.3±11.1
BMI（kg/mm^2）	22.9±3.2	24.2±2.2
血中PeCDF濃度（pg/g lipid）	197.1±262.0	134.4±239.6

表３：VASのベースラインからの変化量
（有効群と無効群の比較）

項目	時期	CFB	S.E.	p-vlue	95%CI	
					Lower	Upper
全身倦怠感/疲れやすさ	1ヶ月	-0.18	0.34	0.6	-0.86	0.5
	3ヶ月	-0.67	0.3	0.03	-1.27	-0.06
末梢神経/痛み・しびれ	1ヶ月	-0.07	0.32	0.84	0.71	0.58
	3ヶ月	-0.56	0.34	0.11	-1.25	0.14
皮膚/にきび・できもの	1ヶ月	-0.11	0.27	0.7	0.66	0.45
	3ヶ月	-0.44	0.18	0.02	-0.8	-0.08
呼吸器症状/せき・たん	1ヶ月	-0.5	0.29	0.09	-1.09	0.08
	3ヶ月	-0.98	0.27	<0.001	0.73	-0.33
		CFB: Change From Baseline, S.E. : Standard Errorを表す				

表４：SF36の下位尺度におけるベースライン
からの変化量（有効群と無効群の比較）

項目	時期	CFB	S.E.	p-vlue	95%CI	
					Lower	Upper
身体機能	1ヶ月	0.58	1.97	0.771	-3.41	4.57
	3ヶ月	2.37	1.75	0.184	-1.17	5.92
日常役割機能（身体）	1ヶ月	0.82	2.57	0.751	-4.44	6.01
	3ヶ月	1.67	3.4	0.626	-5.22	8.56
体の痛み	1ヶ月	-0.57	3.11	0.857	-6.86	5.73
	3ヶ月	-2.09	3.14	0.509	-8.45	4.26
活力	1ヶ月	5.3	2.34	0.029	0.56	10.04
	3ヶ月	1.39	3.08	0.654	-4.84	7.63
日常役割機能（精神）	1ヶ月	3.42	3.06	0.27	-2.77	9.61
	3ヶ月	1.04	2.69	0.7	-4.39	6.48
心の健康	1ヶ月	4.33	1.87	0.026	0.55	8.11
	3ヶ月	5	1.9	0.012	1.15	8.86
		CFB: Change From Baseline, S.E. : Standard Errorを表す				

分担研究報告書

油症検診における眼病変の追跡調査

研究分担者　　園田　康平　九州大学医学研究院眼科学分野　教授

研究要旨　令和４年度油症患者の眼症状を調査した。

A．研究目的

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

B．研究方法

令和４年度の油症検診にて、九州大学病院眼科外来あるいは福岡県の油症一斉検診時に油症患者を診察し、眼所見および症状を把握する。

（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事を確認した。

C．研究結果

新型コロナウイルス感染の拡大の影響を懸念し、今年度も検診を行っていないが、昨年度までの患者データおよび臨床所見を解析し、文献的考察を行った。これまでの油症研究で、血中 PCDF 濃度と関係がある眼症状として、眼からの浸出液の増加が指摘されている。一方で、油症患者の特徴的な症状であるマイボーム腺の分泌過多には関係性が認められていない(Nakamura T, et al., Journal of Dermatological Science Supplement Volume 1, Issue 1, April 2005, Pages S57-S63)。この原因としては、加齢性の変化、もしくはダイオキシン類の毒性影響のため、マイボーム腺に萎縮性変化を来たし、分泌過多が減少している可能性が想定される。

D．考察

一昨年度までの経過では受診者の高齢化が進み臨床所見は少なくなってきていた。新型コロナウイルス流行の社会的影響が軽減され次第、油症眼科症状の検診を再開したいと考える。

E．結論

一昨年度までの経過では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が今後も経過観察が必要である。

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

（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

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　病院准教授
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水疱性角膜症の原因となる。動物実験において、外的要因により障害された角膜内皮細胞の形態変化が電子顕微鏡でも観察された。同様の変化があれば、ダイオキシン類による角膜内皮細胞への毒性があることが推測できる可能性がある。

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。

また、動物実験において外的要因での角膜内皮細胞の形態変化を観察し、ダイオキシン等による障害があった場合の、角膜内皮細胞の形態を推測する。

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 2022 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。

また、動物実験では摘出したウサギ角膜を様々な条件で保存し、角膜内皮細胞の形態変化を観察する。今回は前年度の研究に加え、電子顕微鏡での知見を加えた。

（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

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。

外的要因による角膜内皮細胞の形態変化を動物実験で調査した。摘出角膜を低温保存した後、角膜内皮細胞を電子顕微鏡で観察すると、基底膜であるデスメ膜から脱落するものが多く、残存している細胞においてはアポトーシスを生じている像が観察された。

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、ダイオキシン類

が角膜の正常形態・代謝維持に影響している可能性がある。油症患者に、動物実験における内皮細胞形態と同様の変化がみられれば、ダイオキシン類が前房に移行し、内皮細胞障害を与えていることが推測できる可能性がある。

E. 結論

動物実験において、外的要因による角膜内皮細胞に生じた形態変化を電子顕微鏡でも確認することができた。同様の変化がみられればダイオキシン類による角膜内皮細胞への毒性が推測できる可能性がある。

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

長崎県油症地区における顎関節症に関する研究

研究分担者　　川崎　五郎　長崎大学口腔腫瘍治療学分野　准教授
研究協力者　　吉冨　泉　諫早総合病院歯科口腔外科　医長

研究要旨　平成 24 年度と平成 29 年の長崎県油症検診において、各年度の検診結果に基づき顎関節症に関する検討を行った。顎関節症の症状が認められた患者はどちらの年度でも５％の発症率であった。症状としては疼痛が最も多くみられ、次いで顎関節部の雑音であった。

A．研究目的

油症患者における口腔領域の症状として、口腔粘膜色素沈着の他、口腔乾燥症や歯周疾患を訴える患者もしばしばみられる。これまで、口腔乾燥症や口腔カンジダ症に関する検討を行ってきたが、油症患者の高齢化が進み、これらの疾患は今後増加していくことと思われる。口腔乾燥やカンジダの原因はいくつか考えられるが、その一つとして咀嚼機能や嚥下機能などの口腔機能の衰えが関係している可能性がある。口腔機能の衰えには咀嚼筋の機能低下が関与している可能性があり、それらの機能を測定しておくことは重要と思われる。

今年度、コロナウイルス感染の影響で例年行われている油症歯科検診が実施されず、予定していた咬筋、側頭筋、内側翼突筋などの咀嚼筋に関する調査および嚥下能力について調査研究が遂行できなかった。よって本研究では、過去に長崎県油症検診において行った顎関節症に関する臨床所見に関して解析を行い検討した。

B．研究方法

平成24年度および平成29年度の長崎県油症検診で歯科検診を行った患者を対象者とした。通常の油症歯科検診において顎関節に異常を訴えた患者を対象に顎関節の疼痛の程度、顎関節の動きなどの機能、日常生活の支障の有無について問診を行い検討した。顎関節の機能については、関節の疼痛、咬筋および内側翼突筋の疼痛、関節雑音について問診した。日常生活の支障については、食事、開口、睡眠、嚥下、会話についての支障の有無を問診した。また、平成 29 年度においては口腔内細菌数ついても検討した。対象症例は平成 24 年度が 187 名であった。平成 29 年度は細菌数の測定のためにランダムに選んだ 62 名を対象とした。また、平成 29 年度では口腔細菌数の測定を併せて行い、その関連性についても検討した。口腔細菌数測定には、細菌カウンターを用いて舌背を綿棒で拭い測定した。

（倫理面への配慮）

本研究の解析結果においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C．研究結果

平成 24 年度は歯科を受診した 187 名中 9 名に顎関節の症状が認められた。また、平成29年度は62名中3名に顎関節の症状が認められた。主症状（主訴）は、平成 24 年度では、疼痛が 3 例、顎関節の雑音が 3 例、開口障害が 3 例で、平成 29 年度では、疼痛が 2 例、顎関節の雑音が 1 例であった。アンケートによる症状（複数回答

可）では、顎の機能に関しては、平成 24 年度は、筋痛が 3 例、関節雑音が 6 例、開口しにくいが 4 例であった。筋痛が 2 例、関節雑音が 2 例、開口しにくいが 2 例であった。平成 24 年度は開口量は自力開口量が 10－42㎜ であった。平成 29 年度の口腔細菌数は、対象者全員の測定値は $5.2x10^5$ から $6.2x\ 10^7$ で、平均値は $9.5x10^6$ であった。顎関節症状のあった患者の平均値は $9.2x10^6$ で、顎関節の症状のなかった患者との差はみられなかった。

D．考察

顎関節症は顎関節のみならず咀嚼筋の障害も含んだ包括的診断名である。内在性外傷や心因性要因などによって運動痛や関節雑音、顎運動異常を呈する。顎関節症と診断するためには、１）顎関節や咀嚼筋等の疼痛、２）関節雑音、３）開口障害ないし顎運動異常の主要症候のうち、少なくとも一つ以上を有することが必要条件となる。さらに臨床的に、顎関節症Ⅰ型：咀嚼筋に筋痛や開口障害を呈する咀嚼筋痛障害、顎関節症Ⅱ型：関節包や滑膜に炎症が生じ顎関節の疼痛や開口障害を呈するもの、顎関節症Ⅲ型：関節円板の転位や変形に起因して関節雑音や開口障害を呈するもの、顎関節Ⅳ型：下顎頭に変形を認める変形性顎関節症、に分類される。

今回の症例群では画像検査はなされていないものの、上記１）から３）の症状を有しており、臨床的に顎関節症と診断できると思われた。

文献などに基づく顎関節症の疫学調査では、臨床症状を訴えていない一般集団でも、40－75％が関節雑音や下顎運動制限などの他覚的症状、28－33％が顔面痛や顎関節痛などの自覚症状があるとされている。別の調査では、一般集団において開口障害がみられるものは 5％未満であり、関節雑音の発症率は変動性が大きく疫学的検討は困難であるとされている。今回の調査では、主訴に顎関節に症状を訴えた患者を対象に調査していたこと、また平成 29 年度においては、口腔細菌数を測定するためにランダムに選んだ患者の中から顎関節に症状があった患者で検討しているため、上記の文献的疫学調査とは一概に比較できない。しかしながら、平成 24 年度が 187 名中 9 名、62 名中 3 名と、どちらの年度でも 5％程度の顎関節症状の発現であり、症状の発現は本研究の結果はやや少ない傾向にあった。一般に、顎関節症は年齢の若い世代にみられる傾向があるとされ、油症地区の対象患者の年齢分布や、地域性なども今回の結果に影響している可能性が考えられる。以前の全国の油症検診結果では、歯科領域の症状としては顎関節症と油症との関連が示唆されたこともあり、今後は少し調査方法を変えて検討する必要があると思われる。

一方、油症患者の高齢化に伴い、唾液腺の機能低下による口腔乾燥症や、あるいは口腔運動機能低下による摂食嚥下障害や構音障害を訴える患者の増加が考えられる。これまで、口腔乾燥症については検討を行ってきており、その結果に基づいて平成 29 年度は口腔細菌数の変化について検討したが特に油症患者において有意差はみられず、またその結果と顎関節症との間にも相関性は認められなかった。顎関節症は口腔機能の衰えとは必ずしも相関はしないと思われるが、今後は、顎関節症に関する検討と並行して口腔機能低下に関する検討が必要であると思われる。

E．結論

平成24年度および平成29年の長崎県油症検診における顎関節症について検討した。顎関節症の発症率は５％であった。

F．研究発表

なし

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

なし

参考文献

１）濱田　傑：顎関節疾患. 白砂兼光、古郷幹彦編：口腔外科学第４版, pp335-375, 医歯薬出版, 東京, 2021

２）飯塚忠彦:顎関節症診療のガイドライン. 日本顎関節学会編：　顎関節症第１版, pp8-14, 永末書店, 東京, 2003

３）De Kanter RJAM and Truin GJ : Prevalence in the Dutch adult population and a meta-analysis of signs and symptoms of temporomandibular disorders. J Den t Res 72 : 1509-1518, 1993.

４）Wanman A and Agerberg G : Temporomandibular joint sounds in adolescents, a longitudinal study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 69 : 2-9, 1990.

分担研究報告書

油症における末梢血 CD4 陽性 CD25 陽性細胞の検討

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　2022 年度福岡県油症一斉検診受診者 187 例について末梢血リンパ球亜集団の CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性細胞を測定した。油症患者 91 例では対照者 78 例に比較し CD4 陽性細胞の比率あるいは絶対密度に差を認めなかった。CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率は油症患者において対照者に比べ上昇を認めた。CD4 陽性 CD25 陽性細胞の絶対密度は油症患者と対照者に差をみなかった。2022 年度福岡県油症一斉検診において油症患者では対照者に比較し CD4 陽性 CD25 陽性細胞の上昇が認められた。

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、2022 年度福岡県油症一斉検診において細胞性免疫機能検査として末梢血リンパ球亜集団の CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性細胞を測定し、油症における細胞性免疫に対する慢性的影響について検討した。

B．研究方法

2022 年度福岡県油症一斉検診における 15 歳以上の受診者 189 例中、細胞性免疫検査にアンケートにて同意が得られた 187 例を対象者とした。

白血球数、末梢血液像は半導体レーザを使用したフローサイトメトリー法により多項目自動血球分析装置 XE-2100（シスメ

ックス(株))にて測定した。末梢血リンパ球亜集団の CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性細胞の測定は抗ヒトマウスモノクローナル抗体を用い二重染色フローサイトメトリー法により、CD4 陽性細胞は CD4 FITC (Beckman Coulter)を用いて、CD25陽性細胞はCD25 PE (BD Biosciences)を用いて BD FACSCantoⅡフローサイトメーター(BD Biosciences)にて測定した。リンパ球亜集団は、総リンパ球に対する比率および絶対密度で表した。

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

2022 年度福岡県油症一斉検診における 15 歳以上の受診者で細胞性免疫検査に同意が得られた 187 例の内訳は女性 106 例、男性 81 例で、平均年齢は 57.8±18.7 (18－93) 歳であり、油症患者 91 例、油症患者 (同居家族) 15 例、未認定患者 78 例、観察者 3 例であった。

2022 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者 91 例について未認定患者 78 例を対照者として、両群間の CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性細胞について検討を行なった (表 1)。CD4 陽性細胞の総リンパ球に対する比率は対照者 46.2±8.6％に比べ油症患者では 47.7±10.0％と差を認めず、CD4 陽性細胞数は対照者 915.2±352.1/μｌに対し油症患者では 847.3±310.6/μｌと差をみなかった。CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率は対照者 16.9±6.9％に対し油症患者では 19.2±7.5％と有意の上昇を認めた (P＜0.05)。CD4 陽性 CD25 陽性の絶対密度は対照者 328.1±165.5/μｌに対し油症患者では 339.7±172.0/μｌと差をみなかった。

D．考察

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

油症における細胞性免疫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について末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中 PCB 濃度および血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度との関連について報告されている。血中 PCB 濃度と末梢血リンパ球、helper/inducer T 細胞を示す CD4 陽性細胞、suppressor/cytotoxic T 細胞を示す CD8 陽性細胞の間に相関はみられなかったが、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と末梢血リンパ球数、CD4 陽性細胞の間に相関が認められ油症患者の末梢血リンパ球、

CD4 陽性細胞の増加に 2,3,4,7,8-PeCDF の関与が示唆された。また、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者において低値の患者に比べ末梢血リンパ球、helper/inducer T 細胞を示す CD4 陽性細胞の増加を認めた[13]。

2022 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者について未認定患者を対照者として CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性細胞を検討した。油症患者では対照者に比較し CD4 陽性細胞の総リンパ球に対する比率あるいは絶対密度に差をみなかった。CD4 陽性 CD25 陽性細胞数は油症患者と対照者の間に差をみなかったが、油症患者では対照者に比べ CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率の上昇を認めた。CD4 陽性 CD25 陽性細胞に含まれる CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞は免疫自己寛容により自己免疫疾患の発症抑制に関与するほか、抗腫瘍免疫の抑制、移植免疫寛容の誘導に関与することが報告されている[14)15)16)]。油症において CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞について検討が必要と考えられる。

2022 年度福岡県油症一斉検診において油症患者では対照者に比較し CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率の上昇を認めた。油症における CD4 陽性 CD25 陽性細胞に対する PCB あるいは 2,3,4,7,8-PeCDF の慢性的影響を検討するため CD4 陽性 CD25 陽性細胞と血中 PCB 濃度あるいは血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度との関連の検討が必要と考えられる。

E．結論

2022 年度福岡県油症一斉検診受診者 187 例について末梢血リンパ球亜集団の CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性細胞を測定した。油症患者 91 例では対照者 78 例に比較し CD4 陽性細胞の比率あるいは絶対密度に差を認めなかった。CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率は油症患者では対照者に比べ上昇を認めた。CD4 陽性 CD25 陽性細胞数は油症患者と対照者の間に差をみなかった。油症において CD4 陽性 CD25 陽性細胞と血中 PCB 濃度あるいは血中 2,3,4,7,8- PeCDF 濃度との関連について検討が必要と考えられた。

F．参考文献

1. Masuda Y, Yoshimura H : Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance : A Review. Amer. J. Ind. Med. 5 : 31-44, 1984.
2. Oishi S, Morita M, Fukuda H : Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 43 : 13-22, 1978.
3. Gonzalez FJ, Liu SY, Yano M : Regulation of cytochrome P450 genes : molecular mechanism. Pharmacogenetics 3 : 51-57, 1993.
4. 飯田隆男，芥野岑男，高田智，中村周三，高橋克巳，増田義人：ヒトの血液中におけるポリ塩化ビフェニルおよびポリ塩化クアテルフェニルについて．福岡医誌 72 : 185－191, 1981.
5. 増田義人，山口早苗，黒木広明，原口浩一：最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニール異性体. 福岡医誌 76 : 150-152, 1985.
6. 増田義人，原口浩一，古野純典：油症患者における PCB 異性体の 30 年にわたる特異な残留. 福岡医誌 94:136-143, 2003.
7. 飯田隆男，戸高尊，平川博仙，飛石和大，松枝隆彦，堀就英，中川礼子，古江増隆：油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査（2001 年）．福岡医誌 94 : 126－135, 2003.
8. Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, 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. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M：Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. 155：1151-1164, 1995.
15. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S：Thymus and auto-immunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. J. Immunol. 162：5317-5326, 1999.
16. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H：Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. Nat. Rev. Clin. Oncol. 16：356-371, 2019.

G．研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表１　油症患者および対照者におけるリンパ球亜集団

		Yusho	Controls
No.		91	78
CD4 陽性細胞	(%)	47.7±10.0	46.2±8.6
	(/μl)	847.3±310.6	915.2±352.1
CD4 陽性 CD25 陽性細胞	(%)	19.2±7.5*	16.9±6.9
	(/μl)	339.7±172.0	328.1±165.5

*P＜0.05 vs. controls.

分担研究報告書

油症患者における皮膚ガス分析の追加検証

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　芦田　美輪　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

油症患者は体内の各臓器にダイオキシン類が蓄積しており、皮膚では脂腺をはじめとする付属器に蓄積され、時に脂腺から毛包を介して排出される。皮膚症状として塩素痤瘡と呼ばれる皮疹が生じる。

近年、皮膚ガスの研究が注目されている。皮膚ガスとは、体表面から発せられる揮発性の化学物質であり、①炭水化物、②タンパク質や脂質の代謝生成物、③細菌の分解産物、④吸入・経口摂取された外因性化学物質、⑤皮膚表面における反応生成物などからなる混合ガスである。昨年の研究で油症患者と健常者の皮膚ガスを採取、成分解析し、双方間での成分比較を行った。結果として香料を油症患者特異的に検出したが、採取環境などの影響が考えられ、今年は追加検証を行なった。

A. 研究目的

油症患者は体内の各臓器にダイオキシン類が蓄積している。皮膚では脂腺をはじめとする付属器に蓄積され、時に脂腺から毛包を介して排出される。皮膚症状として塩素痤瘡と呼ばれる皮疹が生じる[1]。

近年着目されている皮膚ガスは身体的・生理的状態、種々の疾病の有無、生活環境や生活行為との関連が示されており[2,3]、油症患者から排出される皮膚ガス中の特徴的な成分の有無を検証した。

B. 研究方法

①対象:油症認定患者 3 名と対照群として、健常人ボランティア 9 名での検討を行った。検体採取地域は、油症患者は 3 名とも五島市で、健常ボランティア 6 名は長崎市、3 名は五島市にて採取した。

②方法:安静、座位の状態で被験者の前腕から皮膚ガス回収器を用いて皮膚ガスを回収した。回収した皮膚ガスはガスクロマトグラフィー法で解析を行った。

③本研究は長崎大学病院、五島中央病院の倫理審査委員会から承認され、すべての被験者にインフォームドコンセントを行い、文書による同意を得た上で実施した。

C. 研究結果

被験者の年齢、性別を表 1 に示す。油症患者は男性 1 名、女性 2 名で平均年齢は 83 歳であった。3 名とも五島市で検体を採取した。長崎市で回収した健常者は、男性 3 名、女性 3 名、平均年齢 52.2 歳であり、五島市で回収した健常者は男性 2 名、女性 1 名で平均年齢 37.3 歳であった。

測定結果を図 1 ～4に示す。油症患者及び健常者から検出したものにmenthol、N,N-dimethyl acetoamide 、 Methyl methoxyacylate、propionic acidがあった。

D. 考察

皮膚ガスは，人の皮膚表面から放散される揮発性の有機・無機化合物であり，炭水化物やタンパク質，脂質等の代謝生成物，腸内細菌による分解生成物，吸入・経口摂取された外因性物質，皮膚表面における生物的・化学的な反応生成物などから構成される混合ガスである[2]。

放散される皮膚ガスの由来は、皮膚表面反応や，汗腺や脂腺などの皮膚の分泌腺，血液に大別できる。皮膚ガス測定は，日常生活における健康状態の確認や，疾患の早期発見や治療効果判定，皮膚ガス成分パターンに基づく個人認証など，健康・医用面において多岐にわたる用途展開が期待される[2,3]。

油症患者の体内に蓄積したダイオキシンは脂腺を経由して排出している経路が知られており、皮膚ガスの測定により油症の診断や体内のダイオキシン濃度の推定に期待がもたれる。

今回検出した化合物は健常者や油症患者、測定地域に特徴的なものは検出しなかった。健常者のみで検出したものにメントール、N,N -dimethyl acetoamide があり、油症患者のみで検出したものに 2-Methoxyethyl Acrylate があった。propionic acid は健常者、油症患者に共通して検出したが、健常者 2 名で特に高値であった。

メントールはモノテルペンの一種で、ハッカ(ペパーミント)に多く含まれる香料成分である。

メントールの受容体である TRPM8 は主に 27℃以下の温度を感知するため、メントールにより冷感を感じることができる。メントールによる TRPM8 を刺激することにより掻痒を一過性に抑制できることが報告されており[4]、外用処方薬に添加される場合や市販の外用剤にも多く含まれているため日常生活においても暴露される頻度は高い。

N,N-dimethyl acetoamide は高沸点、高い引火点であり、化学的に安定なこと、毒性が低いことなど特長から種々の反応溶媒として有機合成化学において広く用いられる。

2-Methoxyethyl Acrylate は無色透明で強いエステル臭がある可燃性の液体である。反応性に富み、重合によってポリマーを形成する特徴から超耐寒性アクリルゴムの原料、塗料、糊・接着剤の原料として使用される。また、医療用プラスチックなどへ応用されている[5、6]。

プロピオン酸は、カルボン酸の一種で油脂の加水分解により得られる脂肪酸のうち、最も炭素数の少ないものである。微量ではあるが、パンや牛乳、チーズ、味噌などの日常食品中に含まれる[7]。

前回の研究において皮膚ガスの採取環境による影響が考えられたため健常被験者についても五島市で実施した。今回の結果からは採取環境によって特異的な結果は確認されなかった。健常者群および油症患者群においても特徴的な結果が出ていないことから個人の趣向や生活環境の影響が大きいと考えられた。

今回の研究の限界は、ダイオキシンの測定は規制の内容と倫理配慮の双方を鑑み、実施できていないことである。

E. 結論

今回の検討では被験者の生活や就業環境、趣向等の影響が大いにあると推定された。

呼吸時や経口摂取で生体内に取り込まれ、皮膚ガスとして放出される物質を検出できることから油症患者特異的な物質の検出への応用が期待できる。ダイオキシン類の直接的な測定は規制上困難であった

