

昭和29年11月5日第三種郵便物認可
平成29年3月25日（毎月25日発行）
第1146号

Vol. 108 No. 3
March 2017

CODEN : FKIZA4
ISSN 0016-254X

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

第 108 卷 第 3 号 (1146)

平成 29 年 3 月 25 日

特 集 号

油症とPCB及びダイオキシン関連化合物

研 究 報 告 第 26 集

責任編集者 古 江 増 隆

The Twenty-sixth Reports of the Study on Yusho
—PCBs and Dioxin-Related Compounds—

Editor Masutaka Furue

福岡医誌

Fukuoka Acta Med.

FUKUOKA ACTA MEDICA

Vol. 108 No. 3, March 2017

福岡医学雑誌

昭和二十九年十一月二十五日第三種郵便物認可
平成二十九年三月二十五日発行

第百八卷 第三号

定価

二〇〇〇円

油症と PCB 及びダイオキシン関連化合物に関する研究

報告集 第 26 集

(福岡医学雑誌 第 108 巻 第 3 号 平成 29 年 3 月)

目 次

- 序 言 古江 増隆…49
- 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
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…51
- 油症原因物質 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran による酸化的ストレス惹起の推定機構:
肝臓での過酸化水素産生亢進と肝障害
山田 健一, 武田 知起, 黒木 廣明, 三苫 千景,
内 博史, 古江 増隆, 山田 英之, 石井 祐次…58
- 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin が思春期ラットに及ぼす影響: ダイオキシン様急性毒性を
指標とした解析
人見 将也, 武田 知起, 山田 英之, 石井 祐次…68
- ベンゾピレンの末梢神経および脊髄感覚系シナプス伝達に及ぼす作用に関する研究
申 敏哲, 吉村 恵…75
- 血液中ダイオキシン類および PCB 濃度測定のカロスチェック (第 2 報)
新谷 依子, 堀 就英, 安武 大輔, 平川 博仙, 小木曾俊孝,
宮脇 崇, 飛石 和夫, 戸高 尊, 梶原 淳睦, 香月 進,
岸 玲子, 三苫 千景, 古江 増隆…83
- 2014-2016 年度油症検診における血液中ポリ塩化クアテルフェニルの分析
小木曾俊孝, 安武 大輔, 佐藤 環, 高橋 浩司, 堀 就英,
梶原 淳睦, 香月 進, 三苫 千景, 古江 増隆…94
- Deans Switch 型 SilFlow を用いた血中ダイオキシン類測定におけるソルベントカット
大量注入法の開発
安武 大輔, 飛石 和夫, 平川 博仙, 新谷 依子, 小木曾俊孝,
堀 就英, 梶原 淳睦, 香月 進, 三苫 千景, 古江 増隆…102
- 油症における甲状腺機能の検討 辻 博, 蓮尾 裕…111
- カネミ油症におけるダイオキシン類の排出速度研究の進展
松本 伸哉, 赤羽 学, 神奈川芳行, 梶原 淳睦,
三苫 千景, 内 博史, 古江 増隆, 今村 知明…118
- 油症の治療—歴史と展望— 三苫 千景…124

The Twenty-sixth Reports of the Study on Yusho
—PCBs and Dioxin-Related Compounds—
(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 108, No. 3, 2017)

CONTENTS

Foreword	M. Furue···49
Metabolism of 2,2',3,4,4',5,6'-Heptachlorobiphenyl (CB182) by Rat, Guinea Pig and Human Liver Microsomes	C. Ohta, Y. Fujii, K. Haraguchi, Y. Kato, O. Kimura, T. Endo and N. Koga···51
Possible Mechanism of 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran-induced Oxidative Stress : Enhanced Production of Hydrogen Peroxide and the Liver Injury	K. Yamada, T. Takeda, H. Kuroki, C. Mitoma, H. Uchi, M. Furue, H. Yamada and Y. Ishii···58
The Effect of 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo- <i>p</i> -dioxin on Pubertal Rats : An Analysis Focusing on the Dioxin-like Acute Toxicity	M. Hitomi, T. Takeda, H. Yamada and Y. Ishii···68
Effects of Benzo [a] pyrene on Conduction Velocity of the Rat Dorsal Root and Synaptic Transmission in Substantia Gelatinosa (SG) Neurons of the Rat Spinal Dorsal Horn	M.C. Shin and M. Yoshimura···75
Inter-Laboratory Cross-Comparison Study of Dioxins and PCBs Analyses in Human Blood Samples (Part 2)	Y. Shintani, T. Hori, D. Yasutake, H. Hirakawa, T. Kogiso, T. Miyawaki, K. Tobiishi, T. Todaka, J. Kajiwara, S. Katsuki, R. Kishi, C. Mitoma and M. Furue···83
Analysis of Polychlorinated Quaterphenyl in Yusho Diagnosis from 2014 to 2016	T. Kogiso, D. Yasutake, T. Satoh, K. Takahashi, T. Hori, J. Kajiwara, S. Katsuki, C. Mitoma and M. Furue···94
Development of Solvent-Cut Large-Volume Injection System using Deans Switch Type SilFlow for Dioxin Determinations in Blood	D. Yasutake, K. Tobiishi, H. Hirakawa, Y. Shintani, T. Kogiso, T. Hori, J. Kajiwara, S. Katsuki, C. Mitoma and M. Furue···102
Thyroid Function in Patients with Yusho	H. Tsuji, Y. Hasuo···111
The Progress of Excretion Rate of Dioxin-Like-Compounds in Yusho	S. Matsumoto, M. Akahane, Y. Kanagawa, J. Kajiwara, C. Mitoma, H. Uchi, M. Furue and T. Imamura···118
Therapeutic Strategies for <i>yusho</i> —History and Outlook for the Future—	C. Mitoma···124

序 言

厚生労働省全国油症治療研究班・班長

九州大学大学院医学研究院・教授

九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター長

古 江 増 隆

Foreword

Masutaka FURUE

Chief of The Study Group for Yusho

(granted by The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan)

Professor, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University

Director, Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital

A mass poisoning, involving at least 2200 individuals, occurred in Kyushu (Western Japan) in 1968. The incident is called Yusho, oil disease, as it was caused by ingestion of rice bran oil that was contaminated with Kanechlor-400, a commercial brand of Japanese polychlorinated biphenyls (PCBs). It was later found that the rice oil had been contaminated with not only PCBs but also polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), polychlorinated quaterphenyls (PCQs) and others.

Yusho is, thus, recognized as a poisoning by a mixture of PCBs, dioxins and related compounds. For more than 45 years, the patients have been suffering from various symptoms such as general malaise, headache, acneform eruption, dark-brownish nail pigmentation, increased discharge from the eyes with swelling of eyelids, pigmentation of oral mucosa, peripheral neuropathy, irregular menstruation in women.

A method for quantification of PCBs in the blood was developed after 1973, five years after the outbreak of Yusho. The blood PCQs levels were then added to the diagnostic criteria of Yusho as a relatively specific marker. Recent technological advancement allowed us to measure dioxins levels in 5 to 10ml of human blood samples. After the evaluation of validity, sensitivity and reproducibility of the blood levels of dioxins, we added the blood levels of 2, 3, 4, 7, 8-penta-CDF (PeCDF) in the new diagnostic criteria in Sep. 29th, 2004.

The clinical and basic observation and follow-up study of Yusho patients are extremely important not only for supporting patients' health but also for understanding the potential prolonged effects of high level exposure to dioxin-related chemicals in humans. In our follow-up study, Yusho consultants, established in 2002 and expanded in 2016, keep in touch with the patients by direct interview, by phone or by mail. Various types of questionnaire were carried out by Yusho consultants. Statistical correlations were analyzed between blood PeCDF levels and clinical/laboratory manifestations in addition to questionnaire comments.

Patients with Yusho still complain various subjective and objective symptoms. Although definitive therapy for Yusho has not been proposed yet, basic and clinical researches by us and others have revealed that various phytochemicals and some Japanese *Kampo* drugs are potential candidates for treatments by modulating aryl hydrocarbon receptors. Finally, we very much appreciate the contribution and

participation of the patients in health examinations for follow-up of Yusho each year. I also deeply thank all of the members of the study group and the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare for their efforts to help and support patients' health and well-being.

Acknowledgement ; This work was supported by a grant from The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

厚生労働省全国油症治療研究班の第 26 報告集を刊行することができましたことを大変うれしく思っております。平成 27 年度と平成 28 年度の研究成果ならびに関連分野の情報などをまとめております。油症は 1968 年（昭和 43 年）に西日本一帯の広範囲な住民の方々が、熱媒体として使用されていた PCB の混入した食用米ぬか油を摂取したことによって起こった食中毒事件です。その後、研究班によって PCDF などのダイオキシン類も混入していたことがつきとめられ、油症は PCB 類とダイオキシン類による複合中毒であったことが証明されました。事件発生 5 年後くらいから PCB の血中濃度測定が可能になりました。その後、PCQ も油症に比較的特異的に検出されることが判明し診断基準に加わりました。ダイオキシン類は血中にごくわずかにしか含まれていないために、その定量は困難な状況でしたが、研究班内での技術改良により少ない血液量で再現性のあるダイオキシン類測定が可能となり、2001 年（平成 13 年）は福岡県の検診でパイロット的に測定を行い、2002 年（平成 14 年）以降は全国の検診で測定を開始しました。これらのデータを妥当性・精度・再現性などの面から解析しました。その結果、血液中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) 値を診断基準に追補することが妥当と考えられ、油症診断基準（平成 16 年 9 月 29 日補遺）が新たに作成されました。

患者さんの健康管理と健康相談の窓口として、2002 年（平成 14 年）から油症相談員システムを立ち上げました。油症相談員は検診での直接面接、電話や手紙による問診や相談受付などを行いません。油症相談員の活躍によって、従来よりも信頼性の高いアンケート調査を行なうことが可能となりました。2016 年（平成 28 年）から油症相談支援員制度として充実拡大されました。油症に関する研究成果は油症ニュース (<http://www.kyudai-derm.org/part/yusho/index.html>) にとりあげて、認定者の方々に送付しております。こうして少しずつではありますが、認定者の方々との交流をさらに深めたいと思っています。現時点では油症に著効する治療薬はありませんが、我々を含めた最近の研究によって、さまざまな野菜や漢方薬にダイオキシンの作用を抑制する効果が期待されることが明らかになってきました。毎年検診に参加いただいている認定者の方々に御礼申し上げますとともに、油症検診 (<http://www.kyudai-derm.org/yusho/index.html>) にお力添えをいただいている班員の方々、そして各県の行政の方々、厚生労働省担当課の皆様にも深く感謝申し上げます。

謝辞：本誌は、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（カネミ油症に関する研究））研究課題名（課題番号）：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（H27 - 食品 - 指定 - 017）によって刊行されています。深く感謝申し上げます。

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

¹⁾中村学園大学栄養科学部 食品衛生学研究室

²⁾第一薬科大学 分析化学教室

³⁾徳島文理大学香川薬学部 薬物動態学講座

⁴⁾北海道医療大学薬学部 病院薬学講座

⁵⁾北海道医療大学薬学部 衛生薬学講座

太田千穂¹⁾, 藤井由希子²⁾, 原口浩一²⁾, 加藤善久³⁾,
木村 治⁴⁾, 遠藤哲也⁵⁾, 古賀信幸¹⁾

Metabolism of 2,2',3,4,4',5,6'-Heptachlorobiphenyl (CB182) by Rat, Guinea Pig and Human Liver Microsomes

Chiho OHTA¹⁾, Yukiko FUJII²⁾, Koichi HARAGUCHI²⁾, Yoshihisa KATO³⁾,
Osamu KIMURA⁴⁾, Tetsuya ENDO⁵⁾ and Nobuyuki KOGA¹⁾

¹⁾*Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University,
5-7-1, Befu, Johnan-ku, Fukuoka 814-0198*

²⁾*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 22-1
Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka, 815-8511*

³⁾*Kagawa School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University,
1314-1 Shido, Sanuki, Kagawa 769-2193*

⁴⁾⁵⁾*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido,
1757 Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293*

Abstract

The *in vitro* metabolism of 2,2',3,4,4',5,6'-heptachlorobiphenyl (CB182) by rat, guinea pig and human liver microsomes was compared and the effects of cytochrome P450 (CYP) inducers, phenobarbital (PB) and 3-methylcholanthrene (MC), on CB182 metabolism were examined. Only one metabolite was produced by rat, guinea pig and human liver microsomes and the order of the activity was rat (PB-treated) >> guinea pig (PB-treated) > guinea pig (untreated, MC-treated) > human > rat (untreated). Pretreatment of PB resulted in the remarkable increase of the metabolite in rats (1,370 pmol/hr/mg protein) and a slight increase in guinea pigs (27 pmol/hr/mg protein). In contrast, MC treatment to rats and guinea pigs decreased M-1. By comparison of GC-MS data of the methylated M-1 with a synthesized authentic sample, M-1 was determined to be 3'-hydroxy (OH)-CB182. These results suggest that 3'-OH-CB182 is a major metabolite formed by PB-inducible CYP2B enzymes in both animals and rat CYP2B enzymes possess much higher activity to hydroxylate CB182 than guinea pig and human CYP2B enzymes.

