令和５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 3～令和 5 年度　総合研究報告書
令和 5 年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　辻　学

令和 6（2024）年 5 月

令和 3～令和 5 年度　総合研究報告書
令和 5 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３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　講師）

緒方　英紀　　（九州大学病院脳神経内科　助教）

小野塚大介　　（国立循環器病研究センター 疫学研究推進室　室長）

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）

古賀　信幸　　（中村学園大学栄養科学部　教授）

申　　敏哲　　（熊本保健科学大学リハビリテーション学科　教授）

園田　康平　　（九州大学大学院医学研究院眼科学分野　教授）

月森　清巳　　（福岡市立こども病院　副院長）

辻　　博　　（北九州若杉病院 西日本総合医学研究所　所長）

津嶋　秀俊　　（九州大学病院整形外科　助教）

戸髙　尊　　（公益財団法人北九州生活科学センター　室長）

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　　（九州大学病院皮膚科　講師）

濵田　直樹　　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教）

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歯科保存学研究分野　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

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）
太田　千穂　（中村学園大学栄養科学部　准教授）
梶原　淳睦　（公益財団法人北九州生活科学センター　参事）
加藤　聖子　（九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学　教授）
北岡　隆　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 眼科・視覚科学分野　教授）
小木曽俊孝　（福岡県保健環境研究所計測技術課　主任技師）
佐藤　環　（福岡県保健環境研究所生活化学課　主任技師）
新谷　依子　（福岡県保健環境研究所生活化学課　研究員）
鈴木　邦裕　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野　助教）
高尾　佳子　（福岡県保健環境研究所企画情報管理課　研究員）
高橋　浩司　（福岡県保健環境研究所企画情報管理課　課長）
千々和勝己　（公益財団法人北九州生活科学センター　常務理事）
飛石　和大　（福岡県保健環境研究所生活化学科　専門研究員）
中村　優子　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　看護師）
平川　周作　（福岡県保健環境研究所水質課　研究員）
平川　博仙　（福岡県保健環境研究所生活化学課　専門研究員）
広瀬　勇気　（公益財団法人北九州生活科学センター　検査員）
古江　増隆　（九州大学　名誉教授）
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）
村山　直也　（九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　助教）
諸隈　誠一　（九州大学大学院医学研究院統合基礎看護学　教授）
柳原　豊史　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野）
吉冨　泉　（諫早総合病院歯科口腔外科　科長）
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）

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　　（九州大学病院脳神経内科　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歯科保存学研究分野　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）
太田　千穂　（中村学園大学栄養科学部　准教授）
梶原　淳睦　（公益財団法人北九州生活科学センター　参事）
加藤　聖子　（九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学　教授）
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）
平川　博仙　（福岡県保健環境研究所生活化学課　専門研究員）
広瀬　勇気　（公益財団法人北九州生活科学センター　検査員）
古江　増隆　（九州大学　名誉教授）
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）
諸隈　誠一　（九州大学大学院医学研究院統合基礎看護学　教授）
柳原　豊史　（九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野）
吉冨　泉　（諫早総合病院歯科口腔外科　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）

令和５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　講師）

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　　（富山大学学術研究部医学系和漢診療学講座　教授）

香月　進　　（福岡県保健環境研究所　所長）

加藤　聖子　　（九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学分野　教授）

川崎　五郎　　（長崎大学口腔腫瘍治療学分野　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）

辻　　博　　（北九州若杉病院 西日本総合医学研究所　所長）

藤原　稔史　　（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　　（北海道大学歯科保存学教室　教授）

鳥巣　剛弘　　（九州大学病院消化管内科　講師）

中原　剛士　　（九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野　教授）

冬野　洋子　　（九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野　助教）

前田　英史　　（九州大学大学院歯学研究院歯科保存学研究分野　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）

市村　清隆　（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）

佐藤　環　（福岡県保健環境研究所生活化学課　研究員）

重富　敬太　（福岡県保健環境研究所生活化学課　主任技師）

新谷　依子　（福岡県保健環境研究所生活化学課　研究員）

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）

髙野　智嗣　（九州大学病院呼吸器科　助教）

坪内　和哉　（九州大学病院呼吸器科　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）

中島　淳一　（福岡県保健環境研究所企画情報管理課　専門研究員）

中村　麻子　（福岡県保健環境研究所生活化学科　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）

濱田　律雄　（九州大学環境発達医学研究センター　特任助教）

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ウイルス課　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 3～令和 5 年度総合研究報告書

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

II．令和 5 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…… 7
研究代表者　辻　学

III．令和 5 年度分担研究報告書

01. 油症患者の追跡調査 ……15
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

02. 油症検診受診者の血液中 PCDF 等（ダイオキシン類）濃度実態調査……17
研究分担者　香月　進
研究協力者　堀　就英，飛石　和大，中村　麻子，新谷　依子，佐藤　環，
重富　敬太，古谷　貴志，平川　周作，戸高　尊，広瀬　勇気
宮脇　崇

03. 油症検診データを用いた基礎的解析 ……28
研究分担者　香月　進
研究協力者　高尾　佳子，中島　淳一，熊谷　博史

04. 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再検討 ‥‥34
研究分担者　戸高　尊
研究協力者　広瀬　勇気，上原口　奈美，梶原　淳睦，市村　清隆

05. カネミ油症患者の漢方治療に対する意識調査 ……40
研究分担者　貝沼　茂三郎

06. 油症暴露による継世代健康影響に関する追加研究
-油症２性における卵巣予備能と油症暴露との関連-……44
研究分担者　加藤　聖子
研究協力者　濱田　律雄

07. 油症における末梢血 CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の検討……49
研究分担者　辻　博

08. 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……54
研究分担者　岡本　勇
研究協力者　坪内　和哉，髙野　智嗣

09. 抗酸化作用を有するポリアミンが消化管上皮の細胞死に与える影響……58
研究分担者　鳥巣　剛弘

10. 油症検診における眼病変の追跡調査……62
研究分担者　園田康平

11. 油症検診受診者における角膜内皮細胞……63
研究分担者　上松聖典
研究協力者　北岡　隆

12. カネミ油症患者における頭痛・頭重のパターンに関する文献的考察と他の中毒性疾患
による頭痛との差異の研究……65
研究分担者　緒方　英紀

13. 行動量計と分子生物学的手法を用いたベンゾピレン中毒ラットに対する
a 5-deazaflavin derivative(TND)の効果検討……68
研究分担者　申　敏哲
研究協力者　吉村　惠

14. 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……75
研究分担者　石井　祐次

15. ヒト末梢感覚神経における AHR シグナルを介した皮膚炎の制御機構の解明……90
研究分担者　山村　和彦

16. 油症患者における皮膚ガス分析のデータマイニング……92
研究分担者　室田　浩之
研究協力者　芦田　美輪

17. 皮膚の慢性炎症による色素沈着における AHR リガンドの影響……96
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……98
研究分担者　冬野　洋子

19.　2,4,6-三塩素置換型 PCB140 のラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる
代謝比較……99
研究分担者　太田　千穂
研究協力者　古賀　信幸

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……107
研究分担者　石井　祐次

21. 芳香族炭化水素受容体を介した骨代謝制御機構に関する研究 ·····119
研究分担者　藤原　稔史

22. 油症患者における口腔粘膜疾患と色素沈着との関連について ·····121
研究分担者　川崎　五郎, 吉冨　泉

23. AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制がヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響について·····124
研究分担者　前田　英史

24. AhR シグナルの活性化を介したヒト歯根膜細胞の MMP12 発現の増加は歯根膜組織にどのような影響を及ぼすか ·····126
研究分担者　友清　淳

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 ·····128

総合研究報告書

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

研究代表者　辻学　九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　准教授

研究要旨

【背景】油症はPCB類やダイオキシン類の摂取による混合中毒である。ダイオキシン類の生体への慢性影響については十分に解明されていない。

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

【研究成果】

１）油症患者の支援と治療研究の推進

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

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

③油症患者血液中ダイオキシン類分析法の検討：新しい分析カラムを用いて血液中PCB異性体分析の昇温条件を詳細に検討した結果、各異性体の分離を維持しながら分析時間も30分程度となり、従来と比較して30分短縮した。

２）臨床的追跡調査・疫学研究

①死因調査：油症患者の 55 年間の追跡調査を実施し、死亡リスクを検証した。H30年度より死因調査の基盤作りに取り掛かり、R2年度に死因調査の結果をまとめ、論文報告した。その結果、一般の人と比較すると、男性の油症患者では、全がん（SMR: 1.22, 95% CI: 1.02-1.45）、肺がん（SMR: 1.59, 95% CI: 1.12-2.19）の死亡リスクが高かった。また、女性の油症患者では、肝がん（SMR: 2.05, 95% CI: 1.02-3.67）の死亡リスクが高いことが明らかとなった。

②血中ダイオキシン類濃度測定：毎年認定患者と未認定者について 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度を測定し、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）濃度を算出し、結果を集計している。

③ダイオキシン類代謝：一般人と比較して油症患者において特徴的に低い2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl（CB118）代謝の特徴について in vitro 解析により調査した。。

④油症検診における眼病変に関する研究：油症患者の眼科領域における臨床所見は徐々に軽くなっていることがわかった。

⑤油症患者における口腔内病変に関する研究：油症患者にみられる口腔内の色素沈着と口腔粘膜疾患の発生との相関性は認められなかった。⑥油症暴露による継世代健康影響に関する追加研究：以前の報告と同様に油症曝露が油症2世の卵巣予備能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

⑦油症患者における頭痛・頭重に関する研究：頭痛を有する群と頭痛の無い群で

血中 PCB 平均濃度を比較したところ，両群間に有意な差は認めなかった。⑧油症患者における免疫機能の検討：油症患者と対照群の間で血中 CD4 陽性 T 細胞、制御性 T 細胞の絶対数と比率の差は見られなかった。
（３）基礎的研究
①ダイオキシン類による気道障害の機構：気道上皮細胞におけるシグナル制御タンパク質α（SIRPα）経路の活性化は、ムチン過剰分泌を抑制するため、油症気道傷害の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。
②肝臓における PCB 異性体の代謝経路：ラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾームを用いて、PCB 異性体の代謝経路の一部を明らかにした。
③皮膚の慢性炎症による色素沈着における AHR リガンドの影響:皮膚の慢性炎症に関与するエンドセリン-1 (ET-1)刺激により、ヒトメラノサイトにおけるメラニン関連因子の発現増加がみられたが、AHR リガンドはその発現増加を抑制しなかった。
④母児曝露による性未成熟機構の解析：AHR 欠損により精巣に認められた重量低下とその関連因子の変動は、副腎および視床下部においては限定的であり、精巣特異的作用であることが示唆された。
⑤ダイオキシン誘導性蛋白質 Selenbp1 の役割：Selenbp1 は脂質代謝に関与し、酸化ストレスを軽減する役割を明らかにした。hSELENBP1 の発現誘導は hESR1 および AHR を介する可能性が示唆された。
⑥ダイオキシン類による神経障害の機構：ベンゾピレンがミトコンドリアに何らかの影響を与え、機能不全を起こすことによってしびれなどの神経異常をきたした可能性が考えられた。一方で TND はそれを回復させる可能性が考えられた。
⑦抗酸化作用を有するポリアミンが消化管上皮の細胞死に与える影響:ポリアミン類の中でもスペルミジンは酸化ストレスに防御的に働くことが示された。
⑧AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制がヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響:AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制はヒト歯根膜細胞のコラーゲン形成能を抑制することがわかった。
⑨芳香族炭化水素受容体を介した骨代謝制御機構に関する研究：AhR は骨代謝を制御する破骨細胞と骨芽細胞の分化に従い発現が増加し、ベンゾピレンはこれらの分化を阻害することがわかった。
⑩膠原病の皮疹形成機序における AHR の役割：膠原病様ケラチノサイトモデルに対する AHR リガンドの抗炎症作用が明らかになった。
⑪ヒト末梢感覚神経における AHR シグナルを介した皮膚炎の制御機構の解明：ヒト末梢感覚神経細胞では AHR の発現が低い一方で、近年ダイオキシン類に対する防御機構で注目されている Pyruvate kinase isoform M2 (PKM2) が恒常的に発現しており、環境汚染物質 PM2.5 でその発現が増強されている可能性が示された。

Ａ．研究目的

PCB とダイオキシンおよびダイオキシン類似化合物（以下、ダイオキシン類）の混合中毒である油症が発生して 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。
５．死因・次世代調査
ダイオキシンの生体への影響、次世代への影響を検証する。
６．台湾油症との情報交換
これまでの研究を通じて得た知識を相補的に交換し、互いの患者の健康増進につとめる。また、これからの研究の方向性を議論し、よりよい研究を目指す。
７．検診体制の見直し
患者の症状の変遷と高齢化にあわせて検診科目、検診項目を見直す。
８．臨床試験の実施
油症患者の様々な症状を軽減するために漢方薬の臨床試験を施行する。
９．油症対策委員会の開催
患者代表者からなる油症対策委員会を開催し、研究成果の公表および次年度の実態調査票の改正点の検討、医療者向けのパンフレット案の検討を行う。
１０．情報の提供
本研究を通じて得られた知識で、情報公開可能なものについては極力情報公開につとめる。パンフレット、ホームページ、油症ニュース、あるいは書面で公表し、油症対策委員会で患者代表者に説明を行う。

Ⅱ．九州大学油症治療研究班と長崎油症研究班が行う調査、治療および研究

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

Ｃ．結果および考察

１）油症患者の支援と治療研究の推進

① 油症相談支援員制度の拡充:
高齢化や社会的偏見により検診を受診していない患者の健康状態や近況を把握し、様々な相談を受けるために、2002 年に患者の集中する福岡県、長崎県、広島県で油症相談員事業を開始した。2016 年には、相談支援員制度を施行した。定期的にセミナーを開催し、情報共有に努めている。
② 検診データベースの集積と構築：
健康実態調査、一斉検診の実施、検診結果を集積した患者データベースを更新した。患者および健常人の血中の PCDF 類の実態調査を行った。実施した血液中ダイオキシン類濃度の分析精度管理の解析を行った。その結果、当所を含む国内 6 機関の定量値は概ね一致しており、各機関で血液中ダイオキシン類の濃度測定が適切に実施されていることが分かった。

油症検診受診者の傾向把握のため、検診票を収集し集計を行った。自覚症状では全身倦怠感の訴えが最も多く、他覚所見では肝・胆・脾エコーの有所見率が高かった。
③ 油症患者血液中ダイオキシン類分析法の検討：新しい分析カラムを用いて血液中PCB異性体分析の昇温条件を詳細に検討した結果、各異性体の分離を維持しながら分析時間も 30 分程度となり、従来と比較して 30 分短縮した。

２）臨床的追跡調査・疫学研究

① 死因調査：油症患者の 55 年間の追跡調査を実施し、死亡リスクを検証した。H30 年度より死因調査の基盤作りに取り掛かり、R2 年度に死因調査の結果をまとめ、論文報告した。その結果、一般の人と比較すると、男性の油症患者では、全がん（SMR: 1.22, 95% CI: 1.02-1.45）、肺がん（SMR: 1.59, 95% CI: 1.12-2.19）の死亡リスクが高かった。また、女性の油症患者では、肝がん（SMR: 2.05, 95% CI: 1.02-3.67）の死亡リスクが高いことが明らかとなった。
② 次世代調査：次世代の自覚症状と親の PCDF の濃度に相関関係があるかを調査したところ、親の PCDF 血中濃度が、50 pg/g lipids 未満と 50 pg/g lipids 以上で次世代の方々の自覚症状を比較したが、統計学的な差は認めなかった。次に、次世代における先天性異常の発生率と一般人口における先天性異常の発生率に統計学的な差があるかを検討した。次世代調査の結果と先天性異常データベースの統計結果をフィッシャーの正確確率検定を用いて解析したところ、口唇・口蓋裂について、次世代に発生率が高い傾向があった。一方で、心室中隔欠損症については次世代に明確な傾向は認めなかった。
③ 血中ダイオキシン類濃度測定：毎年認定患者と未認定者について 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度を測定し、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）濃度を算出し、結果を集計している。
④ ダイオキシン類代謝：一般人と比較して油症患者において特徴的に低い 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) 代謝の特徴について in vitro 解析により調査した。これまで 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からヒトチトクロームP450(CYP)2A6による代謝の可能性が示唆されている。そこで、CB118 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 を HRGC/HRMS で分析した。その結果、塩素が一つ脱離した 4 塩素化体の水酸化 PCB 異性体の生成を確認した。
⑤ 油症検診における眼病変に関する研究：受診者の高齢化が進み臨床所見は少なくなってきており、油症患者の眼科領域における臨床所見は徐々に軽くなっていることがわかった。
⑥ 油症患者における口腔内病変に関する研究：歯科検診を受診した患者を対象に口腔粘膜疾患の発生に関する検討を行ったところ、対象 175 名中 12 名に口腔粘膜疾患の発現がみられたが、油症患者にみられる口腔内の色素沈着と口腔粘膜疾患の発生との相関性は認められなかった。
⑦ 油症暴露による継世代健康影響に関する追加研究：油症発生後に油症患者より出生した児(油症 2 世) の卵巣機能と油症曝露との関連について追加検討した。卵巣機能の指標として卵巣の予備能を反映する血中抗ミュラー管ホルモン(AMH)濃度を測定したところ、油症 2 世の血中 AMH 濃度(z-score)の中央値(範囲)は、-1.06(-3.02-4.92)と同年代の健常女性と比較して低い傾向にあった。以前の報告と同様に油症曝露が油症 2 世の卵巣予備能に影響を及ぼすことが示唆された。
⑧ 油症患者における頭痛・頭重に関する研究：頭痛を有する群と頭痛の無い群で血中 PCB 平均濃度を比較したところ，両群間に有意な差は認めなかった。
⑨ 油症患者における免疫機能の検討：油症患者と対照群の間で血中 CD4 陽性 T 細胞、CD4CD25FOXP3 陽性制御性 T 細胞の絶

対数と比率の差は見られなかった。また、患者群で血中 PCB 濃度と CD4CD25FOXP3 陽性制御性 T 細胞の相関を認めなかった。

３）基礎的研究

① ダイオキシン類による気道障害の機構：気道上皮細胞におけるシグナル制御タンパク質α（SIRPα）経路の活性化は、ムチン過剰分泌を抑制するため、油症気道傷害の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

② 肝臓における PCB 異性体の代謝経路：ラット、ヒト、モルモット肝ミクロゾームを用いて、PCB 異性体の代謝経路の一部を明らかにした。その結果、1)PCB140 は、246 型の PCB155、PCB182 や PCB188 と共通して、代謝され易いこと、2)M1 生成活性は、ラット＞ヒト＞モルモットであること、3)M1 の生成には主に PB 誘導性の CYP2B 酵素が関与していること、が明らかとなった。

③ 皮膚の慢性炎症による色素沈着における AHR リガンドの影響：皮膚の慢性炎症に関与するエンドセリン-1 (ET-1)刺激により、ヒトメラノサイトにおけるメラニン関連因子の発現増加がみられたが、AHR リガンドはその発現増加を抑制しなかった。

④ 母児曝露による性未成熟機構の解析：AHR 欠損により精巣に認められた重量低下とその関連因子の変動は、副腎および視床下部においては限定的であり、精巣特異的作用であることが示唆された。

⑤ ダイオキシン誘導性蛋白質 Selenbp1 の役割：Selenbp1 は脂質代謝に関与し、酸化ストレスを軽減する役割を明らかにした。hSELENBP1 の発現誘導は hESR1 および AHR を介する可能性が示唆された。

⑥ ダイオキシン類による神経障害の機構：ベンゾピレンがミトコンドリアに何らかの影響を与え、機能不全を起こすことによってしびれなどの神経異常をきたした可能性が考えられた。一方で TND はそれを回復させる可能性が考えられた。

⑦ 抗酸化作用を有するポリアミンが消化管上皮の細胞死に与える影響：ポリアミン類の中でもスペルミジンは抗酸化作用があることが知られており、スペルミジンによる細胞保護効果は油症などの酸化ストレスに防御的に働くことが示された。

⑧ AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制がヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響：AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制はヒト歯根膜細胞のコラーゲン形成能を抑制することがわかった。

⑨ 芳香族炭化水素受容体を介した骨代謝制御機構に関する研究：AhR は骨代謝を制御する破骨細胞と骨芽細胞の分化に従い発現が増加し、ベンゾピレンはこれらの分化を阻害することがわかった。

⑩ 膠原病の皮疹形成機序における AHR の役割：膠原病様ケラチノサイトモデルに対する AHR リガンドの抗炎症作用が明らかになった。

⑪ ヒト末梢感覚神経における AHR シグナルを介した皮膚炎の制御機構の解明：ヒト末梢感覚神経細胞では AHR の発現が低い一方で、近年ダイオキシン類に対する防御機構で注目されている Pyruvate kinase isoform M2 (PKM2) が恒常的に発現しており、環境汚染物質 PM2.5 でその発現が増強されている可能性が示された。

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。すなわち、油症患者、そして継世代の症状・所見、血中ダイオキシン類濃度、および個々の経時的変化を解析することは、ダイオキシン類の慢性的な生体への影響を解明することにつ

ながる。

疫学調査では、油症発生から 55 年の追跡調査による死因調査で、油症患者は、がんのリスクが高いことが明らかとなった。特に女性では肝臓がんの発生が２倍以上高く、この結果は、油症検診で肝臓に関する検査（血液検査、腹部エコー）がより重要となる可能性がある。さらに、油症暴露による継世代健康影響に関する研究では、以前の報告と同様に油症曝露が油症 2 世の卵巣予備能に影響を及ぼす可能性が示唆された。一方で、高齢化に伴い、油症患者に見られる眼症状は徐々に軽減してきた。また、油症患者にみられる口腔内の色素沈着と口腔粘膜疾患の発生との相関性は認められず、頭痛と血中 PCB 濃度も関連は認められなかった。

基礎的研究においては、芳香族炭化水素受容体が、薬物代謝に加えて、気道障害、感覚障害、性分化・生殖障害にも重要な働きをしていることが明らかとなった。また、PCB の肝臓における代謝や AHR の骨代謝における役割なども研究が進んでいる。TND によるベンゾピレンの神経症状における回復効果や、スペルミジンの酸化ストレスに対する防御効果など将来的に治療につながりうる研究も進んでいる。

以上、ダイオキシン類の慢性影響、生体内動態、毒性機構、次世代への影響について、疫学・臨床医学・基礎医学の観点から多面的に明らかになりつつある。これらの結果を踏まえて、将来的に、油症の症状を緩和する新しい治療薬の発見・開発につなげたいと考えている。

Ｅ．健康危険情報

なし。

総括研究報告書

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

研究代表者　辻学　九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター　准教授

研究要旨

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

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

【研究成果】

臨床的追跡調査・疫学研究

（１）油症患者の支援と治療研究の推進

①健康実態調査、一斉検診の実施、検診結果を集積した患者データベースを更新した。令和4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

①2022年度に測定を行った認定患者221名と未認定者215名について結果集計を行った。認定患者の2,3,4,7,8-PeCDF濃度は平均42 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)濃度は平均31 pg TEQ/g-fatであった。未認定者の2,3,4,7,8-PeCDF濃度は平均5.3 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は8.8 pg TEQ/g-fatであった。

②一般人と比較して油症患者において特徴的に低い2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl（CB118）代謝の特徴についてin vitro解析により調査した。これまで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からヒトチトクローム P450（CYP）2A6による代謝の可能性が示唆されている。そこで、CB118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をHRGC/HRMSで分析した。その結果、塩素が一つ脱離した4塩素化体の水酸化PCB異性体の生成を確認した。現在、2023年度の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の測定対象者（364名）について測定及び解析作業を継続している。

③新しい分析カラムを用いて血液中 PCB 異性体分析の昇温条件を詳細に検討した結果、各異性体の分離を維持しながら分析時間も30分程度となり、昨年度と今年度で分析時間を30分短縮した。

④カネミ油症発生後に油症患者より出生した児(油症2世）の卵巣機能と油症曝露との関連について追加検討したところ、以前の報告と同様に油症曝露が油症2世の卵巣予備能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

⑤頭痛を有する群と頭痛の無い群で血中 PCB 平均濃度を比較したところ，両群間に有意な差は認めなかった。
⑥令和 5 年度油症患者の眼症状の発生およびその経過を調査したところ、受診者の高齢化が進み臨床所見は少なくなってきており、油症患者の眼科領域における臨床所見は徐々に軽くなっていることがわかった。
⑦令和 5 年度の長崎県油症検診において歯科検診を受診した患者を対象に口腔粘膜疾患の発生に関する検討を行ったところ、対象 175 名中 12 名に口腔粘膜疾患の発現がみられたが、油症患者にみられる口腔内の色素沈着と口腔粘膜疾患の発生との相関性は認められなかった。
⑧油症患者と対照群の間で血中 CD4 陽性細胞、CD4CD25FOXP3 陽性細胞の絶対数と比率の差は見られなかった。また、患者群で血中 PCB 濃度と CD4CD25FOXP3 陽性細胞の相関を認めなかった。

（３）基礎的研究
①気道上皮細胞におけるシグナル制御タンパク質α（SIRPα）経路の活性化は、ムチン過剰分泌を抑制するため、油症気道傷害の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。
②246 型 PCB の 1 つである 2,3,4,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB140)につき、ラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べた結果、1)PCB140 は、246 型の PCB155、PCB182 や PCB188 と共通して、代謝され易いこと、2)M1 生成活性は、ラット＞ヒト＞モルモットであること、3) M1 の生成には主に PB 誘導性の CYP2B 酵素が関与していること、が明らかとなった。
③皮膚の慢性炎症に関与するエンドセリン-1 (ET-1)刺激により、ヒトメラノサイトにおけるメラニン関連因子の発現増加がみられたが、AHR リガンドはその発現増加を抑制しなかった。
④AHR 欠損により精巣に認められた重量低下とその関連因子の変動は、副腎および視床下部においては限定的であり、精巣特異的作用であることが示唆された。また、hSELENBP1 の発現誘導は hESR1 および AHR を介する可能性が示唆された。
⑤ベンゾピレンがミトコンドリアに何らかの影響を与え、機能不全を起こすことによってしびれなどの神経異常をきたした可能性が考えられた。一方で TND はそれを回復させる可能性が考えられた。
⑥ヒト歯根膜細胞において、AhR シグナルの活性化により MMP12 遺伝子発現量に加え、タンパク合成量および分泌量が上昇することが明らかとなった。
⑦AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制はヒト歯根膜細胞のコラーゲン形成能を抑制することがわかった。
⑧ポリアミン類の中でもスペルミジンは抗酸化作用があることが知られており、スペルミジンによる細胞保護効果は油症などの酸化ストレスに防御的に働くことが示された。
⑨AhR は骨代謝を制御する破骨細胞と骨芽細胞の分化に従い発現が増加し、ベンゾピレンはこれらの分化を阻害することがわかった。
⑩膠原病様ケラチノサイトモデルに対する AHR リガンドの抗炎症作用が明らかになった。
⑪ヒト末梢感覚神経細胞では AHR の発現が低い一方、近年ダイオキシン類に対する防御機構で注目されている Pyruvate kinase isoform M2 (PKM2) が恒常的に発現しており環境汚染物質 PM2.5 でその発現が増強されている可能性が示された。

Ａ．研究目的

PCB とダイオキシンおよびダイオキシン類似化合物（以下、ダイオキシン類）の混合中毒である油症が発生して 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

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を行なった。具体的には、次世代の自覚症状と親の PCDF の濃度に相関関係があるかを調査したところ、親の PCDF 血中濃度が、50 pg/g lipids 未満と 50 pg/g lipids 以上で次世代の方々の自覚症状を比較したが、統計学的な差は認めなかった。次に、次世代における先天性異常の発生率と一般人口における先天性異常の発生率に統計学的な差があるかを検討した。次世代調査の結果と先天性異常データベースの統計結果をフィッシャーの正確確率検定を用いて解析したところ、口唇・口蓋裂について、次世代に発生率が高い傾向があった。一方で、心室中隔欠損症については次世代に明確な傾向は認めなかった。最後に、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．油症検診データを用いた基礎的解析
2022 年度に実施された油症検診受診者の傾向把握のため、検診票を収集し集計した。検診受診者数は 570 人(認定及び同居家族認定 337 人、未認定 233 人)だった。2022 年度検診は、次世代調査参加者の受診により、以前の検診に比べ未認定者や若い世代の割合が増えていた。

８．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再検討
油症患者血液中ポリ塩化ビフェニール(PCB)の異性体分析に使用していたカラムが、新しい新規ポリマーを固定相に配合したカラムに変更されたため、昨年度変更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。血液中 PCB 異性体分析の昇温条件を詳細に検討した結果、各異性体の分離を維持しながら、分析時間も 30 分程度となり、昨年度と今年度で、分析時間を 30 分短縮した。

II. 臨床的追跡調査・疫学研究

１．油症検診の追跡調査

１）油症患者の追跡調査
油症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、油症患者の生存・死亡情報をアップデートした。

２）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
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。2022 年度に測定を行った認定患者221名と未認定者215名について結果集計を行った。認定患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は平均 42 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）濃度は平均 31 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は平均 5.3 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 8.8 pg TEQ/g-fat であった。
一般人と比較して油症患者において特徴的に低い 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) 代謝の特徴についてin vitro解析により調査した。これまで 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からヒトチトクローム P450（CYP）2A6 による代謝の可能性が示唆されている。そこで、CB118 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 を HRGC/HRMS で分析した。その結果、塩素が一つ脱離した 4 塩素化体の水酸化 PCB 異性体の生成を確認した。
現在、2023 年度の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の測定対象者（364 名）について測定及び解析作業を継続している。

２．油症検診における眼病変の追跡調査
令和 5 年度油症患者の眼症状の発生およびその経過を調査した。受診者の高齢化が進み臨床所見は少なくなってきている。また、油症患者の眼科領域における臨床所見は徐々に軽くなっている。

３．油症検診受診者における角膜内皮細胞
角膜内皮細胞は角膜の透明性を保つために重要である。今回油症認定患者の角膜内皮細胞密度と、血中の PeCDF 濃度との関連を調査した。

４．油症患者における口腔粘膜疾患と色素沈着との関連について
令和 5 年度の長崎県油症検診において歯科検診を受診した患者を対象に口腔粘膜疾患の発生に関する検討を行った。対象 175 名中 12 名に口腔粘膜疾患の発現がみ

られた。疾患の内訳としては、白板症 4 例、腫瘤性病変 1 例、歯肉増殖 1 例、アフタ性口内炎 4 例、黒毛舌 1 例、口腔扁平苔癬 1 例であった。口腔粘膜色素沈着は上顎歯肉 44 例（発現率 25.1%）、下顎歯肉 53 例（30.3%）、右頬粘膜 20 例（11.4%）、左頬粘膜 33 例(18.9%)、口蓋 18 例(10.3%)、上唇 63 例(36%)および下唇 70 例(40%)にみられたが、口腔粘膜疾患の発生との相関性は認められなかった。

５．油症における末梢血 CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の検討

2023 年度福岡県油症一斉検診受診者 65 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 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞を測定した。油症患者 43 例では対照者 14 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 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の比率あるいは絶対密度は油症患者と対照者に差をみなかった。血中 PCB 濃度と CD4 陽性細胞の総リンパ球に対する比率あるいは絶対数の間に相関をみなかった。血中 PCB 濃度と CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の比率あるいは絶対密度の間に相関をみなかった。

６．油症患者における皮膚ガス分析のデータマイニング

油症患者と健常対照者から採取した皮膚ガス中に含まれる揮発性の成分を網羅的比較分析した。これまでに収集したデータを機械学習し、油症患者に特徴的に検出された皮膚ガス成分を抽出した。

７．カネミ油症患者における頭痛・頭重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頭痛との差異の研究

文献的検討により，カネミ油症患者における頭痛・頭重の頻度・性状を確認した．一斉検診の結果では，半数以上で頭痛を有していることが報告されている．一方，神経学的検査で他覚的な異常所見は認めず，頭痛の性状はいわゆる緊張性頭痛または機能性頭痛に酷似していた．また，頭痛を有する群と頭痛の無い群で血中 PCB 平均濃度を比較したところ，両群間に有意な差は認めなかった．慢性期の同症患者に自覚される頭痛・頭重に PCB の関与があるのか慎重な判断が必要である。

８．カネミ油症患者の漢方治療に対する意識調査

カネミ油症患者の漢方治療に対する実態調査を施行した。漢方薬を服用している患者は頓服も含めて 24.2%(306/1262)だった。また服用歴のある患者で現在漢方薬を服用していない理由としては‘漢方薬の効果不明’が 31.9%（72/226）と最も多かった。一方で服用歴のない患者では‘症状がない’が 29.5%（215/730）と最も多かったが、漢方薬の効果不明も 27.5%(201/730)だった。また服用歴のない患者は 31.0%（226/730）と意外と多くの患者が漢方薬に関しての情報を求めていることがわかった。

９．油症暴露による継世代健康影響に関する追加研究 -油症 2 性における卵巣予備能と油症暴露との関連-

カネミ油症発生後に油症患者より出生した児(油症 2 世）の卵巣機能と油症曝露との関連について追加検討した。卵巣機能の指標として卵巣の予備能を反映する血中抗ミュラー管ホルモン(AMH)濃度を測定したところ、油症 2 世の血中 AMH 濃度(z-score)の中央値(範囲)は、-1.06(-3.02-4.92)と同年代の健常女性と比較して低い傾向にあった。以前の報告と同様に油症曝露が油症 2 世の卵巣予備能に影響を及ぼすことが示唆された。

III. 基礎的研究

１．ダイオキシン類による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

ヒト杯細胞株 NCI-H292 細胞において、肺サーファクタント蛋白 D はシグナル制御

タンパク質α（SIRPα）を介してBenzo[a]pyrene(BaP)によって誘導されるERKのリン酸化とムチン産生亢進を制御する。気道上皮細胞における SIRPα経路の活性化は、ムチン過剰分泌を抑制するため、油症気道傷害の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

２.行動量計と分子生物学的手法を用いたベンゾピレン中毒ラットに対するa 5-deazaflavin derivative(TND)の効果検討

ベンゾピレン投与によるベンゾピレン暴露ラットにおける TND の効果を行動学的手法と分子生物学的手法を用いて検証した。その結果、ベンゾピレンの投与はミトコンドリアに何らかの影響を与え、機能不全を起こすことによって軸索の変性による神経伝導速度の低下を引き起こししびれなどの神経異常をきたした可能性が考えられた。一方、TND はミトコンドリア内の ATP 生産を促進することで、ベンゾピレンの毒性によって引き起こされミトコンドリアの機能不全を抑制、又は機能不全となったミトコンドリアに作用し、機能を回復せることで軸索や樹状突起の神経損傷回復を促進し、感覚異常の症状を改善させた可能性が考えられた。

３.皮膚の慢性炎症による色素沈着における AHR リガンドの影響

皮膚の慢性炎症に関与するエンドセリン-1 (ET-1)刺激により、ヒトメラノサイトにおけるメラニン関連因子の発現増加がみられたが、AHRリガンドはその発現増加を抑制しなかった。

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

膠原病様ケラチノサイトモデルに対するAHRリガンドの抗炎症作用が明らかになった。

５.2,4,6-三塩素置換型PCB140のラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝比較

本年度は、246型PCBの１つである2,3,4,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB140)につき、ラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べた。その結果、①PCB140は、246型のPCB155、PCB182やPCB188と共通して、代謝され易いこと、② M1生成活性は、ラット＞ヒト＞モルモットであること、③ M1の生成には主にPB誘導性のCYP2B酵素が関与していること、が明らかとなった。

６.2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxinによる出生児の性未成熟の機構解析: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欠損により精巣に認められた重量低下とその関連因子の変動は、副腎および視床下部においては限定的であり、精巣特異的作用であることが示唆された。精巣における制御に AHR が重要であることが示唆された。

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

ヒト乳がん由来細胞 T47D 細胞を用いてダイオキシン類と同じく AHR リガンドの一つである 3-methylcholanthrene (3-MC)3-MC 刺激したところ、hSELENBP1 が有意に誘導された。本研究の実験結果からhSELENBP1 の発現誘導は hESR1 および芳香族炭化水素受容体 (AHR)を介する可能性が浮上した。

８.抗酸化作用を有するポリアミンが消化管上皮の細胞死に与える影響

油症の病態として酸化ストレスの亢進が指摘されている。油症の治療薬として抗酸化物質が候補となるが、ポリアミン類の中でもスペルミジンは抗酸化作用があることが知られている。スペルミジンは細胞死が生じた際に周囲に分泌され周囲の細胞死を制御している。今回我々は腸上皮細胞を用いて腸炎時に細胞内にポリアミンが

上昇すること、スペルミジンが炎症時に抗酸化作用を有することを示した。そのメカニズムとして HO-1 の増加があり NRF2 を介していることが示唆された。スペルミジンによる細胞保護効果は油症などの酸化ストレスに防御的に働くことが示された。

９．AhR シグナルの活性化を介したヒト歯根膜細胞の MMP12 発現の増加は歯根膜組織にどのような影響を及ぼすか

ヒト歯根膜細胞において、AhR シグナルの活性化により MMP12 遺伝子発現量に加え、タンパク合成量および分泌量が上昇することが明らかとなった。

１０.AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制がヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響について

AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制はヒト歯根膜細胞のコラーゲン形成能を抑制する。

１１.芳香族炭化水素受容体を介した骨代謝制御機構に関する研究

AhR は骨代謝を制御する破骨細胞と骨芽細胞の分化に従い発現が増加し、ベンゾピレンはこれらの分化を阻害する。

１２.ヒト末梢感覚神経における AHR シグナルを介した皮膚炎の制御機構の解明

ヒト末梢感覚神経細胞では AHR の発現が低い一方で、近年ダイオキシン類に対する防御機構で注目されている Pyruvate kinase isoform M2 (PKM2) が恒常的に発現しており、環境汚染物質 PM2.5 でその発現が増強されている可能性が示された。

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。

疫学研究では、昨年度より油症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。また、油症患者における卵巣機能予備能の低下や、頭痛と PCB 平均濃度との関連、口腔内の色素沈着と口腔粘膜疾患の発生との相関性などが明らかとなってきた。