が、代謝産物等について測定対象を精査し追加の検討を行うことで油症の病態解明の一助となることを期待する。

謝辞

油症研究にお力添え頂いた関係者の皆様、ご協力いただいた油症患者、健常ボランティアの皆様に深謝致します。

参考文献

1. 古江増隆、油症における塩素ざ瘡と色素沈着の発症機序とその対策 aryl hydrocarbon receptor の役割:福岡医学雑誌 111 巻 3 号 124-136, 2020
2. 関根嘉香、木村桂大、梅澤和夫、【生体ガス活用の最前線】皮膚ガス測定は何に役立つか?:におい・かおり環境学会誌 48 巻 6 号 410-417; 2017
3. 津田孝雄、小松史哉、鈴木健志、伊藤宏、佐々木陽典、瓜田純久、皮膚ガスの疾病へのアプローチ 皮膚ガス 2-エチルヘキサノールの由来と透析中における変動:安定同位体と生体ガス: 医学応用 12 巻 1 号 45-54; 2020
4. Radhika Palkar, Serra Ongun, Edward Catich, Natalie Li, Neil Borad, Angela Sarkisian, David D McKemy, Cooling Relief of Acute and Chronic Itch Requires TRPM8 Channels and Neurons. J Invest Dermatol. 2018 Jun; 138(6): 1391-1399.
5. 菅谷博之, 生産と技術第 65 巻 第 1 号(2013) ; 63-67 抗血栓性人工腎臓の研究開発
6. Masaru Tanaka, Akira Mochizuki, Naoki Ishii, Tadahiro, Motomura, and Tatsuko Hatakeyama, Study of Blood Compatibility with Poly(2-methoxyethyl acrylate). Relationship between Water Structure and Platelet Compatibility in Poly(2-methoxyethylacrylate-co-2-hydroxyethylmethacrylate); Biomacromolecules 2002, 3(1): 36-41
7. 細谷圭助、森真弓、庶務品中のプロピオン酸の含有量について,日本栄養・食糧学会誌 231-233vol39 No. 3 1986

Ｆ．研究発表

なし

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

なし

表１．被験者一覧

令和4年度研究				
	年齢	性別	回収地域	
健常者 4	34	男	長崎市	
健常者 5	53	男	長崎市	
健常者 6	84	男	長崎市	
健常者 7	35	女	長崎市	
健常者 8	64	女	長崎市	平均年齢
健常者 9	43	女	長崎市	52.2
	年齢	性別	回収地域	
油症 4	76	女	五島市	
油症 5	84	女	五島市	平均年齢
油症 6	89	男	五島市	83.0
	年齢	性別	回収地域	
健常者 10	44	男	五島市	
健常者 11	34	女	五島市	平均年齢
健常者 12	34	男	五島市	37.3

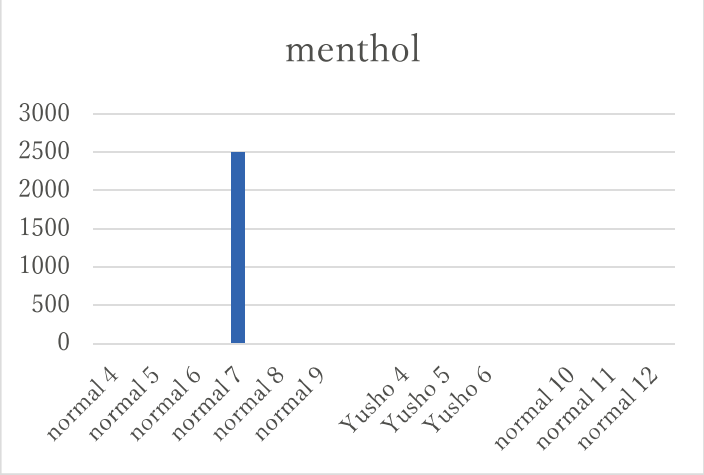


図１．menthol を健常者１名から検出した。

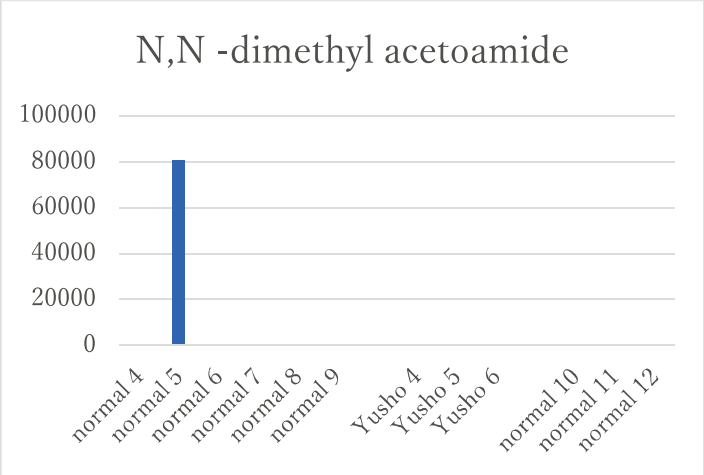


図２．N,N -dimethyl acetoamide を健常者１名から検出した。

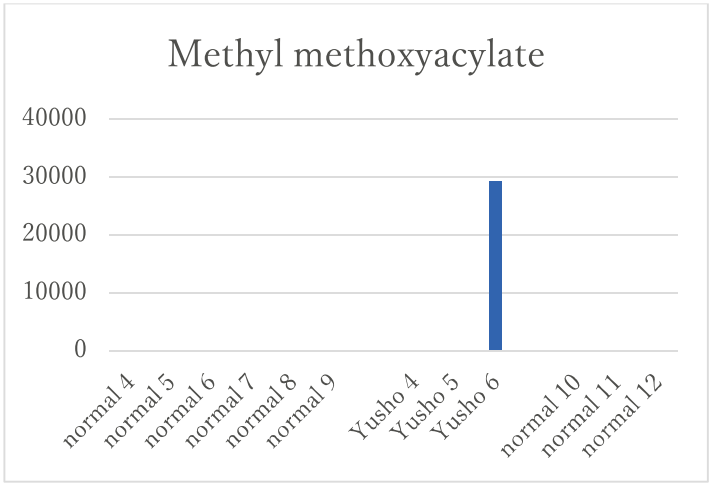


図３．Methyl methoxyacylate を油症患者１名から検出した。

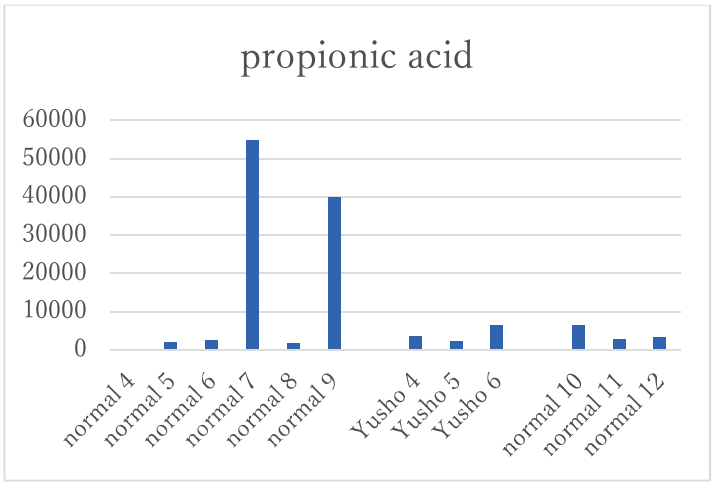


図４.propionic acid を健常者と油症患者から検出した。

分担研究報告書

油症患者の関節症状に関する研究
―関節炎におけるキヌレニン経路の影響 ―

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

関節炎においては炎症が強く惹起されている。炎症状態においてキヌレニン経路の影響を調べるために、ヒト軟骨細胞を用いて KYN を中心としたトリプトファンの代謝産物を投与し、刺激を受けた軟骨細胞軟骨細胞の合成因子(aggrecan, Col2 など)、炎症促進サイトカイン IL-6、軟骨変性因子

(MMP-3、MMP-13、ADAMTS-4,-5 など)の遺伝子発現変化を PCR にて解析する。また、炎症を強く惹起するリポポリサッカイライド（LPS）投与も同時に行い、その変化を調べた。軟骨細胞は OA 患者が人工関節置換術を施行された際の切除骨軟骨片より抽出した。

C.研究結果

ヒト OA 軟骨細胞に LPS を投与すると、律速段階酵素 IDO1,2mRNA は著明に上昇しており、LPS によってキヌレニン経路は活性化していることが示された（Figure2A)。キヌレニン代謝産物で最も大量に産生されるとされる KYN 投与では、IL6 mRNA が KYN 濃度依存的に増加していた。

KYNA 単独投与では、100μM にて IL-6、基質分解酵素 MMP-3, -13 mRNA 発現は抑制されていた（Figure 2B)。LPS と KYNA の投与では、LPS で上昇した IL-6、MMP-3, -13 mRNA 発現は KYNA100μM にて抑制された(Figure2C)。

D．考察

関節炎状態下の軟骨細胞において、キヌレニン経路は活性化している。AhR の endogeneous ligand として知られる KYN が軟骨細胞において、IL-6 を促進して catabolic な作用を有している可能性が示された。一方で、KYNA は濃度次第ではあるが、炎症を抑制する作用があることが示唆された。キヌレニン経路における代謝産物をコントロールできれば、関節炎を制御できる可能性がある

E.結論

キヌレニン経路における KYNA は軟骨変性において正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

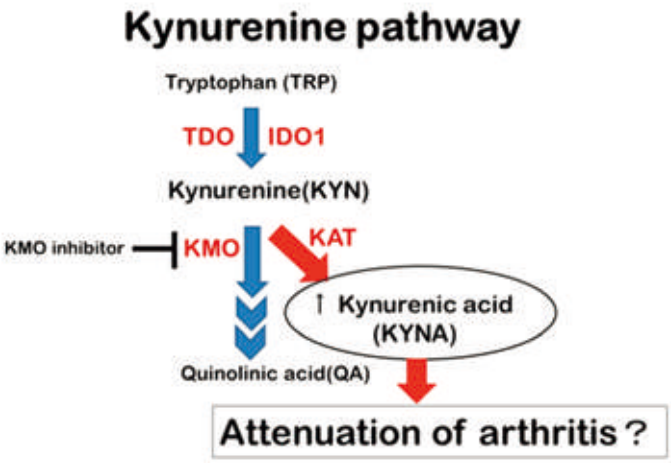
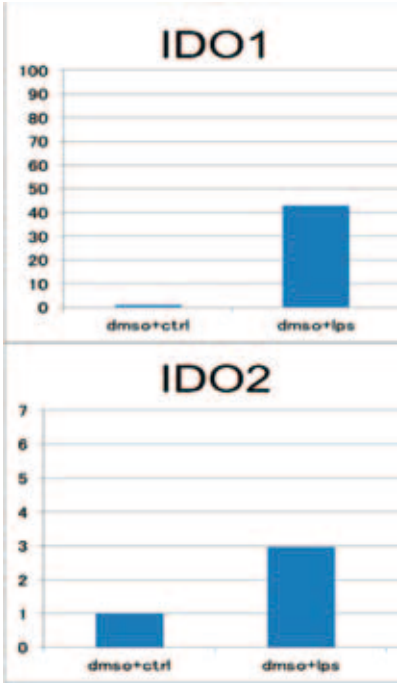
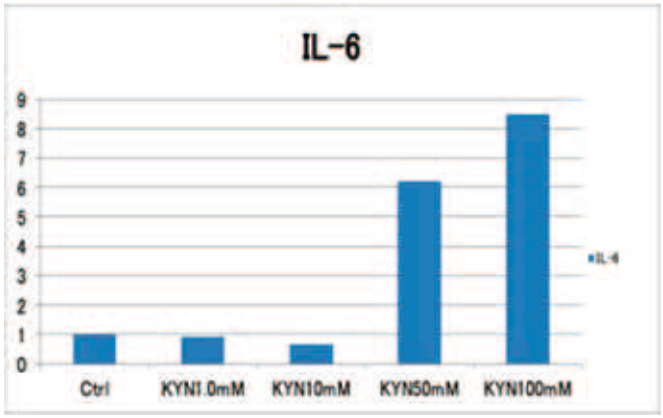


Figure2

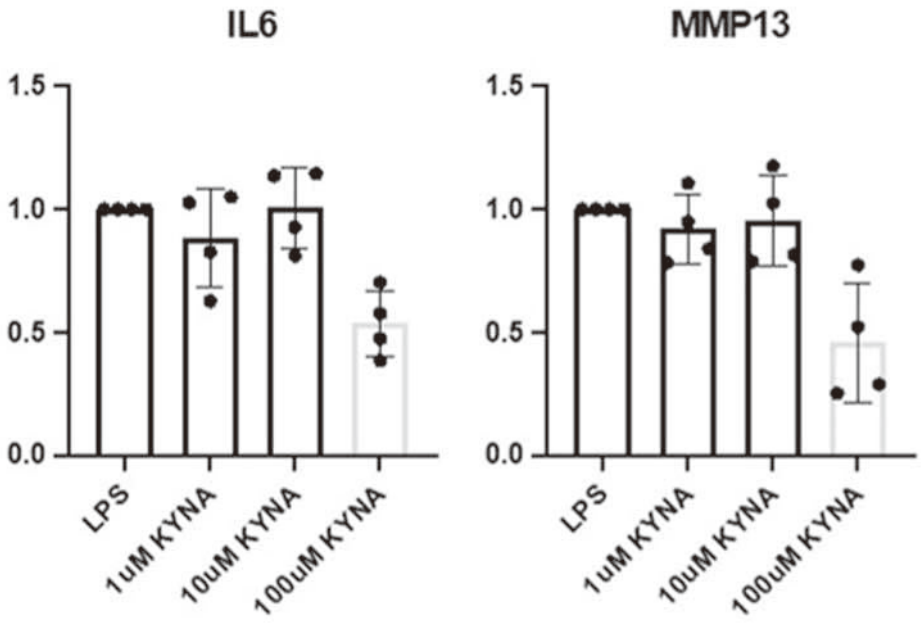
A



B


IL-6
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
IL-6
Ctrl
KYN1.0mM
KYN10mM
KYN50mM
KYN100mM

C


IL6
MMP13
1.5
1.0
0.5
0.0
LPS
1uM KYNA
10uM KYNA
100uM KYNA

分担研究報告書

カネミ油症患者における末梢神経障害のパターンに関する文献的考察と他の中毒性疾患による神経障害との差異の研究

研究分担者　　緒方　英紀　九州大学病院　脳神経内科　助教

研究要旨　文献的検討により、カネミ油症患者における末梢神経障害のパターンを確認した。電気生理学的に運動・感覚神経の障害が確認されるが、その障害の程度は軽度に留まるため、PCB 中毒症例の末梢神経障害の診断において、神経伝導検査の果たす役割は限定的と言える。近年では、Aβ線維、Aδ線維、C 線維の知覚機能をそれぞれ選択的に無侵襲で評価することが可能な電流知覚閾値検査が施行可能であり、それを用いて PCB 中毒症例を評価することで、末梢神経障害のパターンをより詳細に評価できる可能性がある。

A．研究目的

カネミ油症症例では、四肢の感覚障害を来すことが知られているが、末梢神経障害の診断は患者の自覚症状を基になされていることが多い。本研究ではカネミ油症による末梢神経障害に関する文献的考察を進め、末梢神経障害のパターンを検索する。また様々な中毒性疾患により末梢神経障害が生じるが、カネミ油症による末梢神経症状との特徴、経時的変化の差異を後方視的な文献的検索により考察する。

B．研究方法

ハンドサーチにより PCB 中毒症例を対象に神経伝導検査を施行した文献を検索した。

発生頻度および曝露の機会の点からアクリルアミド、n-ヘキサン、有機リン化合物を挙げ、各有機物により発症する中毒性ニューロパチーの特徴を調査した。

（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

検索の結果、1978 年に起こった台湾油症の PCB 中毒患者を対象とし、1980 年と 1982 年に縦断的に調査を行った研究論文を入手した[1]。臨床的なニューロパチーの頻度および神経伝導検査異常の詳細が記述されており、四肢遠位部の異常感覚については初回の調査で 60.7%に認め、2 年後に 53.6%に認めた。四肢遠位部の感覚鈍麻は初回の調査で 35.7%に認め、2 年後は 17.5%に留まった。腱反射低下は初回の調査で 17.9%、2 年後に 21.4%に認めた。一方で筋疲労や筋力低下は初回調査時より認めなかった。神経伝導検査では、運動神経は尺骨神経・脛骨神経が、感覚神経は橈骨神経・腓腹神経が検査対象とされ、遠位潜時、神経伝導検査、誘発電位の振幅が評価された。結果、いずれの運動神経、感覚神経も健常対照と比較して遠位潜時の延長、神経伝導検査の低下を認めたが、その程度は軽度であった。経時的には脛骨神経の運動神経伝導検査と腓腹神経の感覚神経伝導検査は、経時的に有意に改善していた。

アクリルアミドは水処理剤や土壌凝固剤に用いられるポリアクリルアミド

の原料として使用される。ポリアクリルアミドは難水溶性で無害であるが、アクリルアミドモノマーは長期間の曝露により進行性の軸索障害をきたす。臨床的には運動感覚性ニューロパチーで、下肢から発症し、左右対称性、遠位優位の障害をきたす[2,3]。

かつて接着剤やシンナーの主成分であったn-ヘキサンは、その代謝産物2,5-ヘキサンジオンが強い神経毒性を有し軸索を障害する。Ranvier絞輪付近にニューロフィラメントが蓄積してミエリンを障害し、伝導遅延を惹起することにより、軸索変性と二次性脱髄が混在する臨床像を示す。病理学的にはニューロフィラメントの蓄積により腫大した軸索(giant axon)が観察される。慢性進行性に感覚運動性多発ニューロパチーの病像をとり、進行すると筋力低下や筋萎縮がみられる。曝露を中断してもしばしば数ヵ月は症状が進行する。運動障害を来す点がPCB中毒とは異なるパターンと考えられた[2]。

殺虫剤や殺鼠剤に使用される有機リン化合物の多くは、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬であり、急性中毒から救命しえたとしても1〜2週間後にニューロパチーを発症する[2]。病理的には脊髄、および末梢神経の軸索変性によるものと云われている。下肢を中心とした運動感覚障害を呈する[4]。

D．考察

他の有機物による中毒性ニューロパチーと比較してもPCBによる神経障害は臨床的には感覚障害が主体である。電気生理学的に運動・感覚神経両者の障害が確認されるが、その障害の程度は軽度に留まるため、PCB中毒症例の末梢神経障害の診断において、神経伝導検査の果たす役割は限定的と言える。近年では、Aβ線維、Aδ線維、C線維の知覚機能をそれぞれ選択的に無侵襲で評価することが可能な電流知覚閾値検査が開発されているため、これを用いることで、PCB中毒症例の末梢神経障害のパターンをより詳細に調査できる可能性がある。

E．結論

文献的検討により、カネミ油症患者における末梢神経障害のパターンを確認した。本研究を基に、PCB中毒症例に対する末梢神経障害に対する新たな評価法を模索していく。

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

（予定を含む。）
１．特許取得
なし
２．実用新案登録
なし
３．その他
特記事項なし

参考文献

1. Chia LG, Chu FL. A clinical and electrophysiological study of patients with polychlorinated biphenyl poisoning. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1985;48:894-901.
2. 神田 隆. 末梢神経障害: 解剖生理から診断,治療,リハビリテーションまで. 医学書院, 2022, 364-365.
3. Bin-Jumah M, Abdel-Fattah A-FM, Saied EM, et al. Acrylamide-induced peripheral neuropathy: manifestations, mechanisms, and potential treatment modalities. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021;28:13031-13046.

4. Lotti M, Moretto A.
Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. Toxicol Rev. 2005;24:37-49.

分担研究報告書

ダイオキシン類による気道傷害に対する肺サーファクタント蛋白(SP-D)の上皮保護作用の研究

研究分担者　岡本　勇　九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　教授
研究協力者　鈴木　邦裕　九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教
坪内　和哉　九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教

研究要旨　ヒトClub細胞株NCI-H441細胞に対してBenzo[a]pyrene(BaP)を投与すると、apoptosisや goblet cell differentiationを認める。これらの変化はヒトリコンビナント SP-D の投与により抑制されるため、油症肺傷害においてSP-Dの保護的役割が考察されるが、CYP1A1-ROS経路の抑制効果は認めなかった。そのため、他の機序が推測された。

A．研究目的

油症の主な原因物質と考えられる PCDFs をげっ歯類に経気道的に投与すると、電子顕微鏡にてClub細胞の壊死が認められると報告されている[1)]。油症患者における肺病変の主座はClub細胞を中心とした細気管支領域と考えられおり、Club細胞は肺においてArylhydrocarbon receptor(AhR)を発現している数少ない細胞のひとつであるため、ダイオキシン類のAhRを介しCYP1A1の経路を通じた細胞傷害作用から推測される病態生理とも合致する[2)3)]。これまで我々は、ダイオキシン類による肺傷害のメカニズムを解明するためにAhR-CYP1A1を介した油症動物実験モデルの作成を目指してきた[8)]。現在のところ、マウスの肺に経気管的にAhR作動性物質であるBenzo[a]pyren(BaP)を投与することにより[4)]、気道分泌物の増加を示すモデルを作成している。我々が着目している Club細胞は、肺サーファクタント蛋白などの肺の恒常性を維持する因子を産生している。肺サーファクタント蛋白は肺胞構造の維持のみならず肺の初期免疫に関わっており、細菌感染防御や免疫細胞の調節など、肺疾患において重要な役割を担っている。今回、我々は、ダイオキシン類による気道上皮傷害(Club 細胞傷害)におよび杯細胞への分化に対する肺サーファクタント蛋白(SP-D)に役割に着目して in vitro での研究を行った。

B．研究方法

Club細胞株：HCI-H441細胞をRoswell Park Memorial Institute(RPMI)培地(10% ウシ胎児血清、1% ストレプトマイシン/ペニシリン)を用いて、6well プレートに培養した。細胞への刺激には、DMSO で溶解した BaP10μM を用いた。ヒトリコンビナント SP-D 1μg/ml を同時投与して効果を解析した。

C．研究結果

前回の報告同様[9)]BaP を投与 24 時間後に解析を行った。RT-PCR により、CYP1A1 の発現を確認したところ、BaP 刺激により NHI-H441 細胞で CYP1A1 の遺伝子発現の上昇が確認されたが、リコンビナント SP-D を同時投与しても、CYP1A1 の抑制効果は認めなかった (図 1)。更に、ROS の産生を CellROX® Oxidative Stre

ss Reagent にて観察したところ、BaP 刺激により Reactive Oxygen Specie：ROS の産生が確認された。しかしながら、リコンビナント SP-D を同時投与による ROS の産生の抑制効果は認めなかった（図 2）。

D. 考察

これまでの文献や実験結果から[1)2)8)]、我々は、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ている。また、in vitro の実験で、BaP 刺激により、Club 細胞株（NCI-H441 細胞）の apoptosis 誘導や、MUC5AC の遺伝子発現亢進を認めたことから、油症患者において Club 細胞の細胞傷害や、goblet 細胞への分化による粘液産生亢進が、咳嗽や喀痰といった症状に関与していることを推測している。

以前の実験[9)]で、Club 細胞株（NCI-H441 細胞）に対して BaP による刺激を行うと、細胞質局在の AhR の核内移行は確認されており、また、CYP1A1 の遺伝子発現の亢進、ROS の産生亢進を認めることから、BaP 投与により、AhR-CYP1A1-ROS 経路が作用することは確認されている。

一方で、我々は、気道上皮傷害（クラブ細胞傷害）と免疫応答をつなぐ因子として、肺サーファクタント蛋白に着目しており、前述の、BaP 刺激により、Club 細胞株（NCI-H441 細胞）の apoptosis 誘導や、MUC5AC の遺伝子発現亢進をリコンビナント SP-D が抑制した結果を得ている。そのため、SP-D が、AhR-CYP1A1-ROS 経路を抑制すると仮説を立てて実験を行った。そのため、BaP による誘導タンパクで細胞障害を示す CYP1A1 のメッセンジャーRNA 発現レベル、その下流の誘導産物の ROS の産生レベルで解析を行った。しかしながら、SP-D による AhR-CYP1A1-ROS 経路の明らかな抑制効果は認めなかった。そのため、別の機序が働いている可能性について検討中である。具体的には、SP-D－Collectin receptor の経路などにも解析を進めていく方針である（図３）。