Key words : PCB, metabolism, rat, guinea pig, cytochrome P450

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs)は、従来より世界的な環境汚染物質として知られているが、高い脂溶性のため、ヒトをはじめ多くの哺乳動物の血液、脂肪組織および肝臓に高濃度で蓄積している¹⁾。そのため、PCBsは2001年のストックホルム条約において、代表的な残留性有機汚染物質(POPs)の1つとして指定されている。PCBsの中でも、塩素数が6個以上で、2,4,5-三塩素置換ベンゼンあるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有しているもの、例えば、2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (hexaCB) (CB153)、2,2',3,4,4',5'-hexaCB (CB138) および2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (heptaCB) (CB180)は、健常者血中に高濃度残留している²⁾⁻⁶⁾。また、油症事件発生後37年を経過した油症患者の血液中PCB濃度を調べた結果、前述のCB153、CB138およびCB180に次いで、2,2',3,4',5,5',6'-heptaCB (CB187)、2,2',3,3',4,4',5'-heptaCB (CB170)、2,2',3,4',5,5'-hexaCB (CB146)が多いこと、さらにCB180、CB170および2,3,3',4,4',5'-hexaCB (CB156)が、健常者の2.2~3.9倍の高濃度であることが明らかになった⁷⁾。これらの結果は、上記PCB異性体が長期間ほとんど代謝されずに体内に蓄積されていること、また、油症患者がこれらのPCB異性体を健常者より多く摂取したことを示唆している。

一般に、PCBsのうち、置換塩素数が5個以下のものやメタ位とパラ位に水素2個が置換されたものは、肝小胞体に局在するチトクロムP450(CYP)によって、比較的容易に水酸化され、主に胆汁を介して糞中へと排泄される⁸⁾。一方、PCB代謝物の4-hydroxy(OH)-CB187、4-OH-CB146、4-OH-2,3,3',4',5'-pentachlorobiphenyl (pentaCB) (CB107) および3-OH-CB153なども血液や肝臓から比較的高濃度で検出されている²⁾⁻⁶⁾⁹⁾。この理由は、これらのPCB水酸化体が、依然として高い脂溶性を有しているため容易に排泄されないものと思われる。

ところで、本研究の2,2',3,4,4',5,6'-heptaCB (CB182)は、GC-MSによるPCB異性体の一斉分析(GCカラムとして長さ60mのDB-5を使用)の際、CB187と保持時間が完全に重なること、ま

た、油症原因油中の含量はCB187と合わせてもPCB全体の0.1%以下と少ないことが報告されている¹⁰⁾。実際、CB182がヒト組織中から検出されたとの報告は見当たらないが、この事実は、CB182が比較的容易に代謝され体外へと排泄されていることを示しているのかもしれない。しかしながら、CB182は、2,4,6-三塩素置換ベンゼンと2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンから成る構造であることから非常に代謝されにくいと思われるが、これまで代謝については全く報告がない。

そこで本研究では、CB182が代謝されるか否かを明らかにするため、ラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム(Ms)によるin vitro代謝を調べた。また、代謝に関与するCYP分子種を明らかにするため、CYP誘導剤のphenobarbital(PB)および3-methylcholanthrene(MC)で前処理したラットおよびモルモット肝Msを用いて同様に検討した。

実験方法

1. 実験材料

(1) 試薬

2,4,6-trichloroaniline, 2,4,6-trichloroanisole, 2,3,4,5-tetrachloroaniline, 1,2,3,4-tetrachlorobenzene, tetrachloroethylene および isoamyl nitrite は、東京化成工業(東京)より購入した。また、NADP, glucose-6-phosphate (G-6-P), phenobarbital (PB), 3-methylcholanthrene (MC), G-6-P脱水素酵素 (G-6-PD) および2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine] ethanesulfonic acid (HEPES) は和光純薬工業(大阪)より購入した。さらに、ウシ血清アルブミンはSigma-Aldrich社から購入した。

(2) CB182の合成

CB182はCadoganの方法¹¹⁾で合成した。すなわち、2,4,6-trichloroaniline 1.0g および1,2,3,4-tetrachlorobenzene 1.2gをtetrachloroethylene 10mlで溶解し、さらにisopentyl nitrite 0.5mlを加えて、110℃で24時間反応させた。反応物はアルミナカラム(100g, Merck製)およびシリカゲルカラム(65g, Merck製)で部分精製した後、分取用HPLCで精製した。CB182は、保持時間40.0minに溶出された。得られたCB182の

純度は、97.4%で最終的な収量は13.8 mgであった。分取用 HPLC の条件は次の通りである。カラム, ODS カラム (250 × 20 mm i.d., 5 μm, YMC 製); プレカラム, ODS プレカラム (50 × 20 mm i.d., YMC 製); 移動相, acetonitrile; 流速, 4 ml/min; 検出波長, 254 nm. なお, CB182 の化学構造は GC-MS により決定した。

CB182: MS (EI) m/z (relative intensity, %): 392 (100) [M^+], 394 (202) [$M^+ + 2$], 396 (198) [$M^+ + 4$], 398 (115) [$M^+ + 6$], 400 (34) [$M^+ + 8$], 357 (33) [$M^+ - Cl$], 322 (101) [$M^+ - Cl_2$].

(3) 代謝物の合成

CB182 の代謝物として, 3'-OH 体を想定し, そのメチル誘導体 3'-Methoxy (MeO)-CB182 の合成を, Cadogan の方法¹¹⁾で行った。すなわち, 2,3,4,5-tetrachloroaniline 0.5 g および 2,4,6-trichloroanisole 0.5 g を tetrachloroethylene 10 ml で溶解し, さらに isoamyl nitrite 0.5 ml を加えて, 110 °C で 24 時間反応させた。反応液は蒸発乾固後, n-ヘキサンで溶解し, アルミナカラム (50 g, Merck 製) およびシリカゲルカラム (50 g, Merck 製) で部分精製し, HPLC にて精製した。得られた予想化合物の分析は, GC-ECD および GC-MS にて行った。GC-ECD の条件は次の通りである。分析機器, ECD 付 HP5890 Series II ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製); カラム, DB-1 フェーズドシリカキャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 230 °C; 注入口温度, 250 °C; 検出器温度, 250 °C; キャリアーガス, N₂ (1 ml/min)。得られた 3'-MeO-CB182 の純度は, 99.4%で最終的な収量は1.60mgであった。

3'-MeO-CB182: MS (EI) m/z (relative intensity) 422 (100) [M^+], 424 (228) [$M^+ + 2$], 426 (218) [$M^+ + 4$], 428 (115) [$M^+ + 6$], 430 (36) [$M^+ + 8$], 407 (46) [$M^+ - CH_3$], 379 (28) [$M^+ - COCH_3$], 372 (18) [$M^+ - CH_3Cl$], 309 (64) [$M^+ - COCH_3Cl_2$].

(4) 実験動物と薬物処理

雄性の Wistar 系ラット (体重約 200 g) および Hartley 系モルモット (体重約 320 g) を, それぞれ未処理群, PB 前処理群および MC 前処理群の

3 群に分け, 1 群 3 匹とした。PB-Na 塩は生理食塩水に溶解し 80 mg/kg/day の用量で, 一方, MC はコーン油に溶解し 20 mg/kg/day の用量で, いずれも 3 日間腹腔内に投与した。最終投与日の翌日に実験動物を屠殺して, 肝を摘出し, 常法により肝 Ms を調製した。なお, これらの動物実験は中村学園大学実験動物委員会による審査承認を得た上で, 「中村学園大学 (含む短期大学部) 動物実験に関する規定」を遵守し実施した。

(5) ヒト肝 Ms

ヒト肝 Ms は, 20 名の白人男性の肝臓から調製されたものを, BD Gentest 社 (Woburn, MA, USA) から購入した。

2. 肝 Ms による代謝

ラット, モルモットおよびヒト肝 Ms による CB182 の代謝は既報¹²⁾に準じて行った。すなわち, 40 μM CB182 を NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-PD 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ および肝 Ms (1 mg protein) を 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計 0.5 ml として, 37 °C で 60 min インキュベート後, 反応液に chloroform-methanol (2:1) 0.5 ml と n-hexane 1.5 ml を加えボルテックスで振とう抽出した。抽出は 3 回行い, 有機層を合わせて濃縮後, diazomethane でメチル化し, 一部を GC-ECD または GC-MS に付した。代謝物の定量は, CB182 の検量線を用いて行った。

3. その他

肝 Ms のタンパク質の定量は, Lowry らの方法¹³⁾に従って行った。なお, 標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

合成した CB182 およびその予想代謝物の分子量は, GC-MS 2000 (島津製作所製) を用いて, EI モードで測定した。GC-MS 分析条件は次の通りである。カラム, DB-1 フェーズドシリカキャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 70 °C (1.5 min) - 20 °C/min - 230 °C (0.5 min) - 4 °C/min - 280 °C (5 min); 注入口温度, 250 °C; キャリアーガス, He (1 ml/min)。

実験結果

1. ラット, モルモットおよびヒト肝 Ms による代謝

CB182 を, NADPH 存在下, 好氣的にラット, モルモットあるいはヒト肝 Ms とともに, 37 °C, 60 min 反応させた. Fig. 1 には, ラット肝 Ms により生成された CB182 代謝物 (メチル誘導体) のガスクロマトグラムを示す. 未処理 Ms と PB 前処理 Ms の場合, 未変化体以外に 1 種類の代謝物 (以下, M-1 とする) が保持時間 19.50 min に検出された. また, モルモットの場合には, 未処理, PB 前処理および MC 前処理のいずれの Ms でも M-1 のみが生成された. さらに, ヒト肝 Ms でも同様に, M-1 のみが生成された (データ未掲載).

次に, 各種動物肝 Ms およびヒト肝 Ms により生成された M-1 の定量を行った (Table 1). M-1 の定量は CB182 の検量線を用いて行った. その結果, ラットの場合, M-1 は未処理肝 Ms では痕跡程度しか生成されなかったが, PB 前処理 Ms では 1,370 pmol/hr/mg protein へと顕著に増加した. なお, MC 前処理 Ms では M-1 は全く生成されなかった. 次に, モルモットの場合, 未処理 Ms でも比較的高い M-1 生成活性を有しており, その活性は 18.7 pmol/hr/mg protein であった. また, PB 前処理 Ms により, 有意ではないものの 1.4 倍に増加した. なお, MC 前処理 Ms では未処理 Ms と同程度の活性を示した. 一方, ヒト肝 Ms の M-1 生成活性は未処理モルモット肝 Ms の 76% 程度と低かった.

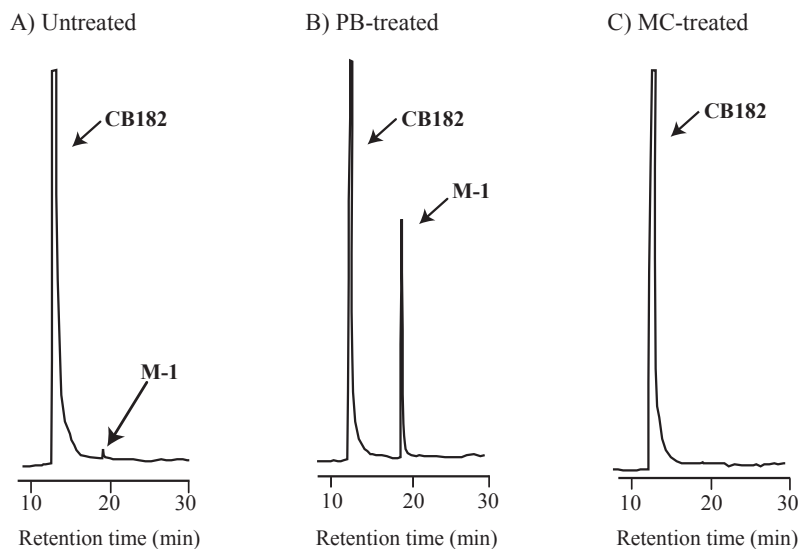


Fig. 1 GC-ECD chromatograms of the methylated derivative of a CB182 metabolite formed by liver microsomes of untreated (A), PB-treated (B) and MC-treated (C) rats

Table 1 Metabolism of CB182 by liver microsomes of rats, guinea pigs and humans and effects of CYP inducers on CB182 metabolism

Animal	M-1 formed (pmol/hr/mg protein)		
	Untreated	PB-treated	MC-treated
Rat	B.D.	1,370 ± 162	N.D.
Guinea pig	18.7 ± 12.6	26.7 ± 11.7	17.7 ± 11.1
Human*	14.3 ± 2.0	-	-

N.D., not detected. B.D., below detection limit. -, not done.