基礎的研究では、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。油症患者で症状のみられる皮膚、肺、口腔内、神経といった臓器において様々な基礎研究が行われ、油症に関連する症状のメカニズムが徐々に明らかになりつつある。また、PCB の肝臓における代謝や AHR の骨代謝における役割なども研究が進んでいる。TND によるベンゾピレンの神経症状における回復効果や、スペルミジンの酸化ストレスに対する防御効果など将来的に治療につながりうる研究も進んでいる。

このダイオキシン類による継世代にわたる健康状況の解析と基礎的研究は、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であり、この研究によって、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。

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、2023 年 12 月 31 日時点で生存の確認ができた者が 793 名(47.7%)、死亡の確認ができた者が 736 名(44.2%)、生死の確認ができていない者が 135 名(8.1%)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、50 年間の追跡期間の結果、男性の油症患者では全がんと肺がんの死亡率が一般人より高いこと、女性の油症患者では、肝がんの死亡率が一般人より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、男性油症患者では 16.8% (95% CI: 14.5-19.5)、女性油症患者では 8.8% (95% CI: 7.0-10.9) であることを明らかにした(Onozuka et al., Environ Int, 2021)。今後、追跡期間をさらに延長し、油症認定患者を対象とした長期死亡リスクの検証を進めていく必要がある。

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

前回実施した 50 年間追跡調査の対象となった油症患者 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に情報収集を行い、生存及び死亡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及び九州大学医系地区部局観察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、2020-212、2023-24) の審査を経て実施した。

C．研究結果

油症患者追跡調査の対象である 1,664 名のうち、2023 年 12 月 31 日時点で生存の確認ができた者が 793 名(47.7%)、死亡の確認ができた者が 736 名(44.2%)、生死の確認ができていない者が 135 名(8.1%)であった。

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

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。令和 5 年度は、新型コロナウイルス感染症が 5 類感染症に移行したことに伴い、ほぼ通常体制で検診が実施されたこともあり、油症認定患者の生存確認を進めることが可能となった。しかし、生死の確認ができていない者が残されており、今後も関係者による情報収集や公的情報をもとに生存確認を継続していく予定である。

また、死亡者の死因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必要に応じて申請を行っていく予定である。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、55 年間追跡調査による長期死亡リスクの解析を行う予定である。

E．結論

油症患者の追跡調査を 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、2023 年 12 月 31 日時点で生存の確認ができた者が 793 名(47.7%)、死亡の確認ができた者が 736 名(44.2%)、生死の確認ができていない者が 135 名(8.1%)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、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
	中村　麻子	福岡県保健環境研究所　生活化学課　研究員
	新谷　依子	福岡県保健環境研究所　生活化学課　研究員
	佐藤　環	福岡県保健環境研究所　生活化学課　研究員
	重富　敬太	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　ウイルス課　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。2022 年度に測定を行った認定患者 221 名と未認定者 215 名について結果集計を行った。認定患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は平均 42 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) 濃度は平均 31 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は平均 5.3 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 8.8 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 2022 年度に実施した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、各機関で血液中ダイオキシン類の定量分析が適切に実施されていることが分かった。

一般人と比較して油症患者において特徴的に低い 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) 代謝の特徴について *in vitro* 解析により調査した。これまで *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からヒトチトクローム P450 (CYP) 2A6 による代謝の可能性が示唆されている。そこで、CB118 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 を HRGC/HRMS で分析した。その結果、塩素が一つ脱離した 4 塩素化体の水酸化 PCB 異性体の生成を確認した。

現在、2023 年度の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の測定対象者（364 名）について測定及び解析作業を継続している。

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、2022 年度現在の認定患者数は 2,357 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血液中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、2022 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を測定した 436 名について結果集計を行った。

また、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。さらに、油症患者の PCB 蓄積において特徴的に低い 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118)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から生成された水酸化 PCB の構造を推定した。

Ｂ．研究方法

１．血液中ダイオキシン類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、ダイオキシン類 (毒性等価係数が設定されている 29 異性体) の測定を依頼した。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。各機関からの報告値は全血重量及び脂肪重量あたりのダイオキシン類異性体別濃度及び毒性等量 (TEQ) とした。TEQ の算出には TEF (WHO-2006) を用いた。

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。定量下限未満の異性体濃度は定量下限の 1/2 値に置き換え、全血重量及び脂肪重量あたりの測定結果を集計した。各分析機関の比較には CV 値および Z スコアを用いた。

２．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。

2022 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 221 名及び未認定者 215 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 2022 年の検診受診時のものを用いた。

３．ヒト CYP2A6 組換え酵素を用いた CB118 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 CB118（AccuStandard Inc.）を用いて、*in vitro* 系で代謝試験を 3 連で実施し、生成した水酸化 PCB を HRGC/HRMS で分析した。また、NADPH Regenerating Solution(CORNING) を加えない陰性対照も準備した。これらの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 の構造を推定した。

（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 10 月 1 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、定量するために機器分析条件を改良して測定を実施した（表 1）。今年度は新たに大量注入方式（PTV）を導入した。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）の血液中ダイオキシン類濃度の測定結果（全血重量あたり）を表 2 に示した。血液中の各同族体 PCDDs、PCDFs、non-*ortho* PCBs、mono-*ortho* PCBs 及び Total TEQ の平均値は Sample 1 がそれぞれ 0.013、0.022、0.011、0.0011 及び 0.047 pg-TEQ/g-wet、Sample 2 が 0.016、0.053、0.0098、0.0015 及び 0.080 pg-TEQ/g-wet であり、Sample 1 及び 2 の Total TEQ の CV 値はそれぞれ 8.8%及び 11%であった。結果として各分析機関の測定値は概ね一致しており、ダイオキシン類の抽出と測定は良好に実施されていたと考えられた。

一方、ダイオキシン類濃度を抽出脂肪重量あたりに換算すると、抽出脂肪量のばらつきが上乗せされ、全血重量あたりの測定値に比べてCV値は高くなった(表3)。しかしZスコアによる評価では、脂肪重量あたりの濃度であってもSample 1、2ともにZスコアが±2を超えた機関はなく、良好な結果であった（図2)。

２．2022年度油症一斉検診受診者の血液中ダイオキシン類濃度

2022年度の血液中ダイオキシン類測定対象者は436名（内訳：認定患者221名及び未認定者215名）であった。2021年度の93名に比べて大幅に増加し、過去最高の数となった。この背景として①新型コロナウイルス感染症のため全国的に縮小されていた健診体制が正常化へ転じたこと、②認定患者では過去3年以内に測定歴の無い受診者を対象としており4年周期で測定件数が多くなる傾向があるが、2022年度はそのピークに当たっていたこと、③2021年から始まった次世代調査の対象者が受診に加わったこと、が挙げられる。

表4に2022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(221名)の2,3,4,7,8-PeCDF濃度は平均で42 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）は平均31 pg TEQ/g-fatであった。未認定者215名の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は5.3 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は8.8 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(2005年)[1)]と比較すると、同等か低い濃度であった。

図3は未認定者の2,3,4,7,8-PeCDF濃度の分布を示した。未認定者の多くは一般人と同等の20 pg TEQ/g-fat未満に分布し、油症診断基準で「高い濃度」の区分とされる50 pg/g-fat以上の受診者はなかった。未認定者215名の採血時年齢に対する濃度分布をみると、濃度は年齢に対して指数関数的に増大する傾向を示し、一般人と同様に日常的な食事経由の摂取に伴う影響が顕著であった。事件後に出生した年代（10～53才）160名の中に今年度の次世代調査の対象者が含まれているが、160名の血中濃度は13 pg/g-fat未満となっていた。

３．ヒトCYP2A6によるCB118の代謝

ヒトCYP2A6組換え酵素とCB118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4に示す。CB118は5塩素化体のPCBであるが、5塩素化体の水酸化PCBの生成は認められず、塩素が一つ脱塩した4塩素化体の水酸化PCB異性体が確認された。また、同時に測定した標準品と比較したところ、一致するものは無く同定はできなかった。

また、ヒトCYP2A6とCB118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から予測された代謝標的部位を考慮すると、図5に示す構造の4塩素化体の水酸化PCB異性体が生成される可能性がある。そのうち、4-OH-CB70と3'-OH-CB74の標準品は同時測定により異なることが確認されているため、これら以外の6種類の水酸化PCB異性体のいずれかであると推測された。

Ｄ．結論

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

2022 年度の血液中ダイオキシン類濃度測定対象は、認定患者 221 名と未認定者 215 名であった。認定患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 平均濃度は 42 pg/g-fat、Total TEQ 濃度の平均は 31 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の 2,3,4,7,8-PeCDF 平均濃度は 5.3 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 8.8 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の血液中ダイオキシン類濃度は一般人と同等か低く、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度で油症診断基準の「高い濃度」に区分される受診者はいなかった。2001 年度から 21 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 6466 件となった。2022 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。

油症患者の PCB 蓄積において特徴的に低い CB118 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。その結果、脱塩素化を伴う反応により、4 塩素化体の水酸化 PCB 異性体が生成していると推測された。しかし、標準品と一致しなかったため同定することはできなかったが、*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統合することにより、生成された水酸化 PCB 異性体として 6 種類の構造を推測できた。このような、*in vitro* 代謝試験及び *in silico* 解析によるシミュレーション技術を統合した解析は、ヒト体内における CYP 分子種と PCB の代謝反応を把握・解明する技術として有用と考えられる。

Ｅ．研究発表

１．論文発表

1) 堀就英、飛石和大、安武大輔、新谷依子、古谷貴志、髙尾佳子、戸髙尊、広瀬勇気、香月進、辻学、同居家族条件によって認定された油症患者の血液中ダイオキシン類と傾向. 福岡医学雑誌、2023. 114(1). 10-16.

２．学会発表

1) 古谷貴志、新谷依子、堀就英、飛石和大、香月進、辻学、血液中ダイオキシン類分析のクロスチェック（2022 年度). 環境化学物質 3 学会合同大会（第 31 回環境化学討論会)、2023 年 5 月 30-6 月 2 日、徳島市.

Ｆ．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

参考文献

1) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Iida T, Furue M. Concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-*ortho* and mono-*ortho* polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. Chemosphere. 66, 1983-1989, 2007.

表１　ダイオキシン類の GC/MS 測定条件

GC conditions		
GC	Thermo Fisher Scientific TRACE 1310	
Column type	GuardGOLD (Thermo, 0.25mm×2m) + BPX-DXN (Trajan, 0.25mm×60m)	
Injection	PTV (Large volume)	
Injection volume	2 μL	
Injector temperature	110 → 330 ℃	
Carrier gas（Flow rate）	He (1.5 mL/min)	
Oven temperature program	160 ℃ (3 min) – 35 ℃/min – 220 ℃ - 2 ℃/min - 260 ℃ - 5 ℃/min - 320 ℃ (3.75 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

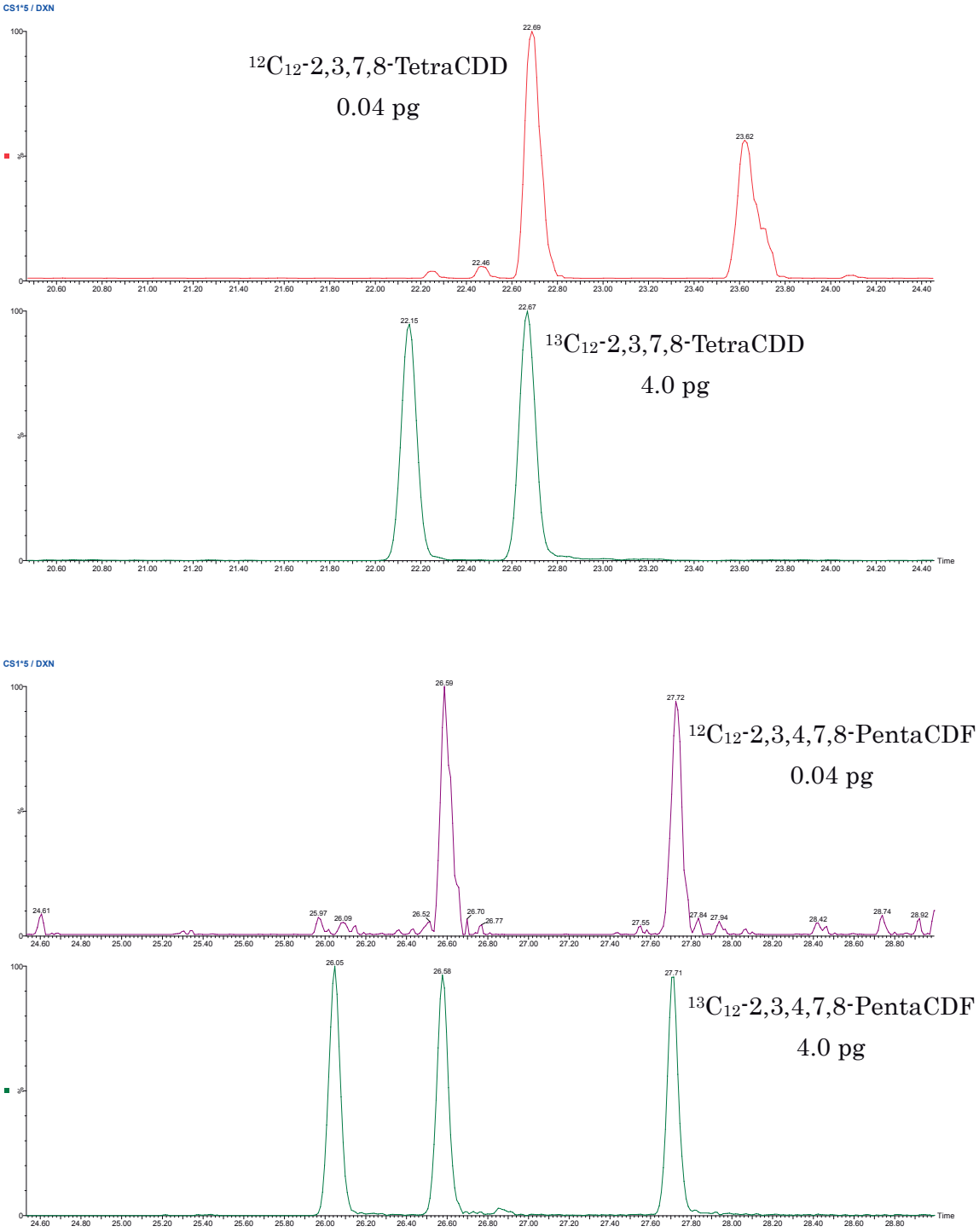


図１　ダイオキシン類標準溶液の測定クロマトグラム例

表２　共通血液試料中の Dioxins 測定結果（単位：pg TEQ/g-wet）

	化合物名	分析機関					Mean	CV(%)
		A	B	C	D	E		
Sample1	PCDDs	0.0098	0.015	0.012	0.017	0.014	0.013	18
	PCDFs	0.018	0.022	0.020	0.024	0.024	0.022	11
	non-ortho PCBs	0.012	0.012	0.012	0.012	0.0067	0.011	19
	mono-ortho PCBs	0.0013	0.0014	0.0013	0.00044	0.00091	0.0011	33
	Total dioxins	0.041	0.050	0.045	0.053	0.046	0.047	8.8
Sample2	PCDDs	0.012	0.021	0.016	0.019	0.011	0.016	26
	PCDFs	0.046	0.052	0.055	0.060	0.049	0.053	9.3
	non-ortho PCBs	0.011	0.012	0.010	0.010	0.0063	0.0098	19
	mono-ortho PCBs	0.0017	0.0020	0.0017	0.00089	0.00097	0.0015	30
	Total dioxins	0.069	0.085	0.081	0.089	0.067	0.080	11

表３　共通血液試料中の Dioxins 測定結果（単位：pg TEQ/g-fat）

	化合物名	分析機関					Mean	CV(%)
		A	B	C	D	E		
Sample1	PCDDs	2.6	5.1	2.7	5.1	4.2	3.9	28
	PCDFs	4.9	7.9	4.8	7.2	6.9	6.3	20
	non-ortho PCBs	3.1	4.2	2.7	3.6	1.8	3.1	26
	mono-ortho PCBs	0.35	0.49	0.31	0.37	0.40	0.40	16
	Total dioxins	11	18	11	16	13	14	21
Sample2	PCDDs	3.1	5.8	4.0	7.1	3.2	4.6	34
	PCDFs	12	14	14	19	15	15	15
	non-ortho PCBs	2.9	3.1	2.4	3.1	1.9	2.7	18
	mono-ortho PCBs	0.44	0.53	0.41	0.52	0.51	0.50	9.8
	Total dioxins	19	23	20	29	20	22	16

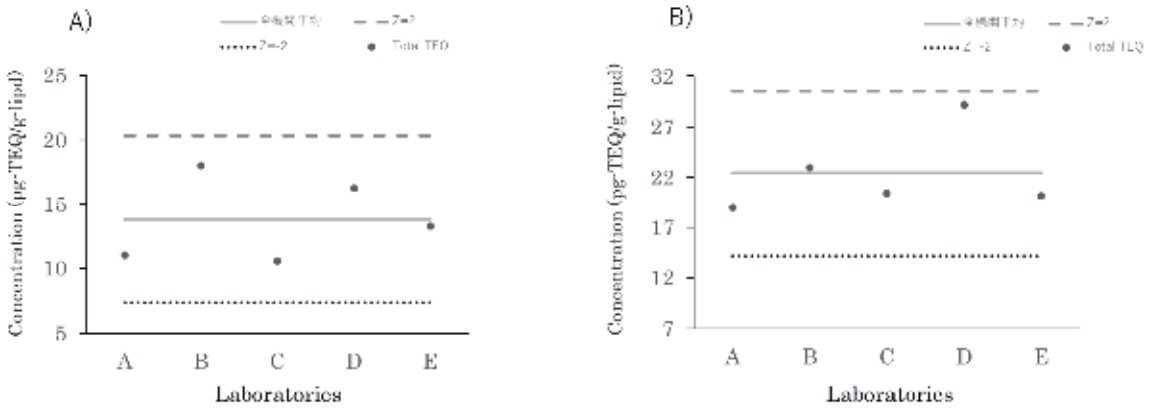


図２　機関別血液中 Total Dioxins 濃度の$\bar{X}$管理図（A:Sample 1、B: Sample 2）

表４　2022 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（221名）				未認定者（215名）				一般住民（127名）[1)]		
	平均	中央値	範囲		平均	中央値	範囲		平均	範囲	
			最小	最大			最小	最大		最小	最大
2,3,7,8-TeCDD	0.95	0.50	0.50	3.6	0.61	0.50	0.50	3.1	1.9	0.50	4.3
1,2,3,7,8-PeCDD	5.1	4.4	0.50	20	1.6	1.0	0.50	14	9.0	3.2	20
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.4	1.0	1.0	5.8	1.2	1.0	1.0	7.0	3.6	0.50	13
1,2,3,6,7,8-HxCDD	19	14	1.0	99	6.3	4.6	1.0	45	28	7.3	70
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1.8	1.0	1.0	8	1.4	1.0	1.0	7.9	4.5	0.50	16
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	11	9.5	1.0	75	8.0	6.7	1.0	61	78	18	470
OCDD	170	140	36	1200	190	160	28	1300	1200	180	7600
2,3,7,8-TeCDF	1.1	0.50	0.50	5.0	0.70	0.50	0.50	4.0	1.0	0.50	4.5
1,2,3,7,8-PeCDF	0.63	0.50	0.50	2.4	0.53	0.50	0.50	1.9	0.67	0.50	4.6
2,3,4,7,8-PeCDF	42	15	1.6	400	5.3	3.7	0.50	45	17	6.0	63
1,2,3,4,7,8-HxCDF	6.4	2.8	1.0	99	1.5	1.0	1.0	11	5.0	1.0	20
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4.2	3.0	1.0	31	1.6	1.0	1.0	12	5.7	1.0	16
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.0	1.0	1.0	4.7	1.1	1.0	1.0	4.1	1.2	1.0	5.2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	–	–	–	ND	–	–	–	ND	–	–
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.2	1.0	1.0	6.9	1.2	1.0	1.0	7.0	2.2	1.0	14
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	–	–	–	1.0	1.0	1.0	2.7	ND	–	–
OCDF	2.0	2.0	2.0	4.2	ND	–	–	–	2.1	2.0	18
3,4,4',5-TeCB(PCB81)	5.1	5.0	5.0	18	5.1	5.0	5.0	17	5.6	ND	24
3,3',4,4'-TeCB(PCB77)	6.2	5.0	5.0	37	5.2	5.0	5.0	21	8.4	ND	31
3,3',4,4',5-PeCB(PCB126)	58	44	5.0	300	24	15	5.0	190	110	17	520
3,3',4,4',5,5'-HxCB(PCB169)	100	72	5.0	610	29	17	5.0	490	64	16	190
Total PCDDs	210	170	47	1300	210	170	37	1500	1300	210	8200
Total PCDFs	61	28	11	520	16	13	10	71	37	15	86
Total PCDDs and PCDFs	270	210	63	1330	230	190	48	1500	1300	220	8300
Total Non-*ortho* PCBs	170	140	20	670	64	41	20	670	190	59	740
Total Dioxins	440	360	130	1600	290	240	68	1800	1500	280	9000
Total PCDDs(TEQ)	8.4	7.1	1.4	27	3.2	2.4	1.3	22	16	5.1	35
Total PCDFs(TEQ)	14	5.3	0.95	130	2.2	1.6	0.64	15	6.6	2.3	14
Total PCDDs and PCDFs(TEQ)	22	13	2.6	150	5.4	4.1	2.0	34	22	7.4	50
Total Non-*ortho* PCBs(TEQ)	8.8	7.1	0.65	38	3.3	2.0	0.65	31	13	2.6	58
Total TEQ	31	21	3.3	170	8.8	6.1	2.6	65	37	12	110

（ND：定量下限値未満）

濃度範囲		未認定者（人）
以上	未満	
40	45	1
35	40	0
30	35	2
25	30	2
20	25	1
15	20	6
10	15	15
5	10	41
0	5	147
	人数計	215

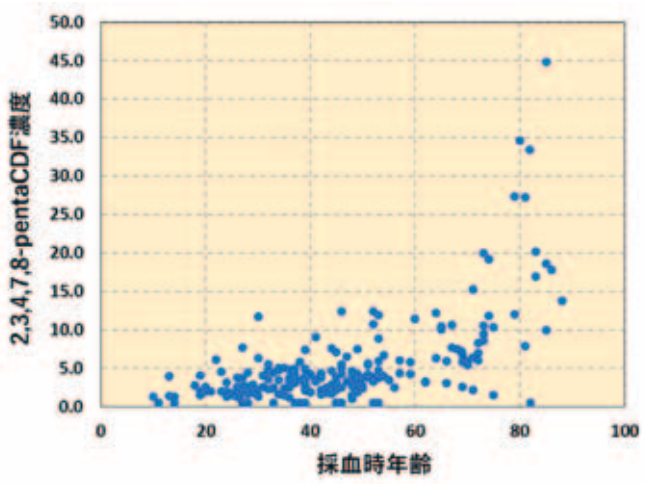


図３　未認定者（215 名）の血液中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度（単位：pg/g-fat）の分布.
左：濃度階級別の度数分布表、右：採血時年齢に対する濃度分布図.

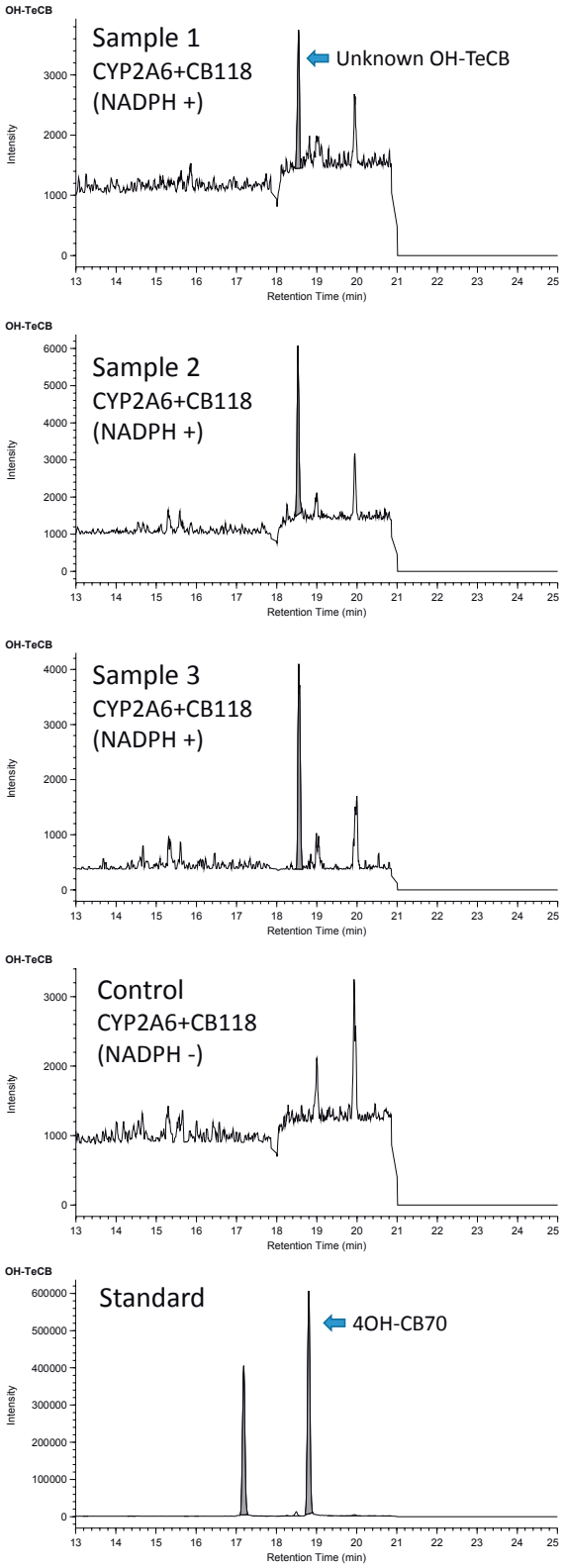


図４　ヒト CYP2A6-CB118 の *in vitro* 代謝試験において生成した４塩素化体代謝物の HRGC/HRMS 測定クロマトグラム

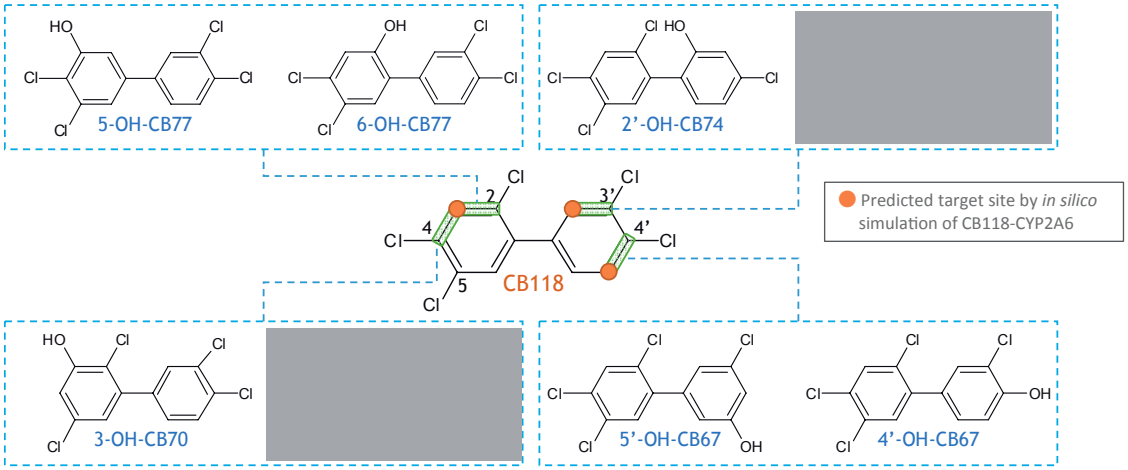


図５　CB118–ヒト CYP2A6 の *in silico* 解析によるドッキング様式から推測される 4 塩素化水酸化 PCB 異性体の構造

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
中島　淳一　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　2022 年度に実施された油症検診受診者の傾向把握のため、検診票を収集し集計した。検診受診者数は 570 人(認定及び同居家族認定 337 人、未認定 233 人)だった。2022 年度検診は、次世代調査参加者の受診により、以前の検診に比べ未認定者や若い世代の割合が増えていた。

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った。

Ｂ．研究方法

１．検診情報の収集及び管理

当所は、1986 年以降の検診情報を収集・整理し、一元管理している。2022 年度の検診は、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、7 月から 11 月に実施された。検診は、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、骨密度測定で、それぞれの検診及び検査の実施の有無は、追跡調査班ごとに異なる。この検診票の写しを、追跡調査班の協力を得て 2023 年 2 月に収集し、3 月に電子化した。その後、4 月から記入内容を点検し、疑義照会により修正を行い、6 月にデータを確定した。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した。

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、検診受診後に変更が生じるものがある。変更について、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当所へ情報提供されたため、検診情報一元管理システムの情報を適宜更新した。

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、検診実施時に測定対象者を判断できるよう測定実績を追跡調査班へ提供した。また、研究班長の指示のもと研究者へデータを送付した。

（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

2022 年度検診について、集計の所見区分を表 1 に、受診者の内訳を表 2 に、各検

診の有所見率を表 3～6 に示す。検診受診者は 570 人（認定及び同居家族認定が 337 人、未認定が 233 人）で、年齢階級別では、認定者は 60 歳代が、未認定者は 40 歳代が最も多かった。内科検診においては、認定者及び未認定者ともに 6 割以上が全身倦怠感を訴えていた。皮膚科検診では、認定者及び未認定者ともに瘢痕化が 2 割以上に見られ、また、認定者は黒色面皰も 2 割以上に認められた。眼科検診では、認定者及び未認定者ともに眼瞼浮腫の所見が、また、未認定者においては瞼板腺チーズ様分泌物圧出の所見が見られた。歯科検診の受診者は認定者のみで、色素沈着は歯肉のみで見られた。

２．検診情報の提供

検診開始前までに、11 追跡調査班へ直近のダイオキシン類測定実績情報を送付した。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送付した。

Ｄ．考察

新型コロナウイルス感染防止対策のために規模を縮小した 2020 年度、2021 年度の検診の受診者は 100 人程であったが、今回（2022 年度）は、規模縮小以前（2019 年度 613 人）と同程度の 570 人が受診した。

検診受診者全体に対する未認定者の割合は、2020 年度及び 2021 年度を除く過去 5 年間は 20%前後で推移していたが、今回は 40%を超えていた。また、40 歳代以下の受診者の割合は、10%前後だったものが、今回は 28.2%だった。今回は、次世代調査参加者も対象だったため、未認定者割合や 40 歳代以下の受診者割合が以前と比べて増加していた。

Ｅ．結論

2022 年度の検診受診者は、同居家族認定を含む認定者が 337 人、未認定者が 233 人の計 570 人だった。次世代調査参加者の検診受診により、受診者全体に占める未認定者の割合や若い世代の割合が増えていた。

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　2022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	570	100.0	260	100.0	310	100.0
0 - 29 歳	46	8.1	19	7.3	27	8.7
30 - 39 歳	49	8.6	15	5.8	34	11.0
40 - 49 歳	66	11.6	22	8.5	44	14.2
50 - 59 歳	83	14.6	39	15.0	44	14.2
60 - 69 歳	131	23.0	69	26.5	62	20.0
70 - 79 歳	123	21.6	64	24.6	59	19.0
80 歳以上	72	12.6	32	12.3	40	12.9
認定	337	100.0	168	100.0	169	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	3	0.9	1	0.6	2	1.2
50 - 59 歳	55	16.3	28	16.7	27	16.0
60 - 69 歳	115	34.1	61	36.3	54	32.0
70 - 79 歳	104	30.9	51	30.4	53	31.4
80 歳以上	60	17.8	27	16.1	33	19.5
未認定	233	100.0	92	100.0	141	100.0
0 - 29 歳	46	19.7	19	20.7	27	19.1
30 - 39 歳	49	21.0	15	16.3	34	24.1
40 - 49 歳	63	27.0	21	22.8	42	29.8
50 - 59 歳	28	12.0	11	12.0	17	12.1
60 - 69 歳	16	6.9	8	8.7	8	5.7
70 - 79 歳	19	8.2	13	14.1	6	4.3
80 歳以上	12	5.2	5	5.4	7	5.0

表3　2022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	65.6%	(210/320)	61.6%	(98/159)	69.6%	(112/161)
頭重・頭痛	45.0%	(144/320)	34.6%	(55/159)	55.3%	(89/161)
咳嗽	42.7%	(137/321)	43.8%	(70/160)	41.6%	(67/161)
喀痰	42.5%	(136/320)	47.2%	(75/159)	37.9%	(61/161)
腹痛	31.7%	(101/319)	24.7%	(39/158)	38.5%	(62/161)
下痢	35.4%	(113/319)	38.6%	(61/158)	32.3%	(52/161)
便秘	43.9%	(140/319)	37.3%	(59/158)	50.3%	(81/161)
しびれ感	55.8%	(178/319)	56.0%	(89/159)	55.6%	(89/160)
関節痛	64.6%	(206/319)	60.8%	(96/158)	68.3%	(110/161)
月経異常	1.0%	(1/97)	.	.	1.0%	(1/97)
他覚所見						
心音	1.9%	(6/322)	2.5%	(4/161)	1.2%	(2/161)
呼吸音	1.2%	(4/322)	2.5%	(4/161)	0.0%	(0/161)
肝腫	1.6%	(5/321)	2.5%	(4/161)	0.6%	(1/160)
脾腫	0.3%	(1/321)	0.6%	(1/161)	0.0%	(0/160)
浮腫	5.3%	(17/322)	3.7%	(6/161)	6.8%	(11/161)
リンパ節腫大	0.6%	(2/322)	0.6%	(1/161)	0.6%	(1/161)
四肢けん反射	11.9%	(36/303)	10.7%	(16/150)	13.1%	(20/153)
感覚障害	24.5%	(74/302)	25.3%	(38/150)	23.7%	(36/152)
胸部レ線	17.0%	(16/94)	17.3%	(9/52)	16.7%	(7/42)
心電図	37.2%	(35/94)	44.2%	(23/52)	28.6%	(12/42)
未認定						
自覚症状						
全身倦怠感	61.6%	(141/229)	51.7%	(46/89)	67.9%	(95/140)
頭重・頭痛	61.1%	(140/229)	41.6%	(37/89)	73.6%	(103/140)
咳嗽	32.3%	(74/229)	28.1%	(25/89)	35.0%	(49/140)
喀痰	30.6%	(70/229)	37.1%	(33/89)	26.4%	(37/140)
腹痛	37.1%	(85/229)	27.0%	(24/89)	43.6%	(61/140)
下痢	39.3%	(90/229)	42.7%	(38/89)	37.1%	(52/140)
便秘	45.0%	(103/229)	29.2%	(26/89)	55.0%	(77/140)
しびれ感	40.4%	(92/228)	39.8%	(35/88)	40.7%	(57/140)
関節痛	45.6%	(104/228)	36.4%	(32/88)	51.4%	(72/140)
月経異常	50.0%	(62/124)	.	.	50.0%	(62/124)
他覚所見						
心音	3.1%	(7/227)	4.5%	(4/88)	2.2%	(3/139)
呼吸音	1.8%	(4/227)	3.4%	(3/88)	0.7%	(1/139)
肝腫	0.9%	(2/227)	2.3%	(2/88)	0.0%	(0/139)
脾腫	0.0%	(0/227)	0.0%	(0/88)	0.0%	(0/139)
浮腫	5.7%	(13/227)	9.1%	(8/88)	3.6%	(5/139)
リンパ節腫大	0.4%	(1/227)	0.0%	(0/88)	0.7%	(1/139)
四肢けん反射	8.9%	(19/214)	7.1%	(6/85)	10.1%	(13/129)
感覚障害	16.8%	(36/214)	18.8%	(16/85)	15.5%	(20/129)
胸部レ線	4.9%	(2/41)	0.0%	(0/12)	6.9%	(2/29)
心電図	14.3%	(6/42)	8.3%	(1/12)	16.7%	(5/30)

表4　2022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	20.4%	(10/49)	15.2%	(5/33)	31.3%	(5/16)
最近の粉りゅう再発傾向	12.2%	(6/49)	15.2%	(5/33)	6.3%	(1/16)
他覚所見						
黒色面皰	24.0%	(12/50)	23.5%	(8/34)	25.0%	(4/16)
ざ瘡様皮疹	14.0%	(7/50)	8.8%	(3/34)	25.0%	(4/16)
瘢痕化	20.0%	(10/50)	11.8%	(4/34)	37.5%	(6/16)
色素沈着	18.0%	(9/50)	11.8%	(4/34)	31.3%	(5/16)
未認定						
問診						
最近の化膿傾向	30.0%	(6/20)	40.0%	(2/5)	26.7%	(4/15)
最近の粉りゅう再発傾向	30.0%	(6/20)	40.0%	(2/5)	26.7%	(4/15)
他覚所見						
黒色面皰	10.0%	(2/20)	20.0%	(1/5)	6.7%	(1/15)
ざ瘡様皮疹	15.0%	(3/20)	20.0%	(1/5)	13.3%	(2/15)
瘢痕化	25.0%	(5/20)	20.0%	(1/5)	26.7%	(4/15)
色素沈着	5.0%	(1/20)	20.0%	(1/5)	0.0%	(0/15)

表5 2022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	12.5%	(2/16)	28.6%	(2/7)	0.0%	(0/9)
他覚所見						
眼瞼浮腫	12.5%	(2/16)	28.6%	(2/7)	0.0%	(0/9)
眼瞼結膜色素沈着	0.0%	(0/16)	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/9)
瞼板腺嚢胞形成	0.0%	(0/16)	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/9)
瞼板腺チーズ様分泌物圧出	0.0%	(0/16)	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/9)
未認定						
主訴						
眼脂過多	50.0%	(5/10)	75.0%	(3/4)	33.3%	(2/6)
他覚所見						
眼瞼浮腫	10.0%	(1/10)	25.0%	(1/4)	0.0%	(0/6)
眼瞼結膜色素沈着	0.0%	(0/10)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/6)
瞼板腺嚢胞形成	0.0%	(0/10)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/6)
瞼板腺チーズ様分泌物圧出	10.0%	(1/10)	25.0%	(1/4)	0.0%	(0/6)

表6 2022年度歯科検診の有所見率

	全体		男性		女性	
認定						
主訴	42.9%	(3/7)	50.0%	(1/2)	40.0%	(2/5)
歯周病	33.3%	(2/6)	0.0%	(0/2)	50.0%	(2/4)
色素沈着所見						
歯肉	42.9%	(3/7)	0.0%	(0/2)	60.0%	(3/5)
頬粘膜	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/2)	0.0%	(0/5)
口蓋粘膜	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/2)	0.0%	(0/5)
唇粘膜	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/2)	0.0%	(0/5)

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再検討

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
市村清隆　　公益財団法人北九州生活科学センター　理事長

研究要旨　油症患者血液中ポリ塩化ビフェニール(PCB)の異性体分析に使用していたカラムが、新しい新規ポリマーを固定相に配合したカラムに変更されたため、昨年度変更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。今年度 PCB の測定検体数は 337 検体で、業務効率を考慮した場合、もう少し時間短縮が必要であったので、今年度も血液中 PCB 異性体分析の昇温条件を詳細に検討した。その結果、各異性体の分離を維持しながら、分析時間も 30 分程度となり、昨年度と今年度で、分析時間を 30 分短縮した。

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。今年度は新型コロナ感染症の規制が 5 月に緩和されたが、海外から検討に必要なパーツ類が供給されたのが 11 月下旬で､十分な検討期間が得られなかったので、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再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。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､効率的な方法ではない。昨年度、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い、20 分短縮することができた。今後も PCB の測定検体数が 350 検体位になると予想されるため、業務の効率を考えた場合、再度分析時間を検討する必要性が生じた。

今回、この問題を解決するために、血液中 PCB 異性体分析の昇温時間を詳細に

再度検討した。

Ｂ．研究方法

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 7890A、MS 部は Waters 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。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 7,800V に設定し、分解能 10,000 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

今年度も PCB の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 3℃/分で昇温、280℃で 0 分間保持、320℃まで 20℃/分で昇温、320℃で 2.5 分間保持の条件下で行うと、検討前の方法と同様な分離が得られるとともに、分析時間が 10 分短縮可能となった(図 1-3)。

令和 5 年度に検診を行った 22 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と昨年行った方法により測定した結果を比較した。その結果、PentaCB (#118), HexaCB (#153), HexaCB (#156)および total PCB 濃度の各値は、ほとんど同じ値であった。さらに、PCB 異性体分析の結果を基に行った 22 名のパターン解析の判定結果も、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

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た。しかしながら、カラムメーカーが提供した分析条件で、PCB の異性体分析を行うと、測定時間が約 60 分となり、すべての面で業務効率が低下したので、昨年度と今年度、分析条件の検討を行った。その結果、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 30 分短縮可能となった。

昨年および今年度に検討を行った血液中 PCB の異性体分析法は、測定時間を短縮でき、ヘリウムガスの消費も抑制できる効率的な方法である。

Ｅ．研究発表

１．論文発表

1) Hori T, Tobiishi K, Yasutake D, Shintani Y, Furutani T, Takao Y, Todaka T, Hirose Y, Katsuki S, Tsuji G. Blood dioxin concentrations and their tendencies examined in family members living with certificated Yusho patients and considered as Yusho patients. Fukuoka Igaku Zasshi, 2023; 14(1): 10-16.