E. 結論

SP-D は BaP 刺激による club 細胞株の apoptosis や goblet cell differentiation を抑制するが、AhR-CYP1A1-ROS は抑制せず、他の機序を介した作用が示唆された。

F. 研究発表

第 57 回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会
令和４年（2022 年）１月 15 日
ヒト Club 細胞株（NCI-H441 細胞）を用いた多環芳香族炭化水素に対する Surfactant protein D（SP-D）の保護作用の検討 秦 兼太朗，鈴木 邦裕，柳原 豊史，濵田 直樹

第 58 回 日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会
令和４年（2022 年）９月 24 日
多環芳香族炭化水素による気道粘液産生亢進に対する肺サーファクタント蛋白の保護作用の検討 秦 兼太朗，坪内 和哉，衛藤 大祐，安藤 裕之，柳原 豊史，鈴木 邦裕，岡本 勇

G. 知的財産権の出願・登録状況

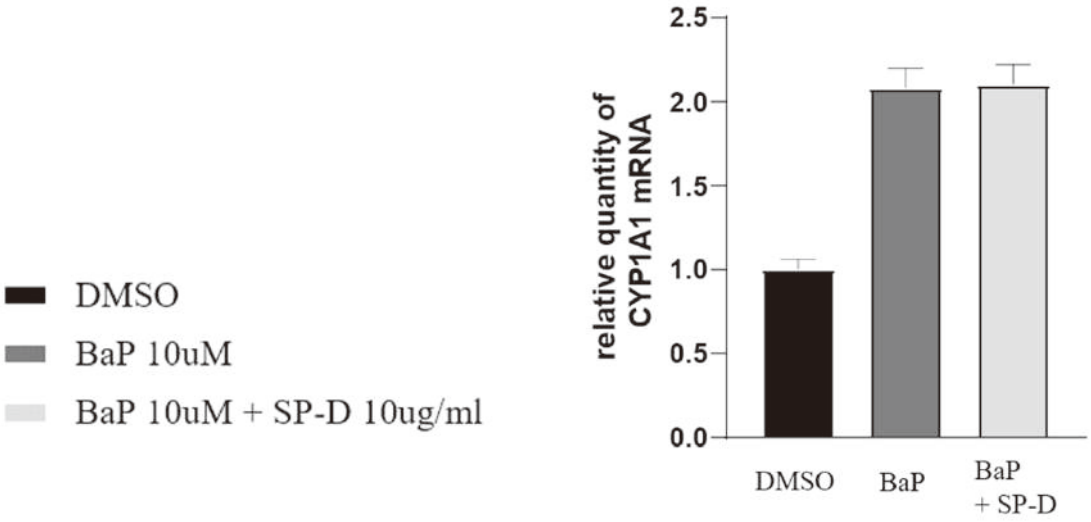
なし

H. 参考文献

1)中西洋一、他、(1985). 油症における呼吸器系ならびに免疫系の障害一経過ならびに発症機序について.福岡医誌. 1985;76:196-203
2)Podechard N, et al. Interleukin-8 Induction by the environmental

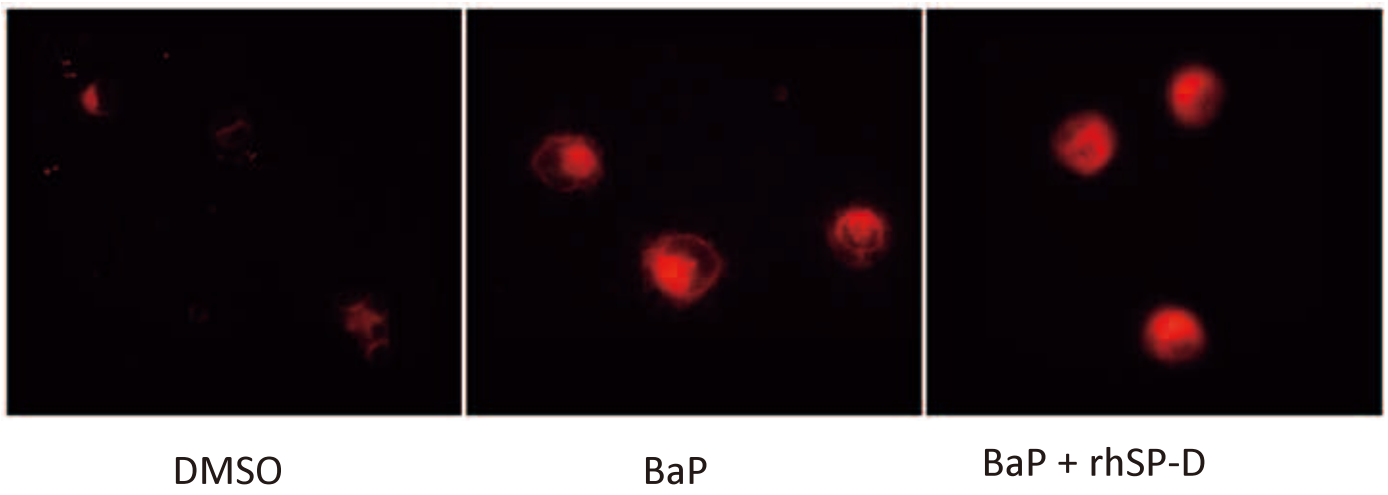
Contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. Toxicol Lett. 2008;177(2):130-7
3) Wong PS, et al. Aryl hydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells
and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010;42(2):210-7.
4) N’Diaye M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. J Biol Chem. 2006:281(29): 19906-15.
5) Nishikiori et al. Distinct compartmentalization of SP-A and SP-D in the vasculature and lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. BMC Pulmonary Medicine 2014, 14:196
6) 中西洋一、他、(2014). 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究「油症患者における血中 Surfactant protein に関する検討」、平成 25 年度 分担者報告書
7) Knudsen L et al. Truncated recombinant human SP-D attenuates emphysema and type II cell changes in SP-D deficient mice. Respir Res 8: 70
8) 中西洋一、他、(2017). 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「ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルにおける肺サーファクタント蛋白に関する検討」、平成 29 年度 分担者報告書
9) 濵田直樹、他、(2022). 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「ダイオキシン類による気道上皮傷害における肺サーファクタント蛋白に関する検討」、令和 3 年度年度 分担者報告書

図1. Club細胞株でのCYP1A1のRT-PCR



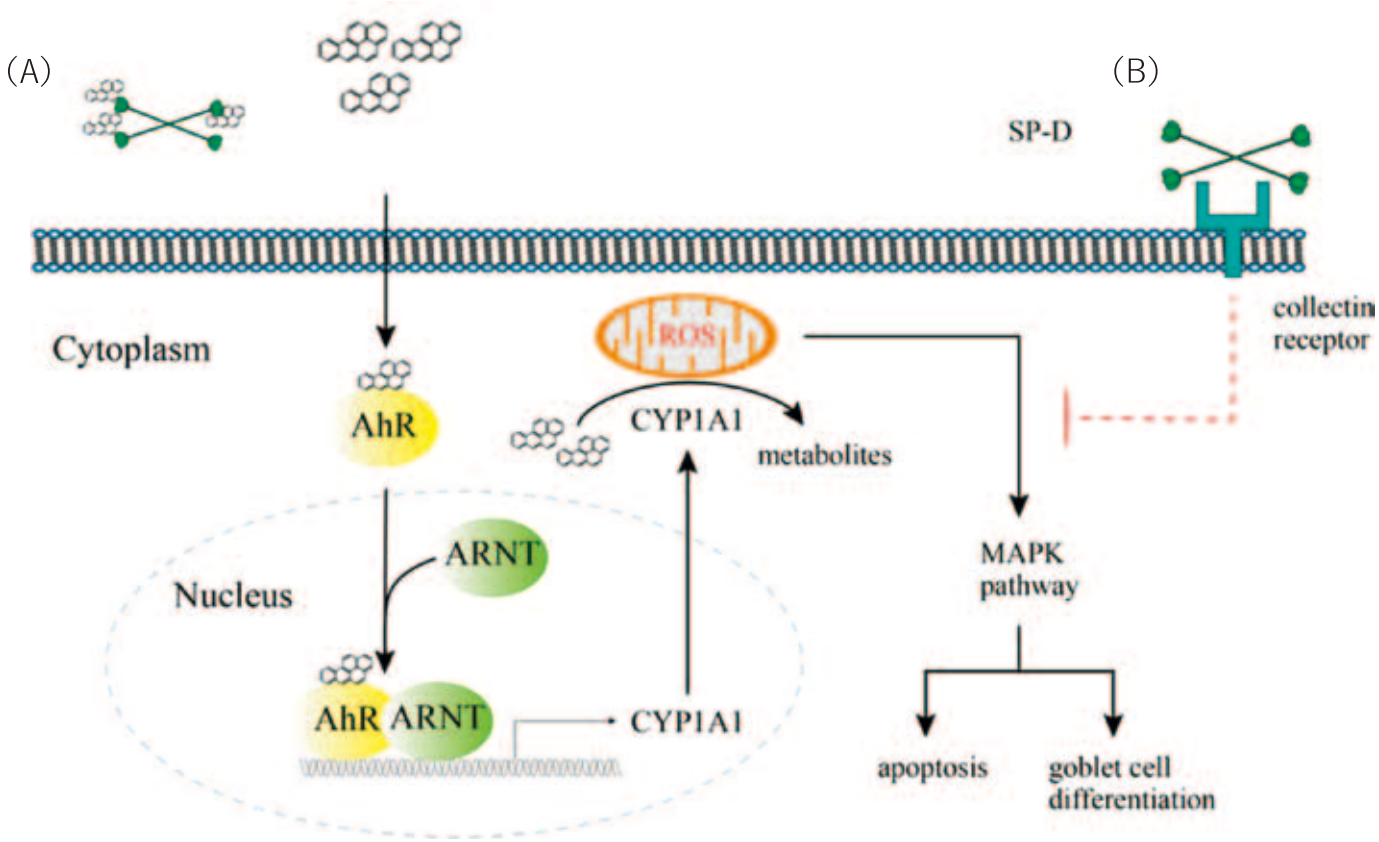
NCI-H441細胞において、BaP刺激により、CYP1A1の誘導が確認されたが、rhSP-Dによる抑制効果は認めなかった。

図2. Club細胞株でのROSの測定



NCI-H441細胞において、BaP刺激により、ROSの誘導が確認されたが、rhSP-Dによる抑制効果は認めなかった。

図3. 仮説図



当初の仮説では、SP-Dによるダイオキシン類のArylhydrocarbon receptor(AhR)への結合阻害などによりるAhR-CYP1A1-ROS経路の抑制を想定していたが（A）、
しかしなが、BaPによる代替検討では、同経路の明らかな抑制効果は認めなかった。
SP-D-Collectin receptorの経路などの別の機序について検討中である（B）。

分担研究報告書

行動量計と分子生物学的手法を用いたベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの中枢神経系での効果検討

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　　療法人社団温故会 直方中村病院　　病院長

研究要旨　本研究では、ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果とその際の中枢神経内の変化を行動量計と分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、コーンオイル投与群（Corn-DW）に対し、ベンゾピレン投与群（Ben-DW）で夜間の自発運動量の有意な低下がみられ、その低下はベンゾピレン投与後 3 mgと 10 mgのケイヒを投与したラット群（Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM）で有意に抑制された。2000Hz の電気刺激による感覚閾値の経時的変化検討では、Corn+DW 群に対し、Ben+DW 群で感覚閾値の有意な上昇がみられ、ケイヒ投与群で、その感覚閾値上昇の抑制がみられた。酸化ストレスに関する検討では、Corn-DW 群に対し Ben-DW 群で酸化ストレス状態になり、ケイヒの投与によりその状態の改善がみられた。ベンゾピレンとケイヒの投与による中枢神経内の変化を検討するために L1～L5 の脊髄を取り出し CYP1A1、MAG、MBP タンパク質を測定した。AHR の標的遺伝子である CYP1A1 に関しては、Ben-DW 群で Corn-DW 群に対し CYP1A1 タンパク質の有意な発現増加がみられたが、ケイヒを投与した群においては、その発現増加の有意な抑制がみられた。MAG、BMP タンパク質においては、Ben-DW 群で Corn-DW 群より若干の発現低下がみられたが有意差は認められなかった。また、ケイヒ投与群においても若干の MAG、BMP タンパク質の変化がみられたものの、有意差はみられなかった。これらの結果からベンゾピレン投与は末梢神経と中枢神経内で AHR を活性化させ、その毒性により神経系が影響を受けることで自発運動量が低下した可能性が示唆された。その作用はケイヒの投与による抗酸化作用と AHR 活性化阻害作用で毒性が抑制されたことにより運動量の低下が改善したものと考えられる。しかし、ベンゾピレンによるラットの行動量低下と中枢神経内脱髄（脱ミエリン）との関連性については未だ明らかではなく、今後更なる検討が必要である。

A．研究目的

ダイオキシン類化合物による複合中毒であるカネミ油症事件は、発生からおおよそ 50 年の年月が経過した現在においても様々な後遺症が多く報告されている 1)。特に、一部の患者では末梢の感覚鈍麻やしびれ感、自律神経失調症等の末梢神経障害および中枢神経障害等が報告されているが、その理由については不明な部分が多い 2-4)。油症の急性期には、全身倦怠感、食欲不振、体重減少、頭重感といった全身症状が見られることが報告されている。特に全身倦怠感、頭痛、手足のしびれといった自覚症状は、未だに 50%の患者さんに認められ、これらの症状はダイオキシン類が末梢神経系に限らず中枢神経系にも何らかの影響を与える可能性を示唆している。ダイオキシン類は、芳香族炭化水素受容体（Arylhydrocarbon receptor、以下 AHR）を介してその毒性を発揮させることと様々な植物成分や生薬が AHR の活性を抑制させることが Uchi ら 6)により報告されている。特に、生薬の一つであるケイヒは、抗酸化作用と AHR 活性化の阻害作用があり、ダイオキシン類の中毒症状を改善させる可能性が報告されている 5)。近年、私たちが行った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、ベンゾピレンに暴露されたラットの末梢のしびれ感等に関係が有るとされる

Aβ神経線維の伝導速度が低下していることが確認された 5)。これらの行動学的・電気生理学的動物実験による結果は、ダイオキシン類が末梢神経系に明らかに影響を与えることを示したものの、中枢神経系に与える影響については未だ明らかでないのが現状である。従って、本研究では、24 時間行動評価ができる自発運動量計を用いた行動学的評価法と分子生物学的手法を用いた脊髄神経内の変化を検討することでベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を検討した。

B．研究方法

5 週齢の Wistar 系雄性ラット(SLC㈱、静岡)を用いて、コーンオイル 2 週間連続投与後蒸留水投与群 (Corn-DW)、ベンゾピレン 2 週間連続投与後蒸留水投与群 (Ben-DW)、ベンゾピレン 2 週間連続投与後ケイヒ投与 (Ben-1 mg CNM と Ben-3 mg CNM) 群に分けた。コーンオイル投与群にはコーンオイルを、ベンゾピレン投与群には 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コーンオイル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 と 10mg/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。時間的経過による行動の変化は、小型運動量計であるナノタグ (キッセイコムテック株式会社、nano tag) を使用した。3%イソフルランを使用し深麻酔下で背中側の毛を剃った後、除毛部位の皮膚を一部切開し、皮膚と筋肉の間にナノタグを挿入した後、手術用の糸を用いて筋肉に固定した。切開した皮膚は手術用の糸にて縫合し、ヨード液で傷部位の消毒を行った。自発運動量は夜行性であるラットの習性を利用し、行動量が多い夜の時間帯の行動変化を測定できる。本実験では昼夜の自発運動量変化を比較検討した。測定時間は、20 時から翌日の 20 時までの 24 時間とし、週 1 回計測した。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。周波数は、末梢のしびれ感と関係する Aβ線維の刺激が可能性である 2000Hz の正弦波電機刺激のみを利用し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。測定はコーンオイル、ベンゾピレン投与前と最終日だけ行った。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、心臓から採血後安楽死を誘導した。その後、L1～L5 の脊髄標本を採集し、-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

時間的経過による自発運動量の変化を、ナノタグを用いてベンゾピレンの投与前、投与 2 週間後、その後の蒸留水又はケイヒの連続4週間投与まで1週間毎に測定を行った。その結果、コーンオイル 2 週間連続投与後蒸留水投与群（Corn-DW）に対し、ベンゾピレン 2 週間投与後蒸留水投与群（Ben-DW)で有意な夜の自発運動量の低下がみられた。また、ベンゾピレンを 2 週間投与後からケイヒを投与した（Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM)群については自発運動量の低下の抑制が認められた。しかし、昼の自発運動量については各群間で有意な変化は認められなかった（Fig.1)。

ベンゾピレンの経口投与後、電気刺激による感覚閾値の経時的変化を小動物用電気刺激装置で測定した。その結果、2000Hz の電気刺激周波数による感覚閾値変化においては、Corn+DW 群に対し、Ben+DW 群で感覚閾値の有意な上昇がみられ、ケイヒ投与群で、その感覚閾値上昇の抑制がみられた（Fig.2)。

自発運動量の変化と酸化ストレスの関係を明らかにするために、酸化ストレス度に対する影響を検討した。Corn-DW 群に対し、Ben-DW 群で酸化ストレスの有意な上昇がみられ、その上昇は Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM 群で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.3A)。抗酸化力に関しては、Corn-DW 群に対し、Ben-DW 群で抗酸化力低下がみられたが、Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM 群では、Ben 群に対し、抗酸化力の上昇傾向又は有意な上昇が認められた（Fig.3B)。これらの結果から酸化ストレス度を計算した結果が Fig.3C 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-DW 群で Corn-DW 群に対し、酸化ストレス状態であり、Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM 群では Ben-DW 群に対し、有意な酸化ストレス状態の改善が見られた。

ベンゾピレンとケイヒの投与による自発運動量の変化や酸化ストレス度の変化及び中枢神経内の変化の関連性を検討するために L1～L5 の脊髄を取り出し、AHR の活性を測定するために CYP1A1 タンパク質（Fig.4A)、中枢神経内の脱髄と自発運動量変化の関係を検討するために MAG（Fig.4B)、MBP（Fig.4C）タンパク質を測定した。AHR の標的遺伝子である CYP1A1 に関しては、Ben-DW 群で Corn-DW 群に対し CYP1A1 タンパク質の有意な発現増加がみられたが、ケイヒを投与した Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM 群においては、発現増加の有意な抑制がみられた。MAG、BMP タンパク質においては、Ben-DW 群で Corn-DW 群より若干の発現低下がみられたが有意差は認められなかった。また、Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM 群においても若干の MAG、BMP タンパク質の変化がみられたものの、有意差はみられなかった。

D．考察

本実験では、ダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを投与したラットに対するケイヒの効果を、自発運動量計を用いた行動学的評価法と中枢神経内のタンパク質の変化を分子生物学的手法で比較検討し、動物の行動変化と中枢神経内の変化の関連性について検討を行った。自発運動量計を用いた行動学的評価法では、ベンゾピレン投与群（Ben-DW）でコーンオイル投与群（Corn-DW）に対し、夜間の自発運動量の有意な低下がみられたが、ケイヒ投与群でその低下が抑制された。古谷ら

４)によるとカネミ油症患者で感覚鈍麻や神経のしびれ感などの末梢神経障害および中枢神経障害が多いことが明らかになっている。末梢のしびれ感は、末梢神経の中でも Aβ線維の伝導速度緩徐化が関係していると考えられており、近年私たちのベンゾピレンを用いた研究の結果でもベンゾピレンの毒性による Aβ神経線維の伝導速度低下が確認されている 5)。また、ベンゾピレンを投与したラットでの閾値測定結果でも先行研究と同様、2000Hz の電気刺激で閾値の上昇がみられたことからダイオキシン類の毒性が Aβ線維の神経異常を起こし、感覚異常に影響を与えた可能性が考えられる。しかし、油症の急性期には、全身倦怠感、食欲不振、体重減少、頭重感といった全身症状がみられることが報告されており、特に全身倦怠感、頭痛、手足のしびれといった自覚症状は、50%の患者さんに認められており、これらの症状はダイオキシン類が末梢神経系に限らず中枢神経系にも何らかの影響を与える可能性を示唆している [2-4]。従って、坐骨神経と L1～L5 までの脊髄を取り出し分子生物学的手法を用いて自発運動量の変化や感覚閾値の上昇と AHR の活性化や脱ミエリンとの関係について末梢神経と中枢神経を用いて検討した。その結果、ベンゾピレン投与により末梢神経と中枢神経内の CYP1A1 タンパク質の発現増加がみられ、その増加はケイヒ投与群で抑制されたことが確認された。MAG タンパク質については、ベンゾピレン投与群の坐骨神経内のみ MAG タンパク質の発現低下がみられ、ケイヒ投与によりその発現低下が抑制されたが、脊髄神経内の MAG タンパク質と坐骨神経や脊髄内の MBP タンパク質 においては、タンパク質発現の若干の変化はみられたものの、有意差が無かった。中枢神経系の神経回路の多くは、神経軸索の周囲が髄鞘に覆われ、跳躍電動を行う有髄神経回路である。また、髄鞘は内部の軸索に対して栄養供給をする働きもあることから 12)、髄鞘は神経機能の恒常性維持に重要な役割を担う構造物と認識されている。種々の中枢神経疾患で病巣周囲に髄鞘の脱落が検出され、脱髄は症状の発症や悪化をもたらす現象と認識されている 12)。従って、油症でみられる全身倦怠感、頭痛、手足のしびれといった自覚症状は、ベンゾピレンによって引き起こされる Aβ神経線維の脱髄と同様に、ダイオキシン類によって中枢神経の脱髄が引き起こされた影響である可能性も考えられる。一方で末梢神経の脱髄疾患は、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疾患とされており、いずれの脱髄疾患も原因不明の疾患である 10,11)。本研究では、ベンゾピレンの毒性作用を CYP1A1 タンパク質で測定した結果、末梢と中枢神経の両側でその作用がみられ、末梢神経ではその毒性によって脱髄が引き起こされたことで神経の伝導速度が低下し、感覚閾値が上昇した可能性が考えられたが、中枢神経の脱髄に関する検討では各群間に差がみられなかったことから、中枢神経よりも末梢神経の方がベンゾピレンによる影響を受けやすいと考えられる。今回使用したナノタグを用いた行動実験の場合、ベンゾピレンの毒性による神経作用が自発運動量低下に影響を与えた可能性が考えられるが、その作用は中枢神経よりも末梢神経の異常による感覚障害が影響を与えた可能性が考えられた。また、本研究では、ベンゾピレン投与ラットに対する 3 mg・10 mg/kg ケイヒの効果を検討した。その結果、自発運動量低下改善、感覚閾値の上昇抑制、酸化ストレス度の改善、CYP1A1 の発現増加抑制、末梢神経内の MAG タンパク質の発現低下抑制傾向がみられた。ケイヒの主な成分であるシンナムアルデヒドは 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

酸化ストレス作用が強い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投与による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、ベンゾピレ投与により発生する 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可能性があると考えられる。

Ｅ．結論

本研究の結果から、ベンゾピレンの暴露による中毒の場合、末梢及び中枢神経の両側でその毒性が作用し感覚異常を起こした可能性（CYP1A1 の検討結果）が示唆された。しかし、その影響は中枢神経より末梢神経が受けやすいこと（MAG タンパク質の検討結果）が考えられる。また、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はダイオキシン類の暴露に効果的である可能性が示唆された。しかし、今回の研究でも中枢神経でのベンゾピレン等のダイオキシン類の作用を明確に調べることができなかった。今後は脳神経内での感覚と関連する部位までの分析を通して中枢神経での影響まで検討する必要があると考えられる。

引用文献

1) Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxin, and polychlorinated dibenzofura- ns as endocrine disrupters what we have learned from Yusho disease. Environ Res, 86(1):2-11, 2001.
2) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司：油症患者における神経学的所見. 福岡医誌, 60：462-463, 1969.
3) 岩下宏, 志田堅四郎, 増田義人：慢性油症患者における頭痛, 四肢異常感と血中 PCB. 福岡医誌, 68：139-144, 1977.
4) 古谷博和, 大八木保政, 山田猛, 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) Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, et al: Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. J Dermatol Sci, 85 (1): 36-43, 2017.
6) 申 敏哲, 吉村恵: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.
7) Philips T and Rothstein JD : Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. J Clin. Invest, 127：3271-3280, 2017.
8) Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, et al：Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. Physiol. Rev, 99 : 1381-1431, 2019.
9) 三井 良之, 楠 進:末梢神経の障害. 日本内科学会雑誌, 97(8) : 1771-1777, 2008.
10) 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.