Each value represents the mean ± S.D. of four animals.

*The value represents the mean ± S.D. of triplicate determination.

2. M-1 の化学構造

M-1 の化学構造を決定するため、PB 前処理ラット肝 Ms を用いて 100 倍のスケール (100 ml) で代謝反応を行い、生成された代謝物を抽出後メチル化し、これを GC-MS に供した。その結果、M-1 のメチル誘導体は、分子量 422 であり、CB182 の分子量より m/z 30 多かった。この結果から、M-1 は OH 体であることが明らかとなった (Table 2)。さらに、M-1 のメチル誘導体では、フラグメントイオン $[M^+-15]$ (m/z 407) に加え、 $[M^+-43]$ (m/z 379) が比較的多く検出された。この結果を既報のデータ¹⁴⁾ と考え合わせると、M-1 はメタ位、すなわち 3 (3') 位あるいは 5 (5') 位に、OH 基を有することが推察された。次に、M-1 のメチル誘導体の GC における保持時間とマススペクトルを、合成標品と比較したところ、3'-MeO-CB182 とほぼ一致した。以上の結果から、M-1 は、3'-OH-CB182 であることが示唆された。

考 察

本研究では、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する CB182 の in vitro 代謝を調べた。代謝酵素として、CYP 誘導剤の PB および MC 前処理したラットおよびモルモット肝 Ms、さらにヒト肝 Ms を用いた。その結果、ラット、モルモットお

よびヒト肝により、CB182 の代謝物が一種類生成され、GC-MS での検討結果、3'-OH 体であることが明らかになった。Fig. 2 に動物肝における CB182 の推定代謝経路を示す。また、その生成量はラット (PB 前処理) >> モルモット (PB 前処理) > モルモット (未処理, MC 前処理) > ヒト > ラット (未処理, MC 前処理) の順であること、さらに、その生成は PB 前処理ラットにおいて特に顕著に増加することも明らかになった。

今回、CB182 の主代謝物 3'-OH 体の生成活性は、PB 前処理ラット肝 Ms で、1,370 pmol/hr/mg protein であったが、この活性の強さは 2,4,5-三塩素置換ベンゼンを有する CB180 の主代謝物 3'-OH-CB180 の生成活性 73 pmol/hr/mg protein (PB 前処理モルモット肝 Ms)¹⁵⁾ に比べ、19 倍も高かった。当初、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する CB182 は、水酸化されにくいと考えられたが、予想に反して、2,4,5-三塩素置換ベンゼンを有するものより、はるかに水酸化されやすいことが明らかになった。また、CB182 以外に、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB として、CB148 (2,2',3,4',5,6'-hexaCB), CB154 (2,2',4,4',5,6'-HexaCB), CB168 (2',3,4,4',5,6'-hexaCB), CB184 (2,2',3,4,4',6,6'-heptaCB) および CB188 (2,2',3,4',5,6,6'-heptaCB) があるが、いずれもヒト組織中からほとんど検出されていない。

Table 2 Mass spectral data and retention times of the methylated derivative of a CB182 metabolite and its synthetic compound

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min) n GC-MS
		$[M^+]$	$[M^+-15]$	$[M^+-35]$	$[M^+-43]$	$[M^+-50]$	$[M^+-70]$	
CB182	392	100	-	33	-	-	101	13.34
M-1	422	100	47	-	27	14	-	15.53
3'-CH ₃ O-CB182	422	100	45	-	29	18	-	15.53

-, not detected.

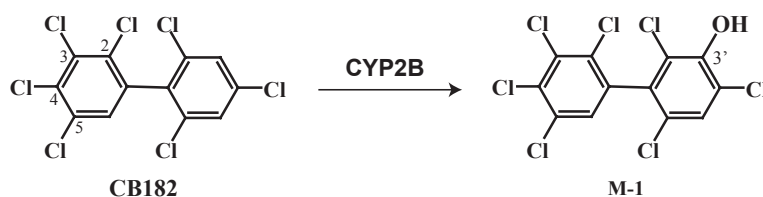


Fig. 2 Postulated metabolic pathway of CB182 in animal liver

この事実は、ラットと同様、ヒトでも容易に代謝され、排泄されることを示しているのかもしれない。

一般に、PCB水酸化の反応機構としては、直接水酸化で進行する場合と、epoxide中間体を経由して進行する場合の2つが考えられている⁸⁾。CB180やCB153の3'-水酸化の場合、直接水酸化機構と考えられる¹⁵⁾¹⁶⁾。一方、CB187やCB138の代謝では、塩素原子のNIH転位や酸化的脱塩素化が観察されることから、後者のepoxide中間体を経由していると考えられる¹⁷⁾¹⁸⁾。また、興味あることに、有吉らはPB前処理イヌ肝Msを用いて2,2',4,4',6,6'-hexaCB(CB155)の代謝を調べ、その結果、3-OH体以外に、NIH転位の産物と思われる4-OH-2,2',3,4',6,6'-pentaCBおよび4-OH-2,2',4',6,6'-hexaCBが生成されることを報告した。この結果は、イヌにおいては、直接水酸化機構だけではなく、epoxide中間体を介した水酸化機構の両方で進行していることを示唆している¹⁹⁾。本研究のラット、モルモットおよびヒト肝MsによるCB182の代謝では、直接水酸化機構で進行しているものと思われる。

今回、CB182代謝がPB前処理で促進されることから、代謝酵素として、ラットCYP2B1²⁰⁾およびモルモットCYP2B18²¹⁾が主に関与していることが示唆された。一方、PCB代謝に関与するヒトCYP分子種としては、これまでに、CYP2B6²²⁾²³⁾およびCYP2A6²⁴⁾²⁵⁾が報告されている。CYP2B6は、CB153の3-水酸化や2,2',3,4',5,5'-hexaCB(CB146)の3'-水酸化を、またCYP2A6は2,2',5,5'-tetraCB(CB72)や2,2',4,5,5'-pentaCB(CB101)の4-水酸化を触媒する。CB182代謝では、3'-水酸化が進行したことから、CYP2B6の関与が大きいと考えられるが、この点は今後の課題である。

総 括

1. CB182はラット、モルモットおよびヒト肝Msによって、いずれも3'-OH-CB182へと代謝された。その活性の強さは、ラット(PB前処理)>>モルモット(PB前処理)>モルモット(未処理,MC前処理)>ヒト>ラット(未処理,MC前処理)の順であった。
2. 3'-OH-CB182の生成は、未処理ラットにおい

て痕跡程度であったが、PB前処理により、その生成量は著しく増加した(1,370 pmol/hr/mg protein)。一方、モルモットの未処理MsおよびMC前処理Msの生成活性は、18 pmol/hr/mg protein程度であった。なお、PB前処理により、有意ではないが、未処理の1.4倍に増加した。

3. 以上の結果から、CB182は、これまで検討してきたheptaCBの中で最も容易に代謝されること、また、PB誘導性のCYP2B酵素によって触媒されることが示唆された。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業, H27-食品-指定-017 古賀信幸)および日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究(C), No. 26340043 加藤善久; 基盤研究(C), No. 16K00565 藤井由希子)の助成を受けたものである。ここに記して謝意を表します。また、本研究を実施するにあたり、代謝物の分析にご協力いただいた國武拓也さんに感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 古賀信幸, 太田千穂: 高残留性PCBの代謝と代謝物の毒性. 古江増隆, 赤峰昭文, 山田英之, 吉村健清編: 油症研究Ⅱ—治療と研究の最新線—, pp. 200-218, 九州大学出版会, 2010.
- 2) Sandau CD, Ayotte P, Dewailly E, Duffe J and Norstrom RJ: Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs (OH-PCBs) and other chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit. *Environ. Health Perspect.* 108: 611-616, 2000.
- 3) Sjödin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Björk J and Bergman Å: Influence of the consumption of fatty Baltic Sea fish on plasma levels of halogenated environmental contaminants in Latvian and Swedish men. *Environ. Health Perspect.* 108: 1035-1041, 2000.
- 4) Fängström B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P and Bergman Å: Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ. Health Perspect.* 110: 895-899, 2002.
- 5) Hovander L, Malmberg T, Athanasiadou M, Athanasiadis I, Rahm S, Bergman Å and Klasson-Wehler E: Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic

- halogenated pollutants in human blood plasma. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42 : 105-117, 2002.
- 6) Park JS, Linderholm L, Charles MJ, Athanasiadou M, Petrik J, Kocan A, Drobna B, Trnovec T, Bergman Å and Hertz-Picciotto I : Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) in pregnant women from eastern Slovakia. Environ. Health Perspect. 115 : 20-27, 2007.
 - 7) Todaka T, Hori T, Yasutake D, Yoshitomi H, Hirakawa H, Onozuka D, Kajiwara J, Iida T, Yoshimura T and Furue M : Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood collected from Yusho patients during medical check-ups performed from 2004 to 2007. Fukuoka Igaku Zasshi 100 : 156-165, 2009.
 - 8) 古賀信幸, 吉村英敏 : PCB と関連化学物質の代謝並びに代謝物の毒性. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆編 : 油症研究—30年の歩み—, pp. 93-110, 九州大学出版会, 2000.
 - 9) Bergman Å, Klasson-Wehler E and Kuroki H : Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. Environ. Health Perspect. 102 : 464-469, 1994.
 - 10) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人 : 高分解能ガスクロマトグラフ/低分解能質量分析計による全 PCB 異性体の分析. 福岡医誌 90 : 192-201, 1999.
 - 11) Cadogan JIG : A convenient new method of aromatic arylation. J. Chem. Soc. : 4257-4258, 1962.
 - 12) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y and Koga N : In vitro metabolism of 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (CB187) by liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs. Xenobiotica 35 : 319-330, 2005.
 - 13) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275, 1951.
 - 14) Tulp MTM, Olie K and Hutzinger O : Identification of hydroxyhalobiphenyls as their methyl ethers by gas chromatography mass spectrometry. Biomed. Mass Spectrom. 4 : 310-316, 1977.
 - 15) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 木村治, 古賀信幸 : 2,2',3,4,4',5,5'-七塩素化ビフェニル (CB180) の動物肝ミクロゾームによる代謝. 福岡医誌 106 : 176-183, 2015.
 - 16) Sundstrom G, Hutzinger O and Safe S : The metabolism of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by rabbits, rats and mice. Chemosphere 5 : 249-253, 1977.
 - 17) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Endo T, Kimura O and Koga N : Distribution and excretion of 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (CB187) and its metabolites in rats and guinea pigs. Chemosphere 118 : 5-11, 2015.
 - 18) 古賀信幸, 金丸知代, 大石奈穂子, 加藤善久, 木村良平, 原口浩一, 増田義人 : 2,4,5,2',3',4'-六塩素化ビフェニルの in vitro 代謝における種差. 福岡医誌 92 : 167-176, 2001.
 - 19) Ariyoshi N, Yoshimura H and Oguri K : Identification of *in vitro* metabolites of 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl from phenobarbital-treated dog liver microsomes. Biol. Pharm. Bull. 16 : 852-857, 1993.
 - 20) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H : Metabolism of 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. Chemosphere 37 : 1895-1904, 1998.
 - 21) Koga N, Kanamaru T, Kikuichi N, Oishi N, Kato S and Yoshimura H : Guinea pig liver cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60 : 898-903, 1998.
 - 22) Ariyoshi N, Oguri K, Koga N, Yoshimura H and Funae Y : Metabolism of highly persistent PCB congener, 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6. Biochem. Biophys. Res. Commun. 212 : 455-460, 1995.
 - 23) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸 : 2,2',3,4',5,5'-六塩素化ビフェニル (CB146) の in vitro 代謝の動物種差. 福岡医誌 104 : 161-169, 2013.
 - 24) McGraw JE Sr and Waller DP : Specific human CYP450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC#101). Biochem. Biophys. Res. Commun. 344 : 129-133, 2006.
 - 25) Shimada T, Kakimoto K, Takenaka S, Koga N, Uehara S, Murayama N, Yamazaki H, Kim D, Guengerich FP and Komori M : Roles of human CYP2A6 and monkey CYP2A24 and 2A26 cytochrome P450 enzymes in the oxidation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. Drug Metab. Dispos. 44 : 1899-1909, 2016.

(Received for publication February 14, 2017)

油症原因物質 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran による酸化ストレス惹起の推定機構：肝臓での過酸化水素産生亢進と肝障害

¹⁾九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

²⁾第一薬科大学

³⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

⁴⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

山田 健一¹⁾, 武田 知起¹⁾, 黒木 廣明²⁾, 三 苜 千 景³⁾,
内 博 史⁴⁾, 古 江 増 隆³⁾⁴⁾, 山 田 英 之¹⁾, 石 井 祐 次¹⁾

Possible Mechanism of 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran-induced Oxidative Stress : Enhanced Production of Hydrogen Peroxide and the Liver Injury

Ken-ichi YAMADA¹⁾, Tomoki TAKEDA¹⁾, Hiroaki KUROKI²⁾, Chikage MITOMA³⁾,
Hiroshi UCHI⁴⁾, Masutaka FURUE³⁾⁴⁾, Hideyuki YAMADA¹⁾
and Yuji ISHII¹⁾

¹⁾Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

²⁾Daiichi University of Pharmacy, Fukuoka, Japan

³⁾Research and Clinical Center for Yusho Dioxin, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan

⁴⁾Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University,
Fukuoka, Japan.