２．学会発表

1） 広瀬勇気， 戸髙尊， 上原口奈美、梶原淳睦、千々和勝巳、池田光政、辻学:油症患者血液中ポリ塩化ビフェニールの異性体分析における分析条件の検討、第 2 回環境化学物質 3 学会合同大会(徳島)、2023 年 5 月 29-6 月 2 日。

Ｆ．知的財産権の出願・登録状況

なし

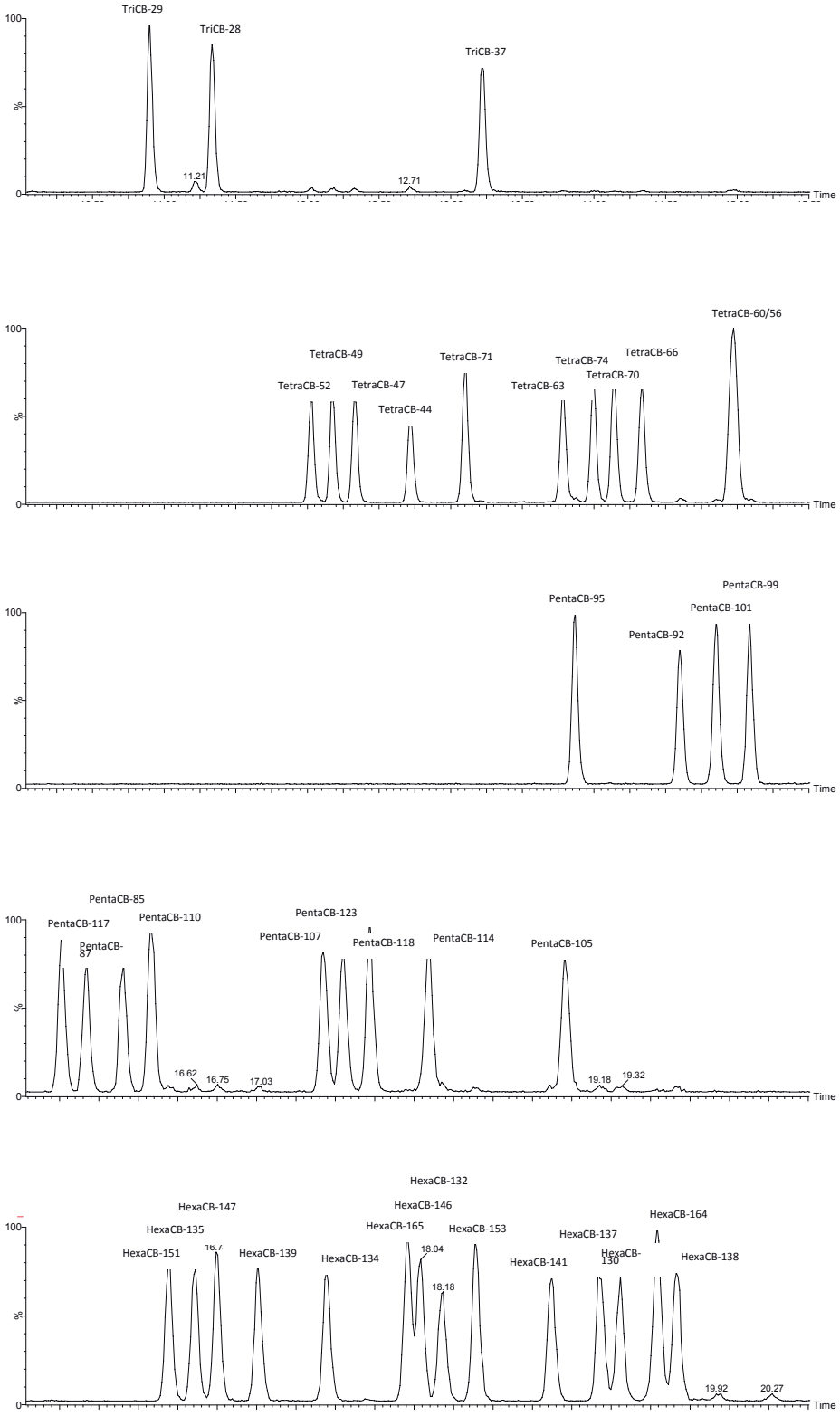


図1 ポリ塩化ビフェニル　66異性体のクロマトグラム

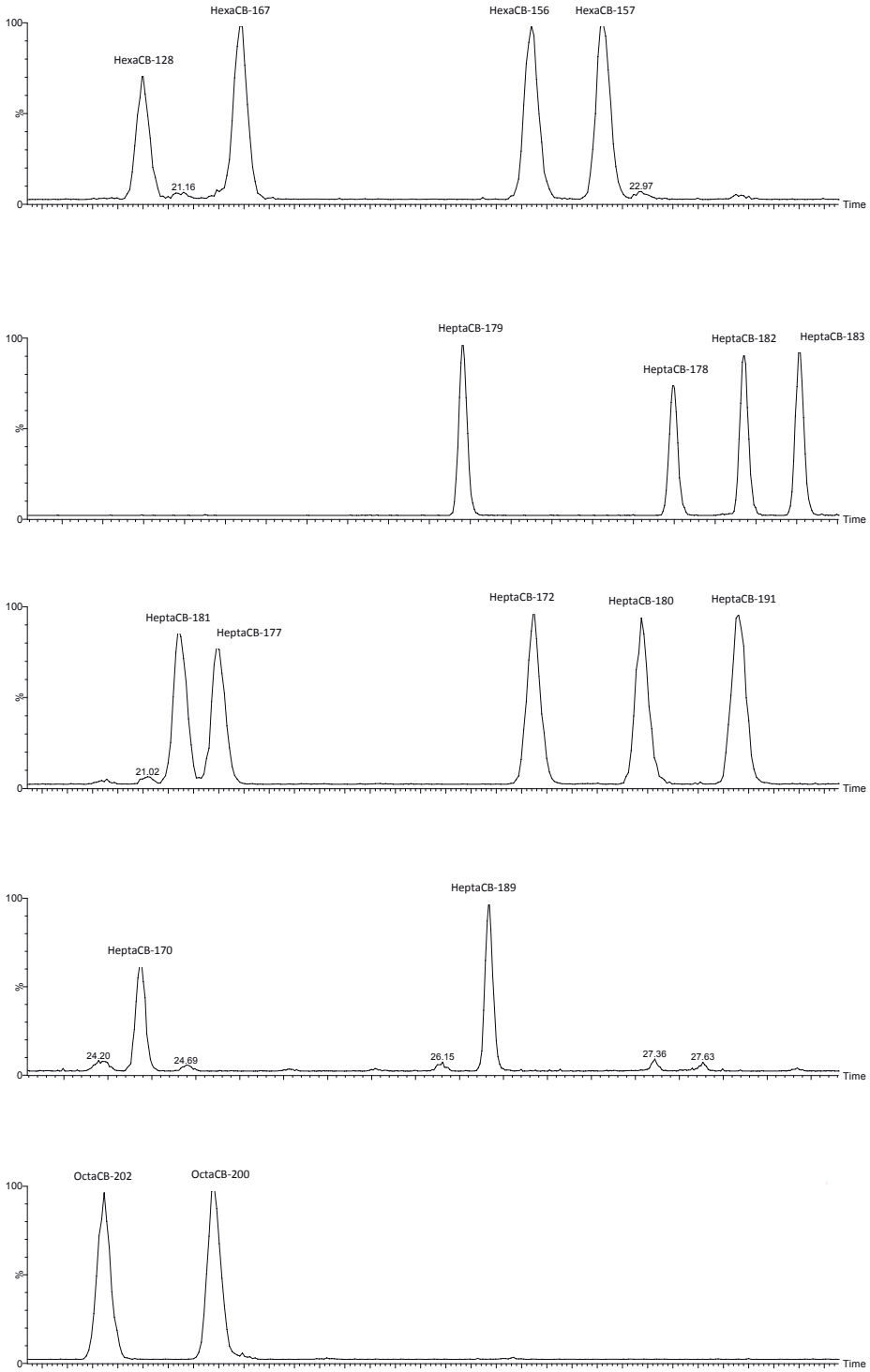


図2 ポリ塩化ビフェニル　66異性体のクロマトグラム

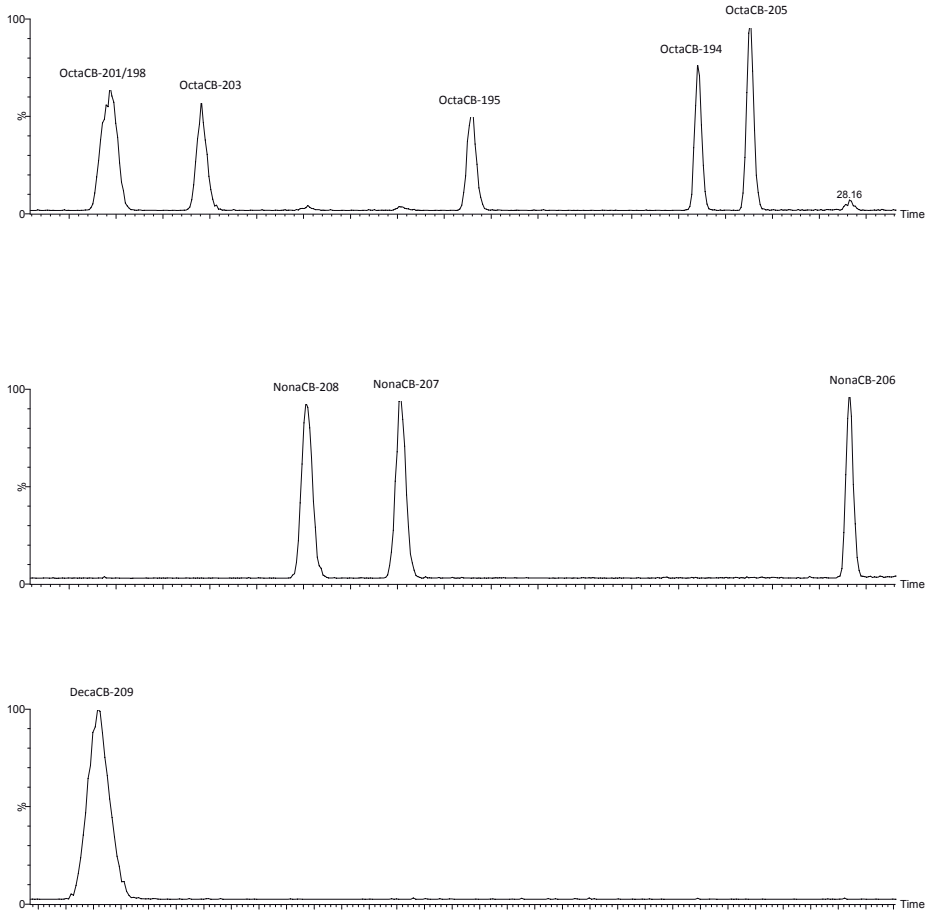


図3 ポリ塩化ビフェニル　66異性体のクロマトグラム

分担研究報告書

カネミ油症患者の漢方治療に対する意識調査

研究分担者　　貝沼　茂三郎　富山大学学術研究部医学系和漢診療学講座　教授

研究要旨　カネミ油症患者の漢方治療に対する実態調査を施行した。漢方薬を服用している患者は頓服も含めて 24.2%(306/1262)だった。また服用歴のある患者で現在漢方薬を服用していない理由としては‘漢方薬の効果不明’が 31.9%（72/226）と最も多かった。一方で服用歴のない患者では‘症状がない’が 29.5%（215/730）と最も多かったが、漢方薬の効果不明も 27.5%（201/730）だった。また服用歴のない患者は 31.0%（226/730）と意外と多くの患者が漢方薬に関しての情報を求めていることがわかった。今回の調査結果を今後のカネミ油症患者に対する漢方治療の活用に生かしていきたい。

Ａ．研究目的

実臨床の現場ではカネミ油症患者の症状軽減に漢方治療が有用であることを経験している。そこで令和４年度のカネミ油症患者健康実態調査で漢方薬内服状況について調べたところ、現在約１割程度のカネミ油症患者が漢方薬を服用し、その多くが効果を実感していることがわかった。しかしそれ以外の油症患者の中にも漢方治療が有用な方がいると推測された。そこで令和 5 年度は実態調査で漢方治療に対する意識調査を行い、カネミ油症患者に対して漢方治療をさらに活用するための検討課題を抽出する。

Ｂ．研究方法

令和 5 年度は実態調査のアンケート項目に漢方薬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薬の内服状況や漢方治療に対する意識調査に関して検証する。

（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）漢方薬の服薬状況

令和 5 年度実態調査の結果、漢方に関する全回答 1262 名中 306 名(定期的に内服 152 名、頓用が 154 名）がなんらかの形で漢方薬を服用していた（24.2%)。又、漢方薬も含めて定期的に内服治療を受けている患者が 932/1282 名（72.7%）であったが、定期的に薬を内服している患者のうち 152/932 名（16.3%）が漢方薬を定期的に内服していた。一方で以前に内服歴があるが、現在は内服していない患者が 226 名（17.9%)、全く漢方薬の服用歴のない患者が 730 名（57.9%）だった。

2）以前に漢方薬の内服歴があるが、現在内服していない患者の理由（複数回答）

漢方薬が効くのかが分からないとの回答が 72 名（31.9%）と最も多かった。次いで効果がなかったが 45 名（19.9%)、これ以上薬を飲みたくないが 43 名（19.0%)、症状がないので特に飲む必要がないが 36 名（15.9%)、高価で続けられなかったが 31 名（13.7%)、効果が出るまでに時間がかかりそうとの回答が 26 名（11.5%）だった。

3)服用歴がない患者の理由（複数回答）

特に症状がないので服用する必要がないとの回答が 215 名（29.5%）と最も多かったが、漢方薬が効くのか分からないとの回

答が 201 名（27.5%）であり、これ以上薬を飲みたくないが 146 名（20.0%）、それ以外では効果が出るまでに時間がかかりそう、高価で続けられない、どこに相談したら良いか分からないがそれぞれ 36 名（4.9%）、32 名（4.4%）、39 名（5.3%）だった。

4）カネミ油症患者に対する漢方薬の臨床研究に関する認知度（表２）

内容は良く知っている、内容はよく知らないが聞いたことがあるという回答を漢方の臨床研究に関して知っているとすると、カネミ油症患者の症状改善に漢方治療が有効であることを知っていたのは定期内服中が66名(43.4%)、頓用が62名(40.3%)、現在は内服なしが 94 名（41.6%）、内服歴なしが 170 名（23.3%）であった。

４）漢方治療に関する情報提供について（表３）

漢方治療についての情報を知りたいかとの質問では是非知りたいと知りたいと回答した患者を漢方の情報提供希望ありとすると、希望ありは定期内服中が 94 名（61.8%）、頓用が 77 名(50.0%)、現在内服なしが 100 名（44.2%）、内服歴なしが 226 名(31.0%)だった。

Ｄ．考察

令和４年度実態調査の結果、全回答 1314 名中 220 名(16.7%)がなんらかの形で漢方薬を服用していたが、令和５年度の実態調査結果では 24.2%と漢方薬を服用している患者がさらに増加していた。これはコロナ禍で新型コロナウイルス感染症に対する漢方治療の有用性が報告され[1)]、漢方治療の有用性がより広く知れ渡るようになったからかもしれない。

次に以前に服用歴があるが、現在漢方薬を服用していない患者の理由として漢方薬の効果を実感できなかったが 117 名（51.8%）もいることがわかった。この要因の一つとして、これまで桂枝茯苓丸が油症患者の症状軽減に対して有用であると報告されたことが考えられる。[2)] つまり病名投与的に桂枝茯苓丸が処方された可能性が否定できない。実際我々が行った桂枝茯苓丸のレスポンダー解析 [3)] では油症患者の全身倦怠感には有用だが、しびれや痛みには効果が低いことが分かっている。そのことから桂枝茯苓丸を服用した患者の一部に効果を実感せずに内服中止となった患者もあったのではないかと考える。内服歴のある油症患者の約 4 割は漢方薬の臨床研究について認識していることから今後は我々の解析結果を踏まえてカネミ油症患者の全身倦怠感には桂枝茯苓丸が有用であることを広く周知していきたい。また内田らの基礎研究の結果から桂枝茯苓丸の構成生薬の桂皮に加え牡丹皮にも抗酸化ストレス効果があるのではないかと考えられる [4)]。油症患者では痛み、しびれを訴える場合も多いが、これまで我々は冷えてしびれがある患者に牛車腎気丸が著効した経験がある（未発表）。牛車腎気丸にも桂皮と牡丹皮のいずれの生薬も含まれていることから油症患者の痛み、しびれに対しては牛車腎気丸を今後は第一候補としてもよいのではないかと考えるが、症例を集積して検討していきた。また牡丹皮に関しては基礎研究での検討も必要と思われる。

さらに今回の漢方薬に関しての実態調査から内服歴のある患者のみならず、内服歴のない患者でも漢方治療に関して興味があり、情報を求めていることがわかった。調査結果から現在内服していない理由として‘漢方薬が効くのかわからない’ことが大きな理由として挙げられていたことから漢方医学的な考え方や実際の油症患者に対する漢方薬の有効症例を紹介していくこと、さらに漢方薬は医師に処方してもらう場合には保険が使えて決して高価ではないことなどを伝える必要ではないかと考えられた。

また漢方治療に関しての情報提供する手段として油症検診などで漢方薬の相談コーナーなどを設けることも一つの方法かもしれない。一方で患者が希望しても主治医が漢方薬のことがよくわからず処方してくれない場合もある。我々は昨年から長崎県五島市の油症外来で主治医の診察に漢方専門医がオンラインで参加する取り組みを始めている。このような取り組みもまた油症患者に漢方治療を活用していくための一つの取り組みになると考える。今回の調査結果を今後のカネミ油症患者に対する漢方治療に生かしていきたい。

Ｅ．結論

カネミ油症患者に対する漢方薬の実態調査を行った。漢方薬を内服している患者が年々増加していることがわかったが、一方で漢方薬の効果不明の理由で服用していない患者が多くいることもわかった。今後は漢方薬に関する様々な情報を油症患者に提供していくことが重要と考えられた。

Ｆ．研究発表

１．論文発表

Kainuma M, Nakahara T, Tsuji G. Responder analysis of keishibukuryogan for the symptoms of Yusho certified patients. Traditional and Kampo medicine. 2024 https://doi.org/10.1002/tkm2.1400２.

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

参考文献

1. Takayama S, Nmki T, Arita R, et al. Multicenter, randomized controlled trial of traditional Japanese medicine, kakkonto with shosaikotokakikyosekko, for mild and moderate coronavirus disease patients. Frontiers in Pharmacology 2022 Nov 9;13:1008946. doi: 10.3389/fphar.2022.1008946. eCollection 2022.

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, Nakahara T, Tsuji G. Responder analysis of keishibukuryogan for the symptoms of Yusho certified patients. Traditional and Kampo medicine. 2024 https://doi.org/10.1002/tkm2.1400２.

4. 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.

表１ 漢方に関する質問事項

① 現在もしくは以前に漢方薬を使用したことはありますか？
1.現在、定期的に内服中
2.症状があるときに使用している
3.以前は内服していたが現在は使っていない
4.使ったことがない

①－2
3もしくは4とお答えの方、漢方薬を使用していない理由は何ですか？(複数回答可)
1. 効果がなかった
2. 漢方薬が効くのか分からない
3. 現在の薬だけで充分である(もうこれ以上は薬は飲みたくない)
4. 飲みにくかった(飲みにくそう)
5. 効果が出るまで時間がかかりそう
6. 高価で続けられなかった又は続けられないと思う
7. どこで相談したら良いか分からない
8. 主治医が専門外だと処方してくれなかったり、専門の先生を紹介してくれない
9. 白湯に溶かして飲んだり飲んだり煎じて飲むことが面倒だと感じる
10. 体質に合わなかった(体調が悪化した、副作用が出たなど)
11. 症状がないので特に飲む必要がない
12. その他(　　)

② 油症患者さんの症状に対して漢方薬治療が有効であるという研究結果が出ていることをご存じですか？
1. よく知っている
2. 聞いたことはあるが内容は知らない
3. 知らない

③ 漢方治療に関する情報を知りたいと思いますか？
1. ぜひ、知りたい(興味あり)
2. やや、知りたい(少し興味あり)
3. どちらでもない
4. 必要ない

表2 カネミ油症患者に対する漢方薬の臨床研究に関する認知度

	よく知っている	聞いたことはあるが、内容は知らない	知らない	未回答
定期的に内服中(n=152)	22	44	86	0
症状があるときに内服(n=154)	11	51	91	1
以前は内服していたが現在は内服なし(n=226)	18	76	131	1
内服歴なし(n=730)	10	160	556	4

表３ 漢方治療に関する情報提供について

	ぜひ、知りたい(興味あり)	ぜひ、知りたい(少し興味あり)	どちらでもない	必要ない	未回答
定期的に内服中(n=152)	51	43	46	12	0
症状があるときに内服(n=154)	26	51	63	13	1
以前は内服していたが現在は内服なし(n=226)	45	55	85	36	5
内服歴なし(n=730)	77	149	299	197	8

分担研究報告書

油症暴露による継世代健康影響に関する追加研究
-油症２性における卵巣予備能と油症暴露との関連-

研究分担者　　加藤　聖子　九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学分野　教授
研究協力者　　濱田　律雄　九州大学環境発達医学研究センター　特任助教

研究要旨　カネミ油症発生後に油症患者より出生した児(油症2世) の卵巣機能と油症曝露との関連について追加検討した。対象は油症2世とし、卵巣機能の指標として卵巣の予備能を反映する血中抗ミュラー管ホルモン(AMH)濃度を測定した。健常女性から得られた年齢別平均の血中AMH 濃度に対する標準偏差値(z-score)を求めた。①年齢別平均の血中AMH濃度の基準値が示されていない20歳未満および51歳以上の症例、②多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の診断基準に含まれるAMH高値症例を除外した油症2世52症例を対象として油症2世の血中AMH濃度(z-score)の各年齢による分布を解析した。その結果、油症2世の血中AMH濃度(z-score)の中央値(範囲)は、-1.06(-3.02-4.92)と同年代の健常女性と比較して低い傾向にあった。以前の報告と同様に油症曝露が油症2世の卵巣予備能に影響を及ぼすことが示唆された。

Ａ．研究目的

ダイオキシン類などの化学物質曝露が次世代の健康にどのような影響をいかに及ぼすのかという継世代的な健康影響とその発現機序に世界的な関心が高まっている。なかでもダイオキシン類は抗エストロゲン作用や抗アンドロゲン作用などのホルモン様作用を有することから、ヒトの生殖現象に影響を及ぼすのではないかと危惧されている[1)]。

近年、卵巣機能の予備能を評価するバイオマーカーとして血中抗ミュラー管ホルモン(AMH：Anti-Mullerian Hormone)濃度が用いられている。AMHはTGFβsuperfamilyに属する糖蛋白で、卵巣の発育過程の卵胞(前胞状卵胞と小胞状卵胞)の顆粒膜細胞から分泌され、原始卵胞数を反映し、卵巣予備能の指標となる[2)]。血中AMH濃度は、血中エストロゲン濃度とは異なり、月経周期に左右されずに測定することができ[3)]、また年齢と共に減少することから早発閉経の診断や不妊の治療方針の決定などに役立つこと[4)]が報告されている。

また、日本における多嚢胞性卵巣症候群の診断基準(日本産科婦人科学会生殖・内分泌委員会, 2024)にAMH高値が新たに加えられ、カットオフ値として、アクセスAMHによる測定の場合は20-29歳では4.4ng/mL、30-39歳では2.8ng/mLが用いられている[5)]。

本研究では、①年齢別平均の血中AMH濃度の基準値が示されていない20歳未満および51歳以上の症例、②多嚢胞性卵巣症候群(PCOS：polycystic ovarian syndrome)の診断基準に含まれるAMH高値症例を除外し、各年代の健常女性との血中AMH濃度と油症2世の血中AMH濃度を比較することで、油症曝露と油症2世の卵巣予備能の関連を明らかにすることを目的とした。

Ｂ．研究方法

1.対象：カネミ油症発生後に油症患者より出生した児(油症2世)のうち、①年齢別平均の血中AMH濃度の基準値が示されていない20歳未満および51歳以上の症例、②PCOSの診断基準に含まれるAMH高値症例を除外した52例を対象とした。

2.方法：

①血中AMH 濃度の解析：油症一斉検診時に対

象者より血液を採取し、血清に分離した後、測定まで凍結保存した。

血中AMH 濃度は化学発光酵素免疫測定法(アクセスAMH、ベックマン・コールター株式会社)を用いて測定した。得られた血中AMH 濃度は、健常女性から得られた年齢別平均の血中AMH濃度[6]に対する標準偏差値(z-score)を求めた。

②油症曝露状況の評価：油症一斉検診で得られたデータより対象者の年齢、身長、体重、BMI、喫煙習慣、油症曝露者(母親曝露、父親曝露)、油症発生から出生までの期間、血中2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF)濃度および母親の血中PeCDF濃度を得て、油症曝露状況の指標として用いた。また、出生時の母親推定血中PeCDF 濃度を、検査時血中濃度×2[出産から血液検体採取までの期間(年)/PeCDFの半減期(7.7 年)] の式を用いて推定した[7]。①で得られた結果をもとに油症2世における血中AMH 濃度と油症曝露との関連について単回帰分析を用いて検討した。

（倫理面への配慮）

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

C．研究結果

1. 油症2世の臨床像：

油症2 世の臨床像を表1 に示す。検査時の年齢の中央値(範囲)は、41才(22-50才)であった。油症曝露状況では、母親曝露(両親曝露を含む)が51例(98.1%)、父親曝露(両親曝露を含む)が10例(19.2%)であった。油症発生から出生までの期間の中央値(範囲)は、9年(0-32年)であった。油症2世およびその母親の血中PeCDF濃度の中央値(範囲)は、各々6.49 pg/g lipid(0.50- 45.64 gig lipid)、26.04 pg/g lipid(5.42- 903.4 gig lipid)であった。

2. 血中AMH濃度：

油症2世における血中AMH濃度の中央値(範囲)は、0.51 ng/mL(<0.02-3.13 ng/mL)であった。血中AMI濃度(z-score)の年齢別分布を図1 に示す。油症2 世における血中AMH濃度(z-score) の中央値(範囲) は 、-1.41(-3.02-4.92)であった。

D．考察

ダイオキシン類が生殖機能に及ぼす影響については、ラットを用いた動物実験では、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo dioxine(TCDD)曝露により卵胞形成や排卵を障害すること、また卵巣でのエストロゲンの産生を抑制することが報告されている[8]。さらに、妊娠ラットへのTCDD曝露により次世代の雌においても血中エストロゲン濃度の低下、卵胞刺激ホルモン濃度の上昇をきたすことが報告されている[9]。

一方、ヒトが高濃度のダイオキシン類に曝露した事例での観察では、Sevesoの農薬工場の爆発事故で高濃度のTCDDに曝露した群では対照群と比較して閉経年齢が早くなることが報告されている[10]。油症患者においては、油症曝露女性の血中エストロゲン濃度が低下していること[11]、胎児期における油症曝露が油症2世の卵巣予備能に影響を及ぼすこと[12]、また自然閉経年齢はわが国における平均閉経年齢と差異はないものの、早発閉経の頻度は高くなること[14]が報告されている。このようにヒトにおいてもダイオキシン類曝露では、卵胞形成やエストロゲン産生などの卵巣機能を障害する可能性が示唆されている。

血中AMH濃度は卵巣の原始卵胞数と相関することが報告されている[2]。ヒト卵巣における原始卵胞は、胎児期より形成され、妊娠5か月には600～700万個に達するが、その後減少し、出生時には100万～200万個となり、出生後も漸減し、思春期には約30万個になることが報告されている[16]。胎児期は原始卵胞の形成に重要な時期であり、この胎児期における油症曝露が原始卵胞の形成障害をきたし、出生後にも血中AMH濃度が低値を示すなど卵巣の予備能に影響を及ぼす可能性が示唆されている[12]。

一方で、PCOSの患者は多嚢胞卵巣所見(polycystic ovarian morphology: PCOM)として、胞状卵胞数(antral follicle count: AFC)10 個以上が診断基準項目の一つとして、AFCを代用できるものとして使用される[5)]。そのため、胞状卵胞を多く有する多嚢胞性卵巣症候群の患者では血中AMH値が高くなる。本研究では、油症2世の卵巣予備能を血中AMH濃度で評価するため、PCOSが疑われる血中AMH濃度が高値の症例を解析対象から除外することで、油症曝露が油症2世の卵巣予備能への影響をより明確に解析した。

血中AMH 濃度は、早発閉経の診断や不妊の治療方針の決定などに役立つことが報告されている[4)]。しかしながら、このAMH 値は年齢とともに減少する傾向はあるものの、年齢に対しては正規分布を示さず、同一年齢層における標準偏差も非常に大きいことから、AMH 値は基準値を設定し、正常か異常かを診断する値ではないと考えられている[17,18)]。また、AMH値と妊娠しやすさは相関しないことから、AMH値による卵巣予備能の評価は、妊孕性の評価ではなく、残存する原始卵胞数の評価であることが報告されている[18,19)]。

油症患者と油症2 世双方の血中ダイオキシン類濃度の観察を介して、油症発症後30年以上経過した時点においても油症患者である母親の血中PeCDF濃度は、正常健常人の約30倍の濃度であったが、油症2 世の血中PeCDF濃度は、正常健常人の値と有意な差はないことが報告されている[14)]。油症2世から出生した児(油症3世)においては、母親である油症2世の血中ダイオキシン類濃度が正常レベルであるため胎児期に高濃度のダイオキシン類曝露を受けていないと考えられるが、今後、油症曝露による継世代的な健康影響を観察する上で、油症2世の卵巣機能や生殖機能について注意深く見守ることが重要であると考えられた。

E．結論

油症2世における血中AMH濃度を、同年代の健常女性の血中AMH濃度と比較することで、油症曝露が油症2世の卵巣予備能に影響を及ぼすことが示唆された。

F．研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

なし

G．知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

なし

３．その他

なし

H．参考文献

1) Ulbrich B, et al. Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls(PCBs):a systematic review of experimental data. Arch Toxicol. 78:483-487, 2004.

2) La Marca A, et al. Anti-Mullerian hormone(AMH): what do we still need to know? Hum Reprod. 24(9):2264-2275, 2009.

3) Tsepelidis S, et al. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. Hum Reprod. 22(7):1837-1840, 2007.

4) Broer SL, et al. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. Hum Reprod Update. 20(5):688-701, 2014.

5) 松崎利也、岩佐武、岩瀬明、金﨑春彦、久具宏司、齊藤和毅、馬場剛、原鐵晃、野拓樹、湊沙希. 本邦における多嚢胞性卵巣症候群の診断基準の検証に関する小委員会(令和3年度)検討結果報告. 日産婦誌 75:624-631, 2023.

6) Helden JV, et al. Age-independent

anti-Mullerian hormone (AMH) standard deviation scores to estimate ovarian function. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.213:64-70,2017.
7) Tsukimori K, et al. Long-Term Effects of Polychlorinated Biphenyls and Dioxins on Pregnancy Outcomes in Women Affected by the Yusho Incident. Environ Healt Persp.116:626-630,2008.
8) Patel S, et al. Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on the Ovary. Biol Reprod.93(1):20,2015.
9) Myllymäki SA, et al. In utero and lactational exposure to TCDD; steroidogenic outcomes differ in male and female rat pups. Toxicol Sci. 88(2):534-544,2005.
10) Eskenazi B, et al. Serum dioxin concentrations and age at menopause. Environ Health Perspect. 113(7):858-862,2005.
11) 辻博、池田正春. 油症における性腺機能の検討. 福岡医誌. 98(5);166-169,2007.
12) 月森清巳、加藤聖子、諸隈誠一. 油症曝露による継世代健康影響に関する研究.平成29年度分担研究報告書. 110-116,2017.
13) 月森清巳.油症患者における婦人科疾患の研究.食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究.平成20年度分担研究報告書. 111-113,2008.
14) Tsukimori K, et al. Comparison of the concentrations of polychlorinated biphenyls and dioxins in mothers affected by the Yusho incident and their children.Chemosphere.84(7):928-935,2011.
15) Todaka T, et al. Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-ortho and mono-ortho polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients.Chemosphere.66(10):1983-1989, 2007.
16) Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in the human ovaries. Proc R Soc Biol Sci. 158:417-433,1963.
17) Seifer DB, et al. Age-specific serum anti-Müllerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. Fertil.Steril.95(2):747-750,2011.
18) 浅田義正. 生殖医療におけるAMHの臨床応用. 産婦人科治療.102;781-787,2011.
19) Steiner AZ, et al. Association Between Biomarkers of Ovarian Reserve and Infertility Among Older Women of Reproductive Age. JAMA. 318(14): 1367-1376,2017.