Ｆ．研究発表

１．論文発表

小牧龍二, 行平崇, 福永貴之, 田中哲子, 申敏哲. ベンゾピレンの投与による感覚障害モデルラットに対する Vitamin B2 関連物質β-NMN の効果検討.

Journal of Kumamoto Health Science University. 20：01－10, 2023.

２．学会発表

申敏哲, 行平　崇, 小牧 龍二, 福永貴之. 自発運動量、感覚閾値を用いたベンゾピレン暴露ラットに対するケイヒの効果検討. 第 73 回西日本生理学会. 2022 年 10 月 28 日.

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

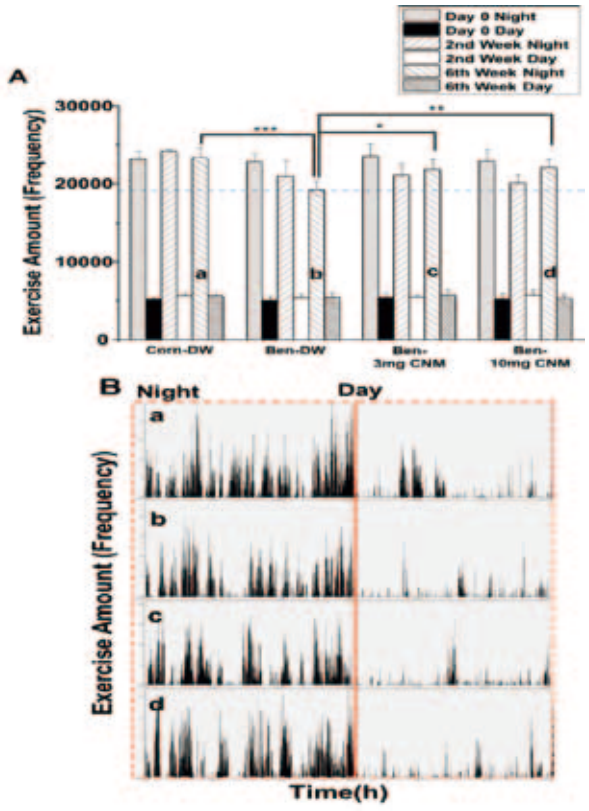
２．実用新案登録

なし

３．その他

なし

Fig 1. ベンゾピレとケイヒの投与がラットの自発運動量変化に及ぼす影響。



A, 時間的経過による自発運動量の変化. B 自発運動量の例.

Fig 2. ベンゾピレとケイヒの投与がラットの感覚閾値の変化に及ぼす影響。

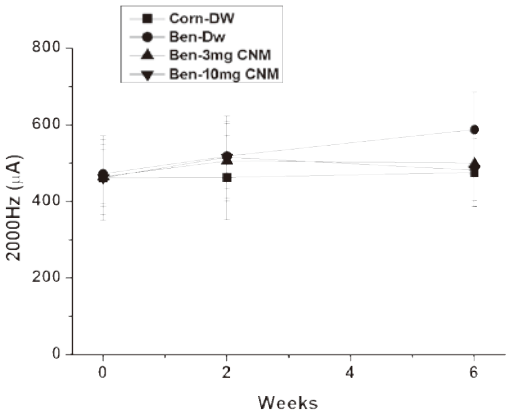
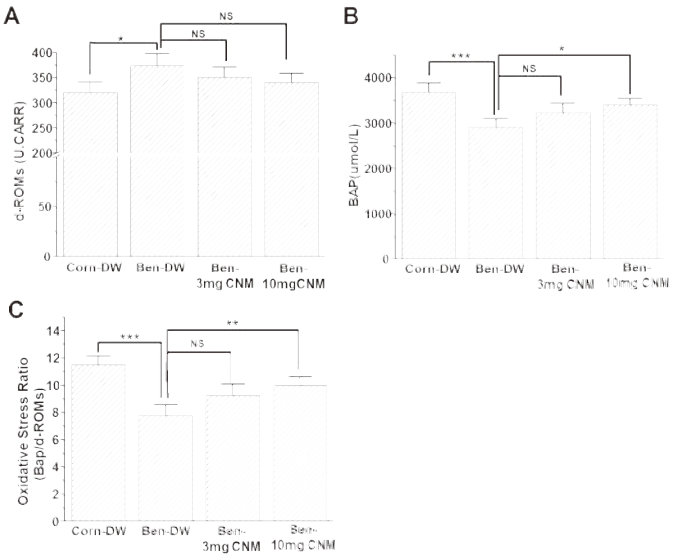
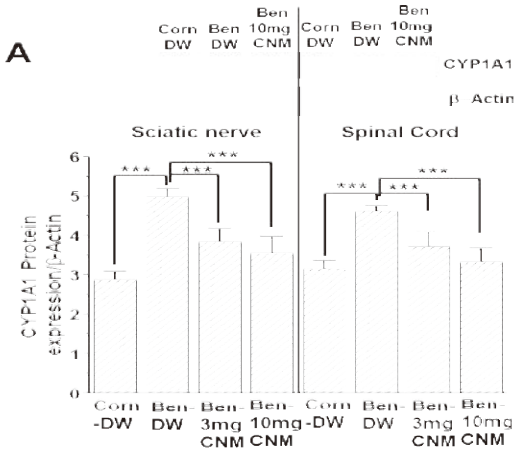


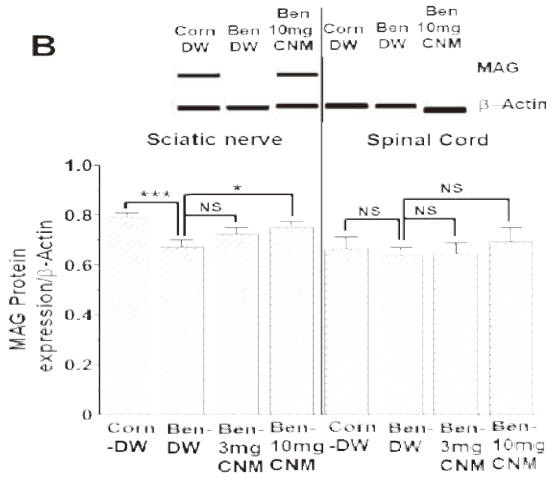
Fig 3. ベンゾピレとケイヒの投与がラットの酸化ストレス度に及ぼす影響。

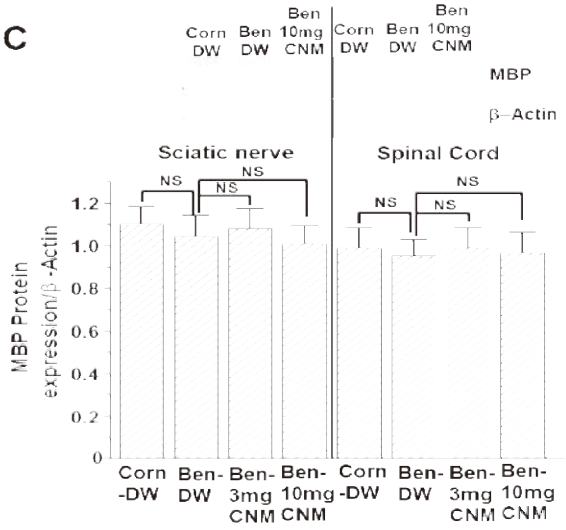


A, 酸化ストレス. B, 抗酸化力. C, 酸化ストレス度.

Fig 4. ベンゾピレとケイヒの投与がラットの CYP1A1、MAG、MBP タンパク質の発現にに及ぼす影響。




B
Corn DW
Ben DW
Ben 10mg CNM
Corn DW
Ben DW
Ben 10mg CNM
MAG
β-Actin
Sciatic nerve
Spinal Cord
MAG Protein expression/β-Actin
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
***
*
NS
NS
NS
NS
Corn -DW
Ben- DW
Ben- 3mg CNM
Ben- 10mg CNM
Corn -DW
Ben- DW
Ben- 3mg CNM
Ben- 10mg CNM


C
Corn DW
Ben DW
Ben 10mg CNM
Corn DW
Ben DW
Ben 10mg CNM
MBP
β-Actin
Sciatic nerve
Spinal Cord
MBP Protein expression/β -Actin
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
NS
NS
NS
NS
NS
NS
Corn -DW
Ben- DW
Ben- 3mg CNM
Ben- 10mg CNM
Corn -DW
Ben- DW
Ben- 3mg CNM
Ben- 10mg CNM

分担研究報告書

Ahリガンドが腸上皮に与える影響

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　ダイオキシン類はAh受容体を介し、様々な生理活性を持つことが油症の一因として知られている。Ah受容体シグナルによる過剰な活性酸素が中心的な役割を果たすとされている。油症の症状として消化器症状が生じるため、Ah受容体が腸上皮にどのような影響を及ぼすかについて検討した。腸上皮細胞におけるAh受容体を刺激したところ転写因子のNrf2の核内移行を認めた。またAh受容体の活性化によりNrf2の転写産物であるHO-1などの抗酸化遺伝子の上昇を認めた。H2O2による細胞死には差を認めなかったが、細胞内の活性酸素の産生が著明に低下していることが示され、Ah受容体の活性酸素に対する生理的な重要性が明らかとなった。

A 研究目的

油症に関連する症状に腹痛や下痢などの消化器症状も含まれている。油症患者では約半数の患者に消化器症状が生じ、長期経過した後においても約３分の１の患者に症状が持続すると報告されている。(1)。油症において消化器症状の出現するメカニズムはまだ不明であるが、油症の全体的なメカニズムとして活性酸素の亢進が示されている。ダイオキシン類は生体内に取り込まれたのち芳香族炭化水素受容体(Ah)受容体に結合する。刺激を受けたAh受容体はARNTと２量体を形成し核内へ移行することにより転写活性を有しCYP1A2やCYP1B1などの転写産物が生成される。ダイオキシン類はその他の自然界のリガンドと比べると、分解を受けにくいため、Ah受容体と強固に結合する。その結果Ah受容体シグナルが強く入ることにより大量の活性酸素が作られ、毒性が発揮されると考えられている(2)。

活性酸素に対する生体応答は様々であるが、NRF2 は中心的な役割補果たす転写因子であり、HO-1 などの転写により酸化ストレスに防御的に働くことが知られている(3)。そこで今回、腸上皮細胞における Ah 受容体の活性化による活性酸素とその防御反応について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

Caco2 細胞を培養し腸上皮モデルとして使用した。CaCo2 細胞を Ah リガンドで刺激し 6 時間後の細胞を回収した。N-PER(Thermo Fischer Science) により核分画を抽出し anti-NRF2 antibody (ab137550; Abcam)によるウエスタンブロットで NRF2 の核移行を評価した。12 時間後の mRNA を TB Green Premix EX Taqtm II (Takara Bio)で祖久江地下。Real-timePCR で評価した。24 時間後の H2O2 添加し 48 時間後に細胞死について viable cell counting(Nacalai Tesqu)を用いて評価した。

ROS の産生を DCFH-DA(Dojindo)で測定した。

C. 研究結果

まず活性酸素ストレスに対してNrF2は中心的な役割を果たすため Ah リガンド刺激による Nrf2 の核移行をウエスタンブロットで評価したところ、核移行がみられた(Fig. 1)。Nrf2の転写活性を探索するために転写産物と

して代表的なHO-1のmRNAレベルを調べた。腸上皮においてHO-1の増加がみられた(Fig. 2). 酸化ストレスに防御力が増加していると予想されH2O2刺激による細胞死を調査したが、有意な差は見出されなかった(Fig. 3)。一方、細胞内のROSについてはAhリガンドにより抑制され、栄養飢餓におるROS産生亢進時には顕著であることが示唆された(Fig.4)

D. 考察

腸上皮における Ah 受容体の活性化により細胞内ROSを軽減することが示された。そのメカニズムについて Nrf2 の核内移行と転写亢進が示された。

Ah 受容体は様々な臓器に存在し腸管においては腸管の自然リンパ球を誘導しリンパ濾胞形成に重要であることが知られている(4)。またこのリンパ球は IL-22 産生を介して腸上皮保護に働く。一方、腸上皮における Ah 受容体の欠損は Goblet 細胞の減少やムチン産生の低下を生じる(5)。そのためバリア機構の低下による細菌の侵入や引き続く高サイトカイン血症や慢性腸炎を生じる(5)。すなわち生理的な Ah 受容体は腸管のバリア機構を高める方向に関与する。

本研究における Ah 受容体の活性化による ROS の低下は炎症などの条件下では腸管障害やバリア機構に保護的に働くと考えられる。このことは油症においては極めて過剰な Ah 受容体の活性化であり異なる働きを示すのであろう。生理的な Ah リガンドが腸管バリア保護に働く別の例としてはウロリチンや類似化合物でも示され(6)、Nrf2 による転写産物によるタイトジャンクションの増加が報告されている。ROSはタイトジャンクションを傷害することも知られており、本研究で示した ROS の抑制はタイトジャンクションを保護することで腸管バリアに寄与するのかもしれない。油症においても過剰な Ah 受容体の活性化が腸管バリアに影響を与え消化器症状をきたすのかは今後検討する必要がある。

E. 結論

腸上皮において Ah 受容体の活性化は活性酸素の制御に重要であることを示した。

参考文献

(1)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.

(2)古江増隆, 石井祐次, 月森清己, 辻学 Aryl hydrocarbon receptor からみた油症の病態と治療開発 2020. 福岡医誌 112(2):61-89.2021

(3) Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. Cell Mol Life Sci. 2016 Sep;73(17):3221-47.

(4)Elina A Kiss 1, Cedric Vonarbourg, Stefanie Kopfmann, Elias Hobeika, Daniela Finke, Charlotte Esser, Andreas Diefenbach Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. Science. 2011 Dec 16;334(6062):1561-5.

(5)Amina Metidji, Sara Omenetti, Stefania

Crotta, Ying Li, Emma Nye, Ellie Ross, Vivian Li, Muralidhara R Maradana, Chris Schiering, Brigitta Stockinger. The Environmental Sensor AHR Protects from Inflammatory Damage by Maintaining Intestinal Stem Cell Homeostasis and Barrier Integrity. Immunity. 2018 Aug 21;49(2):353-362.e5.

(6)Rajbir Singh, Sandeep Chandrashekharappa, Sobha R Bodduluri, Becca V Baby, Bindu Hegde, Niranjan G Kotla, Ankita A Hiwale, Taslimarif Saiyed, Paresh Patel, Matam Vijay-Kumar, Morgan G I Langille, Gavin M Douglas, Xi Cheng, Eric C Rouchka, Sabine J Waigel, Gerald W Dryden, Houda Alatassi, Huang-Ge Zhang, Bodduluri Haribabu, Praveen K Vemula, Venkatakrishna R Jala. Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway. Nat Commun. 2019 Jan 9;10(1):89.

Fig1

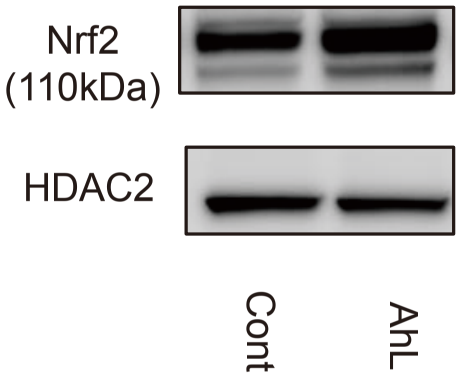


Fig.1 :AhリガンドによるNrf2の核移行を示す。
HDAC2は核分画のコントロール。

Fig2

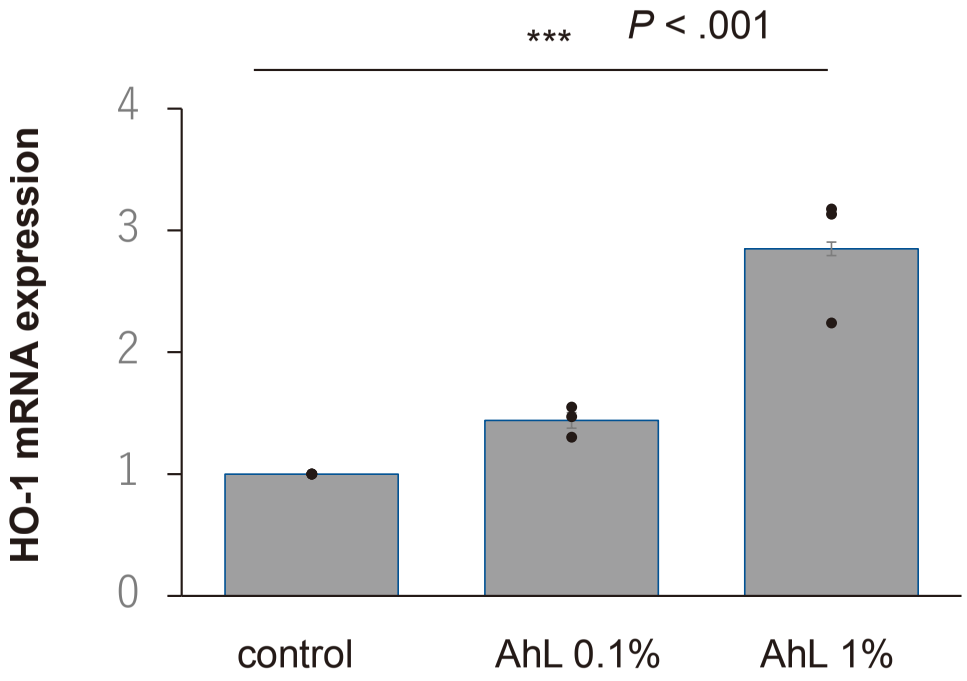


Fig.2 :AhリガンドによるNrf2の転写産物であるHO-1のmRNAが増加することを示す。

Fig.4: AhLによるROS産生の抑制を示す。

Fig.3: H2O2による細胞死に対するAhLの影響を示す。

分担研究報告書

2,4,6-三塩素置換型PCB119の動物肝ミクロゾーム(Ms)による代謝研究

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

本年度は、2,4,6-三塩素置換型 PCB (246 型 PCB)の１つである 2,4,6,3',4'-pentachlorobiphenyl (PCB119)につき、ラットおよびヒト肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べた。ラット肝 Ms は、未処理、phenobarbital (PB)前処理および 3-methylcholanthrene (MC)前処理ラット肝より調製した。37℃で 60 分間反応したところ、PB 前処理 Ms では、代謝物が 1 種類（以下 M1 とする）生成されたが、未処理 Ms および MC 前処理 Ms では、代謝物の生成は全く見られなかった。ヒト肝 Ms では、M1 のみ生成された。そこで、GC-MS により M1（メチル化体）の分子量を調べた結果、354 であり、PCB119 より 30 大きいことが明らかになった。この結果から、M1 は一水酸化(OH)体であることが推定された。さらに、予想代謝物として 3-MeO-PCB119 を別途合成し比較したところ、分子量、マスフラグメンテーションおよび保持時間が完全に一致した。さらに、PCB119 の検量線を用いて M1 を定量したところ、その生成活性は、ラット肝 Ms で 1.57 nmol/hr/mg protein、一方、ヒト肝 Ms では 0.22 nmol/hr/mg protein であった。以上の結果から、PCB119 はラットおよびヒト肝において、比較的容易に 3-OH 体へと代謝されること、また、この生成には PB 誘導性で 3 位水酸化を触媒するラット CYP2B1 およびヒト CYP2B6 が強く関与することが示唆された。

A. 研究目的

PCB類のうち、ヒト組織中で高濃度残留しているものは、化学構造的に、2,4,5-三塩素置換あるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有している（以下、245型および2345型と略する）。Todakaらは、油症患者および健常者の血中PCB濃度を調べ、いずれの場合も 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)が多く残留すること、さらに、油症患者ではこれらが健常者の1.6～2.2倍多いことを報告した。

当研究室ではこれまでに、PCB180の異性体で、245型を246型に換えた化学構造のPCB182について、ラットおよびモルモット肝Msによる代謝を調べたところ、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、高残留性のPCB180に比べ、数10倍の高い活性でM1を生成することを明らかにした。さらに、PCB187の異性体で246型のPCB188についても検討し、PCB182と同様に比較的容易に3'-OH体へと代謝されることが明らかになった。実際、PCB182、PCB188、等の246型PCBはヒト組織からほとんど検出されていない。

これらの結果は、塩素数が6～7個の高塩素化PCBであっても、塩素置換位置が2,4,6位であれば、易代謝性になることを示している。本研究では、この点をさらに確かめるため、246型PCBの１つである2,3',4,4',6-五塩素化ビフェニル(PCB119)のラットおよびヒト肝Msによる代謝を調べた。

B. 研究方法

① PCB119 合成：3,4-dichloroaniline 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 42 mg で純度は 99.8% (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-PCB119 の合成：3,4-dichloroaniline および 2,4,6-trichloroanisole を合成原料とし、以下、PCB119 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 12 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）および 3-methylcho-lanthrene (MC)前処理群（20 mg/kg 体重 × 3 日間）のラットから、常法により調製した。④ ヒト肝 Ms：白人男性 20 名（47.9±29.0 歳）の pooled Ms を Corning 社から購入した。 ⑤ 肝 Ms による代謝：40 μM PCB119 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 あるいはヒト肝 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 分間インキュベート後、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-ECD（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、270℃；検出器温度、350℃。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℃ (1.5min) - 20℃/min - 230℃ (0.5min) - 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。（承認番号 動倫 2022-2）

C. 研究結果

代謝物の化学構造：PCB119を、NADPH存在下、好気的にラット肝Msとともに、37℃、60 分間反応した。Fig. 1に、GC-ECDにおける代謝物のクロマトグラムを示した。PB前処理Msでは、PCB119（保持時間4.14 min）に続き、1つの代謝物ピーク（以下M1とする）が保持時間6.48 minに検出されたが、未処理およびMC前処理MsではM1は全く生成されなかった。

次に、PB 前処理ラット肝 Ms により生成された M1（メチル誘導体）の分子量を GC-MS により測定した。Table 1 にその結果を示す。M1（メチル誘導体）は、分子量 354 を有しており、PCB119 の分子量より 30 大きいことから、水酸化（OH）体（メチル誘導体）であることが明らかになった。さらに、この結果を、別途合成した予想代謝物 3-MeO-PCB119 と比較したところ、M1（メチル化体）は、分子量、マスフラグメンテーションおよび GC における保持時間が、3-MeO-PCB119 と完全に一致した。これらの結果から、M1 は 3-OH 体であると決定された。

ラット肝 Ms の PCB119 代謝活性：PCB119 の検量線を用いて、M1 の定量を試みた。その結果、Table 2 に示すように、PB 前処理 Ms の M1 生成活性は、1.57 nmol/hr/mg protein であった。この値は、これまでに報告した 246 型 PCB と同様に高いものであり、PCB168 > PCB155 > PCB119 > PCB182 の順となった。

ヒト肝 Ms の PCB119 代謝活性：ヒト肝 Ms で

も、ラット肝 Ms と同様に、M1 が保持時間 6.48 min に検出された。その生成活性は、0.22 nmol/hr/mg protein であり、ラットの約 14%と低かった。

D. 考察

2006年の戸高らの報告では、健常者（福岡県）の血中PCB118濃度は、PCB153、PCB180、PCB138に次いで第４位であった。また、2004年の健常者（那珂川町）および2015年の健常者（久山町）ではPCB187/182が第4位に入り、PCB118は第5位のヒト血中での高濃度を示した。一方、油症患者においては、前述のPCB異性体はいずれも健常者の3～5倍と高濃度検出されるのに対し、PCB118は半減していることが報告されている。以前から、PCB118は、摂取したPCB類により誘導されたシトクロムP450(CYP)が代謝を促進し、その結果、体外に排泄されたものと考えられている。また、これまでに、ヒト血中に残存するPCB水酸化体のうち、4-OH-PCB107が3番目に高濃度で検出されているが、PCB118が親PCBであろうと考えられている。

今回の PCB119 は、245 型の PCB118 に対応する 246 型 PCB であり、PB 前処理ラット肝 Ms およびヒト肝 Ms により、容易に 3-OH 体に変換されることが明らかになった(Fig. 2)。また、この代謝には、PB 前処理で顕著に誘導されるラット CYP2B1 が関与することが示唆された。さらに、これまで報告した 246 型 PCB の代謝パターンと非常に似ていることから、ヒト CYP2B6 がこの代謝に強く関与していることが示唆された。なお、これらの CYP は、246 型 PCB に対し置換塩素数の多少にかかわらず、メタ位に対する強い水酸化活性を示すことが示唆された。

実際には、ヒト血中において、246 型 PCB はほとんど検出されないが、一連の研究から、いずれの 246 型 PCB も、245 型 PCB に比べ、非常に代謝されやすいことが明らかになってきている。

E. 結論

PCB119は、他の246型PCB と同様に、ラット肝ではPB誘導性のCYP2B1により、一方、ヒト肝ではCYP2B6により、比較的容易に、3-OH体へと代謝されることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Y. Fujii, K. H. Harada, Y. Ito, M. Yoshitake, C. Matsunobu, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, A. Koizumi, and K. Haraguchi, Profiles and determinants of dicofol, endosulfans, mirex, and toxaphenes in breast milk samples from 10 prefectures in Japan. Chemosphere, 311 (2023) 137002.