Abstract

The mechanism of oxidative stress which is one of the major toxicities observed in 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF)-treated mice was studied. Previously, we evaluated the dose-response relationship on the wasting syndrome and oxidative stress elicited with PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 and 10 mg/kg, once, p.o.). Of PenCDF doses examined, the wasting syndrome and oxidative stress were most marked in 5 mg/kg. In disagreement with this, the hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity which is a marker of aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cytochrome P450 1a1 (Cyp1a1) was most significantly elevated at 0.3 mg/kg. To clarify this discrepancy, in this study, we determined the contents of Cyp1a1 and 1a2 protein. The content of Cyp1a1 was well correlated with the EROD activity up to the PenCDF dose 1.0 mg/kg while the induction profile of Cyp1a2 was not correlated with it. Although, at the PenCDF 5.0 mg/kg, the contents of Cyp1a1 and 1a2 protein were induced consistently, the EROD activity declined to the level far smaller than the PenCDF dose 1.0 mg/kg. Further, the NADPH consumption was comparable among the PenCDF dose examined. Instead, the hydrogen peroxide production was elevated in S9 fraction most markedly by PenCDF dose 5.0 mg/kg. In agreement with this, the marker of hepatic injury, the serum AST and ALT activities were also most elevated at the same dose. Therefore, it is possible that PenCDF elicits oxidative stress and hepatic injury through the production of hydrogen peroxide via the mechanism involving uncoupling of the P450s.

Corresponding author : Yuji ISHII

Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

Key words : Oxidative stress, Dioxins, PCDF, Cytochrome P450, Hydrogen peroxide, uncoupling, Liver injury

はじめに

1968年、西日本一帯に発生した奇病、油症では、皮膚症状や脂質代謝異常を始めとする多岐にわたる障害が発生し、発生後49年以上経過した現在もなお、多くの患者が苦しんでいる。油症原因物質は、ライスオイルの加熱脱臭時の熱媒体として用いられた polychlorinated biphenyl (PCB) およびその加熱により生じた非意図的生成物であるダイオキシン類であると考えられている¹⁾。中でも、2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) は、油症患者の体内でのダイオキシン類としての毒性指標である TEQ [Toxicity Equivalency Quantity : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 換算量, TEF (Toxicity Equivalency Factor) と存在量との積] が全体の約70%と最も高く、発症への寄与が最も高い原因物質と考えられている²⁾³⁾。動物実験では、高用量のダイオキシン類によって、体重増加抑制作用を特徴とする消耗症 (wasting syndrome)、肝肥大および胸腺や脾臓の萎縮などの発症が知られている⁴⁾。

ダイオキシン類の毒性には、aryl hydrocarbon receptor (AhR) が関与することが、AhR ノックアウトマウスを用いた研究から示唆されている⁵⁾⁶⁾。ダイオキシンが細胞質の AhR に結合すると、AhR は核内に移行したのち、AhR nuclear translocator と結合し、ヘテロダイマーを形成後、標的遺伝子に存在する xenobiotic responsive element に結合する。これにより、転写が活性化され、cytochrome P450 (CYP) 1A1 を始めとするさまざまな酵素が誘導される⁷⁾。ダイオキシン類は多面的毒性を示すが、中でも酸化ストレスは代表的な毒性の一つである⁸⁾⁹⁾。ダイオキシン類により酸化ストレスが惹起される機構としては、複数の要因が考えられる。当研究室の先行研究では、ダイオキシン類の一種である coplanar PCB は、活性酸素消去系である Se-dependent glutathione peroxidase (GPx) や catalase を抑制することにより酸化ストレスを亢進させることが示唆されている¹⁰⁾¹¹⁾。一方、活性酸素生成系の亢進を示唆する報告もある。例えば、薬物の酸化に関

わる P450 は、スーパーオキシドアニオンや過酸化水素の生成も触媒する¹²⁾。これは、NADPH-P450 還元酵素から P450 へ供給された電子が、薬物の酸化に使われずに活性酸素種の生成/遊離に転用される場合である (uncoupling 反応)。TCDD 処理により誘導された Cyp1a1 は、この反応への寄与が大きいと考えられている¹³⁾。これ以外にも、xanthine oxidase や NADPH-oxidase などの誘導も酸化ストレス亢進に関与する¹⁴⁾¹⁵⁾。これらのことから、ダイオキシン類による酸化ストレス惹起には、活性酸素消去系の破綻と生成系の亢進があり、PenCDF ではどちらが重要かは明らかではない。

著者らの先行研究において、PenCDF の毒性の用量依存性を、C57BL/6J マウスにて PenCDF 用量 0.3, 1.0, 5.0 および 10.0 mg/kg (p.o.) にて検討した結果、Cyp1a1 の誘導の指標となる、ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 活性は、PenCDF 0.3 mg/kg で最も顕著に誘導された¹⁶⁾。一方、マウスに著しい体重減少や脾臓、胸腺の萎縮を伴った wasting syndrome を惹起する用量は、これとは明らかに異なっており、PenCDF 5 mg/kg の高用量で最も顕著であった¹⁶⁾。また、これと同じ用量において、脂質過酸化の指標である thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) も著しく上昇させた¹⁶⁾。ダイオキシン類中で最強毒性の TCDD は、雌ラットにおいて wasting syndrome を引き起こすが、これは抗酸化剤の butylated hydroxyanisole で抑制できる¹⁷⁾。同様に PenCDF による wasting syndrome においても、酸化ストレスの亢進が毒性発現に寄与する可能性は当然に考えられる。しかし、PenCDF による EROD 活性の誘導の用量依存性が、wasting syndrome や酸化ストレスの惹起作用のそれとは明らかに異なる理由は明らかではない。

TCDD で誘導された Cyp1a1 が酸化ストレスの惹起に関与することが、Cyp1a2 ノックアウトマウスを使った検討で明らかにされている。すなわち、TCDD による TBARS の上昇に、野生型と Cyp1a2 ノックアウトマウスで違いがない¹³⁾。一方、著者らの先行研究では、PenCDF0.3

mg/kg で著しく Cyplal が誘導されているものの酸化ストレスの惹起は限定的であった¹⁶⁾。従って、PenCDF の場合には、AhR を介した Cyplal の誘導だけでは、酸化ストレスを十分には説明できないと思われる。

これを支持する報告もある。すなわち、低用量の TCDD (15 μ g/kg, i.p.) を投与した雄性ラットの肝臓ミクロゾームでは、過酸化水素の生成はむしろ未処理群より抑えられているが、TCDD 等の多ハロゲン化炭化水素を 2.5 μ M 添加することにより過酸化水素の生成が増加すると言う¹⁸⁾。このことから、TCDD 処理ラット肝臓から単離したミクロゾームには、投与に由来する TCDD と誘導された CYP1A1 が含まれているものの、外から 2.5 μ M の TCDD を添加しなければ CYP1A1 は過酸化水素の生成にほとんど関与しないことが分かる。

本研究では、Cyp1a2 の PenCDF に対する親和性に着目した。当教室における先行研究で、PenCDF がラットの CYP1A2 に高い親和性を示すことが明らかにされている¹⁹⁾。つまり、PenCDF は自ら誘導した Cyp1a2 に結合して自身の毒性が低減された可能性が高い²⁰⁾。著者らの先行研究¹⁶⁾ の成果と併せて考えると、PenCDF はそれ自身が誘導した Cyp1a2 が保持し得る PenCDF 濃度までは著しい毒性は回避され、そのキャパシティーを超えたときに、wasting syndrome のような著しい毒性が引き起こされると推定される。

そこで、本研究では、この仮説を検証すべく、著者らの先行研究で得た試料¹⁶⁾ を用いて、PenCDF 投与量と EROD 活性、Cyplal および Cyp1a2 タンパク質レベルの関係について調べた。その結果、PenCDF 5 mg/kg では、Cyplal および 1a2 タンパク質の誘導性はほとんど変化していないにも関わらず、EROD 活性が低下することが分かったため、さらに、NADPH 消費量についても検討し、P450 の uncoupling 反応の亢進について調べた。また、肝障害のマーカーである血清 aspartate transaminase (AST) および alanine transaminase (ALT) の活性についても調べた。さらに、PenCDF 処理マウスの肝臓組織中の過酸化水素量も併せて定量し、PenCDF 毒性発現への酸化ストレスの寄与について考察した。

実験方法

1. PenCDF 処理動物の試料

著者らは、既報にて C57BL/6J マウスを用い PenCDF 用量依存性の検討を 0.3, 1.0, 5.0 および 10.0 mg/kg (p.o.) の用量にて行った¹⁶⁾。本研究における PenCDF 処理動物の試料は、既報¹⁶⁾にて著者らが調製したのを用いた。なお、PenCDF は既報に従い合成²¹⁾、PenCDF の構造と純度を確認の上使用した。動物実験は、すべて九州大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。PenCDF 用量依存性に関する実験は、九州大学薬学研究院動物舎において行った。マウスは日本クレア(株)より購入し、一週間の馴化ののち使用した。ダイオキシン類に対して高親和性の AhR を発現するマウス (C57BL/6J 系統) を使用した。7 週令の C57BL/6J 系雄性マウスに PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 および 10 mg/kg/5 mL コーン油) を単回経口投与した。対照群には、コーン油を経口投与した。投与 7 日後に体重を測定したのち臓器を採取した。

2. EROD 活性の測定

摘出した肝臓を 3 倍量の 1.15% KCl にてホモジナイズした。これを 9,000 \times g で 20 分間遠心分離した。得られた上清 (S9) 分画を用い、Burke らの方法に従って²²⁾、7-ethoxyresorufin の O-脱エチル化反応により生じる resorufin の蛍光を測定した (励起光, 544 nm; 測定光, 590 nm)。

3. 肝臓組織中の過酸化水素の測定

Pierce[®] Quantitative Peroxide Assay Kits (Thermo-Fisher Scientific) を用いて測定した。S9 サンプルをタンパク質濃度 (2 mg/mL) とするよう 1.15% KCl で希釈し、その 100 μ L を過酸化水素定量に使用した。15 分間室温でインキュベートしたのち、560 nm の吸光度を測定した。測定時の室温は概ね 20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C の範囲にあり、毎回の測定には過酸化水素 (三徳化学工業(株)) (30%, 8.8 M) を milli Q 水で希釈して作成した検量線を同時に測定した。過酸化水素濃度 0.031 M ~ 0.244 M の範囲では良好な直線性があり、すべてのサンプルは、この範囲内で定量した。

4. NADPH 消費活性測定

De Matteis らの方法²³⁾ に準じて行った。β-NADPH 添加後の 340 nm の吸光度の変化を 37 °C にて U-3210 形自記分光光度計 (HITACHI) を用いて 5 分間スキャンした。NADPH のミリモル吸光係数である 6.2²⁴⁾ を用いて NADPH 消費量を算出した。

5. ALT および AST 活性の測定

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼキット・アラニンアミノトランスフェラーゼキット・トランスアミナーゼ C II-テストワコー (和光純薬工業株) を用いて、血清を測定した。ALT は、基本的に 10 倍希釈にて測定したが、control 群は吸光度が低かったため、5 倍希釈や原液を用いて測定した。また、AST は、control 群のみ原液で測定した。555 nm における吸光度を反応後 1 時間以内に測定した。

6. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) および Western blotting

SDS-PAGE は Laemmli の方法²⁵⁾ に従って行った。SDS-PAGE 終了後のゲルを用い、Towbin らの方法²⁶⁾ に準じて PVDF 膜にタンパク質を転写した。一次抗体に、rabbit anti-rat P450 1A1 antibody²⁷⁾、二次抗体に、horseradish peroxidase-donkey anti-rabbit IgG (GE Healthcare 社) を用い、ClarityTM Western ECL Substrate (BioRad 社) により ChemiDoc MP (BioRad 社) を用いて Cypl1 および 1a2 のバンドを化学発光法にて検出した。