表 1 油症 2 世の臨床像

項目	中央値(範囲)
年齢(才)	41(22-50)
BMI(kg/㎡)	21.7(15.2-29.9)
AMH 濃度(ng/mL)	0.51(<0.02-3.13)
AMH 濃度(z-score)	**-1.41(-3.02-4.92)**
喫煙習慣あり	16(30.8%)*
油症曝露状況	
母親曝露	51(98.1%)*
父親曝露	10(19.2%)*
油症発生から出生までの期間(年)	9(0-32)
血中 PeCDF 濃度(pg/g lipid)	
油症 2 世血中 PeCDF 濃度	6.49(0.50-45.64)
母親血中 PeCDF 濃度	26.04(5.42-903.4)
出生時母親推定血中 PeCDF 濃度	304.4(13.19-6479)

*症例数(%)

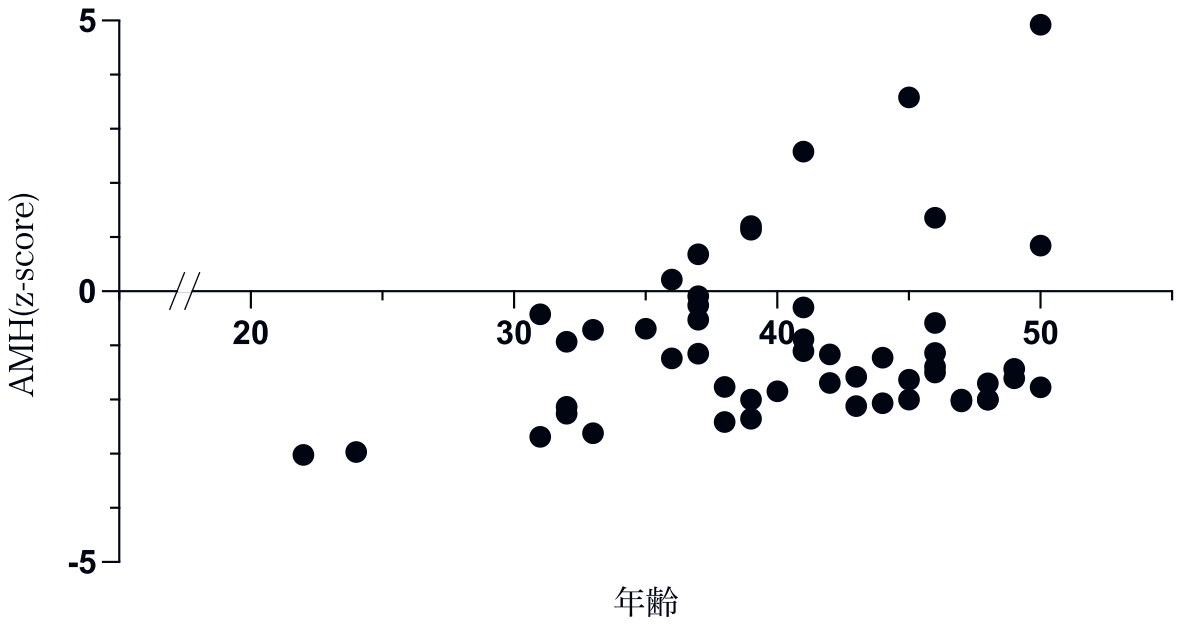


図1 油症2世における血中AMH濃度(z-score)の年齢別分布

分担研究報告書

油症における末梢血 CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 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　2023 年度福岡県油症一斉検診受診者 65 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 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞を測定した。油症患者 43 例では対照者 14 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 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の比率あるいは絶対密度は油症患者と対照者に差をみなかった。血中 PCB 濃度と CD4 陽性細胞の総リンパ球に対する比率あるいは絶対数の間に相関をみなかった。血中 PCB 濃度と CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の比率あるいは絶対密度の間に相関をみなかった。

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、2023 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 Foxp3 陽性の制御性 T 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

2023 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アンケートにて同意が得られた 65 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

Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の測定は抗ヒトマウスモノクローナル抗体 CD4 PerCP (BD Biosciences)、CD25 APC (BD Biosciences) および抗ヒトラットモノクローナル抗体 Foxp3 PE（eBioscience)を用いて BD FACSLyric 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

2023 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 65 例の内訳は女性 39 例、男性 26 例で、平均年齢は 63.2±18.3（20－89）歳であり、油症患者 43 例、油症患者（同居家族）5 例、未認定患者 14 例、観察者 2 例、診定保留 1 例であった。

2023 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者 43 例について未認定患者 14 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 Foxp3 陽性の制御性 T 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 40.5±5.5％に比べ油症患者では 40.6±9.5％と差を認めず、CD4 陽性細胞数は対照者 830.7±347.8/μl に対し油症患者では 752.3±217.0/μl と低下傾向を認めたが、有意差をみなかった。CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の比率は対照者 2.78±0.56 ％に対し油症患者では 2.70±0.84％と差を認めず、制御性 T 細胞の絶対密度は対照者 56.9±25.4/μl に対し油症患者では 50.4±19.1/μl と低下傾向を認めたが、有意差をみなかった。

2023 年度福岡県油症一斉検診の受診者 65 例について血中 PCB 濃度と末梢血リンパ球亜集団の関連について検討した（表 2)。血中 PCB 濃度と CD4 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に有意の相関を認めず、血中 PCB 濃度と CD4 陽性細胞絶対数の間に相関をみなかった。血中 PCB 濃度と CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の比率あるいは絶対密度の間に有意の相関をみなかった。

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]。

2023 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者 43 例について未認定患者 14 例を対照者として CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞を検討した。油症患者では対照者に比較し CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の総リンパ球に対する比率に差をみなかった。CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の絶対密度は対照者に比べ油症患者では低下傾向を認めたが、差をみなかった。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)]。油症において制御性 T 細胞についての更なる検討が必要と考えられる。

2023 年度福岡県油症一斉検診において血中 PCB 濃度と CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の比率あるいは絶対密度の間に相関をみなかった。油症における CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞に対する慢性的影響を検討するため血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の関連の検討が必要と考えられる。

E. 結論

2023 年度福岡県油症一斉検診受診者 65 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 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞を測定した。油症患者 43 例では対照者 14 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 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の比率あるいは絶対密度は油症患者と対照者の間に差をみなかった。血中 PCB 濃度と CD4 陽性細胞あるいは CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の間に相関はみられなかった。CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞と血中 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

		Controls	Yusho
No.		14	43
CD4 陽性細胞	(%)	40.5±5.5	40.6±9.5
	(/μl)	830.7±347.8	752.3±217.0
CD4 陽性 CD25 陽性 FOXP3 陽性 T 細胞	(%)	2.78±0.56	2.70±0.84
	(/μl)	56.9±25.4	50.4±19.1

表２　血中 PCB 濃度とリンパ球亜集団の関連

		r
CD4 陽性細胞	(%)	−0.0417
	(/μl)	−0.1014
CD4 陽性 CD25 陽性 FOXP3 陽性 T 細胞	(%)	−0.1113
	(/μl)	−0.1092

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　坪内　和哉　九州大学病院　呼吸器科　助教
髙野　智嗣　九州大学病院　呼吸器科　助教

研究要旨　ヒト杯細胞株 NCI-H292 細胞において、肺サーファクタント蛋白 D はシグナル制御タンパク質α（SIRPα）を介して Benzo[a]pyrene(BaP)によって誘導される ERK のリン酸化とムチン産生亢進を制御する。気道上皮細胞における SIRPα経路の活性化は、ムチン過剰分泌を抑制するため、油症気道傷害の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

Ａ．研究目的

油症の呼吸器症状としては喀痰、咳嗽、喘鳴などの気道症状が主体である。ダイオキシン類や類似の多環芳香族炭化水素により気道上皮細胞が傷害をうけ粘液（ムチン）産生過多を引き起こしている可能性がある[1－4]。一方、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。これまで我々は、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 Club 細胞に着目し、肺サーファクタント蛋白の一つであり肺サーファクタント D（SP-D）の保護作用を検討してきた。

Club 細胞における Benzo[a]pyren(BaP)をよる活性酸素（ROS）やムチンの産生亢進に対する SP-D の抑制効果を確認したが、SP-D よる抑制効果が見られなかった。今回、我々は Club 細胞ではない粘液分泌気道上皮細胞である杯細胞株（NCI-H292 細胞）を用いて Bap によるムチン産生亢進に対する SP-D の抑制効果を検討するため、in vitro での研究を行った。

Ｂ．研究方法

杯細胞株：NCI-H292 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 BaP 1μM を用いた。ヒトリコンビナント SP-D 1μg/ml を用いて効果を解析した。

Ｃ．研究結果

NCI-H292 細胞に対して、1μM の BaP で刺激すると、mRNA およびタンパク質レベルで MUC5AC 発現を増加させた。SP-D（1μg/ml）で 2 時間前処理した後、BaP と SP-D で 24 時間共刺激を行ったところ、Club 細胞株（NCI-H441 細胞）では見られなかった、BaP 誘導性 MUC5AC 発現亢進に対する SP-D による抑制効果が、NCI-H292 細胞において確認された（図１A）。さらに、SP-D は BaP で誘導される ERK のリン酸化を抑制した（図 1B）。しかし、BaP による CYP1A1 の発現と ROS 産生上昇に対しては、NCI-H292

細胞でもSP-Dの抑制作用は認めなかった(図1C)。以上の結果から、SP-DはNCI-H292細胞において、CYP1A1-ROSとは独立した経路でBaPによるERKのリン酸化を抑制し、その結果、MUC5AC の発現が抑制されることが示された。

NCI-H292 細胞においてBaP で誘導されるMUC5AC発現に対するSP-Dの抑制効果のメカニズムを探索するため、シグナル制御タンパク質α (SIRPα：Signal regulatory protein α)に着目した。SIRPαは NCI-H292 細胞で発現していたが、NCI-H441 細胞では発現していなかった(図2A)。SIRPA mRNAを標的とするsmall interfering RNA(siRNA:Small interfering RNA)をNCI-H292細胞に導入し Bap で刺激を行ったところ、SIRPαのノックダウンは、BaPで誘導されるERK リン酸化およびMUC5AC 発現に対するSP-Dの抑制効果を消失させた(図2B)。

以上より、杯細胞においてSP-D はSIRPα を介して、ERKのリン酸化を制御しMUC5AC発現を抑制することが示唆された。

D.考察

本研究で、BaP が気道上皮にムチンの過剰産生を誘導し、SP-D が杯細胞においてムチン産生を抑制することを明らかにした。また、SIRPαが杯細胞で発現し、SP-D との結合を介して ERK の脱リン酸化し、ムチン産生を制御している可能性があることを見出した。

SP-D は肺で吸入された病原体やアレルゲンと結合し、気道上皮表面からの侵入を阻害する [5,6]。さらに、SP-D は免疫細胞に作用し、細菌やウイルスによる炎症反応、アレルゲンへの曝露による2 型ヘルパーT 細胞の反応を抑制する[7－9]。このような免疫反応に対するSP-Dの抑制作用が、慢性気道疾患の進行とそれに伴う過剰な粘液分泌を抑制すると考えられていた。今回のデータから、SP-DはBaPによるCYP1A1の発現とROS産生を抑制しなかったため、BaPとの直接的な結合を介して BaP の気道上皮細胞への侵入を妨げないことが示された。その条件下でも、SP-D は気道上皮細胞のみからなる培養細胞において、SIRPαに依存した形でBaPによるMUC5AC産生を抑制することが明らかになった。これらの結果から、SP-D は病原体やアレルゲンの除去または免疫反応の制御に加えて、気道上皮細胞に対する直接的かつ保護的な作用をもつことが明らかになった。

SIRPαは主に骨髄系細胞に発現する膜貫通タンパク質で、SP-D に結合することで抑制性のシグナルを伝達する[10]。今回の結果は、気道上皮細胞においてもSIRPαがSP-Dによって活性化され、BaPによって誘導されるERKのリン酸化とMUC5ACの産生を抑制することを示した。このようなSP-Dの抑制作用は、SIRPαの発現レベルの違いを反映し、杯細胞の特徴をもつNCI-H292細胞では見られたが、クラブ細胞の特徴をもつNCI-H441細胞では見られなかった。気道上皮細胞における SIRPαの生理的機能はまだ明らかにされておらず、この蛋白に着目しさらなる研究を行う予定である。

E.結論

SP-D は、SIRPαを介して、杯細胞におけるBaPで誘導されたERKのリン酸化とMUC5AC の発現を抑制した。気道上皮細胞における SIRPα経路の活性化は、ムチン過剰分泌を抑制するための新たな治療戦略となる可能性がある。

F.研究発表

１． 論文発表

Surfactant protein D prevents mucin overproduction in airway goblet ce

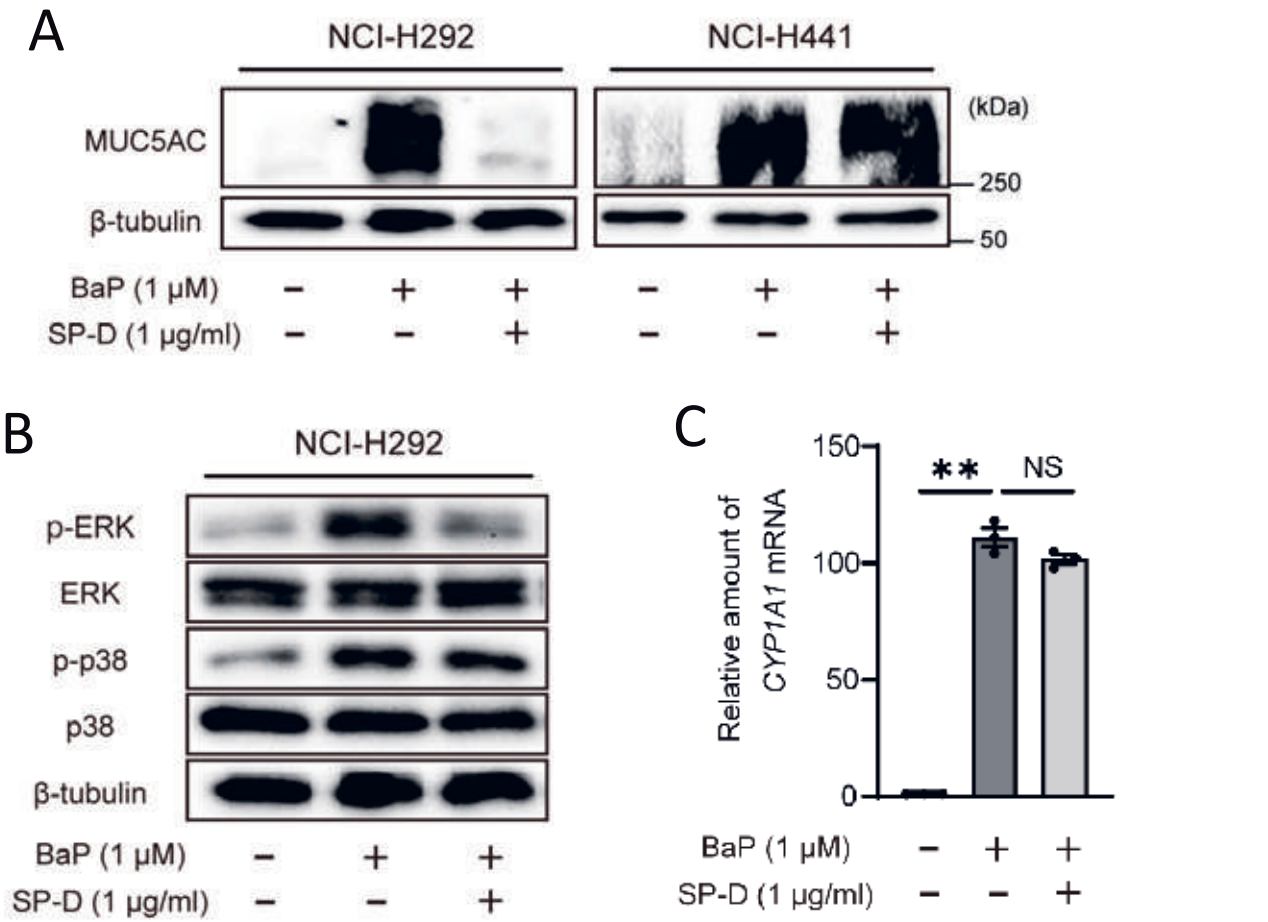
lls via SIRPα.
Hata K, Tsubouchi K, Suzuki K, Eto D, Ando H, Yanagihara T, Kan-O K, Okamoto I.
Sci Rep. 2024 Jan 20;14(1):1799. doi: 10.1038/s41598-024-52328-5.

２．学会発表
第63回日本呼吸器学会学術講演会
2023年4月30日（日）
Surfactant protein D (SP-D) はSIRPαを介して多環芳香族炭化水素による気道上皮細胞の粘液分泌過多を抑制する
秦 兼太朗、坪内 和哉、衛藤 大祐、安藤 裕之、柳原 豊史、鈴木 邦裕、神尾 敬子、岡本 勇

G.知的財産権の出願・登録状況
なし

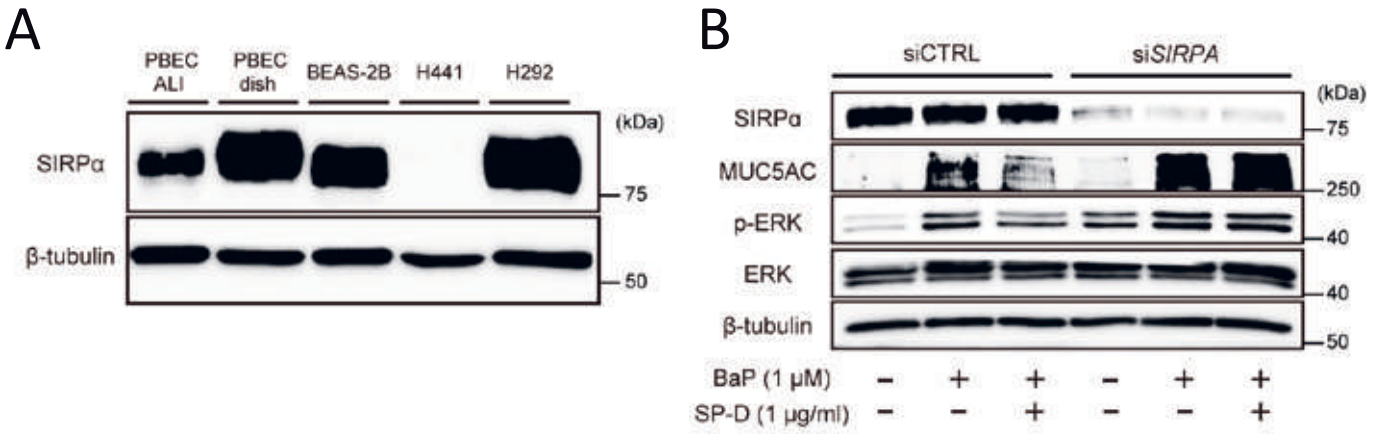
H.参考文献
1) Låg, M., Øvrevik, et al. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons in air pollution-induced non-malignant respiratory diseases. Respir. Res. 21, 299 (2020).
2) Sun, Y. et al. Benzo(a)pyrene induces MUC5AC expression through the AhR/mitochondrial ROS/ERK pathway in airway epithelial cells. Ecotoxicol. Environ. Saf. 210, 111857 (2021).
3) Gakidou, E. et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet 390, 1345- 1422 (2017).
4) Doiron, D. et al. Air pollution, lung function and COPD: Results from the population-based UK Biobank study. Eur. Respir. J. 54, (2019).
5) Shepherd, V. L. Distinct roles for lung collectins in pulmonary host defense. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 26, 257- 260 (2002).
6) Erpenbeck, V. J. et al. Surfactant protein D increases phagocytosis and aggregation of pollen-allergen starch granules. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. 288, 692 - 698 (2005).
7) LeVine, A. M. et al. Distinct Effects of Surfactant Protein A or D Deficiency During Bacterial Infection on the Lung. J. Immunol. 165, 3934- 3940 (2000).
8) LeVine, A. M., Whitsett, J. A., Hartshorn, K. L., Crouch, E. C. & Korfhagen, T. R. Surfactant Protein D Enhances Clearance of Influenza A Virus from the Lung In Vivo. J. Immunol. 167, 5868- 5873 (2001).
9) Haczku, A. et al. IL-4 and IL-13 Form a Negative Feedback Circuit with Surfactant Protein-D in the Allergic Airway Response. J. Immunol. 176, 3557- 3565 (2006).
10) Barclay, A. N. & Brown, M. H. The SIRP family of receptors and immune regulation. Nat. Rev. Immunol. 6, 457- 464 (2006).

図1. 杯細胞株（NCI-H292細胞株）でのSP-Dによる抑制効果



Sci Rep. 2024 Jan 20;14(1):1799.

図2. 杯細胞におけるSIRPαの発現とSP-Dによる抑制効果への関与



Sci Rep. 2024 Jan 20;14(1):1799.

分担報告書

抗酸化作用を有するポリアミンが消化管上皮の細胞死に与える影響

研究分担者　鳥巣　剛弘　九州大学病院消化管内科　講師

研究要旨　油症の病態として酸化ストレスの亢進が指摘されている。油症の治療薬として抗酸化物質が候補となるが、ポリアミン類の中でもスペルミジンは抗酸化作用があることが知られている。スペルミジンは細胞死が生じた際に周囲に分泌され周囲の細胞死を制御している。今回我々は腸上皮細胞を用いて腸炎時に細胞内にポリアミンが上昇すること、スペルミジンが炎症時に抗酸化作用を有することを示した。そのメカニズムとしてHO-1の増加がありNRF2を介していることが示唆された。スペルミジンによる細胞保護効果は油症などの酸化ストレスに防御的に働くことが示された。

A 研究目的

ダイオキシン類が混入した食用油を摂取した住民に多彩な症状が出現するなどの混合中毒である油症が生じ長期間経過した。多くの患者に下痢や腹痛などの消化器症状も出現し、現在でも消化器症状が持続していることが知られている。油症の症状に対し様々な対症療法がおこなわれてきたがいまだに明確な有効性は示されていない(1)。油症の病態として酸化ストレスの亢進が指摘されているため、酸化ストレスの軽減が治療の候補と考えられている。近年、酸化ストレスの抑制としてポリアミン代謝が着目されている。ポリアミンは第一級アミノ酸が３つ以上結合した直鎖脂肪族炭化水素の総称である。アミノ酸のアルギニンはオルニチンに変換されたのちピトレッシン、スペルミジン、スペルミン、などのポリアミンに代謝される。スペルミジンが抗酸化作用の中心的役割を果たす。スペルミジンは細胞がアポトーシスを生じたときに周囲に分泌されることが知られ(2)、油症も含め消化管が傷害されたときに分泌されることが予想される。そこで腸上皮細胞においてスペルミジンが炎症時に酸化ストレスを軽減するか検討した。

B 方法

腸上皮細胞として HCT116 細胞を用いた。炎症刺激として 500ng/mL の LPS や 50ng/mL の TNFα、250uM の H2O2 を添加した。

細胞内ポリアミンの検出のためポリアミン Red(Funakoshi)の蛍光輝度を測定した。活性酸素の測定として DCF-DA(Dojindo)を用いて測定した。蛍光顕微鏡は BZ-X700(Keyence)を用いて撮影した。細胞死については MTTassay(Dojindo)で評価した。分子メカニズムを評価するため HO-1 の mRNA レベルを Realtime-PCR により測定した。PCR は TB Green Premix Taq を用い Applied Biosystems QuatStudio3

(Thermo Fisher Scientific)により測定した。

C 研究結果

腸炎時のポリアミンを評価するために、腸炎のモデルとして HCT116 細胞に LPS や TNFαを添加し 24 時間後に細胞内ポリアミンを polyamineRED の蛍光を測定した。細胞内のポリアミンは炎症時に増加していることが示された(Fig1)。

ポリアミンの中で抗酸化作用が知られているスペルミジンが細胞内の酸化ストレスに影響しているか検討した。TNFαにより炎症状態を惹起したとき細胞内の活性酸素が増加していることが示された。さらにスペルミジンを添加すると著明に抑制されることが示された(Fig2)。

この分子メカニズムとして抗酸化に働く HO-1 について mRNA で評価したところスペルミジンにより著明に増加することが示された(Fig3)。

このことが生理的に機能しているか検討するために過剰な活性酸素により細胞死を生じる条件でスペルミジンを添加すると細胞死が抑制されることが示された(Fig4)。

これらの結果から炎症時にスペルミジンは増加し、炎症による活性酸素や細胞死を抑制していることが示された。

D 考察

今回スペルミジンが腸上皮細胞において活性酸素の抑制に働くことを示した。消化管粘膜においても酸化ストレスの制御は多くの病態や症状に重要であることは知られている。油症対象者においてスペルミジンの評価は行っていないがポリアミン類の中では尿中ジアセチルスペルミンの測定を行っている(3)。油症対象者の腸内や全身で、酸化ストレスの亢進や慢性炎症が油症対象者でみられることからポリアミン代謝も亢進が予想される。

腸炎時には腸上皮で酸化ストレスが亢進していることは知られ、また腸炎の重症度とスペルミジンの血中濃度も相関していることが報告されている(4)。この上昇したスペルミジンがどのような作用をもたらすかは不明ではあるが、今回の検討から腸上皮に対しては保護的に働くことが予想される。また近年腸内細菌によるポリアミン産生が腸炎の抑制に働くことも報告されている(5)。スペルミジンは今回示した細胞死の抑制だけではなくマクロファージの分化にも影響を及ぼし腸管免疫の点からも抗炎症作用もあるとされている。スペルミジンによる抗炎症作用の詳細な分子機構は明らかではないが、老化の進行によりスペルミジンが減少し慢性炎症が進むことやポリアミンにより炎症性サイトカインが減少すること、活性酸素のスカベンジャー機能など知られている(5)。NRF2 は抗酸化機構の中心的な転写因子であるが、その転写産物の HO-1 が著明にスペルミジンで上昇していることからスペルミジンは NRF2 を介していることが予想される。NRF2 の制御は油症の治療薬として重要と考えられている (1)。スペルミジン投与により活性酸素の抑制や症状の腸炎の緩和効果は生じることから、油症においてもスペルミジンによる症状緩和が得られることが期待される。

E 結論

ポリアミン代謝のうちスペルミジンは抗酸化作用により細胞死を抑制する。

参考文献

1) 油症の最新の知見と治療開発に向けて. 三苫千景, 内博史, 辻学, 古賀沙緒里, 古江増隆.
福岡医学雑誌 106(5): 184-194, 2015.
2)Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers.
Medina CB, et al. Nature. 2020 Apr;580(7801):130-135.
3) 尿中ジアセチルスペルミンと油症に関する検討. 柴田智子, 徳永章二, 古江増隆.
福岡医学雑誌 98(5): 136-140, 2007.
4) Protective Role of Spermidine in Colitis and Colon Carcinogenesis.
Gobert AP, et al. Gastroenterology. 2022 Mar;162(3):813-827.
5) Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon.
Nakamura A, et al. Nat Commun. 2021 Apr 8;12(1):2105.

Fig1

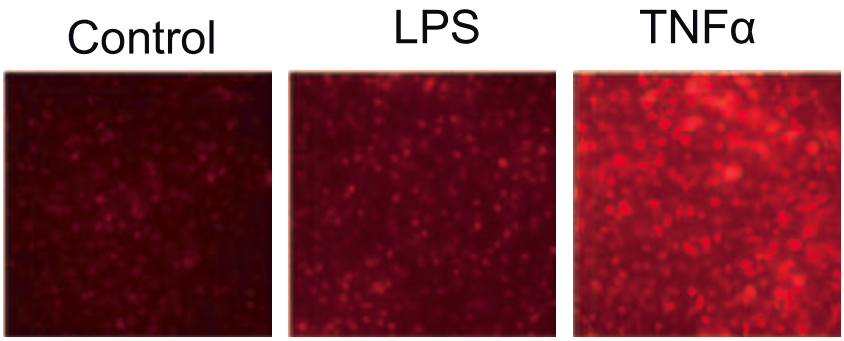


Fig1.炎症刺激時の細胞内ポリアミン: HCT116細胞に対してLPS(500ng/mL)、TNFα(50ng/mL)を添加し24時間後にポリアミンRedの蛍光を示す。

Fig2

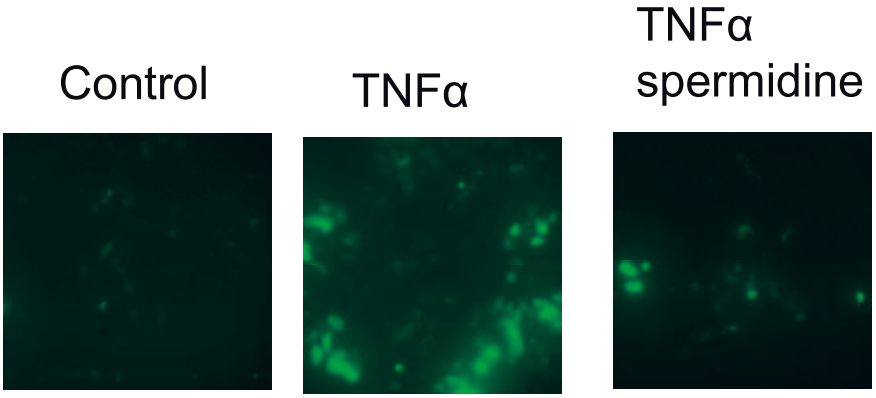


Fig2 スペルミジンによる酸化ストレスの減少
TNFα(50ng/mL) Spermidine50μMを添加し24時間後にDCF-DAの蛍光を示す。

Fig3

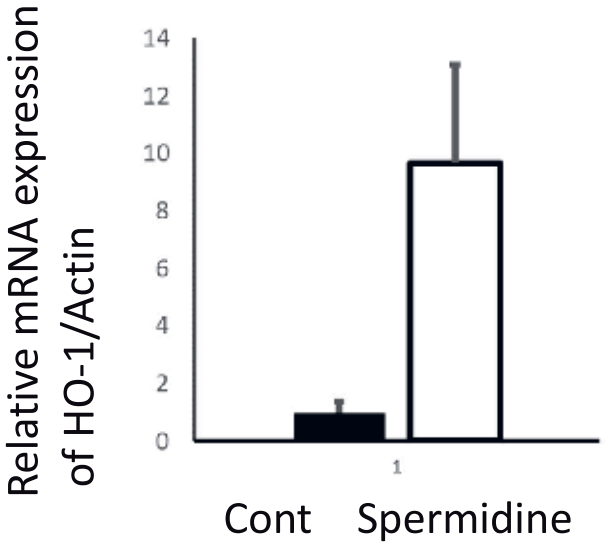


Fig3 スペルミジンによるHO-1の増加
Spermidine50μMによるmRNAの変化を示す

Fig4

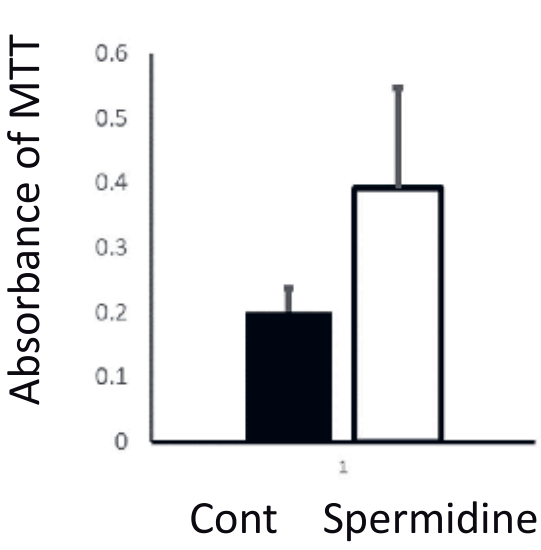


Fig4酸化ストレスによる細胞死のスペルミジンによる抑制効果。H2O2 800uMによる細胞死とスペルミジン50uM添加後のMTT assayの結果を示す。

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５年度油症患者の眼症状の発生およびその経過を調査した。

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５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

油症患者の眼症状の発生およびその経過を調査した。検診受診者は認定患者 155 名、未認定者 66 名であった。眼科的所見として、眼脂過多、眼瞼浮腫、眼瞼結膜色素沈着、瞼板腺嚢胞形成、瞼板腺チーズ様分泌物圧出の５項目を検討した。

Ｄ．考察

新型コロナウイルス感染症のため、2 年間検診の実施がなかったが、今回２年ぶりの実施で認定患者、未認定患者ともに多くの受診があった。受診者の高齢化が進み臨床所見は少なくなってきている。また、油症患者の眼科領域における臨床所見は徐々に軽くなっている。

Ｅ．結論

今後も油症患者の眼科的所見の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　講師
研究協力者　北岡 隆　　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 眼科・視覚科学分野　教授

研究要旨：角膜内皮細胞は角膜の透明性を保つために重要である。今回油症認定患者の角膜内皮細胞密度と、血中の PeCDF 濃度との関連を調査した。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

長崎県油症検診の 3 地区すなわち、玉之浦、奈留、長崎地区において 2023 年度油症検診の眼科部門を受診し、角膜内皮細胞密度の測定が可能であり、血中 PeCDF 濃度が測定された油症検診受診者を対象とした。スペキュラーマイクロスコープを用いて右眼の角膜内皮細胞密度を測定した。角膜内皮細胞に影響のある白内障術後や明らかな角膜疾患がある眼は除外した。右眼が対象外となる場合は左眼で測定した。角膜内皮細胞密度と直近の血中 PeCDF 濃度との関連を解析した。

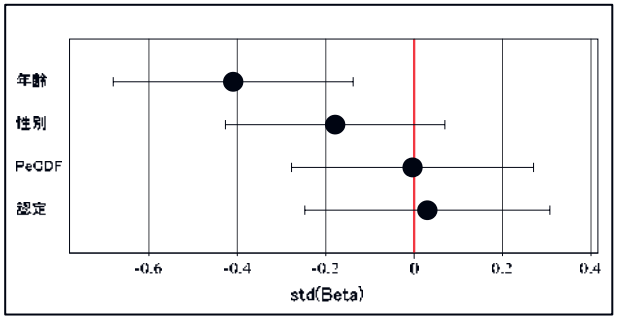
（倫理面への配慮）

本研究のデータ解析においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C. 研究結果

対象者は 63 人（男性 27 人、女性 36 人）で、年齢は 63.2±14.5（平均±標準偏差）歳であった。角膜内皮細胞密度は 2639.0±402.8 個/mm^2（平均±標準偏差）で、直近の血中 PeCDF 濃度は 26.7±52.6 pg/g lipids であった。

角膜内皮細胞密度を目的変数、年齢、性別、血中 PeCDF 濃度、認定の有無を説明変数として重回帰分析を行うと、年齢のみ角膜内皮細胞密度に関連した（図 1）。

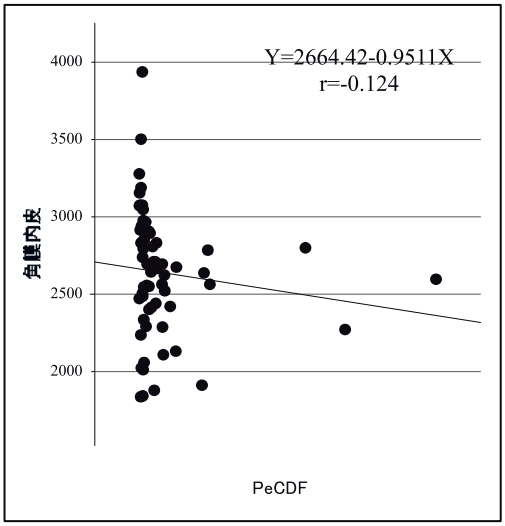


変数名	β	SE(β)	std β	t-val	df	P-val
認定	23.96	111.4	0.0298	0.2151	58	0.83044
年齢	-11.35	3.758	-0.4094	-3.0194	58	0.00376
性別	-144.3	100.1	-0.1787	-1.4416	58	0.15478
PeCDF	-0.02778	1.048	-0.0036	-0.0265	58	0.97894

（図 1）

また角膜内皮細胞密度と血中 PeCDF 濃

度の相関係数は-0.124 であり、明らかな相関は認められなかった（図 2)。



(図 2)

D. 考察

成人期の健康な眼の角膜内皮細胞の平均密度は 3,200 個/mm^2 であり、年齢により年間約 0.5%減少する [1)]。角膜内皮細胞は、角膜疾患、水晶体再建術や酸素透過性の低いコンタクトレンズの装用などで減少し、角膜内皮細胞密度が 500 個/mm^2 以下になると、水疱性角膜症を発症する可能性がある。角膜はマイボーム腺の分泌物を含む涙液に保護されているが、油症患者ではマイボーム腺に変性をきたすことがあるため、角膜に何らかの障害をきたす可能性も考えられる。

今回ダイオキシン類の角膜内皮細胞への影響について検討した。角膜内皮細胞密度に、年齢が関連することが再確認されたが、性別、血中 PeCDF 濃度や認定の有無との関連は認められなかった。マイボーム腺と角膜内皮細胞は角膜上皮および角膜実質により隔てられているため、血中 PeCDF 濃度が角膜内皮の減少に関連する可能性は低いと思われた。

E. 結論

今回の長崎県油症検診受診者において血中 PeCDF 濃度は角膜内皮細胞密度と関連はなかった。

F. 研究発表　なし

G. 知的財産権の出願・登録状況　なし

参考文献

1) Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. Eye (Lond). 1990;4 :389-424.

分担研究報告書

カネミ油症患者における頭痛・頭重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頭痛との差異の研究

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頭痛・頭重の頻度・性状を確認した．一斉検診の結果では，半数以上で頭痛を有していることが報告されている．一方，神経学的検査で他覚的な異常所見は認めず，頭痛の性状はいわゆる緊張性頭痛または機能性頭痛に酷似していた．また，,頭痛を有する群と頭痛の無い群で血中 PCB 平均濃度を比較したところ，両群間に有意な差は認めなかった．慢性期の同症患者に自覚される頭痛・頭重に PCB の関与があるのか慎重な判断が必要である。最新の機能・形態画像技術を用いることによって,新たな知見が得られるかもしれない.

A．研究目的

カネミ油症症例では、頭痛・頭重を来すことが知られているが、因果関係については十分明らかとなっていない。本研究ではカネミ油症による頭痛・頭重に関する文献的考察を進め、カネミ油との因果関係について考察する。また様々な中毒性疾患により頭痛・頭重が生じるが、カネミ油症による頭痛・頭重との特徴、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ポリ塩化ビフェニル(PCB)中毒症例を対象に頭痛・頭重に関して記載された文献を検索した。

発生頻度および曝露の機会の点から有機リン化合物・トルエンを挙げ、各有機物により発症する頭痛・頭重の特徴を調査した。

（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

1973 年度油症患者一斉検診時における患者 208 名について，頭痛の頻度（カルテ調査による）と血中 PCB 濃度，パターンとの関係が調査されていた[1]．また，九大病院油症外来(1974 年 1 月 1 日～9 月 14 日)患者 68 名について頭痛の頻度を調査し，頭痛を訴える患者に神経学的検査，2 名の患者に髄液検査（髄液中 PCB 測定）が施行された．

1973 年度一斉検診時,頭痛を訴えるものは全体の 59．1%にみられ，頭痛の訴えの無い症例（29．7%）と比較したところ，両群間に血中 PCB 平均濃度に差はみられなかった.九大病院油症外来患者では成人（20～75 才）50 名中 25 名（50%）が頭痛を訴え，そのうち 15 名（30%）が自覚的な四肢の異常感を自覚していた．一方，神経学的検査で他覚的に異常所見は認めず，頭痛の性状はいわゆる緊張性頭痛または機能性頭痛に酷似していた.種々の鎮静剤,筋弛緩剤はほとんど無効であった．2 名の患者の髄液一般検査で異常はなく，髄液 PCB 濃度もコントロールと比して上昇していなかった.