2) O. Kimura, C. Ohta, N. Koga, Y. Kato, K. Haraguchi, and T. Endo, Effect of 5,7-dimethoxyflavone on the efflux transporter expression and transport function in Caco-2 cells. J. Pharma. Pharmacol., 9(1), 9 (2022).

2. 学会発表

1) 7,8,3',4'-Tetramethoxyflavone (7834-TMF) 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. 太田千穂、緒方瞳、加藤善久、木村 治、藤井由希子、原口浩一、古賀信幸、第 76 回日本栄養・食糧学会大会、2022 年 6 月 10～12 日、武庫川女子大学（神戸）p281.
2) 5,6,7-Trimethoxyflavone (567-TMF)の動物肝およびヒト肝ミクロゾームによる代謝とその代謝物の抗酸化活性. 出口昌代、太田千穂、古賀信幸（中村学園大院・栄養）、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部 2022 年度合同支部大会、2022 年 11 月 19、20 日、鹿児島大学（鹿児島）
3) ラット肝およびヒト肝ミクロゾームによる sinensetin の代謝 －5 位脱メチル化体の生成－. 杉村果奈、古賀信幸、太田千穂（中村学園大院・栄養）、日本栄養・

食糧学会九州・沖縄支部合同支部大会、2022 年 11 月 19、20 日、鹿児島大学（鹿児島）

4) 2,4,6-三塩素置換 PCB 異性体 PCB168 のラット肝ミクロゾームによる代謝. 太田千穂、加藤善久、藤井由希子、原口浩一、木村 治、古賀信幸、日本薬学会第 143 年会、令和 5 年 3 月 25～28 日、北海道大学（札幌）

5) Caco-2 細胞における排出トランスポーターの発現と輸送能に及ぼす 5,7-ジメトキシフラボンの影響. 木村 治、町田拓自、柳 圭鉉、足達令昴、太田千穂、古賀信幸、加藤善久、藤井由希子、原口浩一、飯塚健治、遠藤 泰、日本薬学会第 143 年会、令和 5 年 3 月 25～28 日、北海道大学（札幌）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

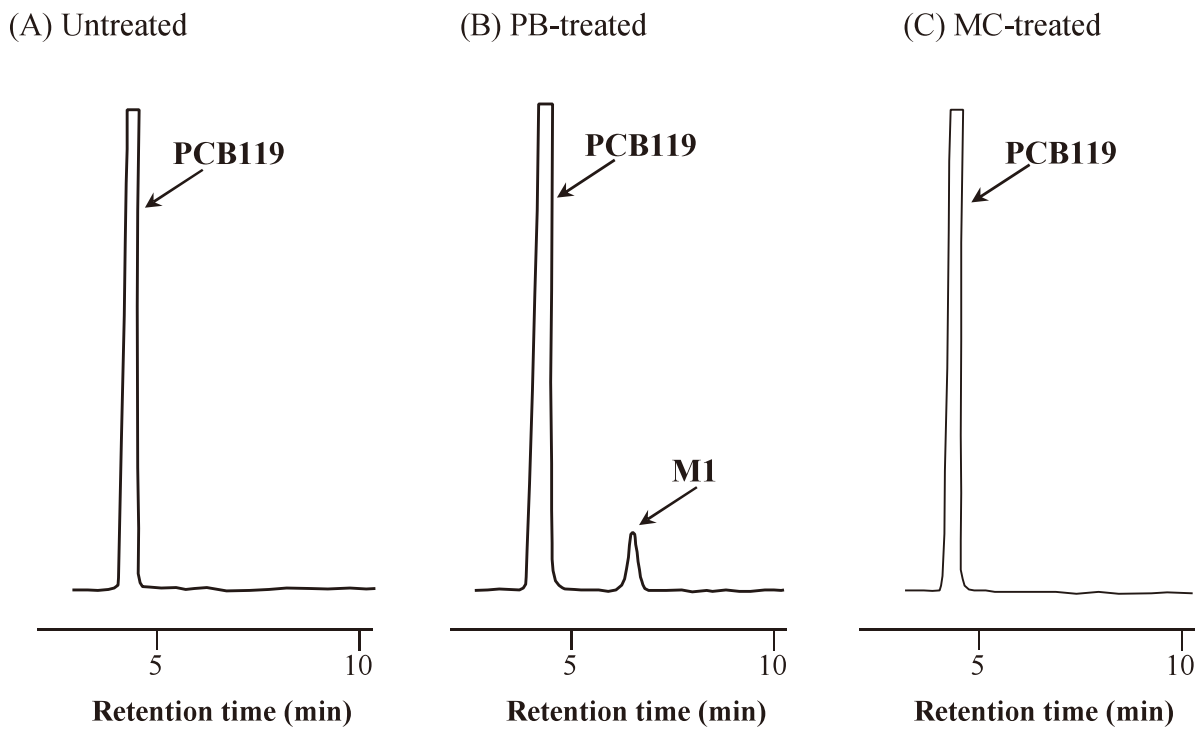


Fig. 1 GC-ECD chromatograms of PCB119 and its metabolite M1 (the methylated derivative) formed by liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated rats

Table 1 Mass spectral data and retention times of PCB119 and the methylated derivative of its metabolite M1

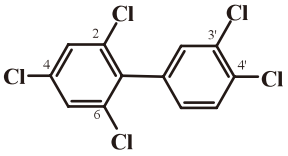
Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)					Retention time (min) in GC-MS
		$[M^+]$	$[M^+-15]$	$[M^+-43]$	$[M^+-50]$	$[M^+-70]$	
PCB119	324	100	-	-	-	79	12.20
M1 (methylated)	354	100	35	45	10	-	14.01
3-MeO-PCB119	354	100	37	45	10	-	14.01

-, not detected.

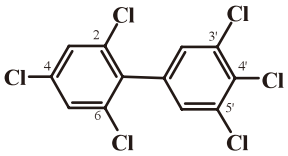
Table 2 Comparison of metabolic pattern of PCB119 and other 246-type PCB congeners in liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated rats

PCB	Metabolite	M1 formed (nmol/hr/mg protein)		
		Untreated	PB-treated	MC-treated
PCB119	M1 (3-OH)	N.D.	1.57 ± 0.23	N.D.
PCB168	M1 (3-OH)	N.D.	9.58 ± 2.24	N.D.
PCB155	M1 (3-OH)	N.D.	4.66 ± 0.20	N.D.
PCB182	M1 (3'-OH)	B.D.	1.37 ± 0.16	N.D.

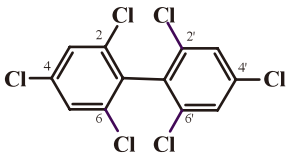
N.D., not detected. B.D., below detection limit.
Each value represents the mean ± S.D. of four rats.



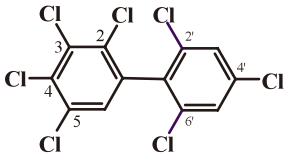
PCB119



PCB168



PCB155



PCB182

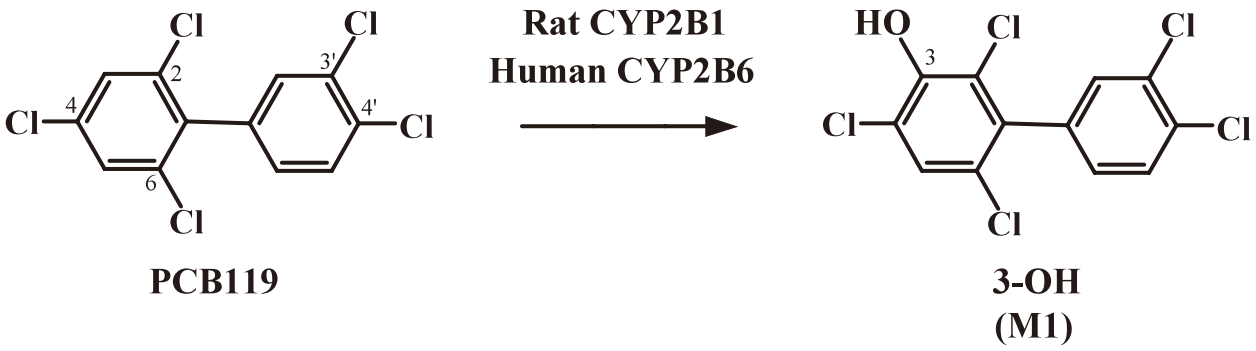


Fig. 2 Postulated metabolic pathway of PCB119 in rat and human liver

分担研究報告書

皮膚の慢性炎症・色素沈着におけるエンドセリン-1 と AHR の相互作用

研究分担者　　中原　剛士　九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野　教授

研究要旨　紫外線照射により、メラノサイトからのメラニン関連遺伝子の増加がみられたが、その増加に対する様々な AHR リガンドの影響は見られなかった。

A．研究目的

ケラチノサイトから産生されるエンドセリン-1 (ET-1)は、メラノサイトに作用してメラニン産生を増加させることで色素沈着を引き起こす。我々はこれまでに、AHR リガンドが皮膚の色素沈着に関わっている可能性を考え、紫外線照射によるケラチノサイトから ET-1 産生に対する様々な AHR リガンドの影響を検討したが、AHR リガンドはケラチノサイトからの ET-1 産生に影響を与えなかった。そこで、本研究では、様々な AHR アゴニストによる刺激が紫外線によるメラノサイトからのメラニン産生と引き続く皮膚の色素沈着にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的に研究を行った。

B．研究方法

ヒトメラノサイト (HEM) に紫外線 UV (20mJ/cm2)を照射し、RT-qPCR にて TYR・Mitf・DCT・TRP-1 の mRNA 発現量を確認した。同時に、様々な AHR リガンド (FICZ (1μM)・B[a]P (10μM)・Glyteer (10-4)・tapinarof (5μM)) をそれぞれ添加して 24 時間刺激を行い、同様に RT-qPCR にて TYR・Mitf・DCT・TRP-1 の mRNA 発現量への影響を検討した。

（倫理面への配慮）

該当せず

C．研究結果

UV 照射は、メラノサイトにおけるメラニン関連遺伝子 (TYR・Mitf・DCT・TRP-1) の発現を増加させた。しかし、様々な AhR リガンド刺激は、UV 照射によるメラノサイトのメラニン関連遺伝子の増加に明らかな影響を与えることはなかった。

D．考察

今回は皮膚の炎症に伴う色素沈着への AHR リガンドの影響を、紫外線によるメラノサイトにおけるメラニン関連遺伝子の発現を指標として評価した。しかし、明らかな AHR リガンドの影響は見られなかった。そこで今後は、慢性炎症によるケラチノサイトからの ET-1 産生、ET-1 刺激によるメラノサイトでのメラニン関連遺伝子の発現に対する様々な AHR リガンドの影響を検討することで、皮膚の炎症に伴う色素沈着への AHR リガンドの影響を別の側面から評価する必要があると考えられた。今後のこれらの研究により、油症患者皮膚の色素沈着における様々な AHR リガンドの関与の解明と同時に、その色素沈着の治療につながる AHR リガンドの探索を目指したい。

E．結論

紫外線照射により、メラノサイトからのメラニン関連遺伝子の発現増強は確認されたが、その増強に対する AHR リガンドの影響は明らかではない。

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

（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

分担研究報告書

膠原病の皮疹形成機序における AHR の役割に関する研究

研究分担者　　冬野　洋子　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　GSK 2795039(NADPH oxidase 2 (NOX2) inhibitor))は AHR のリガンドであり、ヒドロキシクロロキン (HCQ) による抗酸化作用を増強させる。

A．研究目的

膠原病の皮疹形成機序には未解明な点が多い。膠原病の病態への AHR の関与について検討を行っている。膠原病の治療薬である HCQ は、ヒト表皮角化細胞で AHR を活性化させ、抗酸化作用を示すが(未発表)、HCQ による AHR の活性化と抗酸化作用を増強させる ROS inhibitor を同定し、膠原病の新たな治療薬としての可能性についての検討を行うことを目的とする。

B．研究方法

SLE の皮膚生検の病理組織を免疫染色し、CYP1A1, NRF2, HO1 の免疫染色を行った。ヒト表皮角化細胞に、HCQ, GSK 2795039(NADPH oxidase 2 (NOX2) inhibitor))を処理し、免疫染色で AHR の核内移行の検討と、qPCR で AHR の活性化、抗酸化作用の検討を行う。

（倫理面への配慮）

ヒト検体を用いた実験は後ろ向きの観察研究として、九州大学の倫理審査委員会にて承認されている。

C．研究結果

ROS inhibitor である GSK 2795039 はヒト表皮角化細胞で AHR の核内移行を誘導し、qPCR で CYP1A1 を誘導した。さらに、HCQ による CYP1A1 の誘導を増強させ、HCQ による Nqo1 の誘導を、GSK 2795039 は相加的に増強させた。

D．考察

SLE の皮疹における AHR の関与については検討中であるが、GSK 2795039 がヒト表皮角化細胞において、AHR を活性化させ、抗酸化作用を有し、HCQ による治療効果を増強させる可能性がある。GSK 2795039 は AHR のリガンドとして抗酸化作用を有することから、ダイオキシン類による酸化ストレス、油症症状を緩和させる可能性もあり、GSK 2795039 がダイオキシン類による AHR 活性および酸化ストレスに対する拮抗作用と、抗酸化作用を示すかどうかについて検討予定である。

E．結論

GSK 2795039 は AHR のリガンドであり、ヒト表皮角化細胞で HCQ による抗酸化作用を増強させる。AHR の活性化による膠原病皮疹への影響について、さらなる検討が必要である。

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。）

なし

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。TCDD による出生児の性未成熟の機構解析を目指して、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、R4 年度は、精巣における testosterone 合成酵素の mRNA 発現レベルを 8 週齢および 13 週齢において調べた。合成酵素に関しては、8 週齢において、17β-hydroxysteroid dehydrogenase 3 (17 β-HSD3) mRNA が有意に低下した。また、13 週齢において、cytochrome P450 11A1 (CYP11A1)および CYP17 の mRNA に有意な減少があった。これらは、testosterone の低下と同じ方向性のものである。AHR 欠損における血中 testosterone レベルの低下は、先行研究で見出しているが、その前駆体である androstenediol、dehydroepiandrosterone、androstenedione については、これまで検討していなかった。R4 年度は、これらの血中レベルを調べた。いずれも有意な影響はなかったものの、8 週齢で androstenedione の低下傾向があった。次に、ステロイドホルモンの硫酸化に関する検討を行った。ステロイドの硫酸転移酵素には有意な変動はなかったものの、補酵素である活性硫酸 PAPS の合成酵素の発現が有意に低下し、また硫酸化ステロイドを脱抱合してステロイドの供給をする脱硫酸化酵素は 8 週齢で有意に低下した。これらのことから、ステロイドの硫酸化が抑制され、ステロイド合成中間体としての原料供給も抑制されることが示唆された。R3 年度までに、先行研究において、思春期である 8 週齢で、AHR 欠損ラットの精巣重量の減少が明らかとなり、その代償的応答として、精巣の成長に関与する線維芽細胞成長因子 FGF (fibroblast growth factor) 及びその受容体である FGFR (fibroblast growth factor receptor) の発現が増加することが強く示唆された。しかしながら、精巣重量は有意に減少していることから、FGF の機能に重要な HSPG (heparan sulfate proteoglycan) の一種である、 Gpc (glypican) および Sdc (syndecan) の mRNA 発現量を解析した。その結果、AHR 欠損によって Gpc4 の発現量が有意に減少し、Sdc4 で減少傾向が見られ、その他の HSPG には AHR による影響はほとんど見られなかった。また、HS6ST（Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase）による HS の 6-O-硫酸化は FGF、FGFR、HSPG シグナル伝達複合体の形成に不可欠であることから、R4 年度は、HS の硫酸化と脱硫酸化酵素に着目した。AHR 欠損ラットの 8 週齢では HS6ST1 が有意に低下し、脱硫酸化酵素 sulfatase 1 (SULF1), SULF2 には低下傾向があった。思春期で

ある 8 週齢では、FGF および FGFR の増加にもかかわらず、精巣重量が低下していることは、HSPG 低下および硫酸化の抑制による FGF の機能不全であることが考えられた。

A．研究目的

妊娠期のダイオキシン曝露による性未成熟等の出生児発育障害は、低用量で発現し、影響が長期間持続するため問題である(1)。当教室では、最強毒性ダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 1 μg/kg、経口) の妊娠ラットへの曝露により、出生前後の限定された時期に脳下垂体 luteinizing hormone (LH) が低下し、これを起点として成長後の性未成熟が固着することを報告している(2, 3)。更に、別の脳下垂体ホルモンである 成長ホルモンの発現も TCDD 母体暴露により胎児期に減少させ、これと付随して低体重や低体長が生じることも見出している (4, 5)。多くのダイオキシン毒性発現には、aryl hydrocarbon receptor (AHR) 活性化が重要であるが (6)、周産期における胎児/新生児脳下垂体の LH 合成、精巣での性ホルモン合成については、未解明な点が多い。また、発達過程、思春期における精巣と性ホルモン合成への AHR の関与については、分かっていない。

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

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

当研究室では、AHR 欠損 (KO) ラットを作成し、ダイオキシンによる肝毒性発現における AHR の関与について研究を行っている (14)。また、同ラットを用いて、ダイオキシン非投与条件下においても、AHR 欠損による影響が解析されている。その中で、成熟期における精巣の機能低下や形態学的異常、さらに交尾行動における異常が確認された (平成 27 年度分担研究報告)。また、胎児期において、脳下垂体ホルモンである LHβ および、性ステロイド合成の律速過程の中心的役割を担う StAR (steroidogenic acute-regulatory protein) の mRNA 発現が AHR 欠損により、胎生 20 日 (gestational day 20, GD20)において低下することが確認されたことから (15)、AHR には胎児期の性ステロイド合成を介して性成熟および生殖機能に重要な役割があることが示唆された。これまでの当研究室の研究成果から、AHR 欠損ラットでは上述のように雄の生殖機能の低下が顕著であることが示唆されている。しかし、

その機構には未だ不明な点が多く残されている。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。また、令和 2 年度、AHR 欠損が PND28 において脳の雄優位の性的二型核(sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, SDN-POA)の体積を有意に低下させることも示唆された。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する中で、精巣重量の低下を見出した。

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 (16)。FGF は精巣での発現が確認されており (16)、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 (17)。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。これらのことから、精巣重量の低下への代償的応答として、精巣の成長に関与する FGF 及び FGFR の発現が増加することが強く示唆された。

R3 年度は、FGF の機能に重要な HSPG (heparan sulfate proteoglycan)とその関連遺伝子 glypican および syndecan について検討したところ glypican の一部の分子種に有意な抑制が観察された。

そこで、R4 年度は、ステロイドホルモンの合成に関与する酵素およびステロイド硫酸化の調節に重要な酵素について検討した。また、HSPG の硫酸化酵素に着目するとともに、これらに共通な硫酸供与体 PAPS の合成酵素 mRNA レベルについても検討した。

B．研究方法

1. 動物実験

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

1-1. 児の AHR 遺伝子型間での比較

雌雄の AHR-Het ラットを一晩交配し、翌朝膣内に精子が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。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、8 週齢および 13 週齢にて実験に供した。精巣を摘出し、遺伝子解析を行った。

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 (18)。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,

A20-060 及び A22-068。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

まず、精巣における性ステロイドの合成酵素の mRNA 発現について、思春期にあたる 8 週齢および生殖能力が成熟していると考えられる (19) 13 週齢の期間を対象にし、AHR 欠損による影響を解析した。性ステロイド合成の出発物質であるコレステロールは、性ステロイド合成の律速過程の中心的役割を担う StAR によって、ミトコンドリア内に運ばれステロイドホルモンへと代謝される (20-23)。Testosterone の合成には、コレステロールの側鎖を切断し、プレグネノロンを産生する反応を触媒する CYP11A1 (20-22, 24)、3β の水酸基を酸化しカルボニル基へ変換する、3β-HSD、17 位を酸化してカルボニル基へ変換する CYP17、17 位のカルボニル基を水酸基へと還元し testosterone を合成する 17β-HSD が関与している (21,22)。これらの mRNA 発現解析の結果、AHR 欠損により、 8 週齢においては、17β-HSD3 で有意な減少、CYP17 において減少傾向を示した (Fig. 1)。また 13 週齢においては、 CYP11A1、CYP17 において有意な減少が見られた (Fig. 1)。その他の合成酵素においては AHR 欠損による影響は見られなかった (Fig. 1)。

Testosterone は精巣において DEHA や androstenedione, androstenediol といった前駆体ホルモンから合成される。思春期における testosterone 低下を受け、これらのステロイドホルモン量が変動している可能性も考えられる。そこで、特に思春期で大きな変動が見られた酵素により合成される DEHA, androstenedione, androstenediol の 3 つのステロイドホルモンの血中濃度の測定を行った。その結果、思春期における androstenediol の血中濃度において若干の減少傾向は見られたが、いずれのステロイドホルモンにおいても、各週齢において AHR 欠損による大きな影響は見られなかった (Fig. 2)。

ステロイドホルモンは硫酸化され、血中を循環している硫酸化体が精巣で取り込まれることで、testosterone の合成が促進される (25)。この硫酸化には、硫酸転移酵素 (sulfotransferase, SULT)が関与し、補酵素として生体内で唯一の硫酸供与体である活性硫酸 PAPS が合成されることが必要である。この PAPS の合成は ATP sulfurylase と APS kinase の 2 つの酵素反応が関与しているが、ヒトやラットなどの哺乳動物においては 2 つの酵素の機能を併せ持つ PAPSS という酵素がこの反応を担う (26)。合成された PAPS は硫酸転移酵素によって、ステロイドを含む多様な生体分子中の多くの水酸基とアミノ基の硫酸化に使用される (27, 28)。また、精巣での活性アンドロゲンの合成には、取り込まれた不活性型の硫酸化ステロイドが脱硫酸化されることが必要であり、脱硫酸化酵素の STS がそれを担う (29)。これらのことを踏まえ、精巣でのステロイドホルモンの硫酸化に関わる各酵素の mRNA 発現の解析を行った。その結果、AHR 欠損により、思春期において PAPSS の mRNA 発現が減少することが明らかとなり (Fig. 3A, B)、硫酸供与体 PAPS の濃度低下が推測された。また、ヒドロキシステロイドの硫酸抱合に主に関与する SULT2A1 においてはいずれの期間においても、 AHR 欠損による影響は見られず、 STS に関しては、思春期において有意な減少が見られた (Fig. 3C,D)。

次に、AHR 欠損により精巣重量の低下が見られたことから、精巣の成長や精子のもととなる精子幹細胞の増殖に関する因子である FGF およびその受容体 FGFR の

mRNA 発現を real-time RT-PCR 法によって解析した結果、思春期において AHR 欠損で、FGF1,2 および FGFR1,3 では有意に増加することが分かっていた (Fig. 4A,B,D,E, 令和 3 年度報告参照)。令和 4 年度は、FGF 9 についても検討を行い、有意に減少することが明らかになった (Fig. 4C)、一方、FGFR2, R4 には変動がなかった (Fig. 4F, G)。

令和 3 年度の検討により、FGF の機能発現に重要な HSPG の発現低下が明らかになっている。HSPG を構成している HS 鎖は 硫酸転移酵素によって硫酸化されているが、この硫酸化は HS 鎖上で不均一になされ、種々の程度に修飾され複雑な硫酸化パターンを持った HS 鎖が形成される。この特定の硫酸化パターンが HS の生物学的活性に重要であることが報告されている (30)。HS 合成に関与する硫酸修飾酵素には、Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase (HS6ST) や Heparan Sulfate 2-O-Sulfotransferase1 (HS2ST1) が知られている (31,32)。