結 果

PenCDF 処理マウス肝臓の S9 分画の相対的 Cypl1 および 1a2 タンパク質含量を Fig. 1 に示す。Cypl1 は、0.3 mg/kg にて強く誘導され、PenCDF 用量を上げて誘導の強さは同程度であった。一方、Cypl2 は、PenCDF 0.3 mg/kg では誘導傾向が認められ、1 mg/kg 以上で有意な誘導が観察された。PenCDF 用量を上げて誘導の強さは同程度であった。著者らの先行研究の図表¹⁶⁾ よりデータを抽出し、PenCDF 投与量と EROD 活性、並びに Cypl1 および Cypl2 含量の変化の関係性を Fig. 2 に示す。PenCDF 1

mg/kg までの用量では、EROD 活性と Cypl1 含量の推移は概ね一致した。PenCDF 1 mg/kg では、Cypl2 が強く誘導されているものの、EROD 活性の変動は Cypl1 含量の変動で説明できることから、EROD 活性への Cypl2 の寄与が小さいことも分かる。一方、PenCDF 5 mg/kg では、Cypl1 および 1a2 の含量はほとんど変化していないにも関わらず、EROD 活性が低下している。既報で述べたように¹⁶⁾、PenCDF 5 mg/kg では TBARS の著しい上昇が起こっているという事実から、P450 の uncoupling 反応が亢進したことは十分考えられる。もし、そうであるならば、EROD 活性と不相应な NADPH 消費量の増大が予想される。

Fig. 3 に PenCDF 処理マウス肝 S9 分画の EROD 活性を示す。ここに記載する実験では、各々の群内のサンプル (S9 分画) を等量ずつプールし、基質濃度を 4 μM として NADPH 消費量測定と同条件で EROD 活性を比較した。基質濃度 20 nM での EROD 活性 (先行研究の図表参照)¹⁶⁾ の場合と同様に、4 μM においても PenCDF 0.3 mg/kg 処理群で最も活性が高かった (Fig. 3)。PenCDF 0.3 mg/kg 群の活性は、Cypl1 阻害剤である α-naphthoflavone により、終濃度 1.2 mM および 2 mM でそれぞれ 90% および 97% 阻害された (データ未掲載)。このことから、この活性には Cypl1 が主に寄与していることが示唆された。Fig. 4 には 4 μM ethoxyresorufin 存在下での S9 の NADPH 消費量を示す。NADPH 消費量は本研究で調べたどの PenCDF 投与量でも有意な上昇が認められた。しかし、EROD 活性の高さとは一致しておらず、EROD 活性の上昇が大きくなかった PenCDF 5 mg/kg でも、EROD 活性が最も高かった PenCDF 0.3 mg/kg と同程度の NADPH が消費された。また、最高投与量の PenCDF 10 mg/kg 投与群において、NADPH 消費量が高い傾向にあったものの、PenCDF 処理群間で有意な差はなかった。

Fig. 5 に、PenCDF 処理マウス肝臓 S9 分画に含まれる過酸化水素の量を示す。PenCDF 5 mg/kg 投与群において過酸化水素レベルが著しく上昇していることが明らかになった。10 mg/kg 群は上昇傾向を示したが、対照群との有意な差は PenCDF 5 mg/kg 投与群のみにとど

まった。PenCDF 5 mg/kg 群の過酸化水素レベルは、他のどの用量を投与した群よりも有意に高かった。AST および ALT は、肝細胞が破壊されたときに血液中に漏出するので、これらの血清中の活性は、肝障害マーカーとして用いることができる。Fig. 5 および 6 に、血清中の AST, ALT 活性に PenCDF が及ぼす影響を示す。血清 AST および ALT 活性は PenCDF 1 mg/kg 以上で有意に増加し、著者らの先行研究¹⁶⁾に記載の体重減少作用、TBARS 値の上昇同様に 5 mg/kg にて最も影響が大きかった。

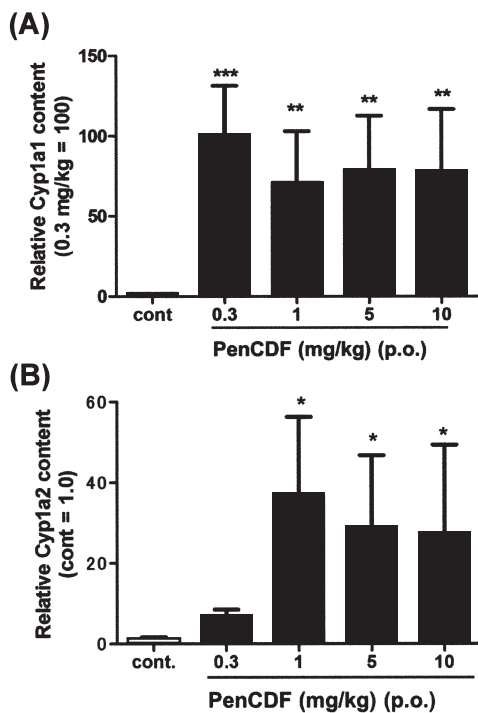


Fig. 1 Effect of 2,3,4,7,8-PenCDF on the Cyp1a1 and 1a2 level in the liver of C57BL/6J mice
Mice were given an oral dose of PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 or 10 mg/kg). Each value represents the mean \pm S.D. of 5 mice. Protein expression levels of Cyp1a1 and 1a2 in S9 of liver were determined by western blotting. Cyp1a1 (**A**) content represents the relative Cyp1a1 content in S9 of PenCDF 0.3 mg/kg group mice (=100). Cyp1a2 (**B**) content represents the relative Cyp1a2 content in S9 of control mice (= 1.0). Significantly different from control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

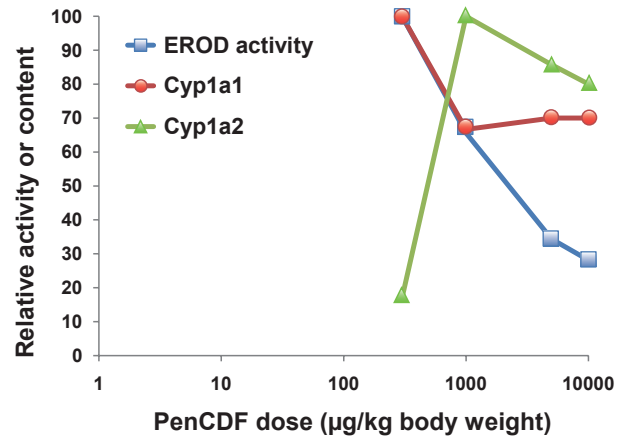


Fig. 2 Induction of EROD activity, Cyp1a1 and Cyp1a2 by PenCDF

EROD activity is shown as a percentage to that of 0.3 mg/kg PenCDF-treated group which exhibited the maximal value. Hepatic EROD activity (pmol/min/mg protein; mean \pm S.E.) in 0.3 mg/kg PenCDF group was 32.6 ± 5.6 . Similarly, the contents of Cyp1a1 and Cyp1a2 are expressed as the percentage to the maximal values in PenCDF (0.3 mg/kg) and PenCDF (1.0 mg/kg) groups, respectively. Data were taken from Fig. 3 of Yamada et al.¹⁶⁾ and Fig. 1.

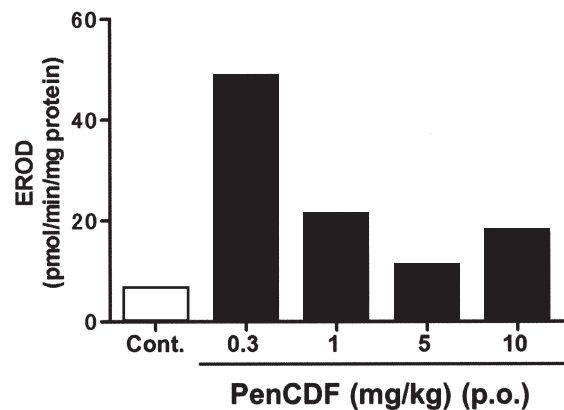


Fig. 3 Effect of 2,3,4,7,8-PenCDF on hepatic EROD activity of C57BL/6J mice
Mice were given an oral dose of PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 or 10 mg/kg). EROD activity in the pooled S9 fraction was used as the index of the induction of Cyp1a1. Each value represents the mean of triplicated assays. EROD activity in the S9 was measured under the conditions in which the final concentrations of NADPH and ethoxyresorufin were set at $130 \mu\text{M}$ and $4 \mu\text{M}$, respectively.

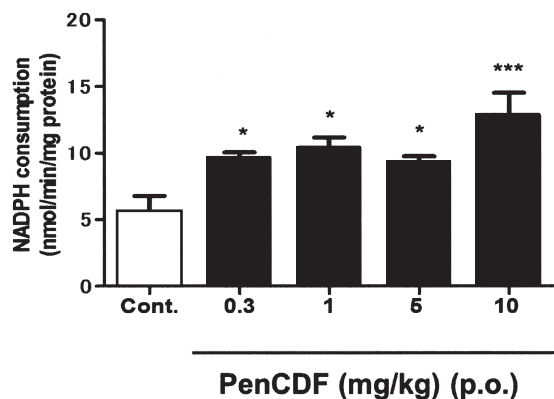


Fig. 4 Comparison of NADPH consumption in the hepatic S9 fraction of C57BL/6J mice treated with PenCDF. Mice were given an oral dose of PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 or 10 mg/kg). Total NADPH consumption is shown. NADPH consumption was determined by comparing the change of absorbance at 340 nm in the presence and absence of 175 μ M NADPH. Ethoxyresorfin (4 μ M) was used as a substrate. Each value represents the mean \pm S. E. of 5 mice. Significantly different from control (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

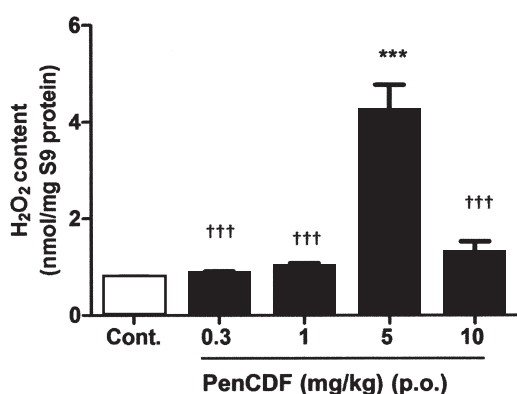


Fig. 5 Effect of 2,3,4,7,8-PenCDF on H₂O₂ production in C57BL/6J mice. Mice were orally administered with PenCDF once at a dose indicated. After 7 days, liver was removed and homogenized in 1.15% KCl. The S9 fraction was stored at -80°C until use. The sample was thawed and an aliquot containing (200 μ g protein) was subjected to the assay at room temperature. The content of hydrogen peroxide was determined by a commercial kit (Pierce Quantitative Peroxide Assay : Aqueous compatible formation). Each value represents the mean \pm S.E. of 5 mice. Significantly different from control (***, $p < 0.001$). Significantly different from PenCDF 5.0 mg/kg group (†††, $p < 0.001$).

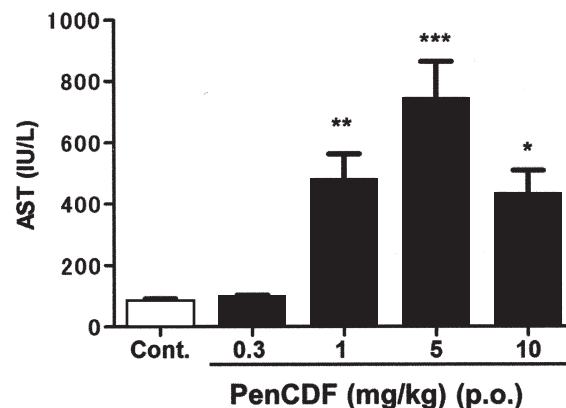


Fig. 6 Effect of 2,3,4,7,8-PenCDF on AST activity in serum of C57BL/6J mice. Mice were given an oral dose of PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 or 10 mg/kg). AST activity in serum was used as the index of liver injury. Each value represents the mean \pm S.E. of 5 mice. Significantly different from control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

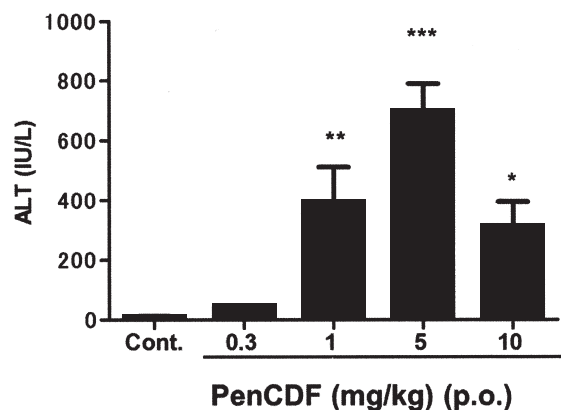


Fig. 7 Effect of 2,3,4,7,8-PenCDF on ALT activity in serum of C57BL/6J mice. Mice were given an oral dose of PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 or 10 mg/kg). ALT activity in serum was used as the index of liver injury. Each value represents the mean \pm S.E. of 5 mice. Significantly different from control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