慢性の油症患者は半数以上が頭痛を訴えることが分ったが,神経学的に特記すべき異常所見を認めず,血中 PCB 濃度との関

係なく，髄液にも異常を認めなかった．本研究では，油症患者における頭痛は緊張性頭痛または機能性頭痛として片付けて良いかが問題となると締めくくられている．

2005 年に全国の油症認定患者に対して行われた調査票調査による油症患者健康調査の結果では，頭痛の既往は男性で 43.9%、女性 63.3%、併せて 53.7%で認められ，依然として高い割合であった[2]．なお本研究では，既往症としての頭痛の割合であるため，経時的な変化については不明で，研究の限界と考えられた．頭痛を有する症例と有さない症例で血中脂質 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度を比較しても統計学的な有意な関連は認めなかった。

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，頭痛・頭重感，全身倦怠感は，有機リン低濃度ガス暴露では一般的な症状で，頭痛・頭重感は眼毛様体筋の痙攣によるとされている[3]．

有機溶剤のトルエンでは，慢性期には頭痛，めまい，倦怠感などの不定愁訴のほか，末梢神経障害を生じる．画像所見として限局性～びまん性の白質病変を呈することが多い．T2 強調像における両側中小脳脚の対称性高信号が特徴的で，脳幹や内包後脚にも同様の高信号病変を認め，慢性期には脳萎縮をきたす[4]．

D．考察

文献的検討により，カネミ油症患者における頭痛・頭重に関する評価・考察を行った．過去の検討では、慢性期の油症患者における頭痛・頭重は神経学的検査で他覚的な異常所見は認めず，頭痛の性状はいわゆる緊張性頭痛または機能性頭痛に酷似すると報告されていた．さらに頭痛と血中 PCB 濃度・パターンとの間に相関関係はなく，髄液にも異常なかった．発症機序が推定されたり，画像検査で異常が同定可能な他の中毒性物質とは異なり，PCB と慢性期のカネミ油症患者に自覚される頭痛・頭重の因果関係については慎重な判断が必要である．一方，画像技術が発達した現在では，核医学検査や，MRI の撮像条件を工夫することで当時捉えられなかった機能的な変化や，微小な形態変化を同定できる可能性は残る．

E．結論

文献的検討により、カネミ油症患者における頭痛・頭重に関する評価・考察を行った。慢性期の同症患者に自覚される頭痛・頭重に PCB の関与があるのか慎重な判断が必要である。最新の機能・形態画像技術を用いることによって，新たな知見が得られるかもしれない．

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

特記事項なし

参考文献

1. 岩下宏，黒岩義五郎：油症における頭痛，最新医学.
1978.06;33(6)：1110-1111.
2. 徳永 章二，柴田 智子，古江 増隆：油症患者の既往歴頻度と血中脂質 2,3,4,7,8-PeCDF レベルとの関連，福岡医学雑誌 2007，05;98(5)：160-165.
3. 内藤裕史：化学兵器．中毒百科．南江堂，東京，2006，p197-220.

4. 豊口 裕樹,鹿戸 将史, 細矢 貴亮: 白質病変をきたす中毒性疾患, 臨床画像 2013;29(3):341-350.

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中毒ラットに対する a 5-deazaflavin derivative(TND)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、ベンゾピレン投与によるベンゾピレン暴露ラットにおける TND の効果を行動学的手法と分子生物学的手法を用いて検証した。その結果、ベンゾピレン投与によるベンゾピレン中毒ラットでは、有意な夜の自発運動量の低下がみられたが、ベンゾピレン中毒ラットに TND を投与した TND 群については自発運動量低下の抑制が認められた。感覚閾値の評価では、触・圧覚を伝える Aβ線維を選択的に刺激できる 2000Hz の電気刺激周波数において、ベンゾピレン中毒ラット群で感覚閾値の有意な上昇がみられたが、TND を投与した群では、その感覚閾値上昇の抑制がみられた。また、ベンゾピレンと TND の投与によるラットの行動変化と末梢及び中枢神経内の変化の関連性を検討するために坐骨神経と脊髄から Western blot 法を用いて cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1)、myelin basic protein (MBP)、myelin-associated glycoprotein (MAG) タンパク質の発現変化を検討した。その結果、ベンゾピレン中毒ラット群で坐骨、脊髄共に CYP1A1 タンパク質の発現増加、MAG タンパク質の発現低下がみられたが、MBP タンパク質については、群間に有意な差はみられなかった。しかし、TND 投与群では、ベンゾピレン中毒ラットでみられた CYP1A1 タンパク質増加の抑制傾向、MAG タンパク質の発現低下の抑制が認められた。MBP タンパク質についても発現減少の若干の抑制がみられたが有意差はなかった。これらの結果から、ベンゾピレンの投与はミトコンドリアに何らかの影響を与え、機能不全を起こすことによって軸索の変性による神経伝導速度の低下を引き起こししびれなどの神経異常をきたした可能性が考えられる。一方、TND はミトコンドリア内の ATP 生産を促進することで、ベンゾピレンの毒性によって引き起こされミトコンドリアの機能不全を抑制、又は機能不全となったミトコンドリアに作用し、機能を回復せることで軸索や樹状突起の神経損傷回復を促進し、感覚異常の症状を改善させた可能性が考えられた。

A．研究目的

カネミ油症事件は 1968 年に発生した食品汚染事件であり、55 年以上の歳月が経過した現在でも、感覚異常、痺れ、筋力低下、運動障害、頭痛、倦怠感などの慢性的な健康問題に悩まされる被害者が多く報告されている[1)]。油症の原因となったカネミオイルには Polychlorinated quarterphenyls (PCQ)、Polychlorinated biphenyls (PCB)、Polychlorinated dibenzoflirans (PCDF)等のダイオキシン類が混在していたことが明らかにされている[1)]。PCB 等のダイオキシン類は神経毒性を持つ化学物質で、摂取すると神経系に深刻な影響を与えことが報告されており、油症患者でも感覚異常や神経痺れ、筋力低下などの神経症状が多く報告されている。しかし、その発生機序や治療方法については未だ不明な部分が多い[2-4)]。近年、私たち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用いた動物実験で、ベンゾピレンの毒性が触・圧覚を伝える Aβ線維に作用し、感覚異常などを発生させた可能性を報告している[5)]。また、ATP 産生量促進作用やニューロンの axon と dendrite の発育促進、神経損傷からの回復促進などの効果が報告されている Vitamin B2 関連物質である β-Nicotinamide mononucleotide

（β-NMN)がベンゾピレンによる感覚異常の症状改善に有効である可能性も確認している[5-6]。しかし、β-NMN の場合-20℃で保存、常温で容易に分解をされるため薬品としての開発に難点があったが、近年常温でも分解されないVitamin B2の誘導体、a 5-deazaflavin derivative(TND)が開発され、常温でも簡単に使用できることと共に、ミトコンドリアの機能不全により起こる神経異常の改善にも効果がある可能性が示唆されている。従って、本研究では、2 週間のベンゾピレン投与によるベンゾピレン暴露ラットにおける TND の効果を行動学的手法と分子生物学的手法を用いて検証することを目的とした。

Ｂ．研究方法

5 週齢の Wistar 系雄性ラット(SLC㈱、静岡)を用いて、Corn-oil 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 0.3 mg/kg TND 投与群 (Ben+0.3 mg TND)、ベンゾピレン 2 週間連続投与後 1 mg/kg TND 投与群 (Ben+1 mg TND) に分けた。Corn-oil 投与群では Corn-oil を、ベンゾピレン投与群では 30mg/kg ベンゾピレンを経口投与器でそれぞれのラットに 2 週間、1 回 500μℓ ずつ胃に直接に投与した。2 週間のベンゾピレン投与後から Corn-oil 投与群とベンゾピレン投与群には蒸留水、TND 投与群には 0.3mg/kg、1mg/kgの TND をそれぞれ経口投与器を用いて 1 ml ずつ、4 週間胃に直接投与した[5,6]。ラットの自発運動量の計測のために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。背中側にナノタグを装着するため、ラット等小動物実験用簡易吸入麻酔装置を用いて、3%イソフルランを使用し深麻酔下で背部を剃毛した後に、ヨード液を用いて皮膚の消毒を行った。滅菌済みの手術道具を用いて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。自発運動量の計測については、手術 1 週間後から毎週 1 回、20 時から 24 時間計測した[6]。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線維の刺激が可能である 2000Hz の正弦波電機刺激のみを使用し、覚醒下のラット右後肢足底部に刺激を与えてからラットの逃避反応が観察される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[5,6]。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、左右の坐骨神経と脊髄標本を採集し、-80℃で凍結した。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)、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。3 種混合麻酔薬を用いて全身麻酔下でラットの左右坐骨神経と脊髄標本を採集後、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、ベンゾピレン投与２週間後、その後の蒸留水又はTNDの４週間投与まで２週間毎に測定を行った。その結果、Corn-oil2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。しかし、ベンゾピレン２週間投与後からTNDを投与した(Ben+0.3 mg TNDとBen+1 mg TND) 群については自発運動量低下の抑制が認められた (Fig.1)。

ベンゾピレンとTND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たが、TNDを投与したBen+0.3 mg TNDとBen+1 mg TND群で、その感覚閾値上昇の抑制がみられた (Fig.2)。

ベンゾピレンと TND の投与によるラットの行動変化と末梢及び中枢神経内の変化の関連性を検討するために坐骨神経と脊髄のL1～L5を取り出し、AHRの活性を測定するために CYP1A1 タンパク質 (Fig.3A)、末梢及び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.3B)、MBP (Fig.3C) 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群に対し坐骨神経、脊髄神経共に CYP1A1タンパク質の有意な発現増加がみられた。その増加は、TND を投与した Ben+0.3 mg TND と Ben+1 mg TND 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。MAGタンパク質においては、Ben+DW群で有意な発現減少が坐骨神経と脊髄神経でみられ、Ben+1 mg TND群ではその発現減少の抑制が坐骨神経と脊髄神経共にみられた。MBPタンパク質については、Ben+DW群で有意な発現減少が坐骨と脊髄神経でみられたが、有意差は認められなかった。TND投与群ではいずれの神経においても発現減少の若干の抑制がみられたものの、有意差はなかった。

D．考察

本研究ではダイオキシン類似化合物の中毒による神経障害症状を呈したラットへの TND の投与が及ぼす影響について検討した。その結果自発運動量計を用いた行動学的手法では、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。蜂須賀 [7] によるとラットに神経障害がある場合、ラットの自由運動量が減少すること報告している。石堂 [8] は、環境化学物質を生後 5 日齢のラット脳に投与した後、ヒトの学童期に相当する 4-5 週齢で自発運動量を測定した結果、フェノール類とフタル酸エステル類でラットの自発運動量が増加したと報告しており、環境化学物質がドーパミン神経だけでなくノルアドレナリン神経やセロトニン神経など多種類の神経に対して毒性を示した可能性や、その影響で行動の変化が起こることを報告している。これらの報告より、本研究でみられたベンゾピレン経口投与ラットの自発運動量低下は、環境化学物質を経口投与し消化管を介して体内に取り込まれた場合と中枢神経内に直接投与された場合では、その影響が異なる可能性が示唆された。ダイオキシン類は、難分解性の環境汚染物質であり、ヒトへの暴露の 90%以上が肉や魚介類、乳製品などの食物を介して起こる。これらの物質は強い毒性を持ち、生殖や成長面の問題、免疫システムやホルモン、神経障害を引き起こすことが報告されており、発がん性も示

されている[9]。ダイオキシン類に暴露されたカネミ油症患者では、感覚鈍麻やしびれ感などの末梢および中枢神経障害が多く報告されている[2-4]。末梢のしびれ感は、末梢神経の Aβ線維の伝導速度低下が関係していると考えられており、近年ベンゾピレンを用いた私たちの研究結果でも、ベンゾピレンの毒性により Aβ神経線維の伝導速度が低下していることを確認している[5]。植田ら[10]によると、Aβ 神経線維は 2000Hz の電気刺激によって選択的に刺激することが可能であると報告しており、これらの報告から本研究で行った 2000Hz の電気刺激による閾値上昇は、ベンゾピレンの毒性による Aβ 線維の異常に起因する感覚異常である可能性が考えられる。閾値の上昇は神経障害や炎症によってみられ、感覚異常やしびれ感を引き起こすことが報告されている[11,12]。閾値と神経伝導速度は、神経の正常な機能と神経障害の評価において重要な指標であり、密接に関係している。神経伝導速度の遅延の要因としては脱髄が考えられ、脱髄疾患は四肢のしびれなど様々な神経症状が出る原因不明の難病であり、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に起こるとされている[14,15]。本研究では、ベンゾピレン経口投与ラットでの Aβ神経線維の伝導速度低下や 2000Hz の電気刺激による閾値上昇と脱ミエリンとの関係を検討するために、神経系におけるミエリン鞘と関連するタンパク質である MBP (Myelin Basic Protein) タンパク質と MAG (Myelin-Associated Glycoprotein) タンパク質の発現を比較した。その結果、ベンゾピレン投与群では MAG タンパク質の有意な発現低下と MBP タンパク質の減少傾向がみられ、ベンゾピレン投与群における感覚閾値の上昇はベンゾピレンの毒性により脱髄が起こることで神経の伝導速度が低下し、感覚閾値が上昇した可能性が示唆された。

本研究の結果、a 5-deazaflavin derivative(TND)の投与はベンゾピレン投与群において、自発運動量の有意な低下抑制、感覚閾値上昇抑制、MAG タンパク質の発現低下を抑制させた。Katsurabayashi ら[15]は、TND がマウス脳から摘出した幼若ならびに成熟海馬細胞内の ATP 産生を増加させ、その結果として樹状突起、神経軸索の発達・分岐およびシナプス数の著明な増加を報告している。Takahashi ら[16]は、マウス脳スライス標本のサイトゾルおよびミトコンドリアにおける重度の脱分極誘発性 Ca^{2+}過負荷からの TND の保護効果をβ-NMN と比較した結果、細胞内遊離 Ca^{2+}の増加を TND が ATP を増加させることにより抑制し、β-NMN より虚血による細胞死を 100 倍程度も薄い濃度で減少させることを報告している。本研究でも TND の効果が以前行ったβ-NMN の効果検討時の濃度より 100 倍程度も薄い濃度で観察された。これらの結果は、TND が親水性であるβ-NMN より疎水性が高いため、神経膜などを通りやすいことで 1 mg/kg 未満の用量でもβ-NMN と同様な有効性を示した可能性が考えられる。これらの TND の効果は、TND が酸化還元活性を持つ分子であり、外部から投与された場合、ミトコンドリアの電子伝達鎖を介してサイトゾルでの嫌気性 ATP 産生および好気性条件に直接組み込まれた結果である可能性を Takahashi ら[16]は報告している。多くの神経変性疾患ではミトコンドリアの異常がみられており[17,18]、ミトコンドリアが軸索の変性および再生において重要な役割を果たすことが確認されている。特にミトコンドリアの機能障害は、軸索変性の初期段階で発生し、酸化ストレス、エネルギー不足、およびミトコンドリア輸送の欠陥を伴うと報告されている[17,18]。また、ミトコンドリア輸送の強化、活性酸素種 (ROS) のクリアランスおよび生体エネルギーを改善することで、軸索再生に大きく

影響を与えることが報告されている[17,18]。これらの報告から、ベンゾピレンの投与はミトコンドリアに何らかの影響を与え、機能不全を起こすことで軸索の変性による神経伝導速度の低下を引き起こした可能性が考えられる。しかし、TNDの投与はミトコンドリア内のATP生産を促進し、ベンゾピレンの毒性により引き起こされたミトコンドリアの機能不全を抑制、又は機能不全となったミトコンドリアに作用し機能回復を起こすことで軸索や樹状突起の神経損傷からの回復を促進し、結果として感覚異常の症状を改善させた可能性が考えられる。

Ｅ．結論

本研究の結果から、ベンゾピレンの毒性がAHRを介して、触・圧覚を伝えるAβ線維に作用することで軸索の変性を起こし、感覚異常等を発生させた可能性が示唆された。一方、TNDの投与はミトコンドリア機能不全の抑制による神経保護、又は機能不全になったミトコンドリアに作用し回復させることで、ベンゾピレンによる感覚異常の症状改善に有効である可能性が示唆された。

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) 申 敏哲，行平 崇，小牧龍二，他:感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討．福岡医誌，112(2)：155-163，2021.
6) 小牧龍二，行平崇，福永貴之，他: 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.
7) 蜂須賀研二：自由走行がラットの acrylamide neuropathy に及ぼす影響-いわゆる overwork weakness について - リハ医学，20:241-250，1983.
8) 石堂正美：読環境化学物質による発達期精神神経とDOHaD仮説 - 中核研究プロジェクト２「感受性要因に注目した化学物質の健康影響評価」から - 国立環境研究所ニュース，28：3 - 5，2009.
9) 公益社団法人日本 WHO 協会:ダイオキシン.https://japan-who.or.jp/ factsheets/factsheets_type/dioxins-and-their-effects-on-human-health/(2024 年 3 月 14 日)
10) 植田 弘師，松本 みさき：ニューロメーターを用いた新しい知覚線維選択的侵害受容評価法．日本薬理学雑誌，131: 367-371，2008.
11) O'Neill J, Sikandar S, McMahon SB, et al.: Human psychophysics and rodent spinal neurones exhibit peripheral and central mechanisms of inflammatory pain in the UVB and UVB heat rekindling models. Pain, 156(9):1666-1675, 2015.
12) Bove GM, Delany SP, Hobson L, et al.: Manual therapy prevents onset of nociceptor activity, sensorimotor dysfunction, and neural fibrosis

induced by a volitional repetitive task. Pain,160(3):632-644, 2019.
13) Michalek JE, Akhtar FZ, Arezzo JC, et al : Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation Ranch Hand. Neurotoxicol, 22(4): 479-490, 2001.
14) Thömke F, Jung D, Besser R, et al : Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans. Acta Neurol Scand, 106(3): 155-158, 2002.
15) Katsurabayashi S, Oyabu K, Kubota K, et al: The novel mitochondria activator, 10-ethyl-3-methylpyrimido[4,5-b]quinoline- 2,4(3H,10H)-dione (TND1128), promotes the development of hippocampal neuronal morphology. Biochem Biophys Res Commun, 560:146-151, 2021.
16) Mandal A, Drerup CM: Axonal Transport and Mitochondrial Function in Neurons. Front Cell Neurosci, 9;13:373, 2019.
17) Wang B, Huang M, Shang D, et al: Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration. Front Aging Neurosci,13:650038, 2021.

F．研究発表

１．論文発表

福永貴之， 小牧龍二，申 敏哲．舌への触・圧、痛覚刺激が脳血管性認知症モデルラットの記憶力と細胞死に及ぼす影響．熊本保健科学大学研究誌，21:1-12,2024.

２．学会発表

無し

G．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

１．特許取得

無し

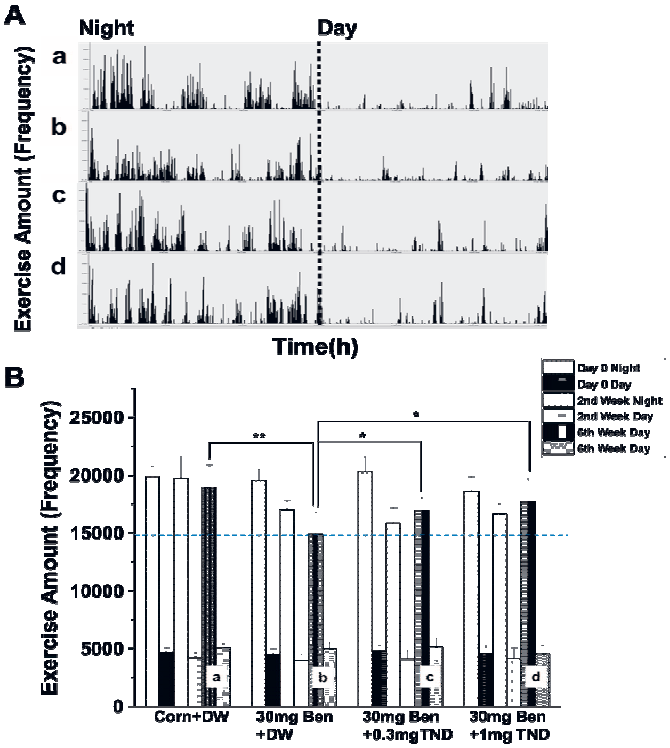
２．実用新案登録

無し

３．その他

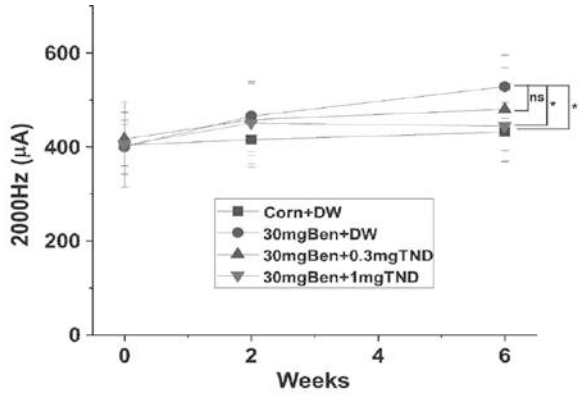
無し

Fig 1. ベンゾピレンと a 5-deazaflavin derivative(TND)の投与がラットの自発運動量変化に及ぼす影響。



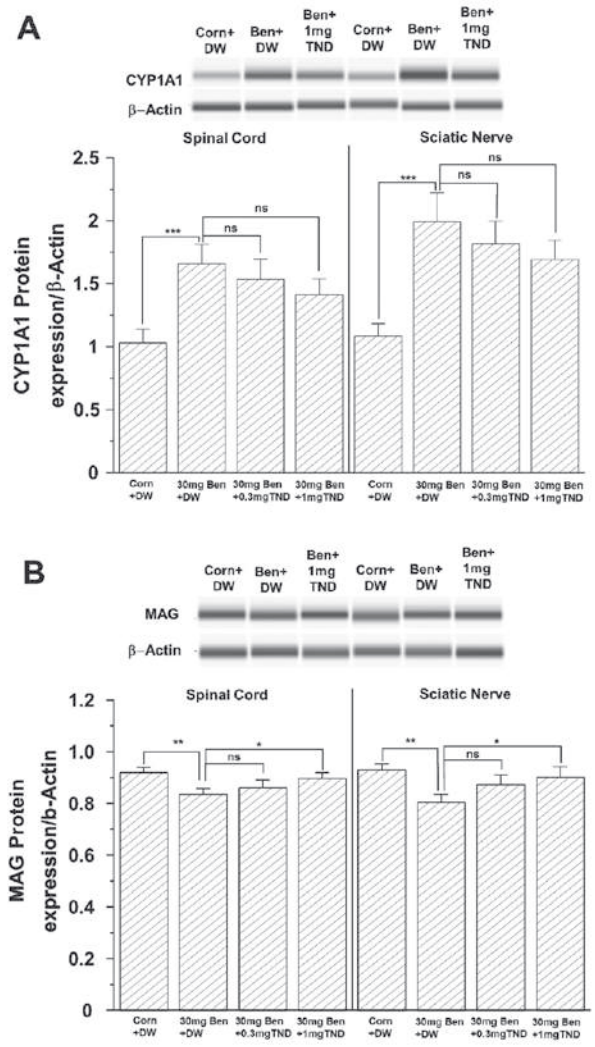
A, 自発運動量の代表例 B. 時間的経過による自発運動量の変化。Corn、 Corn-oil; DW、蒸留水; 30mgBen、30mg/kg ベンゾピレン;TND、a 5-deazaflavin derivative。*、P<0.05; **、 P<0.01; n.s.、no signific ant; Mean±S.D.

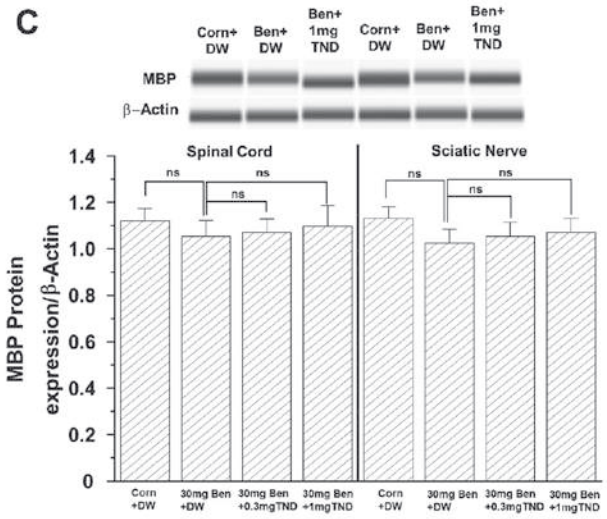
Fig 2. ベンゾピレンと TND の投与がラットの感覚閾値の変化に及ぼす影響。



Corn、 Corn-oil; DW、蒸留水; 30mgBen、30mg/kg ベンゾピレン;TND、a 5-deazaflavin derivative。*、P<0.05; n.s.、no significant; Mean±S.D.

Fig 3. ベンゾピレンと TND の投与がラットの CYP1A1、MAG、MBP タンパク質の発現に及ぼす影響。





A、CYP1A1 タンパク質の変化;B、MAG タンパク質の変化;C、MBP タンパク質の変化. Corn、Corn-oil; DW、蒸留水; 30mgBen、30mg/kg ベンゾピレン;TND、a 5-deazaflavin derivative;CYP1A1、cytochrome P450 (P450) 1A1;MAG、myelin-associated glycoprotein;MBP、myelin basic protein。*、P<0.05; **、P<0.01; ***、P<0.001; n.s.、no significant; Mean±S.E.

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。このように、AHR 欠損がラット精巣重量を低下させ、FGF および FGFR を誘導することを明らかにしてきた。R5 年度は、精巣以外のステロイド合成に重要な臓器として副腎、およびステロイド合成の上位調節器官の視床下部について検討を行い、PAPSS1 では減少傾向、PAPSS2 では AHR 欠損による影響は見られなかった。また、副腎・視床下部でも FGF 類解析を行った。その結果、副腎の FGFR1,3 のみ有意な増加が見られ、その他の因子に関しては AHR 欠損による影響は見られなかった。さらに、副腎・視床下部においても Gpc, Sdc の解析を行ったが、どの因子においても AHR 欠損による影響は見られなかった。副腎・視床下部いずれにおいても、AHR 欠損により FGF および FGFR への影響は限定的で、硫酸化の補酵素 PAPS 合成酵素も変動しなかった。従って、FGF および FGFR 誘導やヘパラン硫酸の硫酸化度合いの低下および発現低下は精巣特異的であることが示唆された。

A．研究目的

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

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

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

当研究室では、AHR 欠損 (KO) ラットを作成し、ダイオキシンによる肝毒性発現

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

これらの結果はすべて精巣における解析であり、他の臓器でも同様の変動が起こるは明らかになっていない。そこで R5 年度は、これらの AHR 欠損による影響が他のステロイド産生臓器である副腎や上位制御器官の視床下部でも起こりうるのか、またその機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

Ｂ．研究方法

1. 動物実験

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

1-1. 児の AHR 遺伝子型間での比較

雌雄の AHR-Het ラットを一晩交配し、

翌朝膣内に精子が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。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 週齢にて実験に供した。副腎皮質および視床下部を摘出し、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 週齢を対象にし、AHR 欠損による影響を解析した。

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 (19)。この硫酸化には、補酵素として硫酸供与体である PAPS が合成されることが必要である。この PAPS の合成にはヒトやラットにおいては PAPSS がこの反応を担い、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 (20,21)。

これらを踏まえ、先行研究では思春期ラットの精巣における PAPSS1,2 の mRNA 発現量が解析された。結果として AHR 欠損によって PAPSS の発現量が減少することが明らかとなった (R4 年度報告書)。この結果を受け、同じく思春期ラットにおいて副腎・視床下部での解析を行った。その結果、副腎・視床下部のどちらにおいても PAPSS1 では減少傾向、PAPSS2 では AHR 欠損による影響は見られなかった (Fig. 1,2)。

先行研究より、AHR 欠損によって思春期での精巣重量の減少が明らかとなった (R2 年度報告書)。このことから、AHR が精巣のサイズに関与する可能性が示唆された。そこで精巣重量減少の原因を解明すべく、精巣の成長や精巣のもととなる製紙幹細胞の増殖に関する因子である、線維芽細胞成長因子 FGF (fibroblast growth factor) およびその受容体である FGFR (FGF receptor) (22) について検討が行われた。FGF は、発生、細胞増殖、形態形成など、多数の発達過程を調節することが知られている (23,24)。結果として、AHR 欠損によって思春期で FGF1,FGF2 及び FGFR1,FGFR3 の発現量が増加、FGF9 においては発現量が減少することが明らかとなった [R4 年度報告書]。

また、HDAC (histone deacetylase) は FGF シグナルを抑制的に調節していると報告されている (22)。そこで先行研究で精巣における発現量を解析したところ、AHR 欠損によって HDAC2,7 の発現量が有意に低下することが明らかとなった [R4 年度報告書]。

これらを受けて、副腎・視床下部でも同様に FGF 類解析を行った。その結果、副腎の FGFR1,3 のみ有意な増加が見られ、その他の因子に関しては AHR 欠損による影響は見られなかった (Fig. 3-6) 。 なお、視床下部の HDAC4,6 については発現量が少なく、データが得られなかった。

FGF の作用発現には HSPG (heparan sulfate proteoglycan) が重要であることが知られている (25)。HSPG は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の硫酸化二糖が繰り返された長い直鎖上の糖鎖である HS (heparan sulfate) 鎖が、SDC (syndecan) や GPC (glypican) などの特定のコアタンパク質に共有結合した構造をもっている (26,27)。FGF は、HSPG に対して高い親和性を有しており、FGF が FGF・FGFR・HSPG 複合体の形態で FGFR と結合することでシグナル伝達が起こる (26,27)。そこで、先行研究では精巣におけるこれら GPC,SDC の mRNA 発現量の解析が行われ、結果として GPC4 で有意な減少、SDC4 で減少傾向が見られた [R4 年度報告書]。これらを踏まえ、副腎・視床下部においても GPC,SDC の解析を行った。結果として、どの因子においても AHR 欠損による影響は見られなかった (Fig. 7,8)。

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について、主に先行研究で精巣において変動があったものに関して検討した。まず、ステロイドホルモンの硫酸化に関する酵素の mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法によって解析した結果、副腎・視床下部では有意な変動は見られなかった (Fig. 1,2)。ステロイドホルモンは硫酸化されることで細胞への取り込みが促進されるが、具体的には、水溶性が増すことで血液中へと移行し、種々の細胞に発現しているトランスポーターを介して容易に取り込まれ、脱硫酸することでホルモン作用を示す。PAPSS1 と 2 は非常によく似たアイソフォームであり、局在箇所は PAPSS1 は核に、PAPSS2 は細胞質に発現と異なっているもののそれらの機能には大きな違いは認められていない (28)。今回、副腎と視床下部ではこれらの酵素の有意な変動はなく、精巣特異的である可能性が示唆されたが、PAPS の定量を行うことも今後検討すべき課題であろう。また、ダイオキシン母体暴露した胎児の脳下垂体で HDAC の発現誘導が認められている (29)。

また、精巣の成長に関わる因子である FGF 類に関しては副腎における FGFR1,3 は有意な増加が見られたもののその他の FGF 類に関しては AHR 欠損による影響は見られなかった (Fig. 3,4)。精巣においては FGF1,2 および FGFR1,3 において有意な増加が見られ、FGF9 に関しては有意な減少が起こっていたが、副腎・視床下部では同様の結果とはならなかった。思春期における精巣では精巣重量の低下が起こっており、精巣重量の低下や精子数減少による FGF 及び 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。よって、AHR を欠損させた思春期ラットの副腎及び視床下部の重量を測定することは今後の課題であろう。

FGF のシグナル伝達は HDAC により抑制されていると報告されており (22)、加えて HDAC による発現抑制が解かれたことによって FGF 類の遺伝子発現が上昇した可能性が考えられたため、HDAC 類の発現量に関しても解析を行った。結果として有意な変動は起こっておらず (Fig. 7,8)、これらの変動が精巣特異的であることを支持する結果となった。また、精巣においては FGF 及び FGFR が十分に機能していないことが推定され、これらの作用

発現に必要な HSPG の変動が疑われ、結果として GPC4,SDC4 で減少が見られた。しかし副腎及び視床下部では有意な変動は見られず (Fig. 7,8)、これら一連の変動が精巣特異的であることを支持する結果となった。

E. 結論

AHR の欠損により、思春期 8 週齢雄の精巣では、精巣重量が低下、testosterone 低下、精子数の減少が起こり、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てきた。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てきた。FGF や FGFR の増加や HDAC の低下、一部の HSPG の低下も示唆されてきた。本研究では、ステロイド産生臓器である副腎、その上位調節器官である視床下部での検討を行った。FGF については、副腎において FGFR1 および 3 が AHR 欠損により有意に増加したが、視床下部には認められなかった。HDAC には副腎および視床下部で変動がなかった。また、PAPS 合成酵素 PSPSS1 への AHR 欠損の影響は減少傾向、PASS2 には影響しなかった。これらのことから、AHR 欠損により精巣に認められた重量低下とその関連因子の変動は、副腎および視床下部においては限定的であり、精巣特異的作用であることが示唆された。これら精巣における制御に 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. 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) 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) Mueller JW, Gilligan LC, Idkowiak J, Arlt W, Foster PA. *Endocr Rev*, **36:** 526-563 (2015)
20) Mueller JW, Shafqat N. *FEBS J*, **280:** 3050-3057 (2013)
21) Markovich D. *Pflugers Arch*, **466**: 131-137 (2014)
22) Lee TW, Lee TI, Lin YK, Kao YH, Chen YJ. *J Biomed Sci*, **25**: 42 (2018)
23) Chen L, Li X, Wang Y, Song T, Li H, Xie L, Li L, Chen X, Ma L, Chen Y, Lv Y, Li X, Ge R. *Front Endocrinol*, (Lausanne)., **10:** 118 (2019)
24) Beenken A, Mohammadi M. *Nat Rev Drug Discov*, **8:** 235-253 (2009)
25) Laslett AL, McFarlane JR, Risbridger GP, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **60**: 171–179 (1997)
26) Ornitz DM, Itoh N. *Rev Dev Biol*, **4**: 215-266 (2015).
27) Turner N, Grose R. *Nat Rev Cancer*, **10**: 116-129 (2010).
28) Boom J, Heider D, Martin SR, Pastore A, Mueller JW. *J. Biol. Chem*, **287:** 17645–17655 (2012)
29) Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y, Yamada H. *J Biol Chem*, **287:** 18440–18450 (2012)

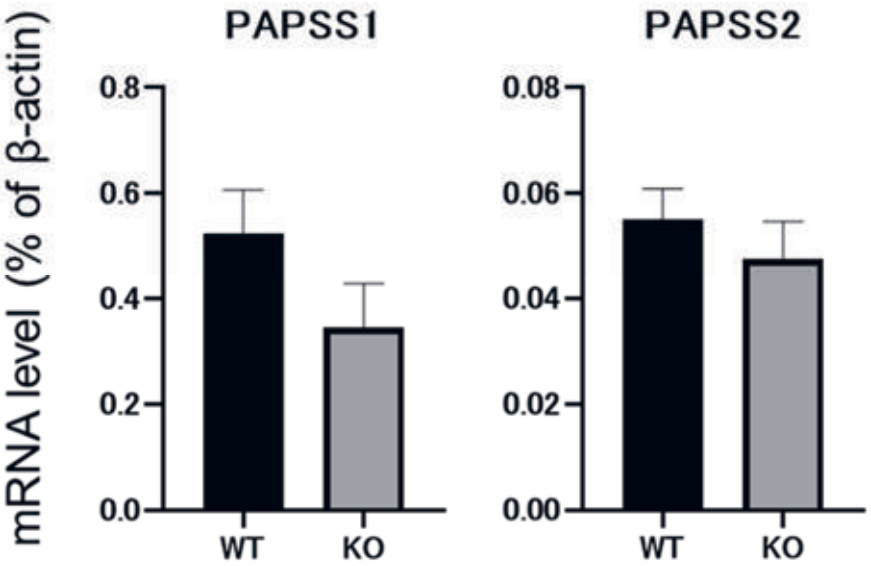


Fig. 1 The adrenal glands expression of PAPS synthase mRNA level in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 3-5 rats. Abbreviations used: PAPS, 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate; PAPSS, PAPS synthase.

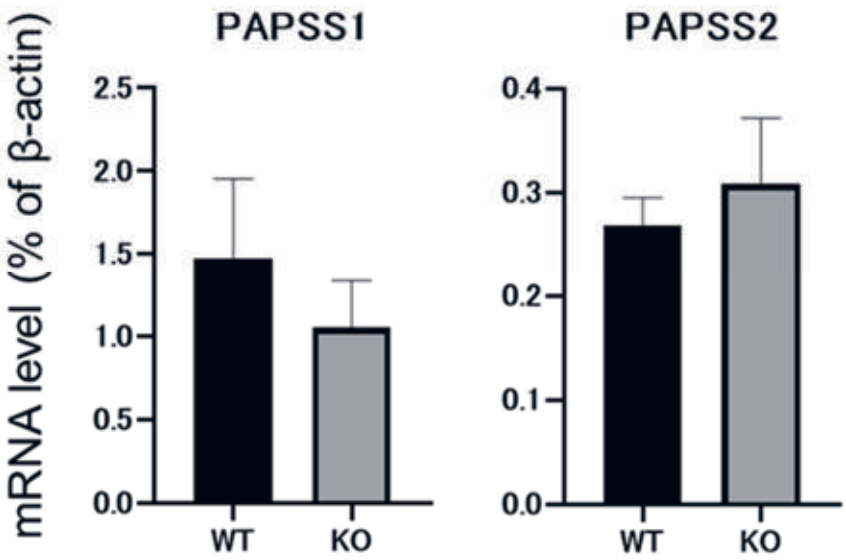


Fig. 2 The Hypothalamus expression of PAPS synthase mRNA level in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 3-5 rats. Abbreviations used: PAPS, 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate; PAPSS, PAPS synthase.