また、sulfatase (SULF) は、HS 鎖のグルコサミン残基の硫酸エステル結合の加水分解を触媒することで、細胞の増殖や分化などに重要な役割を果たしていると考えられている (33-38)。そこで、精巣における HS 鎖の硫酸化及び脱硫酸化を担う酵素の mRNA 発現の解析を行った。その結果、思春期において、 HS6ST1 で減少、その他の硫酸転移酵素および SULF において減少傾向が見られた (Fig. 5)。このことから、 AHR が HS 鎖の硫酸化を制御している可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、AHR 欠損が雄の生殖腺の発達に及ぼす影響を検討した。先行研究で、生殖器官の重量を解析した結果、AHR 欠損により体重ならびに思春期での精巣重量が有意に減少することが明らかになった (令和 2 年度報告書)。不妊症の原因となる、男児において精巣が増大しないという性分化疾患が問題となってきている。ヒトにおいて、精巣容積が低下すると、精液量、精子濃度、および正常な形態の精子の割合が低いことが報告されている (39)。ヒトにおいて、精液中の精子数が 20~40 % 減少している男性では、約 50 % が不妊であり、20 % 以下の男性は全てが不妊である (40)。一概に、ラットにこの知見を当てはめることはできないが、先行研究において、AHR 欠損により、30~50% 程度の精子数の減少が見られている (令和元年年度報告)。これらのことから、AHR 欠損による精巣重量の低下はラットにおける不妊症につながる可能性がある。実際、本研究においても、繁殖維持には AHR ホモ欠損雄ラットではなく、AHR ヘテロ雄欠損ラットを主に用いている。それは、 AHR ホモ雄ラットでは経験的に妊娠動物を得にくく、ヘテロ欠損動物であっても野生型と比べると交配での妊娠動物を得にくい傾向がある。また、ヒトの AHR 遺伝子多型は男性不妊のリスクファクターと推定されている (41) ことから、 AHR がヒトの性成熟にも関与することが十分に考えられる。したがって、 AHR 欠損ラットの性的未成熟の解明は、将来的にヒトにおける性成熟や不妊問題の解決策となる可能性が考えられる。その上で、 AHR を欠損させるというヒトでは行うことの出来ない条件下において、さらなる解析を行うことは意義があると考えられる。不妊という観点では、精子数という量的要素も重要であるが、精子の運動率や正常形態率などの質的要素も重要視される (42)。精子の運動性が低下することを『精子無力症』といい、男性不妊の原因のひとつである (43)。また、異常な形態の精子のことを『奇形精子』といい、この「奇形精子」が増加することで、男性の生殖能力低下の最も一般的な原因であ

る『奇形精子症』となるとされている (43)。このことから、AHR 欠損による精子への質的影響として、精子の活性測定や形態解析を行うことは今後の検討課題であろう。次に、AHR 欠損により精巣重量の低下が見られたことから、精巣の成長や精子のもととなる精子幹細胞の増殖に関する因子である FGF およびその受容体 FGFR の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法によって解析した結果、思春期において AHR 欠損で、FGF 9 では有意な減少、それ以外の FGF および FGFR では有意に増加することが明らかとなった (Fig. 4)。FGF は、精子形成をつかさどるセルトリ細胞や、testosterone 分泌を行うライディッヒ細胞、生殖細胞など、精巣全体の多くの細胞に局在している (44, 45)。FGF 1 と FGF 2 の両方が、ライディッヒ細胞による testosterone 産生を刺激すること、 in vitro において、FGF 2 はラット生殖細胞の増殖活性を有意に刺激することや、セルトリ細胞の増殖に関与することが報告されており、FGF 2 が精子形成開始における重要な因子であることが示唆されている (46)。これらのことから、FGF および FGFR の遺伝子発現が増加したことは、思春期において精巣重量低下や精子数減少による、 FGF および FGFR へのポジティブフィードバックが起こっていることが考えられる。また、FGF 9 に関しては、FGF 9 シグナル伝達が、精巣の間質コンパートメントの形成に寄与することが示されている (47)。FGF 9 の発現が低下した理由としては、AHR 欠損による XRE 配列に対する結合および転写の抑制が考えられる。 FGF 9 について XRE 配列の有無を確認したところ、転写開始点から 5000 bp までに 4 か所の XRE 配列が確認された。このことから、AHR 欠損による転写抑制により、 FGF 9 の遺伝子発現が低下したことが推測される。一方、FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR3 については、AHR 欠損によって発現が上昇しており、FGFR1 以外はこれらの遺伝子の転写開始点から 5000 bp までに各 1 か所の XRE 配列はあるものの、それだけでは説明が難しい。先行研究で HDAC は、ダイオキシン母胎暴露した胎児の脳下垂体で発現誘導が認められている (48)。そこで、HDAC の発現を調べたところ、HDAC 2,7 の発現が減少した (令和 3 年度報告書)。FGF2-FGFR1 シグナル伝達は HDAC により抑制されていると報告されており (49)、FGF2 の発現上昇は AHR 欠損による HDAC の発現抑制によって、HDAC による FGF2 抑制が解除されたことによると推察された。他の FGF および FGFR に関しては、HDAC による制御の報告は筆者の知る限り存在しない。しかし、AHR 欠損により、 HDAC の mRNA 発現が全体的に減少していることからも、HDAC による FGF および FGFR の発現抑制が解かれ、遺伝子発現が上昇した可能性は十分に考えられる。

また、これまでの結果から、精巣での FGF および FGFR が十分に機能していないことが推定された。FGF および FGFR が正常に機能しない要因として、FGF の作用発現に必要な HSPG (50) の変動が疑われ、 令和 3 年度に HSPG の遺伝子発現の解析を行った。その結果、思春期において、AHR 欠損で GPC4 の減少、SDC4 の減少傾向が見られた (令和 3 年度報告書)。FGF は、HSPG に対して高い親和性を有しており、FGF が FGF・FGFR・HSPG 三元複合体の形態で FGFR と結合すると、FGFR の二量体化を形成し (51-53)、細胞内領域のチロシン残基がリン酸化され、シグナル伝達複合体が形成される。その後、RAS / MAP キナーゼ経路、PI3 キナーゼ / AKT 経路、PLCγ 経路などのシグナル経路が多数誘導され、特異的な細胞応答を引き起こすことが知られている (51-54)。また、 HSPG の合成に必要な硫酸転移酵素

および脱硫酸酵素の発現の解析も行ったところ、 AHR 欠損で硫酸転移酵素である HS6ST1 で有意な減少、その他の硫酸転移酵素で減少傾向が見られた。脱硫酸酵素 SULF においては、 AHR 欠損で減少傾向が観察された (Fig. 5)。 HS6ST は、N-アセチルグルコサミン残基の 6 位に硫酸基を転移する (55)。HS2ST1 は、PAPS から グルクロン酸の 2-OH 位置への硫酸基の転移を触媒する (31, 32)。SULF は、N-アセチルグルコサミン残基の 6 位の硫酸基を脱硫酸し、in vitro または SULF 過剰発現系を利用した実験では、SULF による 6 -O-硫酸の酵素的除去が、FGF 活性に大きな影響を与えることが実証されている (36, 56-58)。これらの結果から、HS 鎖の生合成調節はまだ未解明な部分が多いが、 AHR が HS 鎖の硫酸化の制御や HSPG 発現制御を通じて、HSPG を介した、FGF-FGFR の作用発現に影響を及ぼしていることが推測された。また、 HS 鎖の硫酸化に関しては、推測された AHR 欠損による PAPS 低下がこの HS 鎖の硫酸化に影響を及ぼしている可能性が考えられる。硫酸供与体 PAPS は細胞質か核で PAPSS によって合成される (59)。しかし、HS 鎖の硫酸化はゴルジ体で行われることから (60)、PAPS がゴルジ内腔へ輸送されることが必要である。この PAPS のトランスポーターとして、PAPS transporter (PAPST1,2) が知られており (61-63)、AHR 欠損による PAPS トランスポーターの変動の有無を調べる必要があろう。

以上、本研究の結果から、 AHR 欠損により、思春期の精巣重量が低下し、精巣の発達に関与する因子への影響が示唆された。

E. 結論

AHR の欠損は、思春期 8 週齢の精巣重量を低下させた。これが testosterone 低下、精子数の減少と関係する可能性がある。思春期である 8 週齢では、testosterone 低下には、合成系酵素である CYP17 および 17β-HSD の低下が関与していることが示唆された。また、硫酸化ステロイドの生成に重要な活性硫酸 PAPS 量の低下も推察された。FGF の増加にもかかわらず、精巣重量が低下していることは、HSPG 低下による FGF の機能不全であることが考えられたが、これには、HSPG の HS 鎖の硫酸化酵素と PAPS の低下も併せて示唆された。これらの制御に AHR が重要であることが示唆された。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、すなわち AHR 欠損させた場合に、ダイオキシン低用量暴露と類似の性未成熟作用が現れることから、ダイオキシンが AHR の構成的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. 日本薬学会九州・山口支部大会 2022 (佐世保、2022 年 11 月 19 日-20 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

1) Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. *Crit Rev Toxicol*, **23**: 283-335 (1993).
2) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y, Yamada H. *Endocrinology*, **147**: 927-936 (2006).
3) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T, Yamada H. *J Pharmacol Exp Ther*, **329**: 1091-1099 (2009).
4) Hattori Y, Takeda T, Taura J, Ishii Y,

Yamada H. *Endocrine*, **47**: 572-580 (2014).
5) Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Yamada H. *Toxicol Appl Pharmacol*, **281**: 48-57 (2014).
6) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol,* **140**: 173-179 (1996).
7) Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. *Biochim Biophys Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
8) Latchney SE, Hein AM, O'Banion MK, DiCicco-Bloom E, Opanashuk LA. *J Neurochem*, **125**: 430-445 (2013).
9) Harrill JA, Hukkanen RR, Lawson M, Martin G, Gilger B, Soldatow V, Lecluyse EL, Budinsky RA, Rowlands JC, Thomas RS. *Toxicol Appl Pharmacol,* **272**: 503-518 (2013)
10) Ikuta T, Kurosumi M, Yatsuoka T, Nishimura Y. *Exp Cell Res*, **343**: 126-134 (2016).
11) Baba T, Shima Y, Owaki A, Mimura J, Oshima M, Fujii-Kuriyama Y, Morohashi K. *Sex Dev,* **2**: 1-11 (2008)
12) Barnett KR, Tomic D, Gupta RK, Miller KP, Meachum S, Paulose T, Flaws JA. *Biol Reprod*, **76**: 1062-1070 (2007).
13) Baba T, Mimura J, Nakamura N, Harada N, Yamamoto M, Morohashi K, Fujii-Kuriyama Y. *Mol Cell Biol*, **25**: 10040-10051 (2005).
14) Takeda T, Komiya Y, Koga T, Ishida T, Ishii Y, Kikuta Y, Nakaya M, Kurose H, Yokomizo T, Shimizu T, Uchi H, Furue M, Yamada H. *J Biol Chem,* **292**: 10586-10599 (2017).
15) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H, Ishii Y. *Biochem Pharmacol*, **154**: 213-221 (2018).
16) Nies VJ, Sancar G, Liu W, van Zutphen T, Struik D, Yu RT, Atkins AR, Evans RM, Jonker JW, Downes MR. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **6**: 193 (2015)
17) Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J, *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**: 139–49 (2005)
18) 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).
19) Takakura I, Creasy DM, Yokoi R, Terashima Y, Onozato T, Maruyama Y, Chion T, Tahara T, Tamura T, Kuroda J, Kusama H. *J Toxicol Sci*, **39**: 269-279 (2014)
20) Waterman M. *Science*, **267**: 1780-1781 (1995)
21) Scott HM, Mason JI, Sharpe RM. *Endocr Rev*, **30**: 883-925 (2009)
22) Zirkin BR, Papadopoulos V. *Biol Reprod*, **99**: 101-111 (2018)
23) Lin D, Sugawara T, Strauss J, Clark B, Stocco D, Saenger P, Rogol A, Miller W. *Science*, **267**: 1828-1831 (1995)
24) Hume R, Kelly RW, Taylor PL, Boyd GS. *Eur J Biochem*, **140**: 583–591 (1984)
25) Mueller JW, Gilligan LC, Idkowiak J, Arlt W, Foster PA. *Endocr Rev*, **36**: 526-563 (2015)
26) Kamiyama S, Nishihara S. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **16**: 109-123 (2004)
27) Mueller JW, Shafqat N. *FEBS J*, **280**: 3050-3057 (2013)
28) Markovich D. *Pflugers Arch*, **466**: 131-137 (2014)
29) Hobkirk R. *Trends Endocrinol Metab*, **4**: 69-74 (1993)
30) Lindahl U, Gullberg MK, Kjellen L. *J Biol Chem*, **273**: 24979-24982 (1998)
31) Kobayashi M, Habuchi H, Yoneda M,

Habuchi O, Kimata K. *J Biol Chem*, **272**: 13980–13985 (1997)
32) Bai X, Esko JD. *J Biol Chem*, **271**: 17711–17717 (1996)
33) Dhoot GK, Gustafsson MK, Ai X, Sun W, Standiford DM, Emerson CP Jr. *Science*, **293:** 1663–1666 (2001)
34) Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Werb Z, Hemmerich S, Rosen SD. *J Biol Chem*, **277**: 49175–49185 (2002)
35) Ohto T, Uchida H, Yamazaki H, Keino-Masu K, Matsui A, Masu M. *Genes Cells*, **7:** 173–185 (2002)
36) Ai X, Do AT, Lozynska O, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Emerson CP Jr. *J Cell Biol*, **162**: 341–351 (2003)
37) Nagamine S, Koike S, Keino-Masu K, Masu M. *Brain Res Dev Brain Res*, **159**: 135–143 (2005)
38) Ai X, Do AT, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Lu K, Emerson CP Jr. *J Biol Chem*, **281**: 4969–4976 (2006)
39) Condorelli R, Calogero AE, Vignera SL. *Int J Endocrinol*, **2013**: 145792 (2013)
40) 佐久間康夫.『内分泌生理学講義』第 10 版 2015
41) Gu A, Ji G, Long Y, Shi X, Song L, Wang X. *Toxicol Sci*, **122**: 415-421 (2011)
42) Fainberg J, Kashanian JA. *F1000Res*., **8**: F1000 (2019)
43) Hirsh A. *BMJ*, **327**: 669-672 (2003)
44) Segretain D, Gilleron J, Carette D, Denizot J, Pointis G. *Developmental Dynamics*., **239**: 1113–1123 (2010)
45) Jiang X, Skibba M, Zhang C, Tan Y, Xin Y, Qu Y. *J Diabetes Res*, **2013**: 489095 (2013)
46) Van Dissel-Emiliani FM, De Boer-Brouwer MD, De Rooij DG. *Endocrinology*, **137**: 647–654 (1996)
47) Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM. *Cell*, **104**: 875–889 (2001)
48) Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y, Yamada H. *J Biol Chem*, **287**: 18440–18450 (2012)
49) Lee TW, Lee TI, Lin YK, Kao YH, Chen YJ. *J Biomed Sci*, **25**: 42 (2018)
50) Laslett AL, McFarlane JR, Risbridger GP, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **60**: 171–179 (1997)
51) Ornitz DM, Itoh N. *Rev Dev Biol*, **4**: 215-266 (2015).
52) Turner N, Grose R. *Nat Rev Cancer*, **10**: 116-129 (2010).
53) Harmer NJ, Ilag LL, Mulloy B, Pellegrini L, Robinson CV, Blundell TL. *J Mol Biol*, **339**: 821-834 (2004).
54) Groth C, Lardelli M. *Int J Dev Biol*, **46**: 393-400 (2002).
55) Nagai N, Kimata K. *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, Second Edition*, **2**: 1067-1080 (2014)
56) Viviano BL, Paine-Saunders S, Gasiunas N, Gallagher J, Saunders S. *J Biol Chem*, **279**: 5604-5611 (2004)
57) Wang S, Ai X, Freeman SD, Pownall ME, Lu Q, Kessler DS, Emerson CP Jr. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 4833-4838 (2004)
58) Narita K, Staub J, Chien J, Meyer K, Bauer M, Friedl A, Ramakrishnan S, Shridhar VH. *Cancer Res*, **66**: 6025-6032 (2006)
59) Besset S, Vincourt JB, Amalric F, Girard JP. *FASEB J*, **14**: 345–354 (2000)
60) Lane N, Caro L, Otero-Vilardebo LR, Godman GC. *J Cell Biol*, **21**: 339-351 (1964)
61) Clement A, Wiweger M, von der Hardt S, Rusch MA, Selleck SB, Chien CB, Roehl HH. *PLoS Genet*, **4**: e1000136 (2008)
62) Kamiyama S, Sasaki N, Goda E, Ui-Tei K, Saigo K, Narimatsu H, Jigami Y,

Kannagi R, Irimura T, Nishihara S. *J Biol Chem*, **281**: 10945-10953 (2006)
63) Kamiyama S, Suda T, Ueda R, Suzuki M, Okubo R, Kikuchi N, Chiba Y, Goto S, Toyoda H, Saigo K, Watanabe M, Narimatsu H, Jigami Y, Nishihara S. *J Biol Chem*, **278**: 25958-25963 (2003)

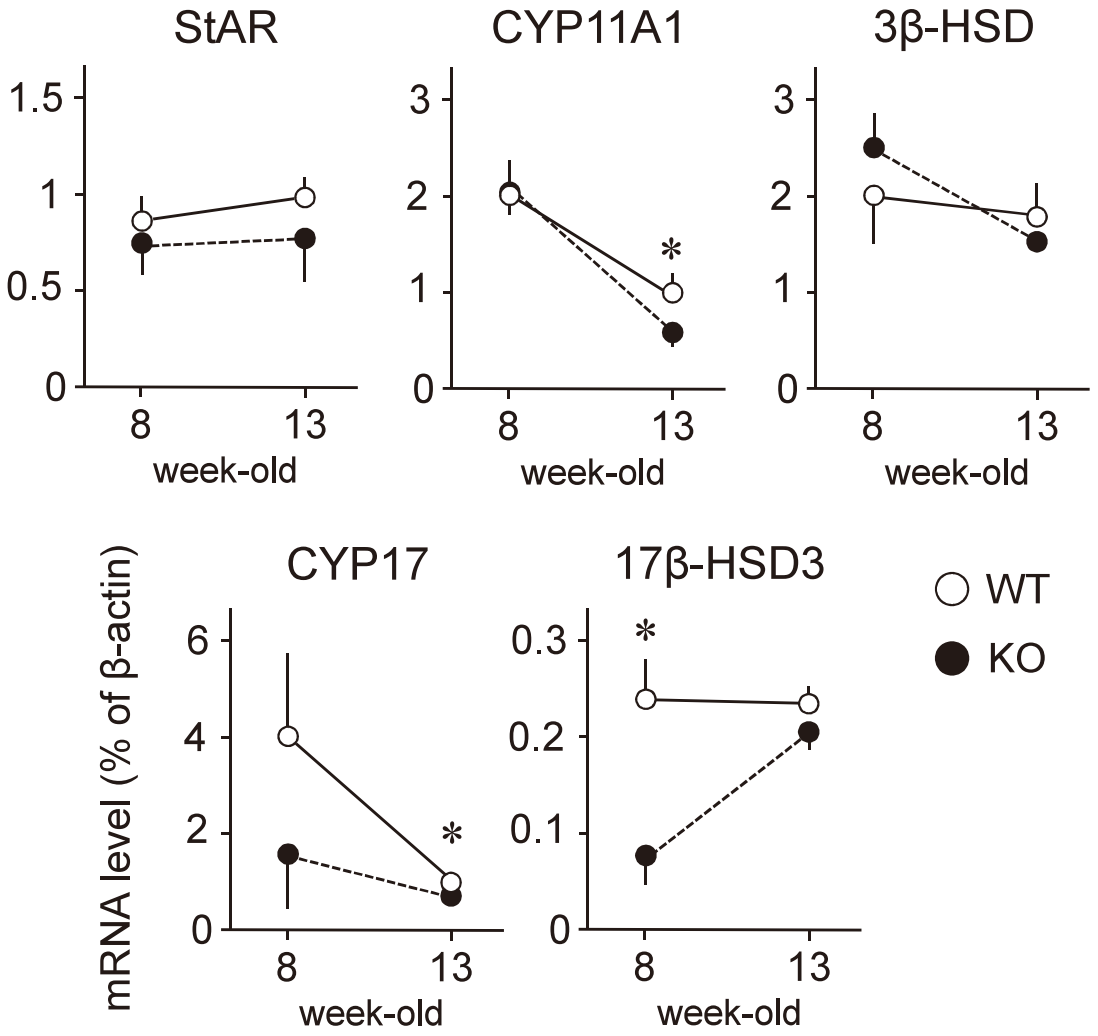


Fig. 1 The testicular expression of mRNAs coding for sex-steroid synthesis protein in AHR deficient rats (8,13 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: *p<0.05. Abbreviations used: StAR, steroidgenic acute-regulatory protein; CYP, cytochrome P450; 3β–HSD, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase; 17β–HSD, 17β-hydroxysteroid dehydrogenase.

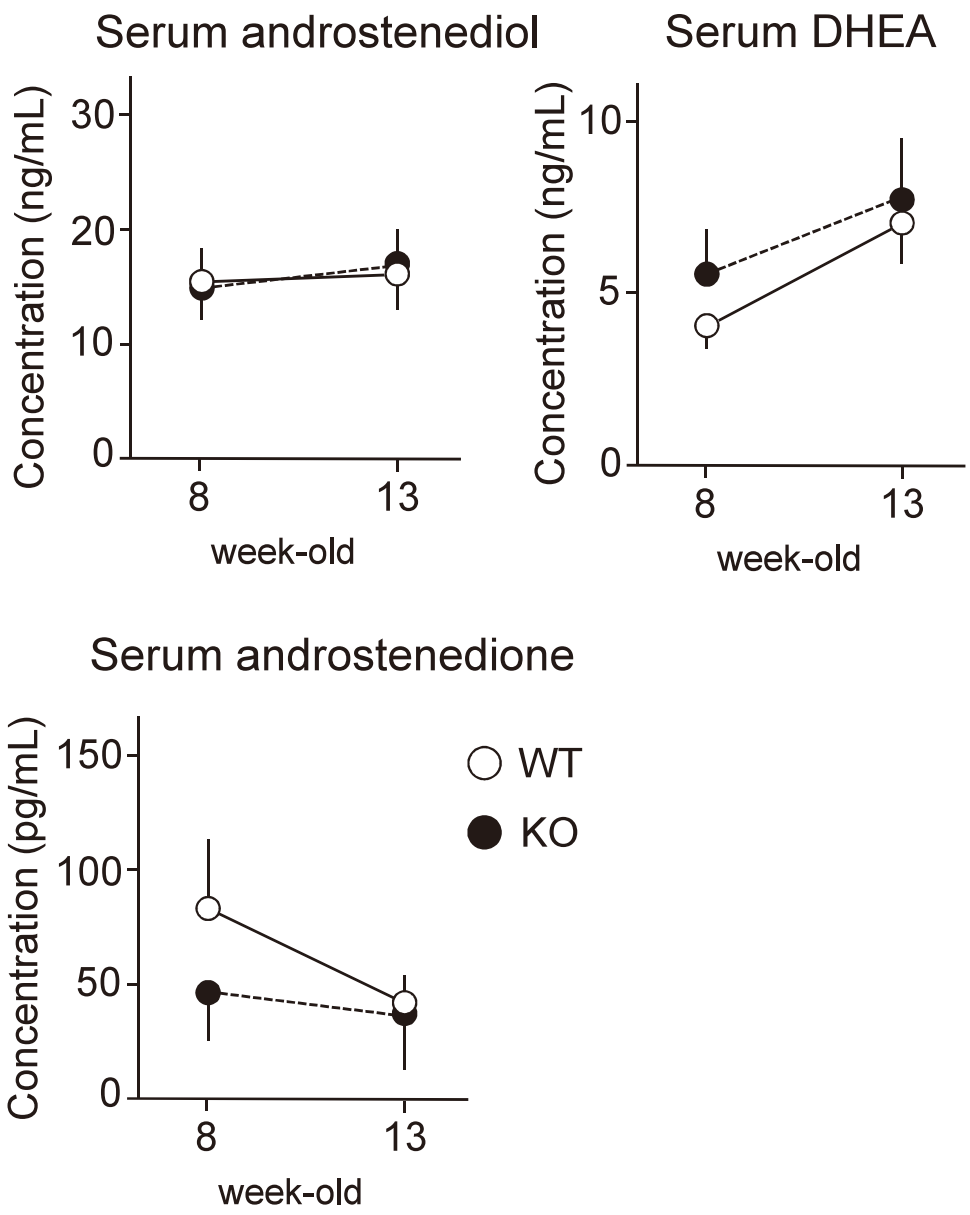


Fig. 2 The circulating level of steroid hormone in AHR deficient rats (8,13 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 5 rats. Abbreviations used: DHEA, Dehydroepiandrosterone.