考 察

本研究では、C57BL/6Jc1系雄性マウスにおいて、経口投与した PenCDF が酸化ストレスを惹起する機構を明らかにするために、EROD 活性と NADPH 消費量の関係を調べるとともに、PenCDF 処理マウスの肝組織に残存する過酸化水素を定量した。肝ホモジネートより得た S9 分画は、約 2 年間に亘り超低温フリーザーに保存していたが、PenCDF 5 mg/kg 群においては、組織中に著しく高いレベルの過酸化水素を検出することができた (Fig. 5)。この群においては、Cyplal 含量および NADPH 消費量は、PenCDF 1 mg/kg 群と同程度であるにもかかわらず、EROD 活性は不相応に低かった (Fig. 3)。このことから、ethoxyresorufin の酸化以外に NADPH が消費されたことが示唆され、P450 反応の uncoupling が起こり、過酸化水素が大量に生成したことが示唆された。この群においては、脂質過酸化の二次生成物質の malondialdehyde を指標とする TBARS も著しく上昇することを著者らの先行研究で示しており¹⁶⁾、この仮説の妥当性を支持している。一方、PenCDF 5 mg/kg 群に比べれば低いものの、PenCDF 10 mg/kg 群にも、TBARS 値は有意に高かった¹⁶⁾。PenCDF 10 mg/kg と 5 mg/kg の二群間では、Cyplal, 1a2 のレベルはほとんど同じであるが (Fig. 1)、PenCDF 5 mg/kg の方にむしろ強い wasting syndrome が惹起されている¹⁶⁾。これは、TBARS の値とも相関している¹⁶⁾。従って、これら二群間の wasting syndrome の強さの違いには、酸化ストレスの違いの寄与が大きいと考えるのは妥当である。

まず、PenCDF が 0.3 mg/kg では酸化ストレスはわずかであるのに、なぜ 5 mg/kg になってから著しく亢進するのかについて考察する。これは、Cypl2 が PenCDF に対して高い親和性を示すことを基に説明できる。Fig. 2 に示す通り、PenCDF 1 mg/kg と 5 mg/kg では、Cyplal および 1a2 の含量がほぼ同じである。しかし、EROD 活性は PenCDF 5 mg/kg で半分以下になっている。これは、PenCDF 1 mg/kg では、まだ Cypl2 と PenCDF の結合が飽和していないためと考えることができる。既報によれば、Cypl2 は、electron sink と考えられており、Cyplal から

の電子を受取り消去することができる²⁸⁾。これを基に考えると、PenCDF 1 mg/kg では、Cypl2 が Cyplal から電子を受け取って、それが過酸化水素生成に使われるのを防いでいる可能性がある。一方、PenCDF の用量が高くなった 5 mg/kg では、Cypl2 が PenCDF で飽和したため、Cyplal から電子を受取り消去する能力を失ってしまったと考えることができる。低用量 TCDD で処理したラットの肝臓ミクロゾーム中の CYP1A1 は、in vitro で過剰量の TCDD を添加したとき過酸化水素を生成することが分かっている¹⁸⁾。従って、Cypl2 が PenCDF で飽和した PenCDF 5 mg/kg 群の S9 においても、これと類似した状況が生じたものと考えられる。PenCDF 5 mg/kg と 10 mg/kg の違いについては、もう一つ別の機構を考える必要がある。それは、Cypl2 との結合が飽和した後の余分な PenCDF の運命である。上述の機構のように、過剰な PenCDF が Cyplal とともに過酸化水素生成に関与することが示唆されるものの、生成した過酸化水素によって、Cyplal が一部不活性化されてしまった可能性である。3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB77) を NADPH 存在下に CYP1A1 と長時間反応させると、CYP1A1 を不活性化することが知られている²⁹⁾。PCB77 は CYP1A1 の uncoupling を引き起こすと同時に、生成した過酸化水素が CYP1A1 を不可逆的に不活性化して P420 にすることが示唆されている。本研究の PenCDF 10 mg/kg 処理群でも同様のことが起こっているのかも知れない。本研究では western blotting により Cyplal と 1a2 を別々に定量しており、PenCDF 5 mg/kg 群と 10 mg/kg 群ではいずれも同程度であった。今後、S9 中の P450 含量を測定して比較することや、Cyplal や 1a2 の精製酵素を用いた再構成系、あるいは発現系に PenCDF を添加するなどして検証する必要がある。これらは、現時点では、多くの推論を含むが、PenCDF により引き起こされる酸化ストレスと wasting syndrome の関係を説明出来る可能性がある。

ダイオキシン類による酸化ストレスの惹起には、これ以外のメカニズムも想定される。その一つには、ミトコンドリアの Cyplbl がある³⁰⁾。本研究では、EROD 活性、NADPH 消費量、また過

酸化水素の測定には S9 分画を用いた。S9 はミトコンドリアの混入を避けて調製しているものの、TBARS の測定を行ったのはホモジネートに対してでありミトコンドリア分画も含んでいる。また、ミトコンドリアで産生された過酸化水素が細胞質に放出されれば、S9 分画に含まれていると思われる。本研究で S9 分画に見出された過酸化水素レベルの上昇の一部が、ミトコンドリアの Cypl1b1 に由来する可能性は否定できない。

また、PenCDF 処理マウスの肝臓 S9 では NADPH 消費量が増加したが、その増加倍率は、EROD 活性の 1,000 倍以上であった。仮に、それがそのまま P450 反応の uncoupling 反応に使われたのであれば、PenCDF 0.3 mg/kg 群においても著しい TBARS の上昇が認められたり、組織中に過酸化水素の顕著な残存があつてしかるべきである。従つて、S9 を使つた場合に、P450 反応以外にも NADPH が消費されていることも考慮する必要がある。PenCDF は、サイトゾル酵素である NADPH:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) を誘導することが知られている³¹⁾。また、TCDD が、過酸化水素の生成にも関与する NADPH-oxidase のサブユニットの一つを誘導することが報告されている¹⁵⁾。Xanthine dehydrogenase は、SH 基の酸化修飾³²⁾あるいは、ミトコンドリアプロテアーゼによる部分加水分解³³⁾により xanthine oxidase となることが知られている。Xanthine oxidase も過酸化水素の生成に寄与するが、TCDD が xanthine oxidase を誘導することも知られている¹⁴⁾。但し、この反応には NADPH は必要ないが、反応後に NADH が生成する。さらに、ダイオキシン類は活性酸素消去系にも影響を及ぼすことが分かつており、Se-dependent GPx の反応にも NADPH が必要である。これは、ダイオキシン類で抑制されるので、NADPH 消費量は少なくなる方向に働く¹⁰⁾³⁴⁾。また、過酸化水素の分解に関与する catalase がダイオキシン類の一つである PCB126 で著しく抑制されることも、当教室の先行研究から示唆されている¹¹⁾。PenCDF 高用量曝露による過酸化水素の肝組織内蓄積に、これらの機構が複合的に関与している可能性は否めない。

結 論

油症原因物質 PenCDF による過酸化水素生成亢進、酸化ストレス惹起とそれによる肝障害の機構について検討した。

1. 経口投与した PenCDF が酸化ストレスを惹起する機構を明らかにするために、EROD 活性と NADPH 消費量の関係を調べるとともに、PenCDF 処理マウスの肝組織に残存する過酸化水素を定量した。PenCDF 5 mg/kg 経口単回投与マウスの肝臓組織由来 S9 分画において、高レベルの過酸化水素が検出された。
2. Cypl1a1 の誘導は、PenCDF 1.0 mg/kg までは EROD 活性と相関したが、それより高濃度では相関しなかった。また、Cypl1a2 の誘導は EROD 活性とは相関しなかった。
3. EROD 活性は、PenCDF 0.3 mg/kg にて最も活性が高かった。NADPH 消費量は、いずれの PenCDF 処理群でも有意に高く、EROD 活性の低い 5 mg/kg 群でも、活性の高い 0.3 mg/kg 群と大差なかった。
4. PenCDF 5 mg/kg 処理群では、EROD 活性は NADPH 消費量と見合つておらず、uncoupling による過酸化水素の生成が起こつたことが示唆された。

本研究では、PenCDF の Cypl1a2 への特異的な結合による毒性軽減、また、そのキャパシティーを超えた PenCDF 用量での Cypl1a1 の uncoupling が過酸化水素生成、酸化ストレス惹起の主たる原因であると推定している。この点の詳細を明らかにするためには、S9 からの直接の過酸化水素の生成に対する、Cypl1a1 阻害剤や、xanthine oxidase 阻害剤の影響等も更に検討していく必要がある。本研究の成績が、今後の油症患者の毒性軽減につながることを期待する。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)(課題番号:H24-食品-指定-014 および H27-食品-指定-017)によつた。

参 考 文 献

- 1) Masuda Y : Behavior and toxic effects of PCBs and PCDFs in Yusho patients for 35 years. *J. Dermatological Sci.* 1 : S11-S20, 2005.
- 2) Masuda Y, Schechter A and Papke O : Concentrations of PCBs, PCDFs and PCDDs in the blood of Yusho patients and their toxic equivalent contribution. *Chemosphere* 37 : 1773-1780, 1998.
- 3) Tanabe S, Kannan N, Wakimoto T, Tatsukawa R, Okamoto T and Masuda Y : Isomer-specific determination and toxic evaluation of potentially hazardous coplanar PCBs, dibenzofurans and dioxins in the tissues of "Yusho" PCB poisoning victim and in the casual oil. *Toxicol. Environ. Chem.* 24 : 215-231, 1989.
- 4) Poland A and Knutson JC : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22 : 517-554, 1982.
- 5) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ : Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140 : 173-179, 1995.
- 6) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M and Fujii-Kuriyama Y : Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2 : 645-654, 1997.
- 7) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 : 307-340, 1995.
- 8) Stohs SJ, Hassan MQ and Murray WJ : Lipid peroxidation as a possible cause of TCDD toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111 : 854-859, 1983.
- 9) Stohs SJ : Oxidative Stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Free Radic. Biol. Med.* 9 : 79-90, 1990.
- 10) Hori M, Kondo H, Ariyoshi N, Yamada H, Hiratsuka A, Watabe T and Oguri, K : Changes in the hepatic glutathione peroxidase redox system produced by coplanar polychlorinated biphenyls in Ah-responsive and -less-responsive strains of mice : mechanism and implications for toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3 : 267-275, 1997.
- 11) 岩崎優, 加藤晴敏, 有吉範高, 小栗一太 : コプラナー PCB によるモルモット肝ペルオキシソーム酵素活性の変化. *福岡医誌* 86 : 144-152, 1995.
- 12) Poulos TL and Raag R : Cytchrome P450_{cam} : crystallography, oxygen activation, and electron transfer. *FASEB J.* 6 : 674-679, 1992.
- 13) Slezak BP, Diliberto JJ and Birnbaum LS : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated oxidative stress in CYP1A2 knockout (CYP1A2^{-/-}) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264 : 376-379, 1999.
- 14) Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M and Fujii-Kuriyama Y : Aryl hydrocarbon receptor (AhR) -mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281 : 1093-1099, 2001.
- 15) Wada T, Sunaga H, Ohkawara R and Shimba S : Aryl hydrocarbon receptor modulates NADPH oxidase activity via direct transcriptional regulation of p40^{phox} expression. *Mol. Pharmacol.* 83 : 1133-1140, 2013.
- 16) 山田健一, 石井祐次, 武田知起, 黒木廣明, 三苦千景, 内博史, 古江増隆, 山田英之 : Cynaropicrin が油症原因物質 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran による wasting syndrome および酸化ストレスに及ぼす影響. *福岡医誌* 106 : 169-175, 2015.
- 17) Stohs SJ, Hassan MQ and Murray WJ : Effects of BHA, d-alpha-tocopherol and retinol acetate on TCDD-mediated changes in lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and survival. *Xenobiotica* 14 : 533-537, 1984.
- 18) Shertzer HG, Clay CD, Genter MB, Chames MC, Schneider SN, Oakley GG, Nebert DW and Dalton TP : Uncoupling-mediated generation of reactive oxygen by halogenated aromatic hydrocarbons in mouse liver microsomes. *Free Radic. Biol. Med.* 36 : 618-631, 2004.
- 19) Kuroki J, Koga N and Yoshimura H : High affinity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran to cytochrome P-450 in the hepatic microsome of rats. *Chemosphere* 15 : 731-738, 1986.
- 20) 吉村英敏 : 生を衛る化学. *薬学雑誌* 111 : 737-755, 1991.
- 21) Kuroki H, Haraguchi K and Masuda Y : Synthesis of polychlorinated dibenzofuran isomers and their gas chromatographic profiles. *Chemosphere* 13 : 561-573, 1984.
- 22) Burke MD and Mayer RT : Inherent specificities of purified cytochromes P-450 and P-448

- toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. *Drug Metab. Dispos.* 3 : 245-253, 1975.
- 23) De Matteis F, Ballou DP, Coon MJ, Estabrook RW and Haines DC : Peroxidase-like activity of uncoupled cytochrome P450 studies with bilirubin and toxicological implications of uncoupling. *Biochem. Pharmacol.* 84 : 374-382, 2012.
- 24) Horecker BL and Kornberg A : The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175 : 385-390, 1948.
- 25) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- 26) Towbin H, Staehelin T and Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350-4354, 1979.
- 27) Ishida C, Koga N, Hanioka N, Saeki HK and Yoshimura H : Metabolism in vitro of 3,4,3',4'- and 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and highly purified cytochrome P-450. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14 : 276-284, 1991.
- 28) Shertzer HG, Clay CD, Genter MB and Schneider SN : CYP1A2 protects against reactive oxygen production in mouse liver microsomes. *Free Radic. Biol. Med.* 36 : 605-617, 2004.
- 29) Schlezinger JJ, White RD and Stegeman JJ : Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl : production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As. *Mol. Pharmacol.* 56 : 588-597, 1999.
- 30) Bansal S, Leu AN, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Chowdhury AR, Anandatheerthavarada HK and Narayan G : Mitochondrial targeting of cytochrome P450 (CYP) 1B1 and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mitochondrial dysfunction. *J. Biol. Chem.* 289 : 9936-9951, 2014.
- 31) Yoshimura H, Yoshihara S, Koga N, Nagata K, Wada I, Kuroki J and Hokama Y : Inductive effect on hepatic enzymes and toxicity of congeners of PCBs and PCDFs. *Environ. Health Perspect.* 59 : 113-119, 1985.
- 32) Corte ED and Stirpe F : The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem. J.* 126 : 739-745, 1972.
- 33) Saksela M, Lapatto R and Raivio KO : Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease. *FEBS Lett.* 443 : 117-120, 1999.
- 34) 堀美穂, 有吉範高, 山田英之, 小栗一太 : Coplanar PCB の肝 glutathione peroxidase redox system に対する影響. *福岡医誌* 88 : 144-148, 1997.