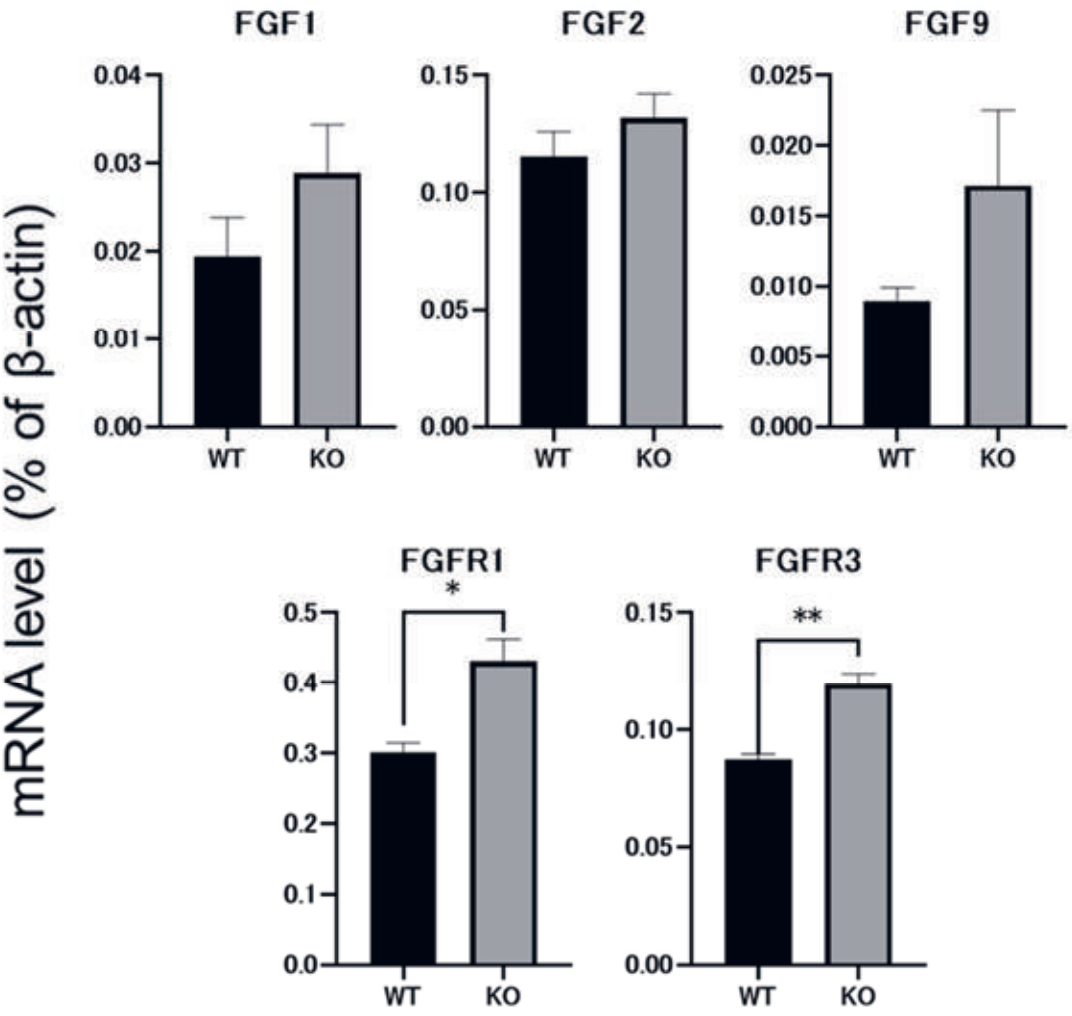


Fig. 3 The adrenal glands expression of the FGF and FGF receptor mRNA level in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 3-5 rats. Significantly different from the control: *p<0.05, **p<0.01.
Abbreviations used: FGF, fibroblast growth factor; FGFR, FGF receptor.

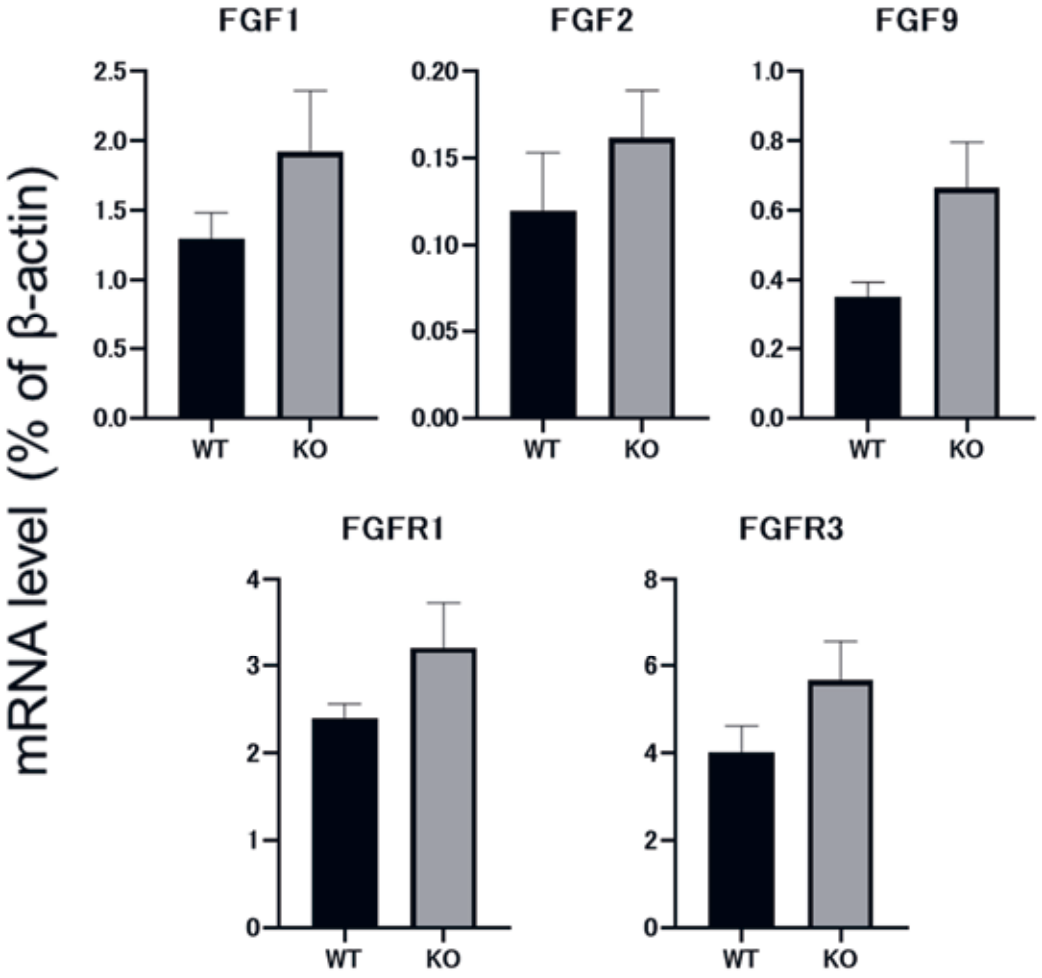


Fig. 4 The hypothalamus expression of FGF and FGF receptor mRNA level in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 3-5 rats.
Abbreviations used: FGF, fibroblast growth factor; FGFR, FGF receptor.

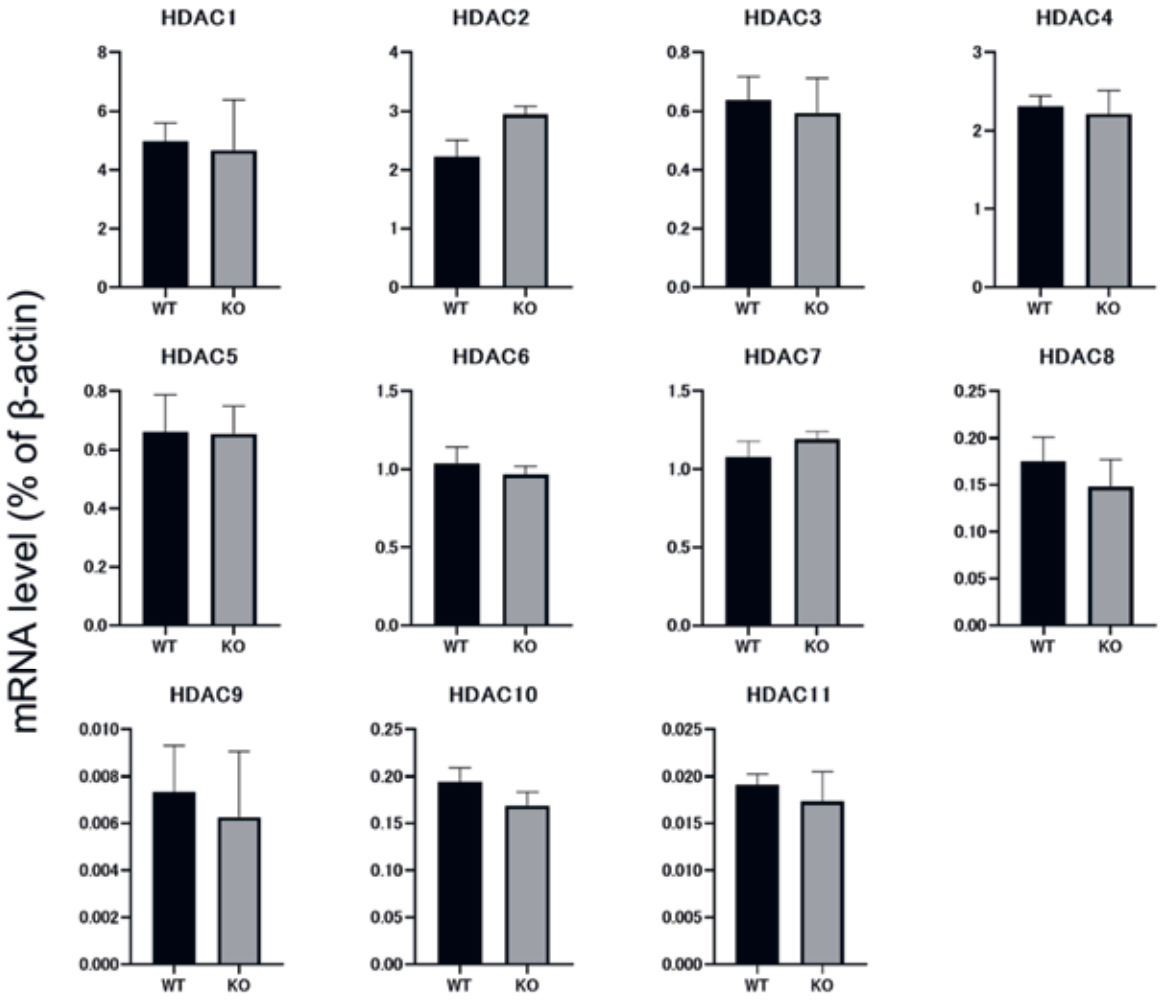


Fig. 5 The adrenal glands expression of histone deacetylase mRNA level in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 3-5 rats.
Abbreviation used: HDAC, histone deacetylase.

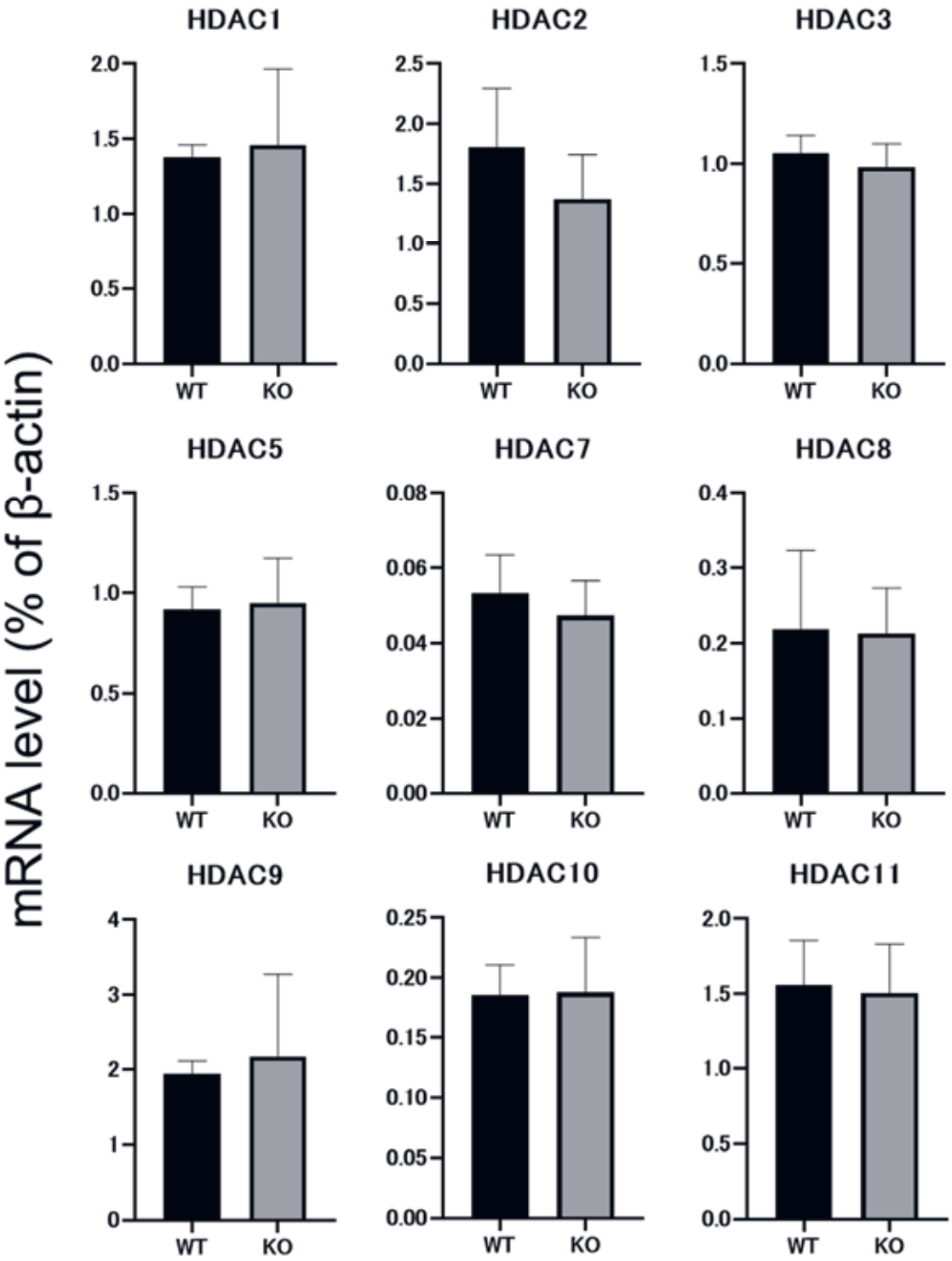


Fig. 6 The hypothalamus expression of histone deacetylase mRNA level in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 3-5 rats. Abbreviation used: HDAC, histone deacetylase.

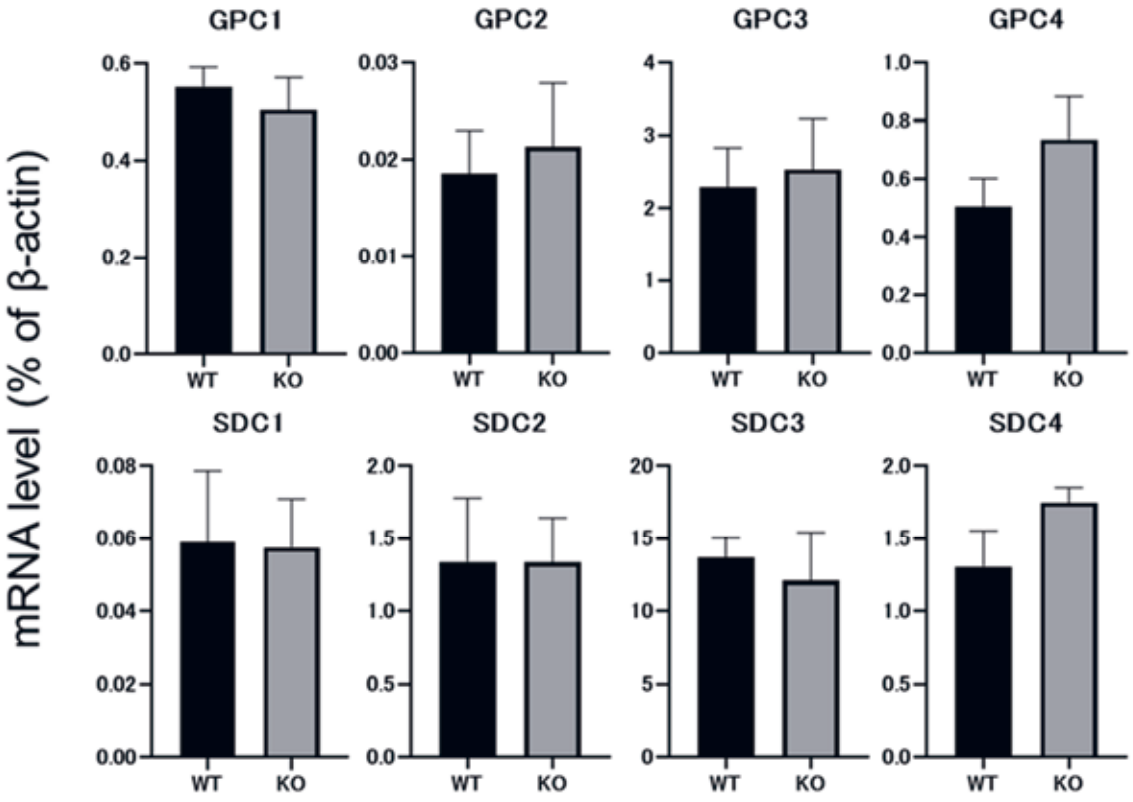


Fig. 7 The adrenal glands expression of glypican and syndecan mRNA level in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 3-5 rats.
Abbreviations used: GPC, glypican; SDC, syndecan.

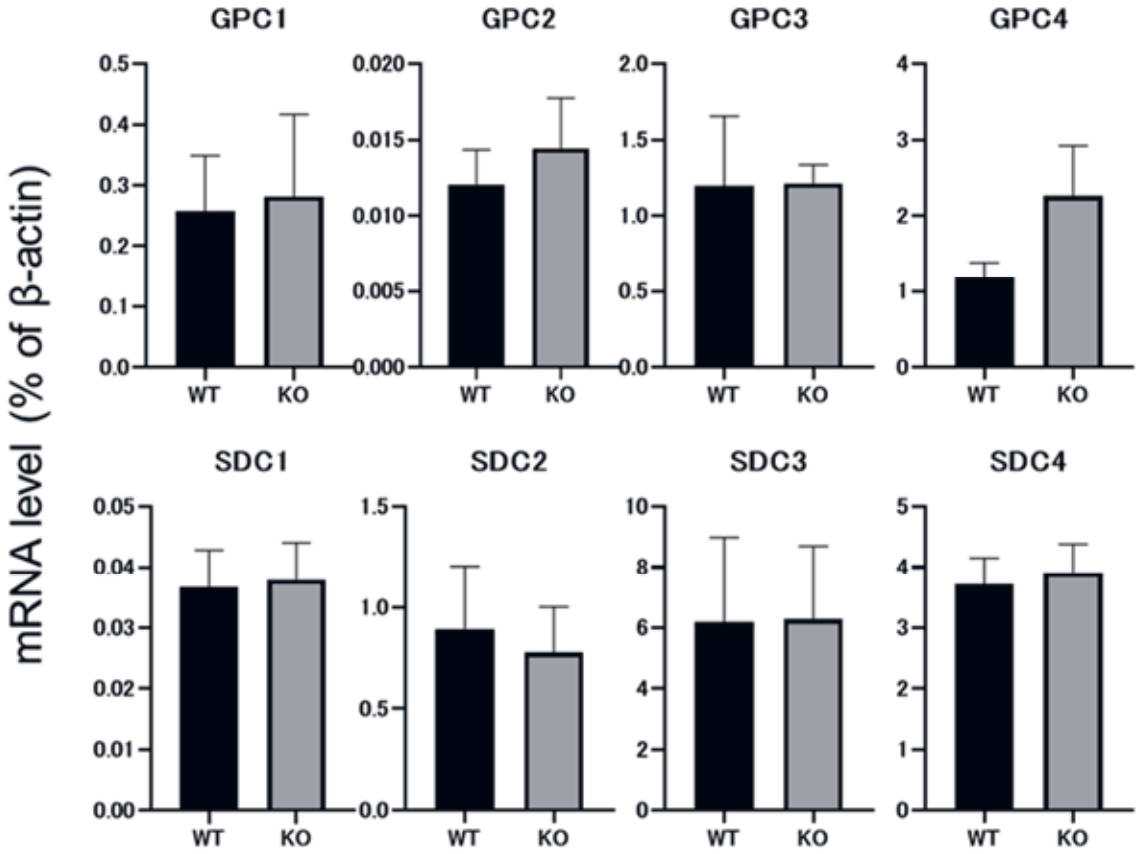


Fig. 8 The hypothalamus expression of glypican and syndecan mRNA level in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 3-5 rats.
Abbreviations used: GPC, glypican; SDC, syndecan.

分担研究報告書

ヒト末梢感覚神経におけるAHRシグナルを介した皮膚炎の制御機構の解明

研究分担者　　山村 和彦　九州大学病院油症ダイオキシン研究センター 助教

研究要旨　ヒト末梢感覚神経細胞ではAHRの発現が低い一方で、近年ダイオキシン類に対する防御機構で注目されているPyruvate kinase isoform M2 (PKM2)が恒常的に発現しており、環境汚染物質PM2.5でその発現が増強されている可能性が示された。

Ａ．研究目的

油症はPCB類とダイオキシン類の混合中毒であり、ダイオキシンの代表的な受容体の一つであるAHRを介してさまざまな皮膚障害を引き起こすことが知られている。加えて油症患者では末梢感覚の低下・しびれなどの感覚障害の頻度も健常人に比べて有意に多い。近年の研究ではAHRを過剰発現させたマウスでは皮膚のartemin の産生が誘導されることで表皮内神経伸長が促され、皮膚炎が惹起されるという機序が明らかとなった。しなしながら油症患者の血清artemin濃度は健常人と比較して明らかな差は認められていない。本研究ではヒト末梢感覚神経/感覚神経を模した細胞株を用いて、主にAHRシグナル等に着目し、油症における感覚異常と皮膚障害の関連とその機序の解明を目的とする。

Ｂ．研究方法

末梢感覚神経である脊髄後根神経節と類似する遺伝子発現パターンをとると報告されているヒト神経芽細胞株SH-SY5Yを用いて実験を行った。同細胞株のAHRの発現を血清：fetal bovine serum (FBS)の非存在下/存在下でwestern blotting法で確認した。また、AHRのリガンドとしてよく知られているBenzo[a]pyrene(BaP)と同様にAHRのリガンドで大気汚染の原因の一つとしても知られるPM2.5を用いて細胞を24, 48, 72時間(h)で刺激し、AHRの発現が誘導されるかを調べた。

さらに、近年AHRとは独立してダイオキシン類に対する抗酸化能力を高める防御機構に関連しているとして注目されているPyruvate kinase isoform M2 (PKM2)の発現も同様にして調べた。

Ｃ．研究結果

比較対照としてヒト表皮角化細胞株(HaCaT)細胞を用いた。AHRはHaCaT細胞に発現しており、FBS存在下でその発現は増強された。一方で、SH-SY5Y細胞ではAHRの発現はみられなかった(Figure 1A)。BaPとPM2.5によるSH-SY5Y細胞刺激では比較対照としてDMSOを用いた。BaPとPM2.5刺激でAHRの発現は誘導されなかったものの、PKM2は定常状態でもSH-SY5Y細胞に発現しており、PM2.5刺激で発現がやや増強される傾向があった(Figure 1B)。

Ｄ．考察

今回用いたのは不死化表皮/神経細胞株であり、ヒト神経でのAHRの発現を規定するものではないが、ヒト末梢感覚神経細胞ではAHRの発現が低い一方でPKM2の発現が高く、環境汚染物質PM2.5でその発現が増強されている可能性があった。

Ｅ．結論

ヒト末梢感覚神経細胞ではAHRではなくPKM2が抗酸化能力に関連して重要な防御機構の働きを担っている可能性があり、今後更なる機序の探究を行う。

Ｆ．研究発表

なし

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

なし

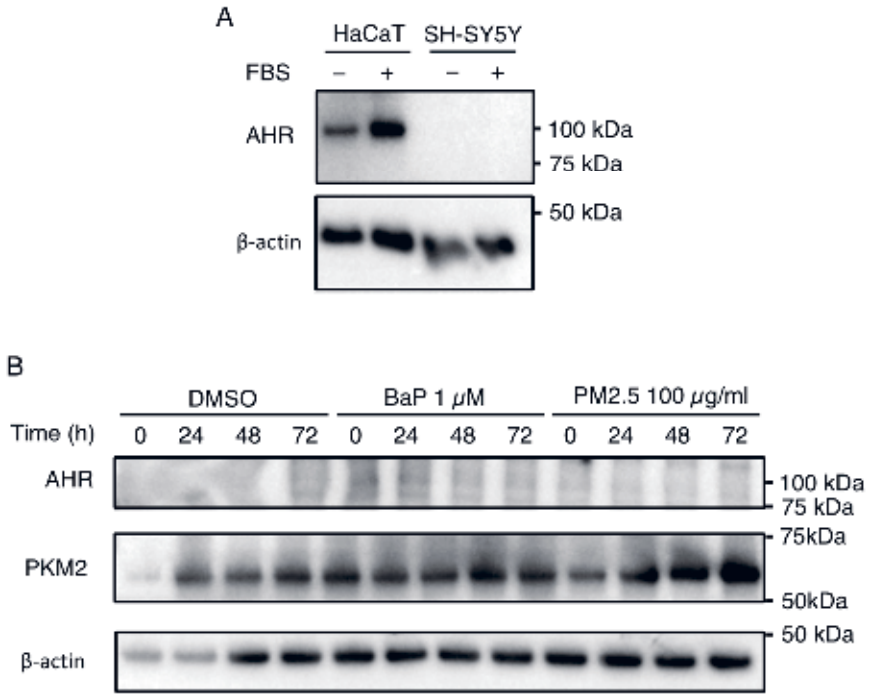


Figure 1

分担研究報告書

油症患者における皮膚ガス分析のデータマイニング

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
これまで我々は、油症患者と健常対照者から採取した皮膚ガス中に含まれる揮発性の成分を網羅的分析し、比較検討することで油症の病態理解と非侵襲的なダイオキシンの影響について検討を行ってきた。今回の研究では、多彩な皮膚ガス成分を網羅的に評価するため、これまでに収集したデータを機械学習し油症患者に特徴的に検出された皮膚ガス成分を抽出した。

A. 研究目的

皮膚ガスは皮表から放散される揮発性代謝産物を含む物質の総称である[1-3]。私たちはダイオキシンが皮脂から排泄されることに着目し[4]、油症患者では皮膚ガス中にダイオキシンに関連する物質が含まれるのではないかと仮説を立て、検証を行ってきた。

これまで被験者の数を年々拡充して解析をおこなっており、本年度はこれまでの皮膚ガス解析結果と並行して、仮説を検証するためのデータマイニングを行った。

B. 研究方法

解析-1

対象：油症認定患者 2 名、対照群として健常人ボランティア 9 名

方法：患者群と対照群の間で有意差を認めた皮膚ガス成分を同定した。解析は Welch の T 検定、およびロジスティック回帰分析による機械学習を行った。

解析-2

対象：油症認定患者 2 名、対照群として健常人ボランティア 8 名

方法：①検出された皮膚ガス成分と血中ダイオキシン濃度の間で関連の有無を調べた。血中ダイオキシン濃度は、油症認定患者は直近の健診で得られた結果を利用し、健常人ボランティアは新たに測定した結果を利用した。解析は、無相関検定にて有意水準 5%で有意差を認めたダイオキシン類を挙げた。②油症との関連が示唆される皮膚ガス成分を同定した。解析は、各皮膚ガス成分に対して血中ダイオキシン類と無相関検定を行い、有意水準 1%で相関があった皮膚ガス成分の種類をカウントし、カウント数が多い化合物を疾病予測の可能性を示唆する皮膚ガス成分と同定した。

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

解析-1：患者群と対照群の間で有意差が大きかった皮膚ガスの推定化合物を表1に示す。Welch の T 検定ではテトラメチルシラ

ン、トルエンなど、ロジスティック回帰による機械学習ではトリアジン、オクタンなどの化合物が推定された。

解析-2

①皮膚ガス成分との間で有意差を認めた血中ダイオキシン類を表 2 に示す。全部で 9 種類のダイオキシン類を同定した。②血中ダイオキシン類と相関があった皮膚ガスの推定化合物とそのカウント数の一部（カウント数 20～16)を表 3 に示す。最もカウント数が多かった化合物はノネン酸で、次いでトリクロロメタン、ヘキサデカンが続いた。

D. 考察

皮膚ガスとは，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[3]。皮膚ガスは、300 種類以上は存在すると考えられており [2]、日本人の一人あたりに検出する皮膚ガスの種類は 150 程度で確認方法を変更すれば 300 種類以上検出できる可能性がある。皮膚ガスの測定は，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ている[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つながる可能性がある。しかしながら、現状において皮膚ガス中のダイオキシンの測定は規制や倫理配慮、技術的な問題などにより実施が困難であることから、我々は油症との関連が考えられる皮膚ガス成分の同定を試みた。

これまでの研究成果において、各被験者で大きなピークを示した皮膚ガス成分について検討したが、油症で特徴的な成分として言及できる情報は得られなかった。今回の研究のうち、解析-2 で明らかにした血中ダイオキシン類と相関があった皮膚ガスの成分は、飽和炭化水素類及び不飽和炭化水素類、酸、トリクロロメタンなどの含ハロゲン化合物、エステル等であった（表 3)。これらは、解析-1 で明らかにした油症患者群に有意に見られた皮膚ガス成分（表1）と類似した結果であった。

解析にあたっては、油症健診で測定した 33 種類のダイオキシン類のうち、Total Coplanar PBC 以外の全ての項目で対照群より患者群で有意に血中濃度が高いことを確認した（データ未掲載)。しかしながら、疾病予測を可能にする成分の同定については年齢、性による影響を考慮する必要がある。通常健常人においては環境から主に食物を介してダイオキシン類に曝露しているため、年齢に依存して体内にダイオキシンが蓄積する [5]。今回の被験者においても、8 割以上のダイオキシン類の血中濃度は年齢と相関していた（データ未掲載)。油症認定患者において、男性より女性の血中濃度が高い傾向にあることがわかっており、その要因として女性の方が汚染食用油の摂取量が多かった可能性，女性の方が一般的に体脂肪率が高いためダイオキシン類を蓄え易い傾向などが考えられている [6]。よって、今後は重回帰分析を用いて交絡因子を考慮した評価を検討している。一方、今回の被験者において、皮膚ガス成分と年齢の関連性についても調査したが、明らかな相関はなかった（データ未掲載)。

E. 結論

今回の検討では、血中ダイオキシン濃度と関連がある皮膚ガス成分を抽出した。今後

は被験者数を拡充し、今回の結果の検証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。

F.研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録

なし

謝辞

ご協力いただいた油症患者、健常ボランティアの皆様、血中ダイオキシン濃度の測定にご協力いただいた北九州生活科学センター、および油症研究にお力添え頂いた関係者の皆様に深謝致します。

H. 参考文献

1. Tsuda T, Ohkuwa T, Itoh H. Findings of Skin Gases and Their Possibilities in Healthcare Monitoring. In Gas Biology Research in Clinical Practice, Yoshikawa T; Naito Y (Eds.) Krager: Basel, Switzerland, 2011, pp.125-132.
2. 関根嘉香、木村桂大、梅澤和夫 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. 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
5. Päpke O. PCDD/PCDF: human background data for Germany, a 10-year experience. Environ Health Perspect 106: 723-731, 1998
6. 梶原淳睦、戸高 尊、平川博仙 油症認定患者の男女間の血液中ダイオキシン類濃度差 福岡医誌 102 巻4号 140－144, 2011

表１：患者群と対照群の間で有意差を認めた皮膚ガスの推定化合物

Welchの T検定			ロジスティック回帰による機械学習		
分子量	保持時間	推定化合物	分子量	保持時間	推定化合物
109	250-290	tetra-methyl-silane	113	640-650	as triazine-3,5-dione,6-dimetyl
115,118,119	280-290	tetra-methyl-silane	92	280-300	5-ethyl-2-methyl-octane
108,114	300-310	toluene	106	280-300	unknown
71,85	330-340	undecane	74	450-470	unknown
111,112	380-390	hexadecane	79	280-290	hexadecane
70,84	370-390	tetradecane	61	180-190	ethyl acetate
99	430-450	hexadecane	55	520-530	nonanal
98,111	440-460	2-amino-nonadecane	46	460-470	formic acid or 2-ethyl hexanol
84	490-500	hexadecane			3,4-dimethyl
101	510-520	3,7-diacetoamido	49	160-170	unknown
118	550-570	decanol	57	290-300	unknown
103,117	570-580	unknown			
72	570-600	unknown			
104	640-680	unknown			
119	740-760	unknown			

表２：皮膚ガス成分との間で有意差を認めた血中ダイオキシン類

2,3,7,8-TCDD
1,2,3,7,8,9-HxCDD
2,3,7,8-TCDF
1,2,3,7,8-PeCDF
1,2,3,6,7,8-HxCDF
2,3,6,7,8-HxCDF
1,2,3,7,8,9-HxCDF
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF

表３：血中ダイオキシン類と相関があった皮膚ガスの推定化合物

分子量	保持時間	カウント数	推定化合物
113	640	20	8-methyl-6-nonenoic acid
91	280	18	trichlorometane
79	280		hexadecane
65	280		(beta-Phellandene or 3-Carene)
92	280		trichlorometane
81	270	17	5-methyl1-2-methyl-octane
79	290		hexadecane
95	280		unknown
81	280	16	5-methyl1-2-methyl-octane
91	280		5-methyl1-2-methyl-octane
91	290		nitric acid metyleste

分担研究報告書

皮膚の慢性炎症による色素沈着におけるAHRリガンドの影響

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　皮膚の慢性炎症に関与するエンドセリン-1（ET-1）刺激により、ヒトメラノサイトにおけるメラニン関連因子の発現増加がみられたが、AHRリガンドはその発現増加を抑制しなかった。

A．研究目的

我々はこれまでに、紫外線照射が皮膚ケラチノサイトからのET-1産生を増加させることを明らかにしたが、様々なAHRリガンドはET-1産生に影響を与えなかった。さらに、様々なAHRリガンドは紫外線によるメラノサイトからのメラニン関連遺伝子の増加にも影響がなかった。そこで今回、皮膚の慢性炎症に関わるET-1刺激によるメラノサイトからのメラニン関連因子の増加と、その増加に対する様々なAHRリガンドの影響を調べ、皮膚の慢性炎症による色素沈着に対する様々なAHRリガンドの影響を解析することとした。

B．研究方法

ヒトメラノサイトをET-1で刺激し、メラニン関連因子（MITF/TYR/DCT（TYRP2）/TYRP１）の発現に与える影響をqPCRまたはウエスタンブロットにて検討した。同時に、様々なAHRリガンド（B[a]P（10μM）・Glyteer（10-4）・tapinarof（5μM））をそれぞれ添加して刺激を行い、同様にRT-qPCRまたはウエスタンブロットにて、TYR・Mitf・DCT・TRP-1の発現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

ヒトメラノサイトへのET-1添加によるメラニン関連因子の発現について、qPCRを用いた評価では、DCTとTYRP1は48-72時間の間で濃度依存的な発現増加がみられたが、MITFとTYRは安定的な評価が難しかった。そこで、ウエスタンブロットで改めてすべてのメラニン関連因子（pMITF/MITF, TYR, DCT, TYRP1）の発現を評価したところ、MITFは24時間、TYRは48時間、DCTおよびTYRP1は72時間で濃度依存的に上昇する傾向が見られた。

更にヒトメラノサイトのET-1刺激によるメラニン関連因子の発現に対するAHRリガンドの影響をWBにより評価したところ、試験に用いたすべてのAHRリガンド（B[a]P（10μM）・Glyteer（10-4）・tapinarof（5μM））そのものが48-72時間の間でメラニン関連のタンパク質の発現を増加させる傾向がみられた。また、ET-1とAHRリガンドの同時添加では、AHRリガンドがET-1刺激によるメラニン関連蛋白の増加を抑制することはなく、むしろ増加させる傾向が見られた。

D．考察

今回ヒトメラノサイトをET-1で刺激したが、時間によっては有意なメラニン関連因子の増加が顕著ではなかった。そのため、ET-1によるメラニン関連因子発現に対するAHRリガンドの影響も結果が安定しないという問題点が見られた。少なくとも今回の実験系においては、AHRリガンドが慢

性炎症による皮膚の色素沈着を改善させる効果があることはあまり期待できないという結果であった。

Ｅ．結論

皮膚の慢性炎症に関与するET-1刺激により、ヒトメラノサイトにおけるメラニン関連因子の発現増加がみられたが、AHR リガンドはその発現増加を抑制しなかった。

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

（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　九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野　助教

研究要旨　膠原病様ケラチノサイトモデルに対する AHR リガンドの抗炎症作用が明らかになった。

Ａ．研究目的

膠原病の皮疹形成機序には未解明な点が多く、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、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ことをこれまでに見出している（未発表）。今回は、膠原病モデルに対する AHR リガンドの効果について検討を行った。

Ｂ．研究方法

膠原病様ケラチノサイトモデルに対する AHR リガンドの効果の評価を、炎症性サイトカイン、アポトーシスシグナル、液性免疫誘導能について、qRT-PCR, ウエスタンブロットで評価を行った。

（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

AHR リガンドにより、膠原病様ケラチノサイトモデルで見られた炎症性サイトカインが抑制されたことが、qRT-PCR, ウエスタンブロットで明らかになった。

Ｄ．考察

AHR リガンドによる、膠原病様ケラチノサイトモデルにおけるアポトーシス誘導能、液性免疫誘導能については、検討中である。また、AHR リガンドによる抗炎症作用の機序についての解明が急務である。今回の AHR リガンドによる抗炎症作用は、ダイオキシン類による炎症、油症症状を緩和させる可能性も考えられ、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