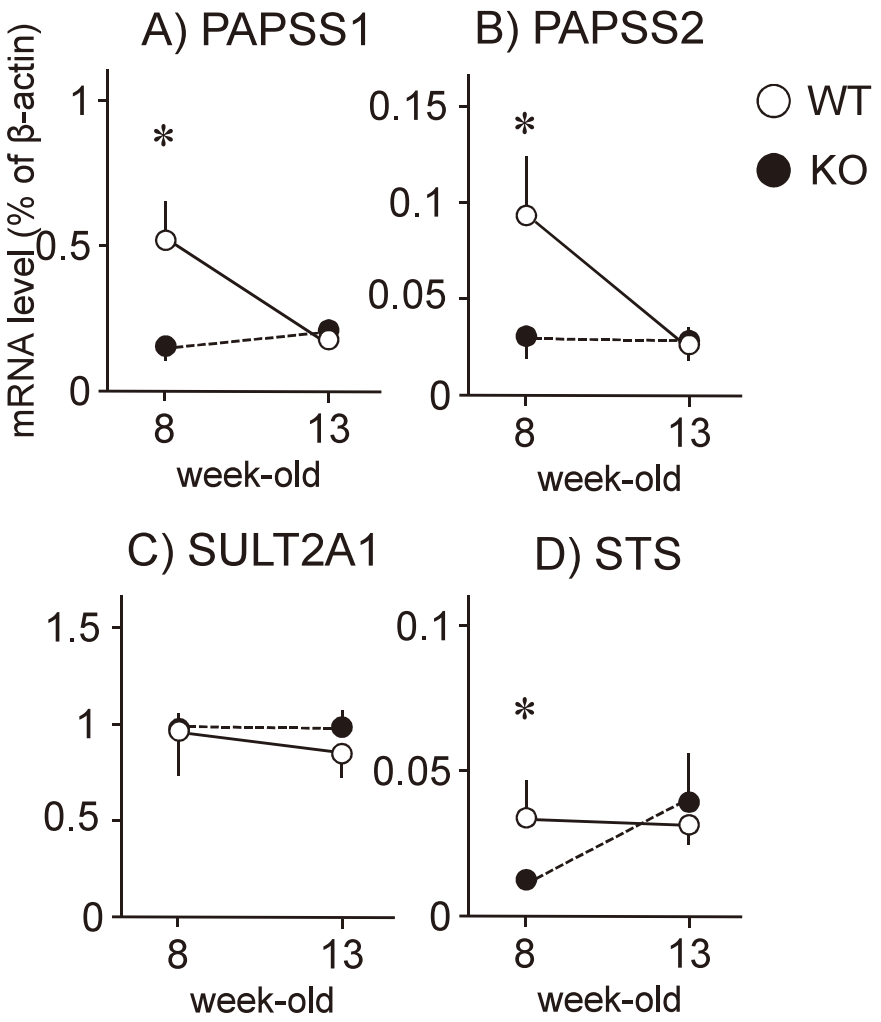


Fig. 3 The testicular expression of mRNAs coding PAPS synthase (A-B), sulfotransferase (C) and steroid sulfatase (D) in AHR deficient rats (8,13 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 5 rats. Significantly different from the control: *p<0.05.
Abbreviations used: PAPSS, 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthase; SULT, sulfotransferase; STS: Steroid Sulfatase.

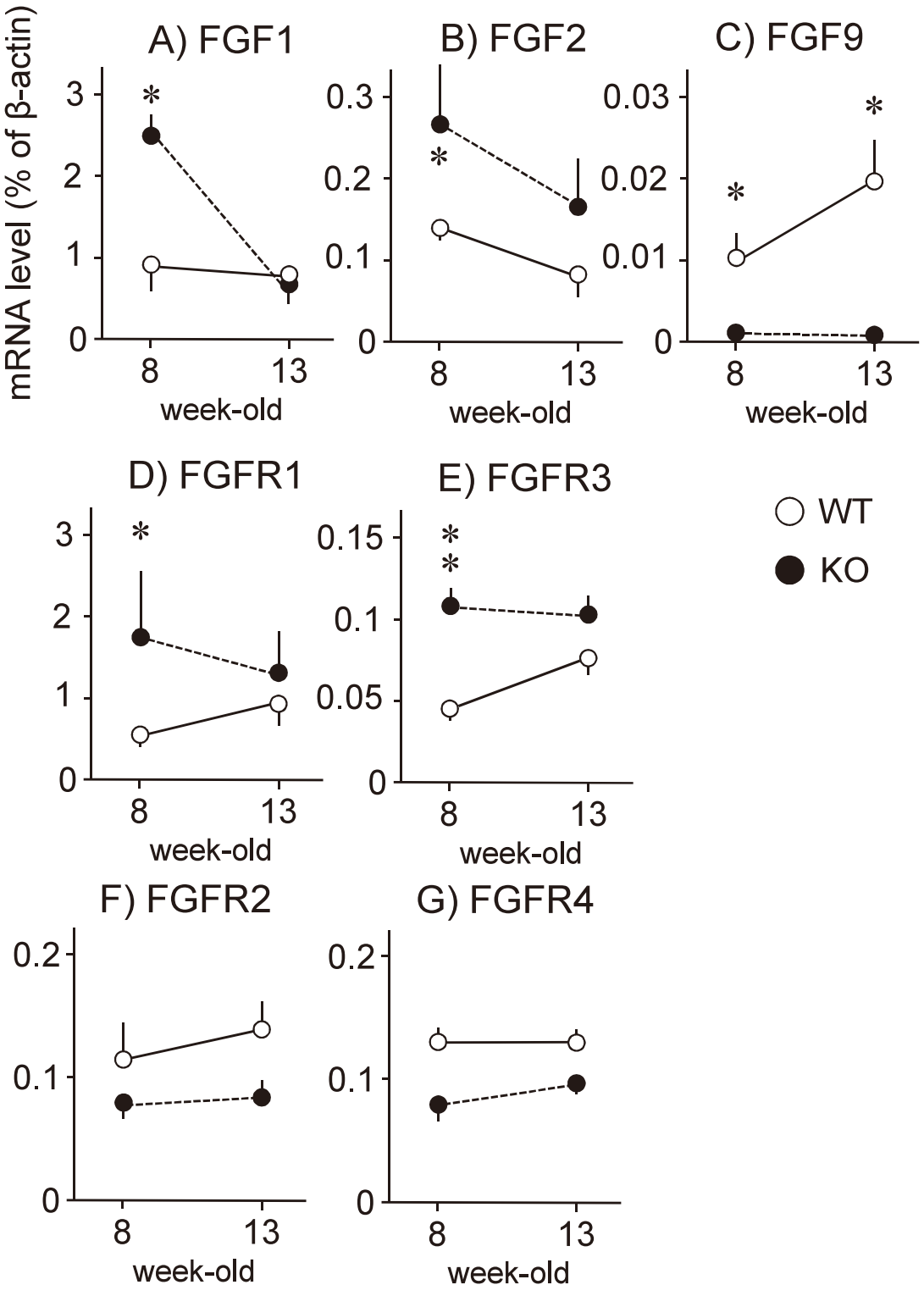


Fig. 4 The testicular expression of fibroblast growth factor (A-C) and fibroblast growth factor receptor (D-G) mRNA in AHR deficient rats (8,13 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: *p<0.05, **p<0.01. Abbreviations used: FGF, fibroblast growth factor; FGFR, FGF receptor. (8 week FGF1, FGF2, FGFR1およびFGFR3は、R3年度報告より引用)

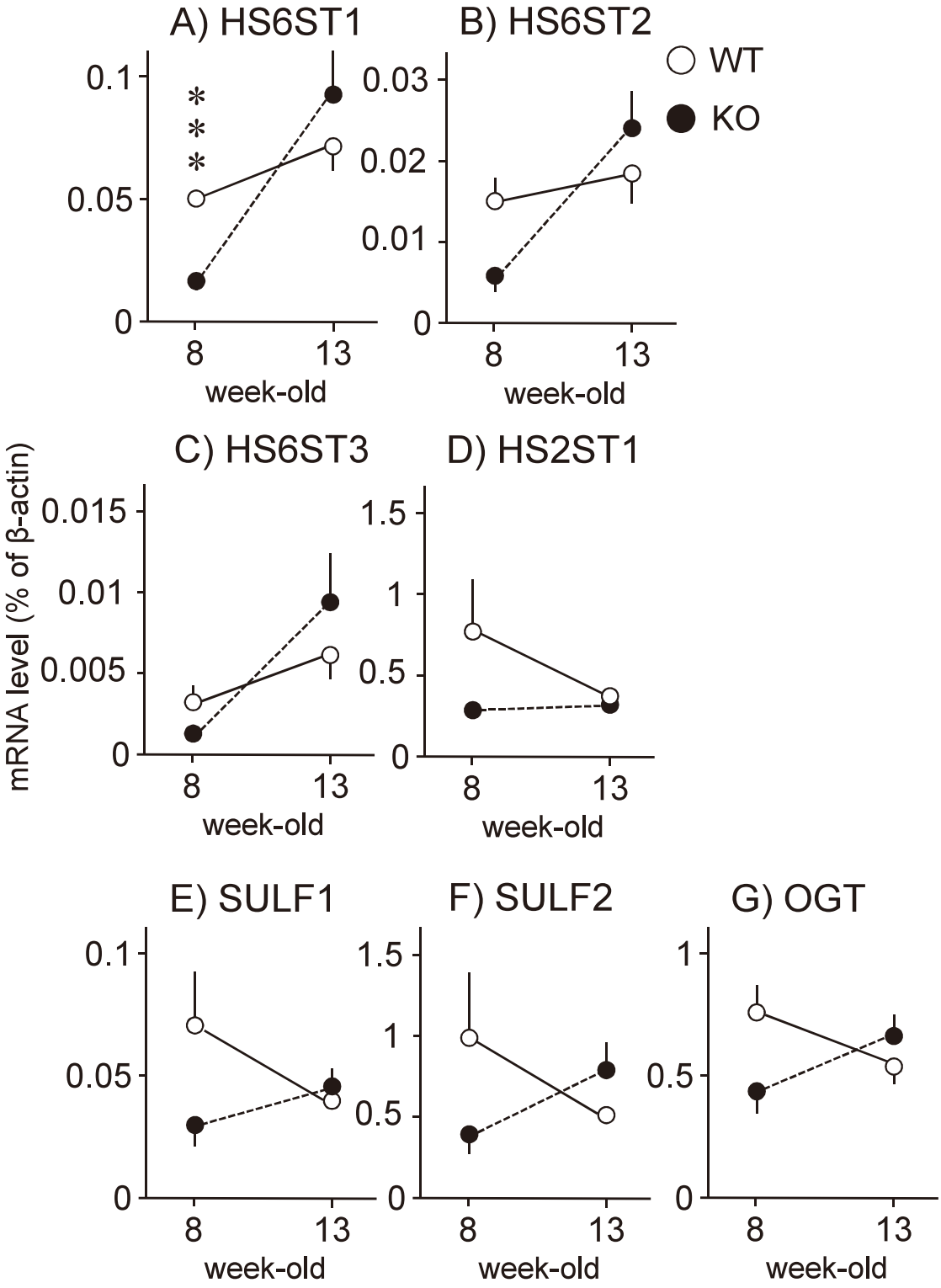


Fig. 5 The testicular expression of Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase (A-C), Heparan Sulfate 2-O-Sulfotransferase (D), sulfatase (E-F) and O-linked N-acetylglucosamine transferase (G) mRNA in AHR deficient rats (8,13 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: ***p<0.001. Abbreviations used: HS6ST, Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase; HS2ST, Heparan Sulfate 2-O-Sulfotransferase; SULF, sulfatase; OGT, O-linked N-acetylglucosamine transferase. (8 week B, C, およびGは、R3年度報告より引用)

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）：ヒト由来細胞を用いた検討

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、ラットおよびマウスのセレン結合性タンパク質 1 (Selenbp1)がダイオキシン類で誘導されることを明らかにしてきた。また、最近、Selenbp1-KO マウス腎臓を用いた検討により、Selenbp1 は脂質代謝の調節に重要であることが分かった。一方、ダイオキシン類がヒトにおいても SELENBP1 を誘導するか否かは明らかになっていない。油症患者において脂質代謝異常が起こっていることは、これまでの検討から明らかであり、肝臓の SELENBP1 レベルが変動しているとすれば、ラットやマウスなど実験動物での検討結果が有用となる。そこで、R4 年度は、ヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を芳香族炭化水素受容体 (AHR)リガンドで処理し、SELENBP1 が誘導されるか否か検討した。HepG2 を AHR リガンドである 3-メチルコランスレン (MC)処理した。代表的マーカーである cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) mRNA の発現は、MC 濃度依存的に誘導された。SELENBP1 への影響は有意ではなく、むしろ抑制傾向にあった。次いで、AHR アンタゴニストであるα-ナフトフラボン (α-NF) により処理したところ、CYP1A1 が誘導された。α-NF には弱いながら CYP1A1 誘導作用があることが分かっていたことから、これを支持する結果となった。一方、α-NF は、CYP1A1 誘導作用が有意でない濃度において、SELENBP1 mRNA を有意に誘導した。また高濃度では却って影響が弱くなった。そこで、別の AHR リガンドとして知られるβ-NF で処理したところ、MC に比べて弱いものの CYP1A1 mRNA がβ-NF 濃度依存的に誘導された。この時、SELENBP1 は低濃度で増加傾向にあったが、影響は有意ではなかった。β-NF の影響には Nrf2 が関与している可能性もあるため、Nrf2 の活性化剤となる tBHQ を用いて CYP1A1 発現に及ぼす影響を調べたところ、低濃度では影響せず、高濃度でわずかな CYP1A1 mRNA レベルの上昇を認めた。tBHQ は SELENBP1 mRNA レベルに影響を与えなかった。これらの結果は、がん由来細胞を用いたためと推定し、未処理の HepG2 細胞を調べると SELENBP1 がタンパク質レベルでは確認できず、SELENBP1 が、がん抑制的働きを持つことを伺わせる結果であった。

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 (MC)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、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 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。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)、当研究室では、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て研究を推進してきた。

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 (Pparα)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。Pparα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 (Rxrα)の発現の低下が示唆されている。従って、PparαおよびRxrα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。また、Sod 活性、過酸化水素生成量が Selenbp1-KO マウス腎臓で低下することを明らかにした。この時、腎臓及び血中のセレン含量については変動がなかった。

一方、ダイオキシン類がヒトにおいても SELENBP1 を誘導するか否かは明らかになっていない。油症患者において脂質代謝異常が起こっていることは、これまでの検討から明らかであり、肝臓の SELENBP1 レベルが変動しているとすれば、ラットやマウスなど実験動物での検討結果が有用となる。そこで、R4 年度は、ヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を芳香族炭化水素受容体 (AHR)リガンドで処理し、SELENBP1 が誘導されるか否か検討した。

B．研究方法

1. 試薬

α-ナフトフラボン (α-NF) は Sigma-Aldrich より、MC およびβ-NF は、ナカライテスクより、t-BHQ は東京化成工業より購入して使用した。

2. 細胞培養

HepG2 cell は、Cellular Engineering Technologies, Inc.社より購入して使用した。HepG2 細胞は 10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む D-MEM 培地を使用して、5% CO_2 、37˚C の加湿インキュベーターで培養し、2～3 日に 1 回 0.25%トリプシン / EDTA で継代を行った。12 well plate に $1x10^5$ cells/well として播種した。24 時間後に、被検物質を含む培地を 1 mL/well ずつ添加した (n=3)。その 24 時間後、HepG2 細胞を回収した。

3. リアルタイム RT-PCR 法

回収した HepG2 細胞から RNeasy® Mini Kit を使用して、total RNA を抽出した。抽出した total RNA を定量したのち、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。

C. 研究結果

ヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を芳香族炭化水素受容体 (AHR)リガンドで処理し、SELENBP1 が誘導されるか否か検討した。HepG2 を AHR リガンドである MC 処理した。0.1-10 μM MC 処理を行ったところ、

代表的マーカーである cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) mRNA の発現は、MC 濃度依存的に誘導された (Fig. 1)。10 μM MC における誘導は特に顕著であった。一方、SELENBP1 への影響は有意ではなく、むしろ抑制傾向にあった (Fig. 1)。MC 濃度依存性は認められていない。次いで、AHR アンタゴニストであるα-NF (16) により処理した。2.5-10 μM α-NF で処理したところ、CYP1A1 が誘導された (Fig. 2)。この誘導作用は、10 μM で比較すると MC のそれに比べて 10 分の 1 程度であった。α-NF には弱いながら CYP1A1 誘導作用があることが分かっていたことから、これを支持する結果となった。一方、α-NF は、その CYP1A1 誘導作用が有意でない 2.5 μM 濃度において、SELENBP1 mRNA を有意に誘導した (Fig. 2)。また高濃度では却って影響が弱くなった。そこで、別の AHR リガンドとして知られるβ-NF により処理した。0.1-10 μM β-NF で処理したところ、MC に比べて弱いものの CYP1A1 mRNA がβ-NF 濃度依存的に誘導された (Fig. 3)。この時、SELENBP1 は低濃度で増加傾向にあったが、影響は有意ではなかった (Fig. 3)。α-NF および β-NF の影響には Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)が関与している可能性もあるため、Nrf2 の活性化剤となる tert-butylhydroquinone (tBHQ) を用いて CYP1A1 発現に及ぼす影響を調べた。1-100 μM tBHQ を用いて検討したところ、低濃度では影響せず、高濃度 100 μM tBHQ でわずかな CYP1A1 mRNA レベルの上昇を認めた (Fig. 4)。tBHQ は SELENBP1 mRNA レベルに影響を与えなかった (Fig. 4)。これらの結果は、がん由来細胞を用いたためと推定し、未処理の HepG2 細胞をウェスタンブロッティングで調べると SELENBP1 がタンパク質レベルでは確認できず (Data not shown)、HepG2 ががん由来細胞であることと、SELENBP1 はがん抑制的な働きがあると報告されていることを総合すると、がん由来細胞故に SELENBP1 の発現が抑えられているのかもしれない。SELENBP1 が、がん抑制的働きを持つことを伺わせる結果であった。

D. 考察

本研究では、ヒトにおける SELENBP1 の発現調節を明らかにすることを目的として、ヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を芳香族炭化水素受容体 (AHR) リガンドで処理し、SELENBP1 が誘導されるか否か検討した。HepG2 を AHR リガンドである MC で処理した場合、AHR を介した誘導の代表的マーカーである CYP1A1 mRNA の発現を著しく上昇させた。このことから、HepG2 細胞において AHR 依存的な CYP1A1 遺伝子の発現誘導を捉えることが出来ることが確認された。一方、SELENBP1 への影響は有意ではなく、むしろ抑制傾向にあった (Fig. 1)。過去に、他の研究者が HepG2 細胞を用いたマイクロアレイを行っており、HepG2 への TCDD の影響を研究した際、顕著な変化を示す遺伝子の中に SELENBP1 はなかった (17, 18)。また、SELENBP1 発現量減少と glutathione peroxidase 1 (GPX1)発現量増加について述べた報告では、SMMC7721 細胞に SELENBP1 の発現が高く、HepG2 細胞には SELENBP1 の発現が低い結果が示されている (19)。マイクロアレイは網羅的解析であるため、個々の解析については別途行う必要がある。また、後者においては、AHR リガンドの影響を検討したわけではなく、検証が必要であった。本研究では、MC およびβ-NF という 2 つの AHR リガンドを用いて用量依存性を調べた結果 10 μM までの範囲では SELENBP1 の誘導が認められていない。本研究では、ダイオキ

シン類のうち最強のAHRリガンドであるTCDDの影響は調べていないため、結論づけることはできないものの、今回検討した2つのAHRリガンドはCYP1A1を誘導していることから考えて、HepG2 細胞では人工的AHRリガンドはSELENBP1を誘導しにくいものと推察される。次に、AHRアンタゴニストであるα-NFの影響について考察する。本来であれば、AHR リガンドと併用して、その作用に拮抗することを示す目的で用いるべきところだが、まず、α-NFの影響について調べた。α-NFが弱いながら CYP1A1 誘導作用があることは分かっていたため、まずそれを検証した(Fig. 2)。次に、SELENBP1 への影響を確認したところ、誘導作用を示した (Fig. 2)。その誘導作用は、CYP1A1誘導よりも低濃度で起こった。何故、このような現象が起こったのかを明らかにするため、Nrf2 の系による調節の可能性を探った。α-NFおよびβ-NFには、Nrf2の系を活性化させる作用も報告されている (20)。α-NFはNrf2系を介してエストロゲン誘導性の乳がんを抑制することも報告されている (21)。Nrf2は、ダイオキシンによるAHR活性化の系に対して防御的に働く可能性があり、期待されている (22)。そこで、具体的には、tBHQという親電子性物質を用いて検討を行った。しかし、tBHQ は高濃度でCYP1A1 を誘導するにとどまり、SELENBP1 の発現へは影響を与えなかった (Fig. 4)。これらの結果から、HepG2細胞でのNrf2を介したSELENBP1の誘導は限定的だと思われた。α-NFは、AHRアンタゴニスト (16)としてだけでなく、CYP1A1 の阻害剤としても働くと考えられている (23)。また、最近の報告では、CYP1A1の阻害剤がAHRを活性化することも示唆されている (24)。後者の場合、CYP1A1 の阻害を通じた内因性リガンドの蓄積が起こることによるAHR活性化と捉えられている。今回観察された、HepG2におけるα-NFによるSELENBP1の誘導がCYP1A1 の阻害を通じた内因性リガンドの蓄積によるものである可能性も否定できない。この検証のためには、別のCYP1A1阻害剤による影響、さらには内因性リガンド候補を併用する実験を行う必要があろう。

また、本研究では、HepG2 においては、元々の SELENBP1 の発現レベルがかなり低いことも改めて確認された。このことから、未処理の細胞においても SELENBP1の発現レベルが高い細胞種を選択して検討を行う必要がある。市販細胞で薬物代謝酵素レベルが正常肝臓細胞と遜色ないものとしてHepaRG細胞があるため、これを用いた検討が望まれる。

E. 結論

以上の結果から、1) 本研究では、α-NF がヒト肝臓がん由来細胞HepG2でSELENBP1を誘導することを初めて明らかにした。2) AHRリガンドであるMCは、CYP1A1を濃度依存的に誘導したが、SELENBP1 は誘導しなかった。3) α-NF は、CYP1A1を誘導するよりも低濃度でSELENBP1を誘導した。今後、このα-NF による SELENBP1 誘導機構の検討を通じて、ヒトにおけるSELENBP1の調節にAHRが関与するか否かを明らかにする必要がある。

F. 研究発表

1. なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

1) Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG, Medina D. *Carcinogenesis*, **10**: 541-546 (1989).
2) Jamba L, Nehru B, Bansal MP. *Mol Cell Biochem*, **177**: 169-175 (1997).

3) Pohl NM, Tong C, Fang W, Bi X, Li T, Yang W. *PLoS One*, **4**: e7774 (2009).
4) Porat A, Sagiv Y, Elazar Z. *J Biol Chem*, **275**: 14457-14465 (2000).
5) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Chemosphere*, **32**: 509-515 (1996).
6) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Toxicol Lett*, **87**: 1-9 (1996).
7) Ishida T, Ishii Y, Tasaki K, Ariyoshi N, Oguri K. *Fukuoka Acta Medica*, **88**: 135-143 (1997).
8) Poland A, Knutson JC. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **26**: 371-399 (1982).
9) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
10) Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. *Biochim Biophys Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
11) Bartolone JB, Sparks K, Cohen SD, Khairallah EA, *Biochem Pharmacol*, **36**: 1193-1196 (1987).
12) Pumford NR, Martin BM, Hinson JA, *Biochem Biophys Res Commun*, **182**: 1348–1355 (1992).
13) Tsujimoto S, Ishida T, Takeda T, Ishii Y, Onomura Y, Tsukimori K, Takechi S, Yamaguchi T, Uchi H, Suzuki SO, Yamamoto M, Himeno M, Furue M, Yamada H. *Biochim Biophys Acta*, **1830**: 3616-3624 (2013).
14) Lanfear J, Fleming J, Walker M, Harrison P. *Carcinogenesis,* **14:** 335-340 (1993).
15) 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) Koley AP, Buters JT, Robinson RC, Markowitz A, Friedman FK. *J Biol Chem,* **272**: 3149-3152 (1997).
17) Puga A, Maier A, Medvedovic M. *Biochem Pharmcol*, **60**: 1129–1142 (2000).
18) Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock Jr JP. *Toxicol Lett*, **122**: 189–203 (2001).
19) Huang C, Ding G, Gu C, Zhou J, Kuang M, Ji Y, He Y, Kondo T, Fan J. *Clin Cancer Res*, **18**: 3042-3053 (2012).
20) Timme-Laragy AR, Van Tiem LA, Linney EA, Di Giulio RT. *Toxicol Sci*, **109**: 217-227 (2009).
21) Singh B, Bhat NK, Bhat HK. *Carcinogenesis*, **33**: 156-163 (2012).
22) Furue M, Ishii Y, Tsukimori K, Tsuji G. *Int J Mol Sci*, 22: 708 (2021).
23) Juvonen RO, Jokinen EM, Javaid A, Lehtonen M, Raunio H, Pentikäinen OT. *Chem Biol Drug Des*, **95**: 520-533 (2020)
24) Yoda T, Tochitani T, Usui T, Kouchi M, Inada H, Hosaka T, Kanno Y, Miyawaki I, Yoshinari K. *J Toxicol Sci*, **47**: 359-373 (2022).