(Received for publication March 15, 2017)

2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin が思春期ラットに及ぼす影響： ダイオキシン様急性毒性を指標とした解析

九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

人見 将也, 武田 知起, 山田 英之, 石井 祐次

The Effect of 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin on Pubertal Rats : An Analysis Focusing on the Dioxin-like Acute Toxicity

Masaya HITOMI, Tomoki TAKEDA, Hideyuki YAMADA and Yuji ISHII

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Abstract

It has long been believed that dioxins cause a number of acute toxicity such as body weight loss, hepatotoxicity and immunosuppression due to binding to the aryl hydrocarbon receptor (AHR). To propose provisions for these toxic effects, many researchers have challenged to identify the substances which are antagonistic to the AHR action. As the results, several compounds including polyphenols have been suggested to inhibit activation of AHR to ameliorate dioxin toxicity. However, none of them dramatically show protective effects on the living body. Therefore, developing revolutionary agents targeting the AHR remain to require for protecting our health from dioxin exposure. To address this issue, we newly synthesized 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD), the product which chlorine atoms of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) are replaced with fluorine atoms. Unlike with TCDD, a single oral administration of TFDD (1-1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) to male pubertal rats hardly altered the hepatic activity of cytochrome P450 1A1 which is induced by AHR activation both one and seven days after treatment. In accordance with this, the suppression of body weight gain, hepatomegaly and thymic atrophy were not observed by TFDD treatment. However, TFDD slightly increased the weights of the lung and spleen, while the heart and kidney weights were slightly decreased by the treatment. These results suggest that an oral administration of TFDD does not have any dioxin-like acute toxicity, although some of tissues are influenced by TFDD at the higher doses.

Key words : Aryl hydrocarbon receptor (AHR), Dioxin-like acute toxicity, Pubertal rat, 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD), 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

はじめに

カネミ油症の原因物質であるポリ塩化ジベンゾフランおよびポリ塩化ビフェニル類を含むダイオキシン類は、肝障害、免疫抑制、発癌プロモーションおよび消耗症など、生体に対して多数の毒性を惹起する¹⁾。事件発生から約50年が経過した現在も、未だに症状に苦しむ被害者は少なくない²⁾。また、ダイオキシン類は環境中への残留性

が高く、極めて高い生体蓄積性を示す化学物質である³⁾。このため、環境中に排出されたダイオキシン類の除去は困難であり、ヒトを含む生態系に対する慢性的な影響が危惧されている。これらのことから、ダイオキシン類曝露による健康被害の治療及び予防法の確立は、油症患者に限らず、未来を生きるヒトの健康を維持するために重要な課題である。

ダイオキシン類による多くの毒性発現には、細

Corresponding author : Yuji ISHII
Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan
E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp



Fig. 1 Structures of TCDD and TFDD.

胞質に存在する受容体型転写因子である芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AHR) が重要な役割を担うことが、AHR 欠損動物を用いた研究により明らかにされている^{4)~6)}。すなわち、AHR はダイオキシン類との結合によって活性化して核内へと移行し、cytochrome P450 (CYP) 1A1 等の標的遺伝子の転写調節領域に存在する xenobiotic responsive element への結合を通して、発現誘導を引き起こす。AHR の作用は、単に遺伝子の発現誘導を起こすにとどまらず、発現抑制を受ける遺伝子も多数存在し、様々な遺伝子の異常な発現状況をもたらす。変動遺伝子は数百種類にもおよび、これらが複合的に毒性に寄与すると考えられている^{7)~9)}。従って、ダイオキシン類への対策を考える上では、AHR 活性化とこれに基づく毒性に対して拮抗する物質を同定することが重要である。これまで我々は、食品成分に着目した取り組みを展開し、geranylgeranylacetone¹⁰⁾、curcumin¹¹⁾、resveratrol¹²⁾ および cynaropicrin¹³⁾ 等が生体内において AHR 拮抗作用を示し、毒性を軽減する可能性を見出してきた。しかし、その殆どがバイオアベイラビリティや AHR に対する親和性/特異性等に問題があり、満足できる効果を持つ物質の同定には至っていない。従って、根本的な問題解決のためには、新たな着眼点での取り組みが必要と考えられる。

ダイオキシン類に指定されている 29 種類の同族体・異性体は、塩素の数や置換位置によって毒性強度が大きく変化するが、これは AHR のリガンド結合部位への構造上の親和性に依存する¹⁴⁾¹⁵⁾。すなわち、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (Fig. 1) の分子サイズが、AHR の結合ポケットに最もフィットし強い毒性をもたらす。さらに、このサイズの適合性に加えて、置換基であるハロゲン原子が持つ電子親和力および電気陰性度等が AHR への親和性に寄与す

ると言う¹⁶⁾。そこで本研究では、これら TCDD の構造上の特徴に注目し、TCDD の塩素原子を全てフッ素原子に置換した 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD) (Fig. 1) を新たに合成した。フッ素原子は、塩素原子よりもサイズが小さいために AHR への結合ポケットには寸法が不足するが、塩素よりも高い電気陰性度を有すると共に水素結合能を持つ。従って、TFDD はこれらの分子間相互作用の違いによって、サイズ不足を克服することで、高い親和性が担保される可能性が考えられる。一方、TFDD は、マウス肝において代謝されやすいことが示されている¹⁷⁾。すなわち、TFDD が AHR への結合能を維持し、ダイオキシン類よりも易代謝性であるならば、より低毒性かつ選択的なダイオキシン拮抗剤として有望であると考えられる。しかし、TFDD 自身の AHR 結合持続力や活性化能力ならびに生体影響に関しては、全く情報が得られていない。本研究では、ダイオキシン毒性に対する新規拮抗剤の創製を目指した取り組みとして、TFDD 自身がダイオキシン様の急性毒性を惹起するか否かを検証した。具体的には、AHR 活性化によって誘導される CYP1A1 の酵素活性、ならびにダイオキシンによって生じる体重増加抑制、肝肥大および胸腺萎縮を指標とした。

実験方法

1. 実験材料

TFDD (purity: > 99%) は、林純薬工業株式会社に委託して合成した。Corn oil は、味の素株式会社の市販品を使用した。その他の試薬は、実験に適した純度のものを使用した。TFDD は、100 μ g TFDD/mL acetone 溶液として使用まで -30 $^{\circ}$ C に保存した。投与時に必要量 corn oil と混和したのち、窒素ガス噴射にて acetone を留去した。

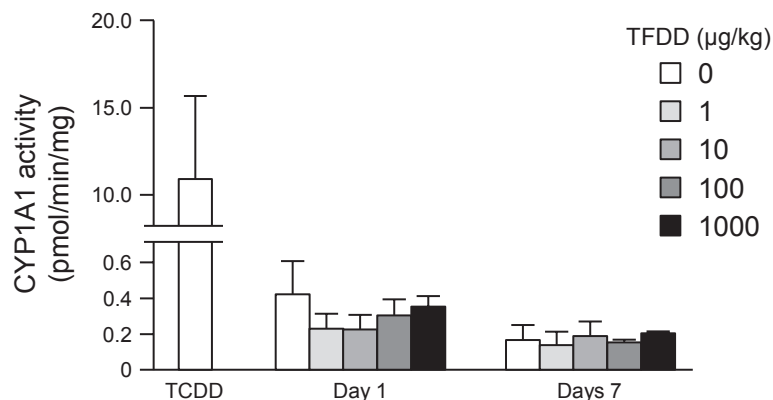


Fig. 2 Effect of TFDD and TCDD on the activity of hepatic CYP1A1 of male pubertal rats. Male pubertal rats at 5 weeks old were orally treated with TFDD (1-1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or TCDD (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$), and their livers were collected 1 day or 7 days after the treatment. The hepatic activity of CYP1A1 was analyzed by an ethoxyresorufin-*O*-deethylase assay. Bars are the means \pm S.E.M. of 3 rats.

2. 動物実験

全ての動物実験は、九州大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。Wistar系雄性ラット（4週齢）は、九動株式会社（佐賀県鳥栖市）より購入した。1週間馴化させたのち、上記に従って調製したTFDD（1, 10, 100 および 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/2$ mL corn oil）を単回経口投与した。コントロール群には、corn oilのみを同様に投与した。投与前日から一日一回体重を測定し、投与1日後（Day 1）および7日後（Days 7）に解剖を行った。肝臓、腎臓、脾臓、生殖腺、心臓、肺、胸腺および脳を採取し、臓器重量を計測したのち、使用まで -80°C に保存した。

3. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase 活性

採取した肝臓は、1.0 M Tris-HCl (pH 7.4) を用いてホモジナイズしたのち、 4°C 、 $9,000\times g$ で20分間遠心分離した。得られた上清の総タンパク質濃度は、Lowry法¹⁸⁾にて測定した。Burkeらの方法¹⁹⁾に従って、肝臓におけるCYP1A1の酵素活性を測定した。

結 果

まず、TFDDが生体内においてAHR活性化能を有するか否かを検討した。5週齢の雄性ラットにTFDDを1~1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回経口投与したのち、投与1日後（Day 1）および7日後（Days 7）に肝臓を摘出し、AHR活性化によって

高感度に誘導される遺伝子であるCYP1A1の酵素活性を測定した。検討の結果、本研究で用いた全ての用量において、CYP1A1の活性変化は認められなかった（Fig. 2）。

そこで次に、TCDDの急性毒性として知られる体重増加抑制、肝肥大ならびに胸腺萎縮を指標として、同様のTFDD処理がダイオキシン様の毒性を示すか否かを検討した。その結果、Day 1およびDays 7のどちらにおいても、TFDD投与によっては体重増加ならびに、肝臓および胸腺重量に影響は観察されなかった（Fig. 3）。

本検討では、TFDDによる生体影響をより広範囲に検討するため、肝臓および胸腺以外の臓器重量も測定した。その結果、Day 1においてはわずかながら有意な腎臓および心臓の萎縮と肺の肥大化が確認された（Fig. 4A）。また、Day 1では1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のみで認められていた心臓の萎縮が、Days 7では10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも認められるようになった。加えて、わずかながら有意な脾臓の肥大が惹起された（Fig. 4B）。

考 察

本研究では、ラットへのTFDD単回経口投与が、ダイオキシンと同様にAHRを活性化し生体毒性を示すか否かを検討した。種々の検討の結果、ダイオキシンによって起こるCYP1A1活性の誘導、体重増加抑制、肝肥大ならびに胸腺萎縮のいずれも、TFDD投与によっては全く認められな