今回検討を行った AHR リガンドは、膠原病様ケラチノサイトに対して、抗炎症作用を示した。抗炎症作用の作用機序についての解明が急務である。

分担研究報告書

2,4,6-三塩素置換型PCB140のラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝比較

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、246 型 PCB の 1 つである 2,3,4,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB140)につき、ラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べた。まず、ラット肝では未処理 Ms、phenobarbital (PB)前処理 Ms および 3-methylcholanthrene 前処理 Ms のいずれでも、代謝物 M1 が生成された。M1 の生成活性はそれぞれ 0.33、4.55 および 0.25 nmol/hr/mg protein であり、PB-Ms では未処理 Ms の 14 倍と増加した。なお、GC-MS の結果から、M1（メチル化体）は分子量が 388 [M^+]であること、さらに、別途合成した 3'-CH_3O-PCB140 の保持時間およびフラグメントイオンがほぼ一致したことから、3'-水酸化(OH)体であると推定された。一方、モルモット肝では、いずれの Ms でも代謝物は全く生成されなかった。また、ヒト肝 Ms では、M1 の生成活性は 0.21 nmol/hr/mg protein であり、ラットの未処理 Ms と同程度であった。次に、高蓄積性で 245 型 PCB の PCB138 につき、ラット肝 Ms による代謝を調べたところ、PB-Ms でのみ、3'-OH 体が生成され、生成活性は 0.62 nmol/hr/mg protein であった。以上の結果から、① PCB140 は、246 型の PCB155、PCB182 や PCB188 と共通して、代謝され易いこと、② M1 生成活性は、ラット＞ヒト＞モルモットであること、③ M1 の生成には主に PB 誘導性の CYP2B 酵素が関与していること、が明らかとなった。

A. 研究目的

PCB異性体のうち、2,4,5-三塩素置換ベンゼン (245型) あるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有するものが、ヒトの血液、脂肪組織および肝臓で高濃度検出されている。また、Todakaらは、油症患者および健常者の血中PCB濃度を調べ、いずれにおいても245 型 PCB の PCB153 、 PCB180 および PCB138が最も多いこと、さらに油症患者では健常者の1.6～2.2倍も多いことを報告した[1)]。

一方、当研究室ではこれまでに、246型PCBのPCB155、PCB182およびPCB188の代謝を、ラットまたはモルモット肝ミクロゾーム (Ms) を用いて調べ、その結果、いずれの動物肝Msも主に代謝物M1（3-または3'-OH体）を生成すること、さらに、ラットではphenobarbital (PB) 前処理により、M1の生成が、対応する245型PCBに比べ、10～50倍に著しく促進されることも明らかにした[2-4)]。この事実は、246型PCB異性体が生体組織でほとんど検出されない理由の1つと考えられる。本研究では、この点をさらに確かめるため、246型PCBの2,3,4,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB140) を用い、ラット、モルモットおよびヒト肝Msによる代謝を調べ、対応する245型PCBのPCB138と比較した (Fig. 1)。

B. 研究方法

① PCB140 合成：2,3,4-trichloroaniline (1.2 g) および 1,3,5-trichlorobenzene (1.0 g) を tetrachloroethylene で溶解し、isoamyl nitrite を入れて 110℃で 24 hr 加熱還流を行った。反応液を、chloroform で抽出し、アルミナカラム、シリカゲル 60 カラムおよび分取用 HPLC で精製した。HPLC の分析条件は以下の通りである。分析機器、高速液体クロマトグラフ LC-10AT（島津製）；カラム、Inertsil ODS-HL カラム（10 × 250 mm i.d.、5 μm、GL Sciences 製）；移動相、acetonitrile；流速、4

mL/min；検出波長、254 nm。② 3'-CH_3O-PCB140 合成：2,3,4-trichloroaniline (1.2 g)および 2,4,6-trichloroanisol (1.0 g) を tetrachloroethylene で溶解した。以後の操作は PCB140 合成と同様に行った。③ ラットおよびモルモット肝 Ms の調製：Wistar 系雄性ラット（体重約 200 g）および Hartley 系モルモット（体重約 280g）を各 12 匹用いた。肝 Ms は、未処理（4 匹）、PB 前処理（80 mg/kg 体重×3 日間、4 匹）および 3-methylcholan-threne (MC)前処理（20 mg/kg 体重×3 日間、4 匹）した動物から、常法により調製した。④ ヒト肝 Ms：男性プールド Ms (平均年齢 41.7 ± 20.5 歳，n＝10) を SXT 社から購入した。④ 動物およびヒト肝 Ms による PCB 代謝：40 μM PCB140 あるいは PCB138 を NADPH 生成系 (0.33 mM NADP、5 mM G-6-P、G-6-PD 1.0 unit)、6 mM $MgCl_2$、動物肝 Ms (1 mg protein) および 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計 1.0 mL として、37℃で 60 min インキュベート後、反応液に chloroform-methanol (2:1) 1 mL と n-hexane 3 mL を加えボルテックスで振とう抽出した。抽出は 2 回行い、有機層を合わせて濃縮後、diazomethane でメチル化し、GC-ECD および GC-MS に付した。まず、GC-ECD の測定条件は次の通りである。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℃。次に GC-MS の測定条件を示す。分析機器、GCMS-QP2010（島津製）；カラム、DB-1 フューズドキャピラリーカラム（30 m × 0.25 mm i.d.、0.25 μm フィルム厚、J&W Scientific 製）；キャリアーガス、He (1 mL/min)；カラム温度、70℃ (1.5min) - 20℃/min - 230℃ (0.5min) - 4℃/min - 280℃ (5min)；注入口温度、250℃；検出器温度、230℃。

（倫理面への配慮）

ラットの屠殺に際しては、「中村学園大学における動物実験のための指針」に従い、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

ラット肝 Ms による代謝および代謝物の化学構造：PCB140 を、NADPH 存在下、好気的に 3 種類のラット肝 Ms とともに、37℃、60 min 反応させた。Fig. 2 に、GC クロマトグラムを示す。PCB140（保持時間 5.47 min）に続き、代謝物 M1（メチル化体）が保持時間 8.26 min に検出された。次に、代謝物を含む試料を GC-MS で分析したところ、M1（メチル化体）は，分子量 388 であり、PCB140 の分子量より m/z 30 大きいことが判明した。この結果から、M1 は一水酸化体であることが示唆された。

次に、予想代謝物として 3'-CH_3O-PCB140 を合成し、マススペクトルと保持時間を、M1（メチル化体）と比較した（Table 1）。両者は、分子量および GC 保持時間が完全に一致した。また、2 つのフラグメントイオン(m/z 348 [M^+-43]、m/z 373 [M^+-15])が、両者から多く検出され、それらの割合もほぼ一致した。これらの結果から、M1 は PCB140 の 3'-OH 体と推定された。

ラット、モルモットおよびヒト肝Msによる代謝：GC-ECDにより得られたクロマトグラムより、M1の定量を試みた。なお、定量はPCB140の検量線を用いて行った（Table 2）。まず、ラット肝では未処理Ms、PBおよびMC前処理Msのいずれでも、M1が生成され、これらの生成活性はそれぞれ0.33、4.55および0.25 nmol/hr/mg proteinであった。PB前処理により、M1の生成は未処理Msの14倍に促進された。モルモット肝では、いずれの肝Msでも代謝物は生成されなかった。一方、ヒト肝では、0.21 nmol/hr/mg proteinであった。

ラット肝 Ms による PCB138 代謝：PCB140 に対応する 245 型 PCB の PCB138 について、ラット肝 Ms による代謝を調べた。その結果、1 種類の代謝物 M1 (3'-OH 体) が、PB 前処理 Ms

でのみ生成されたものの、その生成活性は0.62 nmol/hr/mg protein と低かった。(Table 3)

D. 考察

本研究では、246 型 PCB の PCB140 とこれに対応する 245 型 PCB の PCB138 の代謝を比較した。前述のように、PCB138 はヒト血中では、PCB153 に次いで、高濃度検出される PCB として有名である[1)]。

まず、PCB140 を用い、ラット、モルモットおよびヒト肝 Ms による代謝を調べた。その結果、既報の PCB155 および PCB182 と同様に、①PCB140 は、代謝され易く、1 種類の代謝物(3'-OH 体)に変換されること、②3'-OH 体の生成は PB 前処理により促進されること、③PCB140 代謝活性の強さは、ラット(PB 前処理)＞ラット(未処理)＞ラット(MC 前処理)＞ヒト＞モルモットの順であること、が明らかになった。一方、PCB138 はラット PB 前処理 Ms でのみ、3'-OH 体の生成が見られたが、その活性は PCB140 の 10 分の 1 以下と低かった。以上の結果から、PCB140 および PCB138 はいずれも、3'-OH 体が主代謝物であること、またこの生成にはラット CYP2B1 およびヒト CYP2B6 が関与することが示唆された(Fig. 3)。しかしながら、246 型 PCB が、なぜ 245 型 PCB に比べ、代謝されやすいのかという点は、現在のところ、不明のままである。

E. 結論

246 型 PCB の PCB140 は、245 型 PCB の PCB138 よりはるかに代謝されやすいこと、本代謝には CYP2B 酵素が大きく関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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) 太田千穂, 加藤善久, 原口浩一, 藤井由希子, 木村　治, 古賀信幸, チャイニーズハムスター肝ミクロゾームによる Tetrachloro-biphenyl の代謝. 福岡医誌, 114(1), 31-39 (2023).

3) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 藤井由希子, 木村　治, 古賀信幸, 2,2',3,4',5',6-六塩素化ビフェニル(CB149)のラット, ハムスター, モルモットおよびヒトにおける in vitro 代謝の比較研究. 福岡医誌, 114(1), 40-50 (2023).

4) 稲次良哉, 池田佳乃子, 佐野宏江, 堤　諒太, 太田千穂, 古賀信幸, 田中嘉孝, 石井祐次, ダイオキシン低用量暴露母体の肝薬物代謝第二相酵素活性の変動とポリメトキシフラボノイドの in vitro 阻害効果. 福岡医誌, 114(1), 65-77 (2023).

2. 学会発表

1) 太田千穂, 杉村果奈, 木村　治, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 古賀信幸, Quercetin pentamethyl ether (QPM) のラットにおける in vivo 代謝. 第 77 回日本栄養・食糧学会大会 (札幌, 札幌コンベンションセンターほか), 2023 年 5 月 12～14 日

2) C. Ohta, Y. Kato, Y. Fujii, K. Haraguchi, O. Kimura, and N. Koga, Metabolism of 2,2',4,4',6,6'-hexachlorobiphebnyl by rat, guinea pig and human liver microsomes and human cytochrome P450. Dioxin 2023 (Maastricht, The Netherlands), 令和 5 年 9 月 10～14 日

3) Y. Fujii, Y. Kato, T. Miyagi, S. Iwamura, K. Atobe, S. Nagata, J. Ando, C. Ohta, N. Koga, and K. Haraguchi, Levels and spatial profile of perflouroalkyl substances in edible parts of shrimp products from coastal areas of Japan and neighboring countries. Dioxin 2023 (Maastricht, The Netherlands), 令和 5 年 9 月

10～14 日

4) 火山稜斗, 陳　宏斌, 太田千穂, 古賀信幸, 田中嘉孝, 石井祐次, ダイオキシン低用量母体暴露による児の発育障害:ポリメトキシフラボノイド ノビレチンによる成長ホルモン回復と障害の改善. フォーラム 2023:衛生薬学・環境トキシコロジー(広島, 広島大学霞キャンパス凌雲棟), 令和 5 年 9 月 12, 13 日

5) 杉村果奈, 釘丸　萌, 古賀信幸, 太田千穂, 柑橘成分シネンセチンの肝チトクロム P450 (CYP) による代謝. 2023 年度（公社）日本栄養・食糧学会 九州・沖縄支部および（一社）日本家政学会九州支部合同大会（大分・大分大学）, 令和 5 年 10 月 14, 15 日

6) 釘丸　萌, 杉村果奈, 古賀信幸, 太田千穂, ラット肝およびモルモット肝ミクロゾームによる 3,5,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone (HexaMF) の代謝. 2023 年度（公社）日本栄養・食糧学会 九州・沖縄支部および（一社）日本家政学会九州支部合同大会（大分・大分大学）, 令和 5 年 10 月 14, 15 日

7) 太田千穂, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村　治, 古賀信幸, ラット肝ミクロゾームによる PCB138 と PCB140 の代謝比較. 日本薬学会第 144 年会（横浜・パシフィコ横浜）, 2024 年 3 月 28～31 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

な し

参考文献

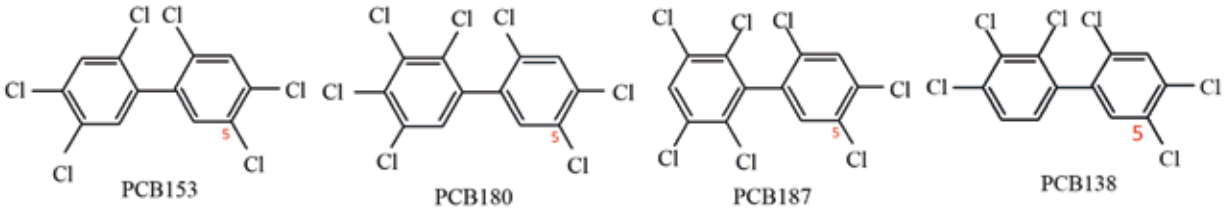
1) T. Todaka, T. Hori, H. Hirakawa, J. Kajiwara, D. Yasutake, D. Onozuka, T. Iida, M. Furue, Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients over 35 years after the incident, Chemosphere, 74, 902-909 (2009).

2) 太田千穂, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 木村　治, 遠藤哲也, 古賀信幸, 2,2',3,4,4',5,6'-七塩素化ビフェニル(CB182)のラット, モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝, 福岡医誌, 108, 51-57 (2017).

3) 太田千穂, 山本健太, 加藤善久,　藤井由希子, 原口浩一,　木村　治, 遠藤哲也, 古賀信幸, 2,2',3,4',5,6,6'-七塩素化ビフェニル(CB188)のラットおよびモルモット肝ミクロゾームによる代謝, 福岡医誌, 110, 83-90 (2019).

4) 太田千穂, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村　治, 古賀信幸, 2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル(PCB155)のラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム、およびヒトチトクロム P450による代謝, 福岡医誌, 112, 127-135 (2021).

(A) 245 型 PCB



(B) 246 型 PCB

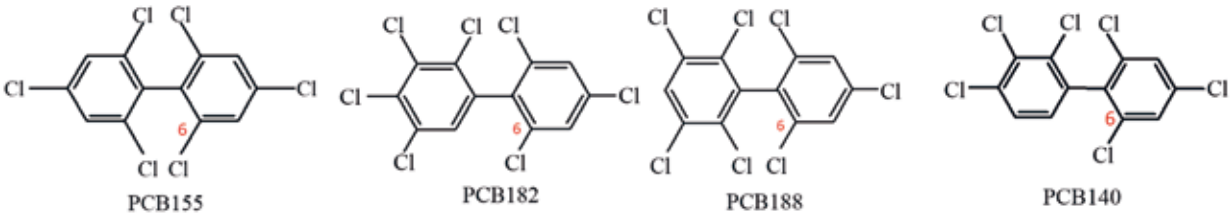


Fig. 1　Chemical structures of polychlorinated biphenyls with 2,4,5-trichloro-substituted benzene (245-type) (A) and 2,4,6-trichloro-substituted benzene (246-type) (B)

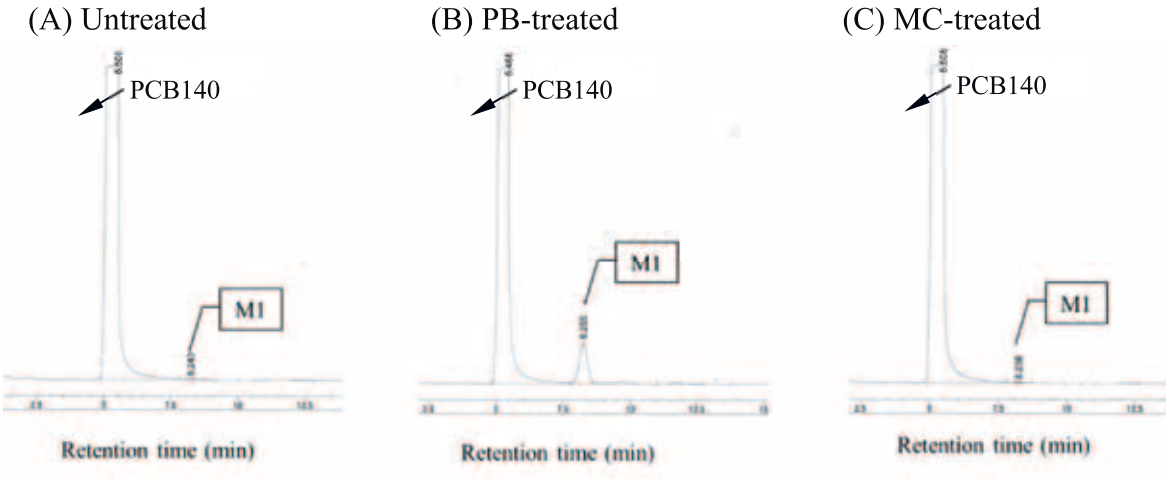


Fig. 2　GC-ECD chromatograms of a PCB140 metabolite produced by liver microsomes of untreated (A), PB-treated (B) and MC-treated (C) rats

Table 1　Mass spectral data and retention times of the methylated derivative of a PCB140 metabolite (A) and its synthetic compound (B)

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min)
		$[M^+]$	$[M^+-15]$	$[M^+-35]$	$[M^+-43]$	$[M^+-50]$	$[M^+-70]$	
PCB140	358	100	-	34	-	-	103	13.125
Methylated M1	388	100	71	-	62	-	-	15.058
3'-CH_3O-PCB140	388	100	96	-	25	-	-	15.058

-, not detected.

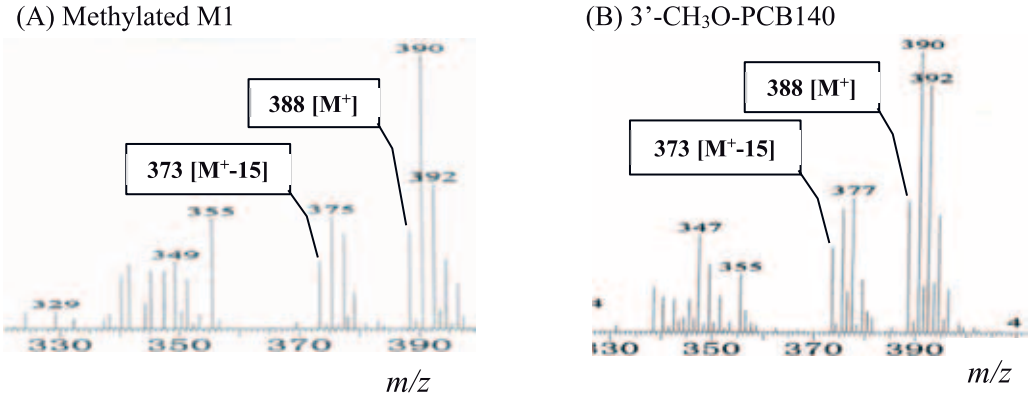


Table 2　Metabolism of PCB140 by liver microsomes of rats, guinea pigs and human

Species	Treatment	3'-OH-PCB140 formed (nmol/hr/mg protein)
Rat	Untreated	0.325 ± 0.052 (100)
	PB-treated	4.547 ± 0.375 (1399)
	MC-treated	0.254 ± 0.015 (78)
Guinea pig	Untreated	N.D.
	PB-treated	N.D.
	MC-treated	N.D.
Human*		0.210 ± 0.004

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

Table 3　Metabolism of PCB138 by rat liver microsomes

Treatment	3'-OH-PCB138 formed (nmol/hr/mg protein)
Untreated	N.D.
PB-treated	0.673 ± 0.045
MC-treated	N.D.

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

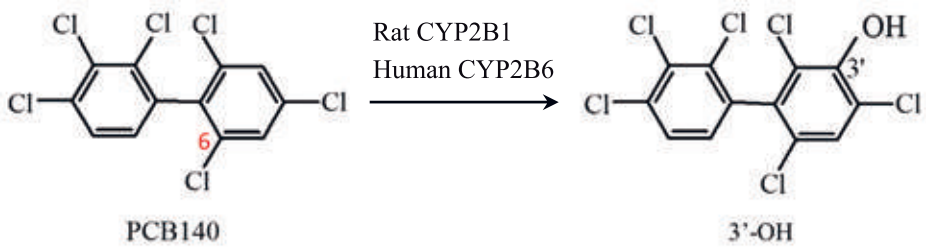


Fig. 3　Postulated metabolic pathway of PCB140 in rat and human liver

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

ヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を用い、ダイオキシン類と同じく AHR リガンドの一つである 3-methylcholanthrene (3-MC)を暴露し、hSELENBP1 の mRNA 発現量の変動を検討したが、有意な変化が見られなかった。一方、ヒト乳がん由来細胞 T47D 細胞を用いた場合、3-MC により hSELENBP1 が有意に誘導された。HepG2(エストロゲン受容体陰性)は男性由来の細胞であることを考慮し、エストロゲン受容体(Gene symbol：ESR1)が、hSELENBP1 の発現誘導に影響を与えるとの作業仮説を立てた。T47D 細胞より total RNA を調製して、nested RT-PCR によりヒト ESR1 (hESR1)の cDNA を増幅、pcDNA3.1-hESR1 を構築した。HepG2 に pcDNA3.1-hESR1 発現ベクターをトランスフェクションした場合、それ自体では hSELENBP1 発現に変動は無いものの、3-MC を暴露させた際に、hSELENBP1 が有意に誘導された。以上本研究から、hSELENBP1 の発現誘導は hESR1 および芳香族炭化水素受容体(AHR)を介する可能性が浮上した。

Ａ．研究目的

Ａ．研究目的

セレン結合性タンパク質 (Selenbp1) は、肝臓、腎臓、性腺などに多く発現するサイトゾルタンパク質の一つである (1)。Selenbp1 は、生体内においてセレンとの結合能を有し、セレンの生理的役割に関わるものと推定されている。これまでに、抗酸化的作用 (2)、増殖抑制作用 (3)、ゴルジ層板間のタンパク質構成因子 (4) 等の機能が報告されているものの、これらは、いずれも決定的とは言い難く、その生理的機能は十分に理解されているとは言い難い。

当研究室では、ダイオキシン類の一種、3,3’,4,4’5-pentachlorobiphenyl、および多環芳香族炭化水素、3-methylcholanthlene (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 (15)。

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。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が、AHR リガンドによる誘導が観察されなかった。一方、AHR アンタゴニストであるα-naphthoflavone (α-NF)により有意に誘導された (R4 年度報告書)。そこで、R5 年度は、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、ヒト肝臓がん由来 HepRG 細胞で検討した。また、ヒト乳がん由来細胞 T47D 細胞でも検討を行い、MC により hSELENBP1 が有意に誘導されることを見出した。これらを基に、AHR リガンドによる hSELENBP1 誘導機構を検討した。本研究は油症患者の脂質代謝異常のメカニズム解明の一助となると期待される。

Ｂ．研究方法

1. 試薬

MC およびβ-NF は、ナカライテスクより購入して使用した。α-NF は、東京化成工業株式会社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。

T47D 細胞は、大日本製薬より購入して使用し,10% FBS を含む RPMI 培地を使用して培養した。その他の条件は HepG2 細胞に同じとした。

HepaRG 細胞は、株式会社 KAC より購入して使用した。HepaRG 細胞は細胞数を計測し、HepaRG Thawing/Plating/General Purpose Medium 670 (100 mL HepaRG Thawing/Plating/General Purpose Medium の中に、13.8 mL supplement ADD670 を含む) 培地 0.96×10^6/mL に希釈し、24-well plate coated with collagen I に 0.5 mL/well 播種した。5% CO_2 、37°C の加湿インキュベーターで培養した。96 時間後で、試薬が含まれる HepaRG® Induction Medium (100 mL HepaRG® Induction Medium の中に、3.7 mL supplement ADD640 を含む) 培地に交換した (n=2)。24 時間後、HepaRG 細胞を回収した。

3. リアルタイム RT-PCR 法

回収した HepG2 細胞、T47D 細胞および HepaRG 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 (16)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、ターゲット mRNA の threshold cycle (Ct) 値を β-actin mRNA の Ct 値で補正した。

4. ヒトエストロゲン受容体 (Gene

symbol：ESR1) の発現

未処理の T47D 細胞より 3.の方法に従って抽出した total RNA から、cDNA を合成し鋳型とした。hESR1 (GenBank accession number, NM_000125.4) の open reading frame を 1 対のオリゴ DNA プライマー、hESR1(-99,-82)F (5'-TCTAACCTCGGGCTGTGCT-3'), hESR1(1895,1913)R (5'-TAGAAAGCCATTGGTGTTG-3')を用いて、KOD Plus Neo (Toyobo)を用いて PCR 増幅した。次いで、XhoI-hESR1(1,16)F 5'-ATACTCGAGATGACCATGACCCTCC-3', KpnI-hESR1(1788,1770)R (5'-ATAGGTACCTCAGACCGTGGCAGGGAAA-3')(下線部は制限酵素部位)を用いて、nested PCR を行い、pcDNA3.1(-)-hygro ベクターにサブクローニングした。塩基配列は、DNA シークエンシングにより確認した。解析は九州大学研究教育支援センターにて行った。トランスフェクショングレードのプラスミド DNA を調製して HepG2 細胞に、Polyethylenimine HCl MAX (Linear, MW 40000, Transfection Grade) (PEI) (Polysciences, Inc., Warrington, PA)を用いてトランスフェクションした。

(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：A23-227。遺伝子組換え実験は、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」第 10 条第 2 項の規定に基づき、委員会の承認を得て行った (承認番号: 1-8)。

C. 研究結果

ヒト肝臓がん由来細胞 HepaRG 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。HepaRG 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、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 (17) により処理した。2.5 および 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、これらの濃度で、SELENBP1 mRNA レベルを変動させなかった (Fig. 2)。次に、ヒト乳がん由来細胞 T47D 細胞を、(AHR)リガンドで処理し、SELENBP1 が誘導されるか否か検討した。T47D 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 CYP1A1 mRNA の発現は、MC 濃度依存的に誘導された (Fig. 3)。10 μM MC における誘導は特に顕著であった。また、SELENBP1 mRNA の発現は、CYP1A1 ほど顕著ではないものの、濃度依存的に有意に誘導された (Fig. 3)。次に、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. 4)。この時、SELENBP1 も、CYP1A1 ほど顕著ではないものの、β-NF 濃度依存的に誘導された (Fig. 4)。

R4 年度の研究から HepG2 では、AHR リガンドにより SELENBP1 は誘導されないこと (R4 年度研究報告書)、HepG2 (エストロゲン受容体陰性)は男性由来の細胞であることを考慮し、hESR1 が、hSELENBP1 の発現誘導に影響を与えると

の作業仮説を立てた。そこで、HepG2 細胞に、pcDNA3.1-hESR1 をトランスフェクションし、AHR リガンドである MC 処理した。この hESR1 を一過性発現させた HepG2 細胞に 0.1-10 μM MC 処理を行ったところ、代表的マーカーである CYP1A1 mRNA の発現は、MC 濃度依存的に誘導された (Fig. 5)。一方、hSELENBP1 mRNA レベルは、1.0 μM MC では影響を受けなかったが、10 μM MC では、有意に誘導された。このことから、hSELENBP1 の誘導には AHR と hER1 が必要であることが示唆された。

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 HepaRG 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。HepaRG 細胞は、薬物代謝酵素などの誘導能が HepG2 よりも優れているとされる。HepaRG 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、HepaRG 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)。R4 年度に、HepG2 細胞を用いて検討を行った際、AHR リガンドにより SELENBP1 は誘導されなかった (R4 年度報告書)。また、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 (18, 19)。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 (20)。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。R4 年度の研究では、HepG2 細胞に対して、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。一方、AHR アンタゴニストの α-NF では、誘導が認められていた (R4 年度報告)。本年度は、HepaRG に、2.5 および 10 μM α-NF を添加した場合、MC に比べ弱いながら CYP1A1 の誘導が認められ、この点は HepG2 と共通していた (Fig. 2)。しかし、α-NF は、HepaRG において SELENBP1 を誘導しなかった (Fig. 2)。したがって、α-NF による SELENBP1 誘導作用は、同じヒト肝がん由来細胞であっても、HepaRG には認められず、HepG2 に認められるものであることが分かった。この原因は現在のところ不明であり、今後の課題である。

次に、HepG2 では、MC により hSELENBP が誘導されない原因を検証した。エストロゲン受容体陰性の HepG2 は男性由来の細胞であるため、hESR1 をトランスフェクションし、その条件下に MC が hSELENBP1 の発現誘導に影響を与える可能性を検証した。hESR1 を一過性発現させた HepG2 細胞では、MC により代表的マーカーである CYP1A1 mRNA の発現が、著しく誘導された (Fig. 5)。さらに、hSELENBP1 mRNA レベルも、10 μM MC で有意に誘導された。CYP1A1 の誘導は MC 濃度依存的であり、これは hESR1 を発現させていない HepG2 でも同様に認められることから (R4 報告書)、AHR の関与が強く支持される。一方、hSELENBP1 の誘導は HepG2 では誘導が認められなかったこと (R4 報告書)、hESR1-HepG2 では高

濃度の 10 μ MC で認められたことから、hSELENBP1 の誘導には AHR と hER1 の両方が必要であることが示唆された。

E. 結論

以上の結果から、

1) 本研究では、AHR リガンド MC および β-NF が、ヒト乳がん由来細胞 T47D 細胞において CYP1A1 および SELENBP1 を濃度依存的に誘導することを初めて明らかにした。

2) MC は、HepaRG では SELENBP1 を誘導しなかったが、hESR1 を発現させた HepG2 で SELENBP1 を誘導した。

3) この hESR1-HepG2 を用いた MC による SELENBP1 誘導機構の検討から、ヒトにおける SELENBP1 の調節に AHR と hESR1 の両方が関与することが示唆された。

本研究は油症患者の脂質代謝異常のメカニズム解明の一助となると期待される。

F. 研究発表

1. フォーラム 2023:衛生薬学・環境トキシコロジー (広島、2023 年 9 月 12 日-13 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

1) Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG, Medina D. *Carcinogenesis*, **10**: 541-546 (1989).
2) Jamba L, Nehru B, Bansal MP. *Mol Cell Biochem*, **177**: 169-175 (1997).
3) Pohl NM, Tong C, Fang W, Bi X, Li T, Yang W. *PLoS One*, **4**: e7774 (2009).
4) Porat A, Sagiv Y, Elazar Z. *J Biol Chem*, **275**: 14457-14465 (2000).
5) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Chemosphere*, **32**: 509-515 (1996).
6) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Toxicol Lett*, **87**: 1-9 (1996).
7) Ishida T, Ishii Y, Tasaki K, Ariyoshi N, Oguri K. *Fukuoka Acta Medica*, **88**: 135-143 (1997).
8) Poland A, Knutson JC. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **26**: 371-399 (1982).
9) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
10) Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. *Biochim Biophys Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
11) Bartolone JB, Sparks K, Cohen SD, Khairallah EA, *Biochem Pharmacol*, **36**: 1193-1196 (1987).
12) Pumford NR, Martin BM, Hinson JA, *Biochem Biophys Res Commun*, **182**: 1348–1355 (1992).
13) Tsujimoto S, Ishida T, Takeda T, Ishii Y, Onomura Y, Tsukimori K, Takechi S, Yamaguchi T, Uchi H, Suzuki SO, Yamamoto M, Himeno M, Furue M, Yamada H. *Biochim Biophys Acta*, **1830**: 3616-3624 (2013).
14) Lanfear J, Fleming J, Walker M, Harrison P. *Carcinogenesis,* **14:** 335-340 (1993).
15) Song Y, Kurose A, Li R, Takeda T, Onomura Y, Koga T, Mutoh J, Ishida T, Tanaka Y, Ishii Y. *Int J Mol Sci*, 22(10): 5334 (2021)
16) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H, Yamada H. *J Toxicol Sci*, **35**: 365-373 (2010).
17) Koley AP, Buters JT, Robinson RC, Markowitz A, Friedman FK. *J Biol Chem,* **272**: 3149-3152 (1997).
18) Puga A, Maier A, Medvedovic M. *Biochem Pharmcol*, **60**: 1129–1142 (2000).

19) Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock Jr JP. *Toxicol Lett*, **122**: 189–203 (2001).
20) 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).

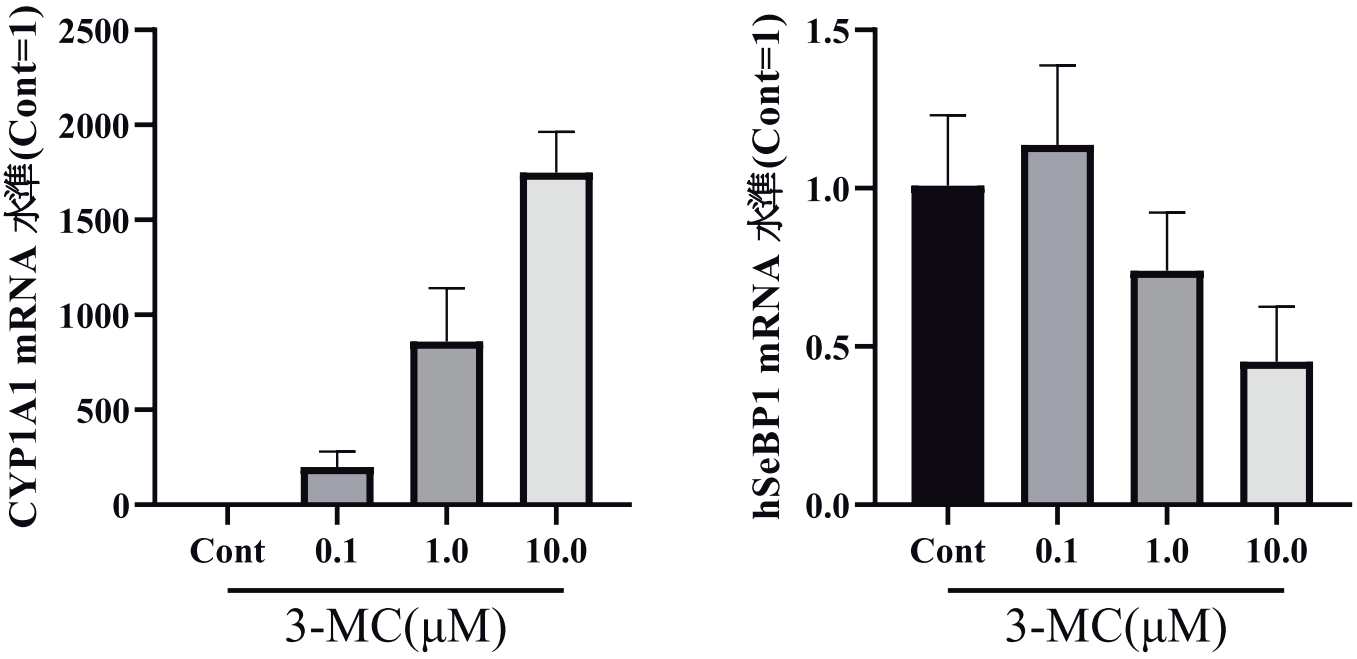


Fig. 1 Effects of 3-MC on the mRNA expression of CYP1A1 and SeBP1 in HepaRG cells. For the control, the same DMSO was added. Each bar represents the mean ± S.D.M of 2 samples. For the control, the same DMSO was added. β-Actin was used as an internal control. CYP1A1, cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1; hSeBP1, human selenium-binding protein 1; 3-MC, 3-methylcholanthrene.

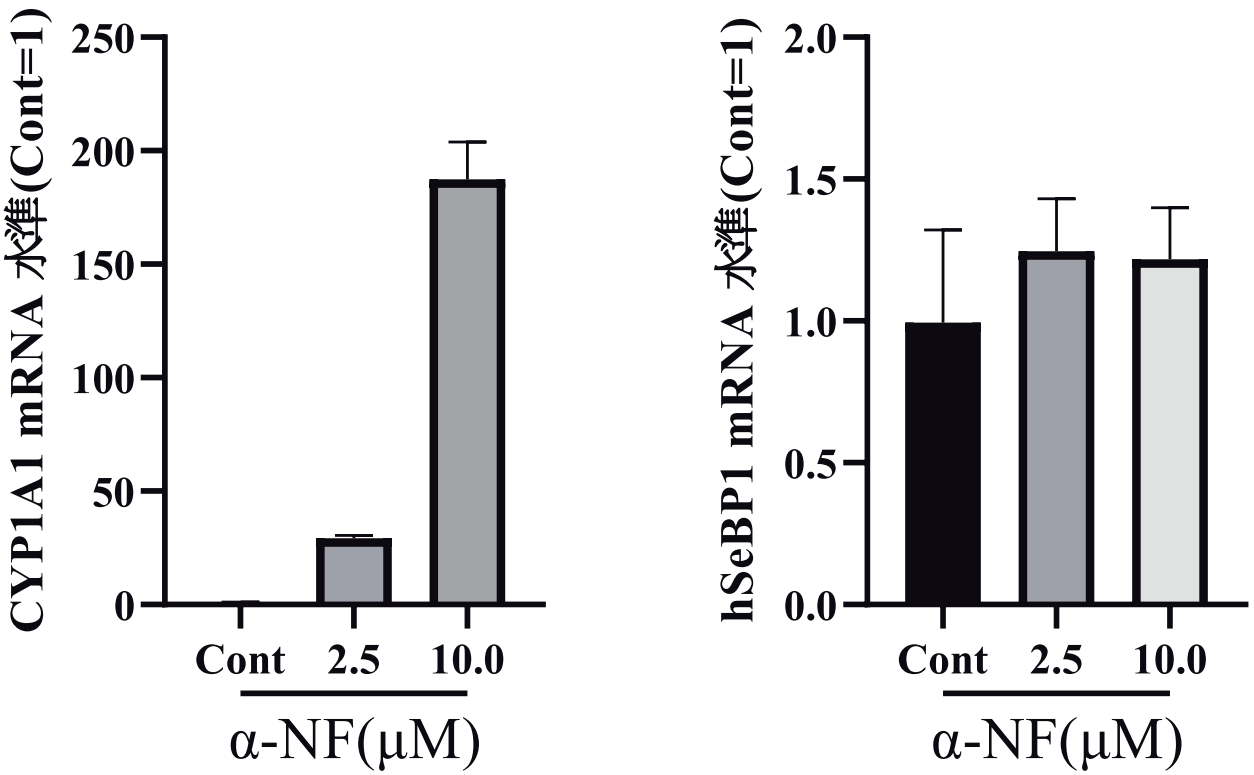


Fig. 2 Effects of α-NF on the mRNA expression of CYP1A1 and SeBP1 in HepaRG cells. For the control, the same DMSO was added. Each bar represents the mean ± S.D.M of 2 samples. For the control, the same DMSO was added. β-Actin was used as an internal control. CYP1A1, cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1; hSeBP1, human selenium-binding protein 1; α-NF, α-naphthoflavone.