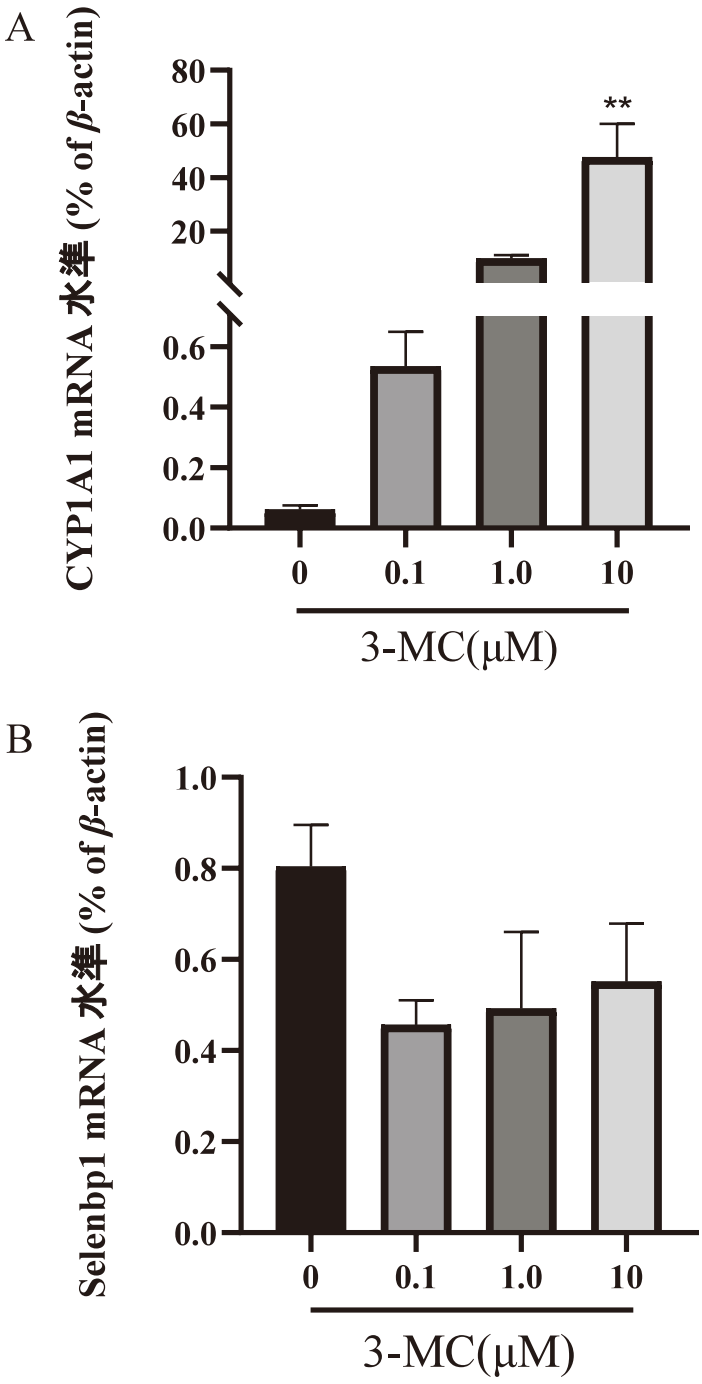


Fig. 1 Effect of 3-MC on CYP1A1 and SELENBP1 mRNA in HepG2 cells. Cells were exposed to 3-MC at 0.1, 1.0 and 10 μM for 24 hr. For the control, the vehicle DMSO was added. Each bar represents the mean ± standard error of the mean (S.E.M.) of 3 samples. Significantly different from control, **, $p<0.01$

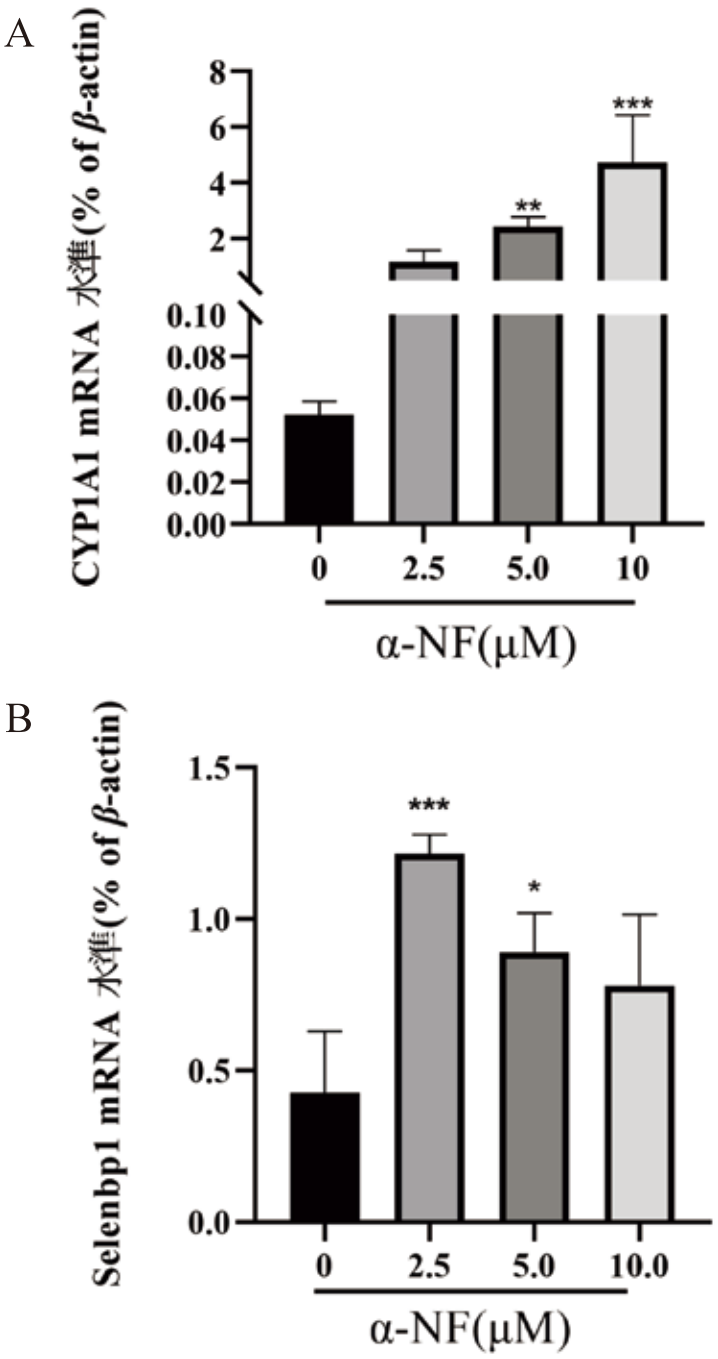


Fig. 2 Effect of α-NF on CYP1A1 and SELENBP1 mRNA in HepG2 cells. Cells were exposed to α-NF at 2.5, 5.0 and 10 μM for 24 hr. For the control, the vehicle DMSO was added. Each bar represents the mean ± standard error of the mean (S.E.M.) of 3 samples. Significantly different from control, * , $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

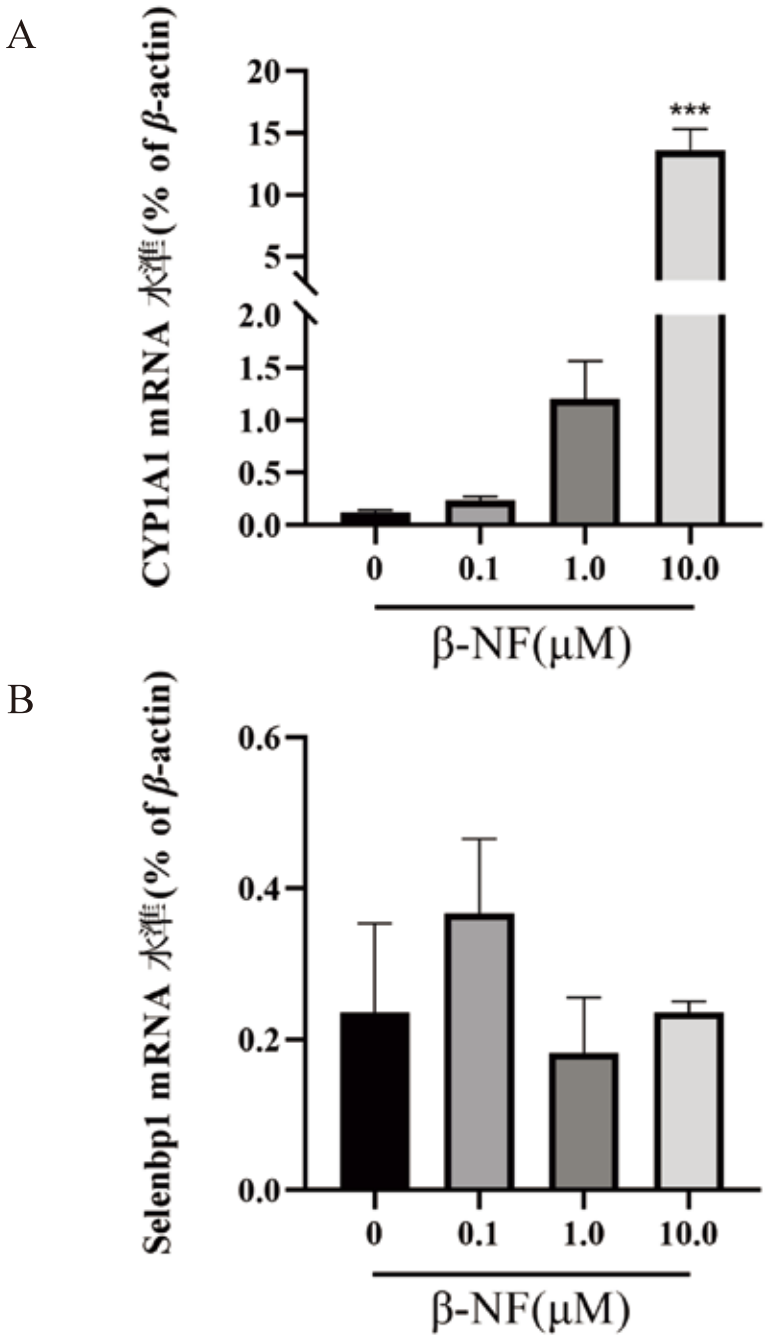


Fig. 3 Effect of β-NF on CYP1A1 and SELENBP1 mRNA in HepG2 cells. Cells were exposed to β-NF at 0.1, 1.0 and 10 μM for 24 hr. For the control, the vehicle DMSO was added. Each bar represents the mean ± standard error of the mean (S.E.M.) of 3 samples. Significantly different from control, ***, $p < 0.001$.

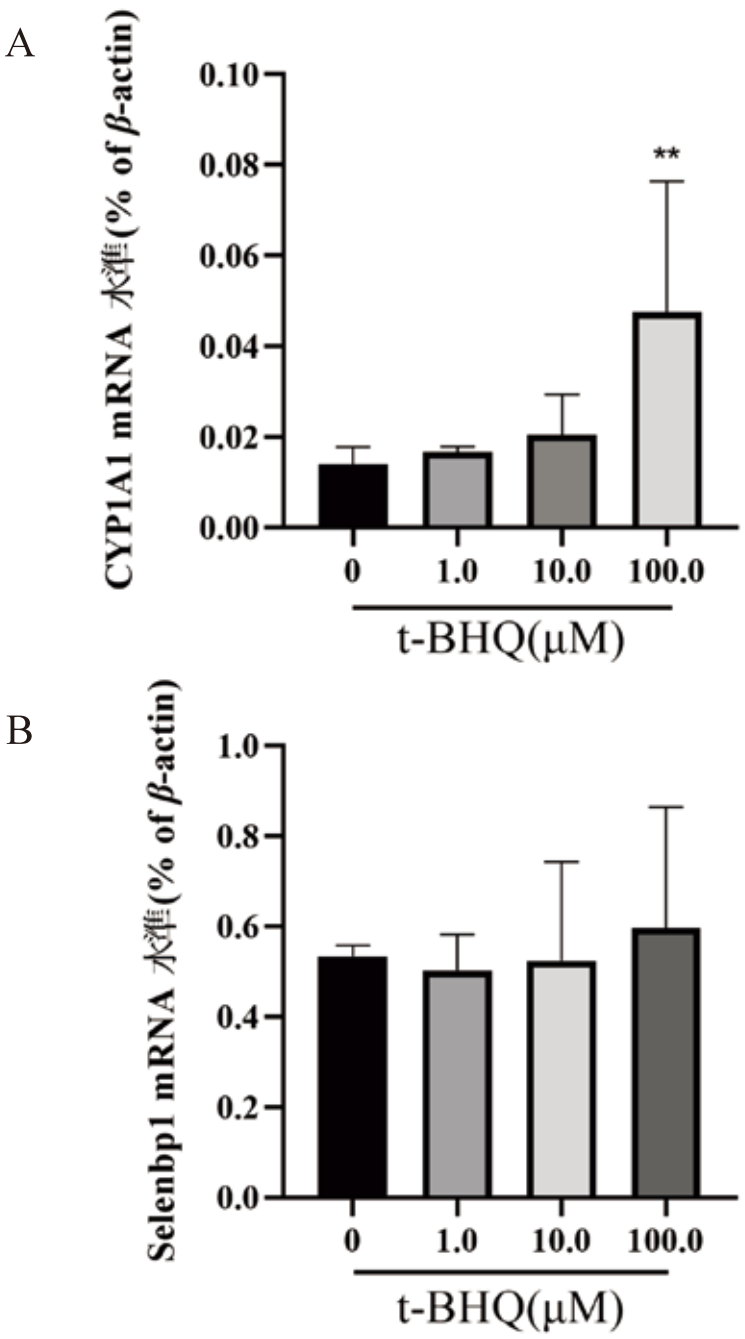


Fig. 4 Effect of t-BHQ on CYP1A1 and SELENBP1 mRNA in HepG2 cells. Cells were exposed to t-BHQ at 1.0, 10.0 and 100.0 μM for 24 hr. For the control, the vehicle DMSO was added. Each bar represents the mean ± standard error of the mean (S.E.M.) of 3 samples. Significantly different from control, **, $p < 0.01$.

分担研究報告書

AhR シグナルの活性化によるヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化抑制メカニズムの解析

研究分担者　　前田　英史　九州大学歯科保存学研究分野教授

研究要旨　AhR シグナルの活性化は、ヒト歯根膜幹細胞の Tenascin-C の発現を抑制する。

A．研究目的

歯槽骨の修復には、骨芽細胞が重要な役割を果たすが、これらの骨芽細胞は、歯根膜細胞に存在する歯根膜幹細胞から分化すると考えられている。我々は油症患者に対する歯科検診を通じて、患者では歯周ポケットが深化する傾向を明らかにしている。そこで、ダイオキシン類による AhR シグナルの活性化が、ヒト歯根膜幹細胞の遺伝子発現を変化させることで、骨芽細胞分化を抑制するとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、ヒト歯根膜幹細胞における骨芽細胞関連遺伝子発現について検証を行うこととした。

B．研究方法

ダイオキシン類（BaP）への曝露により、AhR シグナルを活性化させたヒト歯根膜細胞（BaP-PDLC）と、曝露していないヒト歯根膜細胞（Cont-PDLC）を用いたマイクロアレイ解析を行い、その中から BaP-PDLC にて発現が減少する骨芽細胞関連遺伝子を選出した。次に、BaP への曝露を行った 2 種のヒト歯根膜幹細胞株（1-17 細胞株および 2-23 細胞株）を用いて、選出した遺伝子群における発現量を検証した。

（倫理面への配慮）

ヒト歯根膜およびヒト歯根膜細胞株の使用は、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-PDLC と Cont-PDLC を用いたマイクロアレイ解析の結果から、BaP-PDLC において発現量が Cont-PDLC の 1/2.37 となる Tenascin-C を選出した。次に、BaP への曝露を行った1-17細胞株および2-23細胞株における Tenascin-C 発現量を RT-PCR 法にて検索したところ、いずれにおいても、非曝露群と比較して、減少する傾向にあった。

D．考察

Tenasicin-C は細胞外マトリックスの糖タンパクの一つであり、創傷治癒が生じている組織にて高発現することから（Midwood KS et al. Cell Mol Life Sci. 2011.）、組織の修復に重要な役割を果たす因子であると考えられる。また、Tenasicin-C はメカニカルストレスを与えた骨組織において、発現上昇が認められることから（Webb CM et al. J Bone Miner Res. 1997）、骨組織においても再生に関与する可能性が考えられる。これらの内容から、ヒト歯根膜幹細胞株における Tenasicin-C 発現の減少は、それらの骨芽細胞分化を介した歯槽骨修復能を低下させる可能性が示唆された。

Ｅ．結論

ヒト歯根膜細胞およびヒト歯根膜幹細胞株において、AhR シグナリングの活性化は、Tenascin-C 発現を減少させる。

Ｆ．研究発表

該当無し。

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

該当無し。

分担研究報告書

AhR シグナルの活性化はヒト歯根膜細胞の MMP 発現にどのような変化を及ぼすか

研究分担者　　友清　淳　　九州大学病院歯内治療科診療准教授

研究要旨　ヒト歯根膜およびヒト歯根膜幹細胞株において、AhR シグナルの活性化により MMP12 発現が上昇することが明らかとなった。

A．研究目的

我々はこれまでに AhR シグナルの活性化が、ヒト歯根膜細胞における collagen type Ⅰ (COL1) 発現を減少させる一方、COL1 の分解酵素である Matrix metalloproteinase (MMP) 1 発現を上昇させることを明らかにし、この結果からダイオキシン類が歯周組織の破壊に関与する可能性を示唆してきた。本研究では、AhR の活性化により、MMP1 以外の MMP も発現上昇が起こるかについて検証した。

B．研究方法

Benzo(a)pyrene (BaP) 存在下または非存在下にて 7 日間培養したヒト歯根膜細胞に対し、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現パターンを比較した。次に、別の2種のヒト歯根膜細胞および2種のヒト歯根膜幹細胞株（1-17 細胞株および2-23 細胞株）に対して、RT-PCR 法を用いて MMP12 発現を比較した。

（倫理面への配慮）

ヒト歯根膜およびヒト歯根膜細胞株の使用は、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

マイクロアレイ解析の結果から、BaP による AhR シグナルの活性化により、ヒト歯根膜細胞において MMP12 発現が上昇することが明らかとなった。また、別の 2 種のヒト歯根膜細胞においても、BaP 刺激により MMP12 発現が上昇した。さらに、2 種のヒト歯根膜幹細胞株においても、MMP12 発現が上昇することが明らかとなった。

D．考察

ヒト歯根膜組織においては、AhR シグナルの活性化は MMP1 に加えて MMP12 発現を上昇させる可能性が示唆された。またヒト歯根膜細胞だけではなく、ヒト歯根膜幹細胞株においても、MMP12 発現が上昇したことから、この上昇は細胞の分化度にかかわらず生じる可能性が示唆された。さらに、マウス歯根膜組織においては MMP12 の発現量はさほど高くないが、矯正力をかけた場合に発現が上昇するという報告があることから (Narimiya T et al. J Periodontal Res. 2017.)、AhR シグナルの活性化も矯正力と同様に、歯根膜組織には大きな刺激となっている可能性も推察された。

E．結論

BaP は、ヒト歯根膜およびヒト歯根膜幹細胞株における MMP12 発現を上昇させることが明らかとなった。

F．研究発表

該当無し。

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

該当無し。

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】

Kunimura K, Yamamura K, Nakahara T, Kido-Nakahara M, Uruno T, Fukui Y. Identification of a functional DOCK8 gene polymorphism associated with atopic dermatitis. Allergy. 2022 Dec;77(12):3670-3672. doi: 10.1111/all.15429. Epub 2022 Jul 15.

○Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Matsuda-Taniguchi T, Takai-Yumine A, Takemura M, Yan X, Furue M, Nakahara T. Natural Compounds Tapinarof and Galactomyces Ferment Filtrate Downregulate IL-33 Expression via the AHR/IL-37 Axis in Human Keratinocytes. Front Immunol. 2022 May 19; 13:745997. Doi 10.3389/fimmu.2022.745997. eCollection 2022.

Nakahara T, Takemoto S, Houzawa H, Nakayama M. Desire for Alternative Treatment Options in Patients with Atopic Dermatitis in Japan: Results of a Web-Based Cross-Sectional Study (AD-JOIN Study). Dermatol Ther (Heidelb). 2022 Jun;12(6):1383-1396. doi: 10.1007/s13555-022-00738-6.

Zeze N, Kido-Nakahara M, Tsuji G, Maehara E, Sato Y, Sakai S, Fujishima K, Hashimoto-Hachiya A, Furue M, Nakahara T. Role of ERK Pathway in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis and Its Potential as a Therapeutic Target. Int J Mol Sci. 2022 Mar 23;23(7):3467. doi: 10.3390/ijms23073467.

Ulzii D, Nakahara T, Furue M, Byamba K, Kido-Nakahara M.
Severity strata of patient-oriented eczema measure scores in patients with atopic dermatitis in Mongolia. Int J Dermatol. 2022 Dec;61(12):e469-e472. doi: 10.1111/ijd.16181. Epub 2022 Apr 10.

Yamamura K, Nakahara T. “The Dawn of a New Era in Atopic Dermatitis Treatment”. J Clin Med. 2022 Oct 18;11(20):6145.

Kunimura K, Yamamura K, Nakahara T, Kido-Nakahara M, Uruno T, Fukui Y. “Identification of a functional DOCK8 gene polymorphism associated with atopic dermatitis.” Allergy.

2022 Dec;77(12):3670-3672.
(3) Miura S, Garcet S, Li X, Cueto I, Salud-Gnilo C, Kunjravia N, Yamamura K, Gonzalez J, Murai-Yamamura M, Rambhia D, Krueger JG. “Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL37 Induces TLR8 and Amplifies IL-36γ and IL-17C in Human Keratinocytes”. J Invest Dermatol. 2022 Dec 7: S0022-202X(22)02820-2.

○小牧龍二，行平崇，福永貴之，田中哲子，申敏哲．ベンゾピレンの投与による感覚障害モデルラットに対する Vitamin B2 関連物質β-NMN の効果検討．Journal of Kumamoto Health Science University. 20: 2023.

福永貴之，行平崇，小牧龍二，田中哲子，上村太亮，亀山 広喜，申敏哲．舌への触・圧覚，痛覚刺激が Valproic acid 曝露発達障害モデルラットの記憶力と学習能力に及ぼす影響．Journal of Kumamoto Health Science University. 19：51－62, 2022

小牧龍二，行平崇，福永貴之，田中哲子，申敏哲．ベンゾピレンの投与による感覚障害モデルラットに対する Vitamin B2 関連物質β-NMN の効果検討．熊本保健科学大学研究誌．20：01－10, 2023.

Y. Fujii, K. H. Harada, Y. Ito, M. Yoshitake, C. Matsunobu, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, A. Koizumi, and K. Haraguchi, Profiles and determinants of dicofol, endosulfans, mirex, and toxaphenes in breast milk samples from 10 prefectures in Japan. Chemosphere, 311 (2023) 137002.

Yuan M, Sano H, Nishino T, Chen H, Li RS, Matsuo Y, Nishida K, Koga T, Takeda T, Tanaka Y, Ishii Y : α-Lipoic acid eliminates dioxin-induced offspring sexual immaturity by improving abnormalities in folic acid metabolism. Biochem. Pharmacol. 210 : 115490, 2023. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115490.