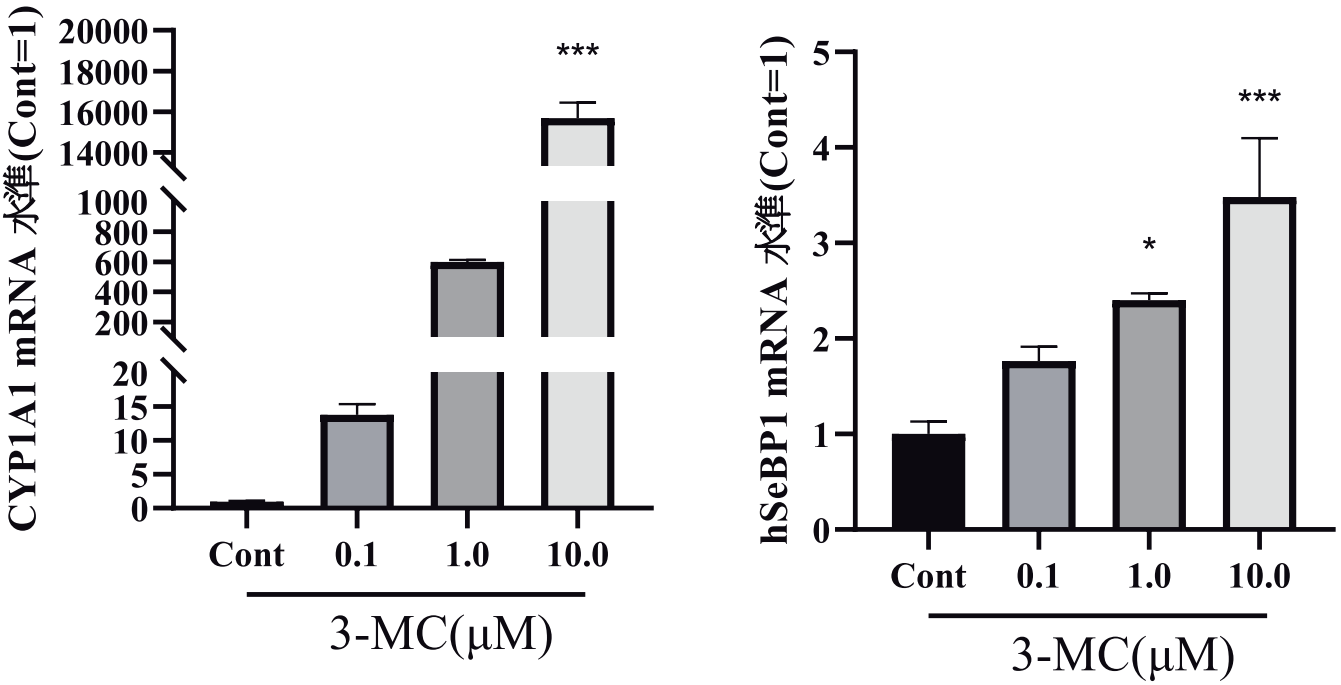


Fig. 3 Effects of 3-MC on the mRNA expression of CYP1A1 and SeBP1 in T47D cells. Results were expressed as mean ± S.E.M. of 4-6 samples. β-Actin was used as an internal control. *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$ *vs*. Control group. For the control, the same DMSO was added. CYP1A1, cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1; hSeBP1, human selenium-binding protein 1; 3-MC, 3-methylcholanthrene.

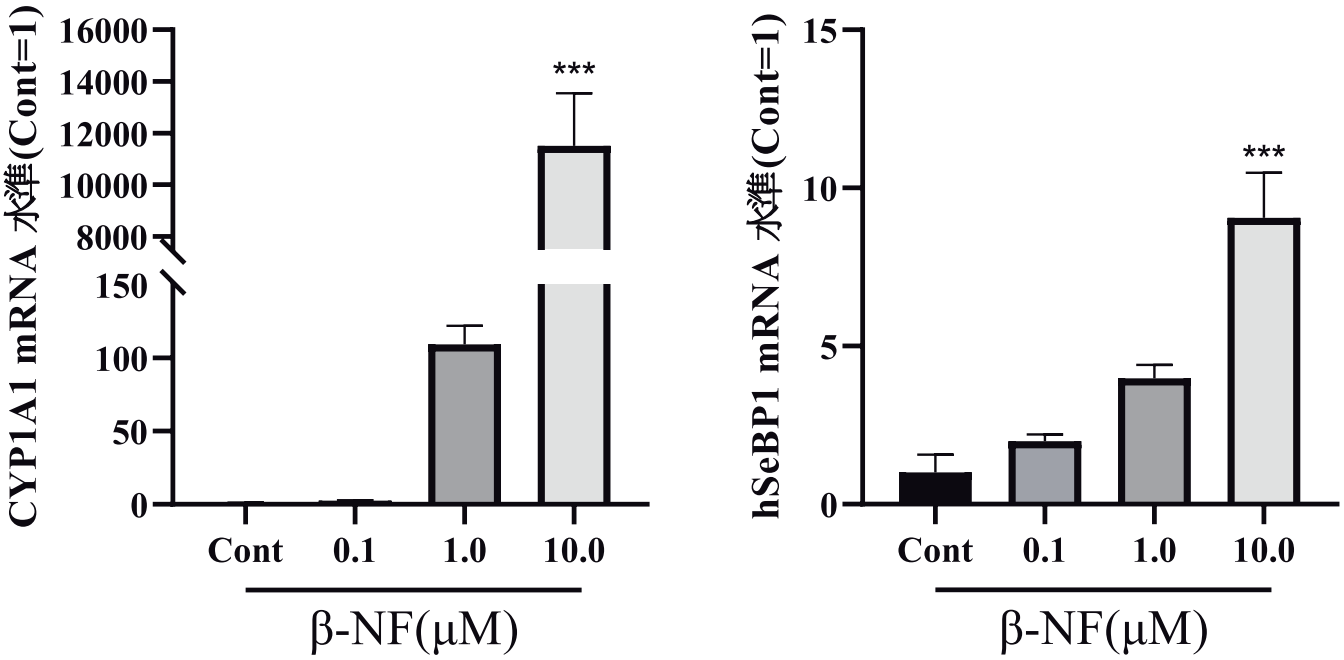


Fig. 4 Effects of β-NF on the mRNA expression of CYP1A1 and SeBP1 in T47D cells. Results were expressed as mean ± S.E.M. of 4-6 samples. β-Actin was used as an internal control. ***$p < 0.001$ *vs*. Control group. For the control, the same DMSO was added. CYP1A1, cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1; hSeBP1, human selenium-binding protein 1; β-NF, β-naphthoflavone.

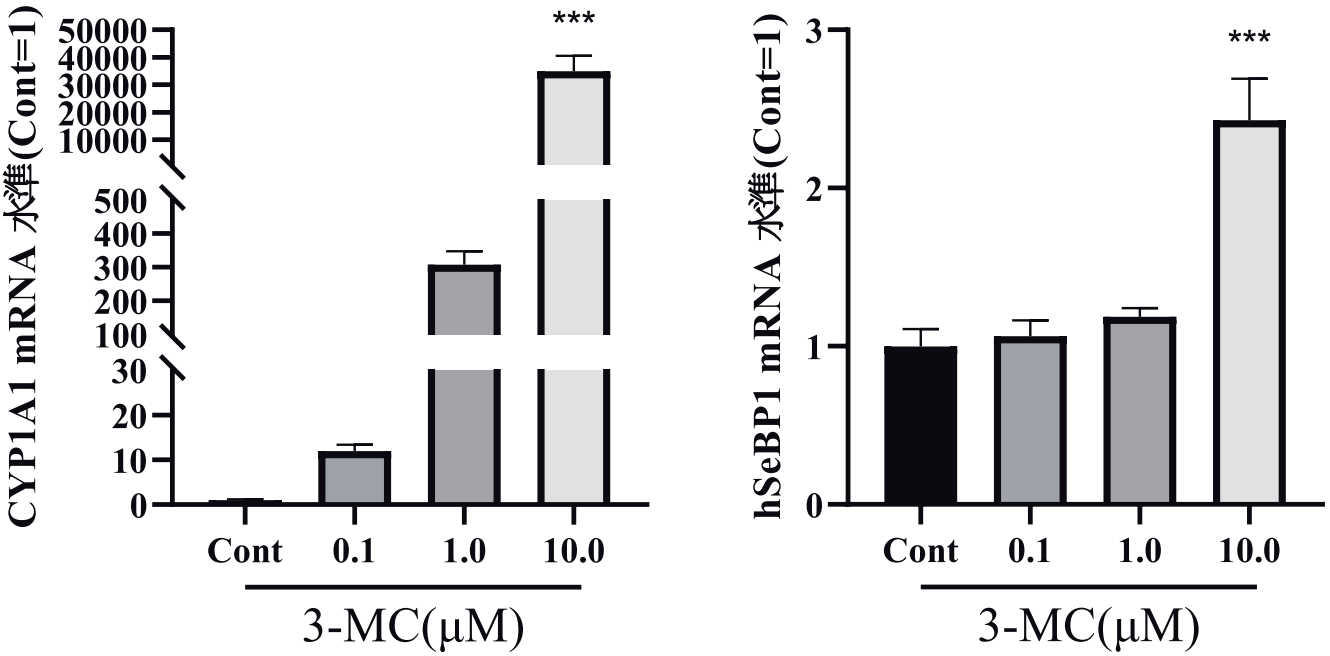


Fig. 5 Effects of 3-MC on the mRNA expression of CYP1A1 and SeBP1 in hESR1-HepG2 cells. Results were expressed as mean ± S.E.M. of 4-6 samples. β-Actin was used as an internal control. ***$p < 0.001$ *vs*. Control group. For the control, the same DMSO was added and transfection with vector. hESR1, human estrogen receptor 1; CYP1A1, cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1; hSeBP1, human selenium-binding protein 1; 3-MC, 3-methylcholanthrene.

分担研究報告書

芳香族炭化水素受容体を介した骨代謝制御機構に関する研究

研究分担者　　藤原 稔史　九州大学病院整形外科　助教

研究要旨　AhR は骨代謝を制御する破骨細胞と骨芽細胞の分化に従い発現が増加し、ベンゾピレンはこれらの分化を阻害する。

Ａ．研究目的

油症被害者の高齢化に伴い、骨粗鬆症との関連が注目されている。骨は骨形成を行う骨芽細胞と骨吸収を行う破骨細胞のバランスによって骨代謝を制御しており、正常な骨代謝制御が骨量と骨質の維持に重要である。エストロゲンやステロイドなどのホルモンや環境因子など、様々な因子が影響している。

ダイオキシンが結合する芳香族炭化水素受容体（AhR）は骨芽細胞と破骨細胞の両者に発現しており、細胞の増殖や分化に関与していることが報告されている。In vitro では骨芽細胞と破骨細胞は AhR 刺激で分化が抑制されることが報告されいるが、破骨細胞は促進するとの報告もあり、まだ統一見解は得られていない 1)2)。また、AhR のアゴニストのタピナロフが皮膚の炎症に対して抗炎症効果を示されており 3)、AhR を介した骨代謝制御機構は新たなる骨粗鬆症治療にも繋がる。そこで、本研究では AhR に作用する薬剤の骨芽細胞と破骨細胞への効果を調べ、新たな治療戦略とすることを目的とする。

Ｂ．研究方法

8～12 週齢の C57Bl/6J マウスの長管骨を採取し、骨髄細胞を回収する。

①破骨細胞培養

骨髄細胞を M-CSF100ng/mL と 3 日間共培養し、単球系細胞へと誘導し、M-CSF100ng/mL と RANKL100ng/mL を共培養し、破骨細胞分化を誘導する。通常 4～5 日で破骨細胞に分化する。

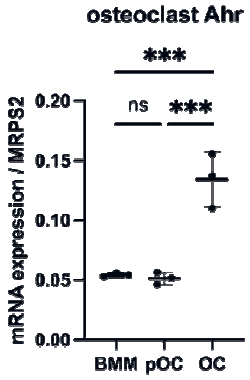
②骨芽細胞培養

骨髄細胞をアスコルビン酸と共培養し、2～3 週ほどかけて骨芽細胞へ培養する。

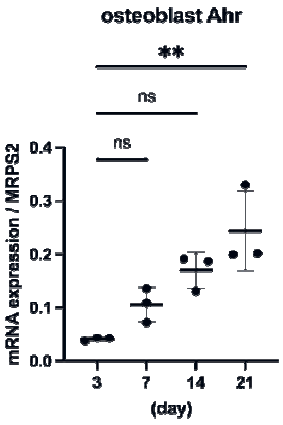
AhR の発現をリアルタイム PCR で破骨細胞と骨芽細胞それぞれで調べ、AhR アゴニストの薬剤を投与し、細胞に与える影響を調べる。破骨細胞分化は TRAP 染色で調べる。

Ｃ．研究結果

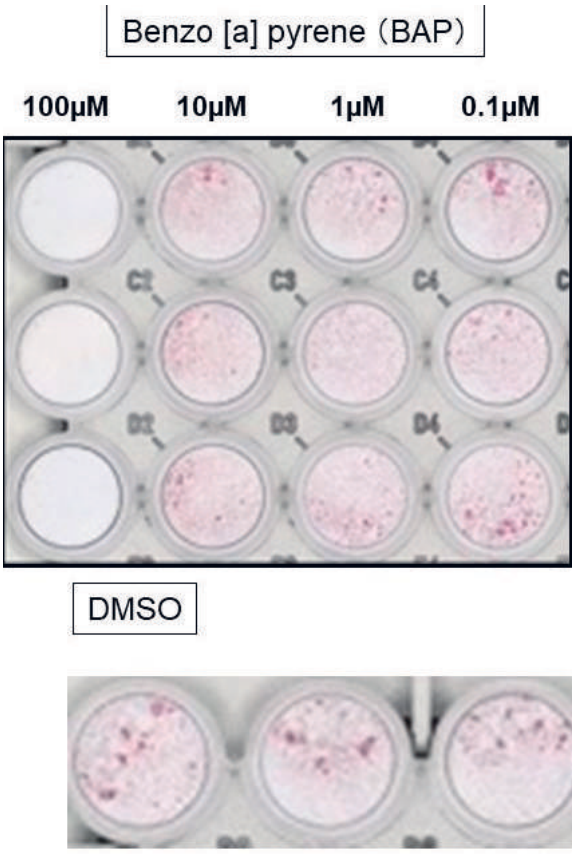
破骨細胞分化における AhR の発現をリアルタイム PCR で計測した（右図）。単球（BMM）から破骨細胞分化（OC）すると AhR の発現は著しく上昇した。



骨芽細胞分化においても 3 日から徐々に発現が上昇し、21 日目には有意に AhR 発現が上昇した（右図）。



ベンゾピレンを 0.1μM から濃度を上げて破骨細胞分化に従って加えると、10μM までは変化なく、100μM で破骨細胞分化の阻害効果がみられた（次ページ図）。また、骨芽細胞はベンゾピレン投与により 1μM から徐々に濃度依存性に分化が抑制



された。

D．考察

破骨細胞と骨芽細胞は分化に従い AhR の発現は上昇していた。また有害物質ベンゾピレンは高濃度で破骨細胞分化を抑制した。骨芽細胞は破骨細胞分化を抑制する濃度よりも低濃度で分化を抑制された。つまり、骨量低下に影響を及ぼしている可能性がある。今後は AhR を介したベンゾピレンの細胞内シグナル伝達機構を解明し、油症患者の骨量減少のメカニズムを同定する。さらに他の薬剤による AhR を介した骨代謝を制御する新たな薬剤を同定し、新たな治療戦略とする。

E．結論

破骨細胞と骨芽細胞は分化に従い AhR の発現は上昇した。有害物質ベンゾピレンは高濃度で破骨細胞分化を抑制した。

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

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

なし

３．その他

なし

H．　引用文献

1) 福士純一、岩本幸英：福岡医誌 2011, ダイオキシン類と骨代謝

2) Park R, et. al：Cells 2020, The Role of Aryl-Hydrocarbon Receptor (AhR) in Osteoclast Differentiation and Function

3) Smith SH, et. al：J invest Dermatol 2017, Tapinarof is a natural AhR agonist that resolves skin inflammation in mice and humans.

分担研究報告書

油症患者における口腔粘膜疾患と色素沈着との関連について

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　令和 5 年度の長崎県油症検診において歯科検診を受診した患者を対象に口腔粘膜疾患の発生に関する検討を行った。対象 175 名中 12 名に口腔粘膜疾患の発現がみられた。疾患の内訳としては、白板症 4 例、腫瘤性病変 1 例、歯肉増殖 1 例、アフタ性口内炎 4 例、黒毛舌 1 例、口腔扁平苔癬 1 例であった。口腔粘膜色素沈着は上顎歯肉 44 例（発現率 25.1%）、下顎歯肉 53 例（30.3%）、右頬粘膜 20 例（11.4%）、左頬粘膜 33 例（18.9%）、口蓋 18 例（10.3%）、上唇 63 例（36%）および下唇 70 例（40%）にみられたが、口腔粘膜疾患の発生との相関性は認められなかった。

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、口腔乾燥症、顎関節症などが報告されている。これまで、それらの症状について油症歯科検診結果に基づき検討を行ってきた。特に口腔粘膜色素沈着は、現在でも油症地区に多くみられ、これまでも認定者および非認定者における色素沈着の発現数や、発現部位の検討を含め報告を行ってきた。

一方、日常みられる口腔粘膜疾患は多彩であり、代表的なものとしては、口腔粘膜色素沈着の他、口腔白板症、口腔粘膜扁平苔癬、アフタ性口内炎などがあげられる。

今年度は、長崎県油症地区における口腔粘膜色素沈着の発現について検討し、色素沈着以外の口腔粘膜疾患の発現について調べ、さらに色素沈着との関連性について検討を行った。

B．研究方法

令和 5 年度の長崎県油症検診で歯科検診を行うことのできた受診者を対象者として検討を行った。長崎地区、五島玉之浦地区および五島奈留地区では 3 名の歯科医師が歯科検診を行い、五島福江地区では 2 名の歯科医師が歯科検診を行った。それらの検診で記録されたデータを基に検討を行った。

口腔粘膜色素沈着は上下顎歯肉、左右頬粘膜、口蓋粘膜および上下唇粘膜の 7 か所に分類し、検診を行った。

色素沈着以外の口腔粘膜疾患については、カルテ上その記載があるものを対象とした。

（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

全受診者のうち歯科を受診した者は、長崎地区 76 名、福江地区 25 名、玉之浦地区 33 名、奈留地区 41 名の計 175 名であった。

残存歯数については、上顎の平均が 10 歯、下顎の平均が 11 歯で、全残存歯の平均は 21 歯であった。なお、歯数を計算するにあたって智歯については除外して計算した。

口腔粘膜色素沈着については、上顎歯肉 44 例（発現率 25.1%）、下顎歯肉 53 例（30.3%）、右頬粘膜 20 例（11.4%）、左

頬粘膜33例(18.9%)、口蓋18例(10.3%)、上唇63例(36%)および下唇70例(40%)に発現が認められた。

口腔粘膜疾患については、12 例認められた。疾患の内訳としては、白板症４例、腫瘤性病変１例、歯肉増殖１例、アフタ性口内炎４例、黒毛舌１例、扁平苔癬１例であった。それらの症例以外に、舌縁部に著明な色素沈着を認める症例が１例認められ、舌縁部以外にも複数の部位に高度の色素沈着の認められた症例であった。白板症のうち１例は舌縁部に発現しており、臨床所見から発がんの可能性が考えられたため長崎大学病院にて切除生検が行われた。病理診断の結果は上皮異形成であった。

口腔粘膜疾患の発現と認定未認定の間、および性、年齢に相関性はみられなかった。また、色素沈着の発現および残存歯数との相関性も認められなかった。

D．考察

口腔粘膜疾患は直視および触知が可能なため形態や色調といった臨床症状によって分類するのが一般的である。臨床症状としては、腫脹、水疱、びらん、潰瘍、白斑、紅斑、色素沈着、偽膜、瘢痕などがあるが、それぞれの形態的特徴、表面性状などから判断する。なかでも、白色を呈する疾患、びらんや潰瘍を呈する疾患などは、悪性化の可能性もあり、臨床的に重要である。

口腔粘膜白板症は、WHO 診断基準(1978)で「口腔粘膜に生じた摩擦によって除去できない白色の板状あるいは斑状の角化性病変で、臨床的あるいは病理組織学的にいかからなる疾患にも分類されないような白斑」と定義されている。白板症の罹患率は概ね3%前後という報告もあり、男性に多く、また高齢者に多いとされている。今回の検診結果でも175名中４名（2.3%）に白板症の発症がみられ、特に油症地区において発生率が高いものではなかった。2017年改訂のWHO頭頸部腫瘍分類(第４版)で、白板症は口腔潜在的悪性疾患として分類された。白板症の癌化率は、本邦では3.1～16.3%と報告されており、その中でも病理組織学的に上皮異形成のみられるものは、癌化率が高いとされている。今回みられた４症例のうち 1 例は臨床視診的特徴と舌縁部にみられたことから、切除生検が行われ、上皮異形成の病理診断を得た。これまでも過去に数例上皮異形成と診断された症例もあるため、油症患者において累積的にどの程度本疾患が存在するのかを検討する必要があると思われた。

扁平苔癬は免疫が関連する粘膜・皮膚の慢性炎症性疾患で、多くは口腔粘膜に発生し、口腔扁平苔癬（OLP）と呼ばれる。発生頻度は１%前後とされ、臨床症状としては頬粘膜に多く、紅斑上に白斑模様を形成する特徴的な臨床所見を呈する。OLP は臨床上しばしばみられ、治療を要さず経過観察とされる症例も多いが、今回の検診でみられた症例も典型的な臨床所見を示す症例であった。今回の検診では１例のみに発症がみられ、当初の予測よりも発生率が低かった。今後も歯科検診の際には注意深く観察していく必要があると思われる。

口腔粘膜色素沈着については、過去の年度と同様高い発生率であった。今回は、口腔粘膜疾患の有無を調査することが目的で検討を行ったが、今後は、口腔粘膜色素沈着と血中ダイオキシン濃度や残存歯数との関係などを調べる必要がある。色素沈着以外の粘膜疾患は発生頻度が低かったため、統計学的検討は困難であったが、昨年度までのデータを集積するなど、さらに検討が必要と思われた。

E．結論

令和 5 年度の長崎県油症検診における口腔粘膜疾患の発現と口腔粘膜色素沈着について検討した。口腔粘膜疾患の発症率は6.9%であった。色素沈着は高い発現が

みられたが、その他の口腔粘膜疾患との関連性は認められなかった。

Ｆ．研究発表

なし

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

なし

参考文献

１）　杉浦　剛：白板症．白砂兼光、古郷幹彦編：口腔外科学第４版，pp194，医歯薬出版，東京，2021

２）　白砂兼光：口腔扁平苔癬と口腔苔癬様病変．白砂兼光、古郷幹彦編：口腔外科学第４版，pp190-193，医歯薬出版，東京，2021

３）　Jawert F, Pettersson H, et al.: Clinicopathologic factors associated with malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study. Int J Oral Maxillofac Surg. 2021; 50: 1422-28

分担研究報告書

AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制がヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響について

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 シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制はヒト歯根膜細胞のコラーゲン形成能を抑制する。

Ａ．研究目的

歯槽骨は歯を支持する上で重要な組織であるが、油症患者では、歯槽骨の破壊によって生じる歯周ポケットが、深化する可能性があることが報告されている。したがって、油症患者の歯を長期にわたり維持するためには、歯槽骨の破壊機構を明らかにし、破壊された歯槽骨の修復を促進することが重要であると考えられる。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。私たちはこれまでに、芳香族炭化水素受容体（AhR）に結合することが知られるベンゾピレン(BaP)によって AhR シグナルを活性化したヒト歯根膜細胞(BaP-PDLC) と、活性化していないヒト歯根膜細胞（Cont-PDLC）を用いて、マイクロアレイ解析を行った。その結果、BaP-PDLC において Tenascin-C（TN-C）の発現が抑制されることを明らかにした。そこで本研究では、AhR シグナルの活性化による TN-C の発現抑制が、ヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

Ｂ．研究方法

BaP-PDLC と Cont-PDLC を用いて、TN-C の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて確認した。また、ヒト歯根膜細胞において TN-C の発現を、siRNA を用いて抑制し、そのコラーゲン形成能に及ぼす影響を、ピクロシリウスレッド染色法を用いて解析した。

（倫理面への配慮）

ヒト歯根膜の使用は、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。細胞には匿名加工化を行い、本人特定を不可としている。

Ｃ．研究結果

BaP-PDLC と Cont-PDLC を用いた定量的 RT-PCR の結果から、BaP-PDLC において、TN-C の遺伝子発現は Cont-PDLC と比較して有意に減少した。次に、TN-C を発現抑制したヒト歯根膜細胞を用いて、TN-C を発現抑制していないヒト歯根膜細胞と比較した結果、有意にそのコラーゲン形成能が減少した。

Ｄ．考察

TN-C は細胞外マトリックスの糖タンパクの一つであり、骨芽細胞の分化中にその発現が上昇することが報告されている（Morgan et al., J Cell Biochem, 2012）。本研究では、骨の有機質の 90%を占めるとされるコラーゲンの形成能が、TN-C を発現抑制したヒト歯根膜細胞において有意に低下したことから、TN-C はヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化に何らかの影響を

及ぼす可能性が示唆された。

Ｅ．結論

AhR シグナルの活性化による TN-C の発現抑制はヒト歯根膜細胞のコラーゲン形成能を抑制する。

Ｆ．研究発表

１．論文発表

該当無し。

２．学会発表

該当無し。

Ｇ．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

１．特許取得

該当無し。

２．実用新案登録

該当無し。

分担研究報告書

AhRシグナルの活性化を介したヒト歯根膜細胞のMMP12発現の増加は歯根膜組織にどのような影響を及ぼすか

研究分担者　　友清　淳　北海道大学歯科保存学教室　教授

研究要旨　ヒト歯根膜細胞において、AhRシグナルの活性化によりMMP12遺伝子発現量に加え、タンパク合成量および分泌量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、ヒト歯根膜細胞のMatrix metalloproteinase（MMP）12遺伝子の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、MMP12遺伝子だけでなく、MMP12タンパクに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、RT-PCR法を用いてMMP12発現を比較した。次にWestern BlotおよびELISAにて、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のMMP12タンパク発現およびタンパク分泌について検証した。

（倫理面への配慮）

ヒト歯根膜の使用は、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

RT-PCR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遺伝子発現が上昇することが明らかとなった。また、Western Blotの結果から、ヒト歯根膜細胞においてBaP刺激によりMMP12タンパク発現が上昇することが明らかとなった。さらにELISAにより、BaPにて刺激されたヒト歯根膜細胞では、MMP12タンパクの分泌量が増加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シグナルの活性化により、MMP12遺伝子の発現を介して、MMP12タンパクの産生が促進されるだけでなく、それらの分泌も促進されることが示唆された。単球から分泌されるMMP12が歯周病の進行に関与するとの報告が行われていることから（Björnfot Holmström S et al. 2019）、ヒト歯根膜細胞からのMMP12も同様に歯周病の進行に関与する可能性が推察された。

Ｅ．結論

BaPによるAhRシグナルの活性化は、ヒト歯根膜細胞のMMP12遺伝子発現上昇だけでなく、MMP12タンパク合成および分泌も促進する。

Ｆ．研究発表

１．論文発表

該当無し

２．学会発表

門脇正敬、友清淳、糸山知宏、長谷川大学、濱野さゆり、杉井英樹、前田英史. AhR シグナルの活性化はヒト歯根膜細胞の MMP12 発現を亢進する. 第 158 回日本歯科保存学会春季学術大会. 2023.6.

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】

福永貴之，小牧龍二，申　敏哲．舌への触・圧、痛覚刺激が脳血管性認知症モデルラットの記憶力と細胞死に及ぼす影響．熊本保健科学大学研究誌，21:1-12,2024.

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.

堀就英、飛石和大、安武大輔、新谷依子、古谷貴志、髙尾佳子、戸髙尊、広瀬勇気、香月進、辻学、同居家族条件によって認定された油症患者の血液中ダイオキシン類と傾向．福岡医学雑誌　2023．114(1)：10-16，2023

辻 博，松村潔：油症における末梢血 CD4 陽性 CD25 陽性 T リンパ球に関する検討．福岡医学雑誌 114:17-21，2023

太田千穂，加藤善久，原口浩一，藤井由希子，木村　治，古賀信幸．チャイニーズハムスター肝ミクロゾームによるTetrachlorobiphenylの代謝．福岡**医学雑誌**，114(1)：31-39，2023

太田千穂，原口浩一，加藤善久，藤井由希子，木村　治，古賀信幸．2,2',3,4',5',6-六塩素化ビフェニル（CB149）のラット、ハムスター、モルモットおよびヒトにおけるin vitro代謝の比較研究．福岡**医学雑誌**，114(1)：40-50，2023

服部　友紀子，　武田 知起，　山田 英之，　石井祐次，【油症と PCB 及びダイオキシン関連化合物に関する研究】2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin 母体暴露による胎児期成長ホルモン発現低下：胎児期の成長ホルモン補給による成長後の骨代謝改善．福岡医学雑誌，114(1)：51-64，2023

稲次良哉，池田佳乃子，佐野宏江，堤　諒太，○太田千穂，古賀信幸，田中嘉孝，石井祐次．ダイオキシン低用量暴露母体の肝薬物代謝第二相酵素活性の変動とポリメトキシフラボノイドの in vitro 阻害効果．福岡医学雑誌，114(1)：65-77，2023

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．福岡医学雑誌 112(2)：61-89,2021

佐藤 環，小木曽 俊孝，上原口 奈美，戸高 尊，平川 博仙，堀 就英，梶原 淳睦，香月 進，古江 増隆，辻 学：2009-2019 年度の油症検診における血中のポリ塩化クアテルフェニルの濃度と傾向．福岡医学雑誌 112(2)：90-98,2021

新谷依子、堀就英、飛石和大、平川博仙、佐藤環、安武大輔、戸髙尊、梶原淳睦、香月進、辻学、古江増隆、血液中ダイオキシン類およびPCB濃度測定のクロスチェック(2016～2019年度). 福岡医学雑誌 112(2)： 99-109, 2021

松本 伸哉, 赤羽 学, 神奈川 芳行, 古江 増隆, 辻 学, 今村 知明：油症患者における体脂肪率推定式の作成と半減期の再検証. 福岡医学雑誌 112(2)： 110-119, 2021

赤羽 学, 松本 伸哉, 神奈川 芳行, 古江 増隆, 辻 学, 今村 知明：油症患者の健康実態に関するアンケート調査自由記載のテキスト分析. 福岡医学雑誌 112(2)： 120-126, 2021

太田千穂, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村　治, 古賀信幸：2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル（PCB155）のラットおよびモルモット肝ミクロゾームによる代謝. 福岡医学雑誌 112(2)： 127-135,2021

池田佳乃子, 佐野宏江, 宮内優, 太田千穂, 古賀信幸, 田中嘉孝, 石井祐次：ダイオキシン低用量曝露母体の肝薬物代謝酵素活性に対する シークワーサー由来ポリメトキシフラボノイド: ノビレチンの in vitro 阻害効果. 福岡医学雑誌 112(2)： 136-147,2021

西田 恭子, 武田 知起, 山田 英之, 石井祐次：2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析: ゴナドトロピン放出ホルモン神経への影響. 福岡医学雑誌 112(2)： 148-154,2021

申敏哲, 行平崇, 小牧龍二, 福永貴之, 田中哲子, 土井 篤, 吉村　恵：感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討. 福岡医学雑誌 112(2)：155-163, 2021.

辻 博, 松村潔：油症における末梢血 CD4 陽性 T 細胞亜集団に関する検討. 福岡医学雑誌 112(2):164-169, 2021

Hata K, Tsubouchi K, Suzuki K, Eto D, Ando H, Yanagihara T, Kan-O K, Okamoto I. Surfactant protein D prevents mucin overproduction in airway goblet cells via SIRPα. Sci Rep. 14(1):1799.2024. doi: 10.1038/s41598-024-52328-5.

Kainuma M, Nakahara T, Tsuji G. Responder analysis of keishibukuryogan for the symptoms of Yusho certified patients.Traditional and Kampo medicine.2024 https://doi.org/10.1002/tkm2.14002.

Tsuji G, Yumine A, Yamamura K, Takemura M, Kido-Nakahara M, Ito T, Nakahara T. The Therapeutic Aryl Hydrocarbon Receptor-Modulating Agent Tapinarof Regulates SEMA3A Expression in Human Keratinocytes through NRF2. J Invest Dermatol. 2023 Oct 12:S0022-202X(23)02952-4. doi: 10.1016/j.jid.2023.10.002.

Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Yumine A, Takemura M, Kido-Nakahara M, Ito T, Yamamura K, Nakahara T. PDE4 inhibition by difamilast regulates filaggrin and loricrin expression via keratinocyte proline-rich protein in human keratinocytes. J Dermatol Sci. 2023 May;110(2):61-68.

Tsuji G, Yamamura K, Kawamura K, Kido-Nakahara M, Ito T, Nakahara T.Regulatory Mechanism of the IL-33-IL-37 Axis via Aryl Hydrocarbon Receptor in Atopic Dermatitis and Psoriasis. Int J Mol Sci. 2023 Sep 27;24(19):14633. doi: 10.3390/ijms241914633.

Tsuji G, Yamamura K, Kawamura K, Kido-Nakahara M, Ito T, Nakahara T. Novel Therapeutic Targets for the Treatment of Atopic Dermatitis. Biomedicines. 2023 Apr 27;11(5):1303. doi: 10.3390/biomedicines11051303. PMID: 37238974; PMCID: PMC10215969.

Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Yumine A, Takemura M, Kido-Nakahara M, Ito T, Yamamura K, Nakahara T. PDE4 inhibition by difamilast regulates filaggrin and loricrin expression via keratinocyte proline-rich protein in human keratinocytes. J Dermatol Sci. 2023 May;110(2):61-68. doi: 10.1016/j.jdermsci.2023.04.007. Epub 2023 Apr 28. PMID: 37156706.

Ming Yuan, Hiroe Sano, Takaaki Nishino, Hongbin Chen, Ren-Shi Li, Yuki Matsuo, Kyoko Nishida, Takayuki Koga, Tomoki Taked, Yoshitaka Tanaka, Yuji Ishii, α-Lipoic acid eliminates dioxin-induced offspring sexual immaturity by improving abnormalities in folic acid metabolism. Biochem. Pharmacol., 210: 115490 (2023).

Yukiko Fujii, Kouji H. Harada, Yoshiko Ito, Miho Yoshitake, Chiharu Matsunobu, Yoshihisa Kato, Chiho Ohta, Nobuyuki Koga, Osamu Kimura, Tetsuya Endo, Akio Koizumi, Koichi Haraguchi. Profiles and determinants of dicofol, endosulfans, mirex, and toxaphenes in breast milk samples from 10 prefectures in Japan. Chemosphere, 311 (2023) 137002.

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.

Yumine A, Tsuji G. Hydroxychloroquine induces matrix metalloproteinase 1 expression and apoptosis in neurofibromatosis type 1 Schwann cells. J Dermatol Sci. 2021 Nov;104(2):142-145. doi: 10.1016/j.jdermsci.2021.09.009. Epub 2021 Oct 1. PMID: 34763989.

Furue M, Ishii Y, Tsukimori K, Tsuji G. Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin- Related Health Hazards-Lessons from Yusho. Int J Mol Sci. 2021 Jan 12;22(2):708. doi: 10.3390/ijms22020708. PMID: 33445793; PMCID: PMC7828254.

Onozuka D, Nakamura Y, Tsuji G, Furue M. Cancer- and noncancer-specific cumulative incidence of death after exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins: A competing risk analysis among Yusho patients. Environment International. 2021; 147:106320.

Matsuda-Taniguchi T, Takemura M, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Takai-Yumine A, Furue M, Tsuji G. The Antidiabetic Agent Metformin Inhibits IL-23 Production in Murine Bone-Marrow-Derived Dendritic Cells. J Clin Med. 2021 Nov 29;10(23):5610. doi: 10.3390/jcm10235610.

Kainuma M, Mitoma C, Tsuji G, Onozuka D, Nakaguchi T, Furue M. The association between objective tongue color and the static blood findings of Yusho patients. Asian J. Complementary Altern. Med, 2021; 9:89-97.

Hong-bin Chen, Jorge Carlos Pineda Garcia, Shinako Arizono, Tomoki Takeda, Ren-shi Li, Yukiko Hattori, Hiroe Sano, Yuu Miyauchi, Yuko Hirota, Yoshitaka Tanaka, Yuji Ishii,, DAPL1 is a novel regulator of testosterone production in Leydig cells of mouse testis., Sci. Rep., 11(1): 18532 (2021)

Yingxia Song, Atsushi Kurose, Ren-shi Li, Tomoki Takeda, Yuko Onomura, Takayuki Koga, Junpei Mutoh, Takumi Ishida, Yoshitaka Tanaka and Yuji Ishii, Ablation of Selenbp1 alters lipid metabolism via the Pparα pathway in mouse kidney, Int. J. Mol. Sci., 22(10): 5334 (2021)

Yukiko Hattori, Tomoki Takeda, Misaki Fujii, Junki Taura, Hideyuki Yamada, Yuji Ishii, Attenuation of growth hormone production at the fetal stage is critical for dioxin-induced developmental disorder in rat offspring, Biochemical Pharmacol., 186: 114495 (2021)

Masutaka Furue, Yuji Ishii, Kiyomi Tsukimori, Gaku Tsuji, Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin-Related Health Hazards-Lessons from Yusho, Int. J. Mol. Sci., 22(2): 708 (2021)