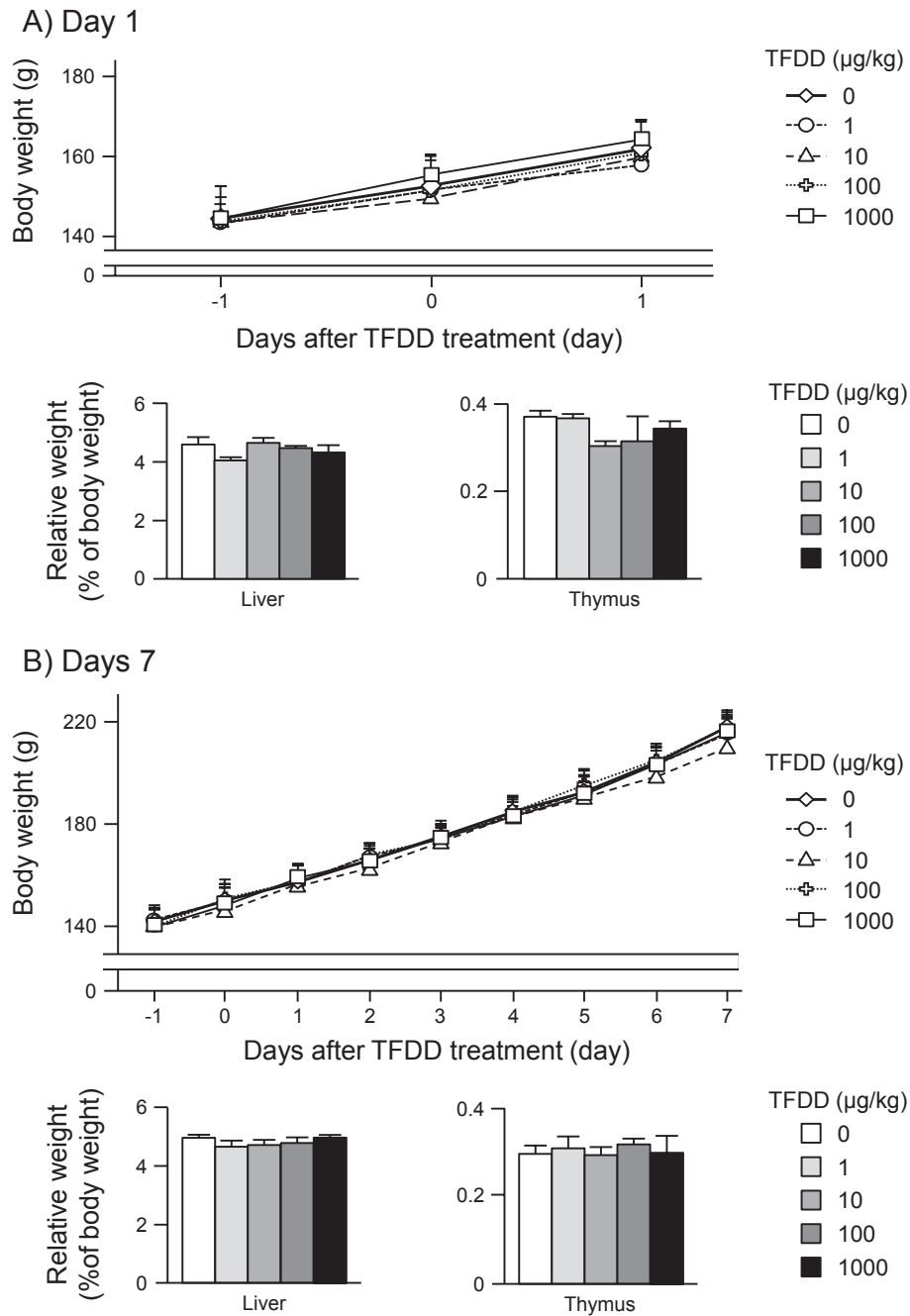


Fig. 3 Little effect on body weight gain and weights of liver and thymus of male pubertal rats one day (A) and seven days (B) after TFDD treatment. Male pubertal rats at 5 weeks old were treated with TFDD (1-1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or vehicle alone, and their livers and thymus were weighed 1 day or 7 days after the treatment. Each plot/bar represents the mean \pm S.E.M. of 3 rats.

かった。本検討では、組織中の TFDD レベルの測定には至っておらず、投与した TFDD が効果を発揮するレベルに達していなかった可能性は否定できない。事実、マウス腹腔内に TFDD を投与した場合、24 時間後には肝臓中レベルが投与量の 1~2% 程度にまで減少することが報告されている²⁰⁾。しかし、TCDD による体重増加抑制や

CYP1A1 発現誘導の 50% 効果量は 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 前後であり²¹⁾、TFDD はこれの 100 倍高用量を与えたとしても殆ど影響を示さなかった。これらを合わせて考えると、ラットへの TFDD の単回経口投与ではダイオキシン様の急性毒性作用を有さないか、あるいは非常に弱いことが強く示唆される。今後、投与後の組織中の TFDD 量を測定すると

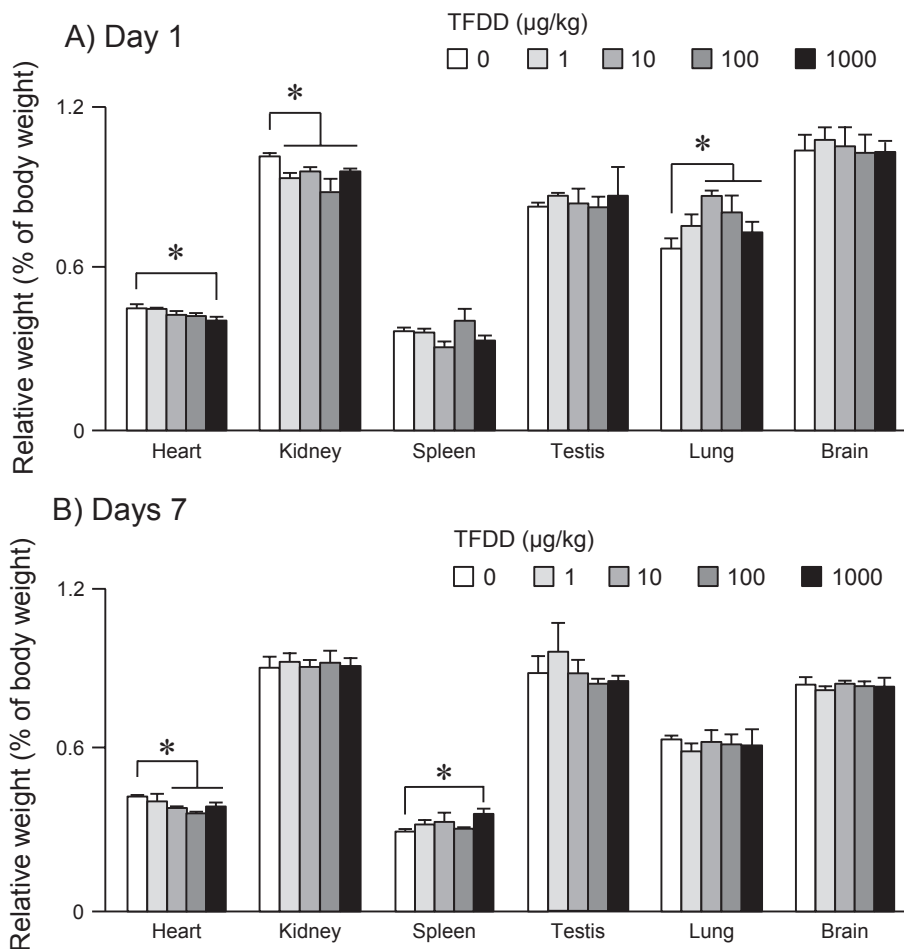


Fig. 4 Effect on the organ weights of male pubertal rats one day (A) and seven days (B) after TFDD treatment. Bars are the means \pm S.E.M. of 3 rats. Significantly different between the pair indicated: * $p < 0.05$.

共に、ダイオキシンとの併用実験を行い、AHR活性化とこれに基づく毒性に対する拮抗作用を明らかにしていく必要がある。

本研究では、TFDDが腎臓、心臓、肺および脾臓において軽度な萎縮や肥大化を惹起することが確認された。中でも心臓の萎縮は、投与1日後では、最高用量のみであったが、投与7日後では、より低用量でも観察され、影響が継続したことから、TFDDは心臓に対して影響を与える可能性が浮上した。これに関連して、フッ素化炭化水素は、心臓の機能を障害することが報告されており²²⁾²³⁾、フッ素化合物の中には心臓において酸化的ストレスを亢進させ、ミトコンドリア機能障害を惹起するものもあると言う²⁴⁾。従って、TFDDも同様の機構によって心臓に影響を及ぼす可能性は否定できない。ダイオキシン毒性に対する新規拮抗剤としてのTFDDの有用性を担保するため、

引き続きこれらの組織への影響を明確にしていくことが重要である。

結 論

TFDDの単回経口投与は、1 mg/kgまでの用量ではAHR活性化作用を示す可能性は低く、典型的なダイオキシン様急性毒性を示さないことが確認された。一方、心臓等のいくつかの臓器重量に変化をもたらしたため、引き続きこれらの影響を詳細に検討する必要があると考えられた。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)(課題番号:H24-食品-指定-014およびH27-食品-指定-017)によった。

参 考 文 献

- 1) Poland A and Knutson JC : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22 : 517-554, 1982.
- 2) Mitoma C, Uchi H, Tsukimori K, Yamada H, Akahane M, Imamura T, Utani A and Furue M : Yusho and its latest findings-A review in studies conducted by the Yusho Group. *Environ. Int.* 82 : 41-48, 2015.
- 3) Van den Berg M, De Jongh J, Poiger H and Olson JR : The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 24 : 1-74, 1994.
- 4) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ : Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140 : 173-179, 1996.
- 5) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M and Fujii-Kuriyama Y : Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2 : 645-654, 1997.
- 6) Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y and Ishikawa T : Benzo [a] pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 : 779-782, 2000.
- 7) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 : 307-340, 1995.
- 8) Mimura J and Fujii-Kuriyama Y : Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* 1619 : 263-268, 2003.
- 9) Whitlock JP Jr : Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 : 103-125, 1999.
- 10) Ishida T, Oshimo T, Nishimura A, Mutoh J, Ishii Y, Koga N, Yamada H, Hashiguchi I, Akamine A and Oguri K : Reduction of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mice using an antiulcer drug, geranylgeranylacetone. *Biol. Pharm. Bull.* 27 : 1397-1402, 2004.
- 11) Ishida T, Taketoh J, Nakatsune E, Kan-o S, Naito E, Takeda S, Mutoh J, Ishii Y and Yamada H : Curcumin anticipates the suppressed body weight gain 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mice. *J. Health Sci.* 50 : 474-482, 2005.
- 12) Ishida T, Takeda T, Koga T, Yahata M, Ike A, Kuramoto C, Taketoh J, Hashiguchi I, Akamine A, Ishii Y and Yamada H : Attenuation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity by resveratrol : a comparative study with different routes of administration. *Biol. Pharm. Bull.* 32 : 876-881, 2009.
- 13) Yamada K, Ishii Y, Takeda T, Kuroki H, Mitoma C, Uchi H, Furue M and Yamada H : Effect of cynaropicrin on 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran-induced wasting syndrome and oxidative stress. *Fukuoka Igaku Zasshi* 106 : 169-175, 2015.
- 14) Bandiera S, Safe S and Okey AB : Binding of polychlorinated biphenyls classified as either phenobarbitone-, 3-methylcholanthrene- or mixed-type inducers to cytosolic Ah receptor. *Chem. Biol. Interact.* 39 : 259-277, 1982.
- 15) Mason G, Sawyer T, Keys B, Bandiera S, Romkes M, Piskorska-Pliszczynska J, Zmudzka B and Safe S : Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) : correlation between in vivo and in vitro structure-activity relationships. *Toxicology.* 37 : 1-12, 1985.
- 16) Kafafi SA, Said HK, Mahmoud MI and Afeefy HY : The electronic and thermodynamic aspects of Ah receptor binding. A new structure-activity model : I. The polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Carcinogenesis* 13 : 1599-1605, 1992.
- 17) Schmitz HJ, Weber R, Hagenmaier A, Hagenmaier H, Poellinger L and Schrenk D : 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin : a potent agonist of the murine dioxin receptor. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3 : 105-113, 1997.
- 18) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 19) Burke MD and Mayer RT : Inherent specificities of purified cytochromes P-450 and P-448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. *Drug Metab. Dispos.* 3 : 245-253, 1975.
- 20) Weber R, Schrenk D, Schmitz HJ, Hagenmaier A and Hagenmaier H : Polyfluorinated dibenzodioxins and dibenzofurans--synthesis, analysis, formation and toxicology. *Chemosphere* 30 : 629-639, 1995.

- 21) Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M and Yamada H : 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran is far less potent than 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in disrupting the pituitary-gonad axis of the rat fetus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 281 : 48-57, 2014.
- 22) Rusch GM, Coombs D and Hardy C : The acute, genetic, developmental, and inhalation toxicology of 1,1,1,3,3-pentafluoropropane (HFC 245fa). *Toxicol. Sci.* 52 : 289-301, 1999.
- 23) Uttamsingh V, Iyer RA, Baggs RB and Anders MW : Fate and toxicity of 2-(fluoromethoxy)-1,1,3,3,3-pentafluoro-1-propene (compound A)-derived mercapturates in male, Fischer 344 rats. *Anesthesiology* 89 : 1174-1183, 1998.
- 24) Miltonprabu S and Thangapandiyar S : Epigallocatechin gallate potentially attenuates fluoride induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 29 : 321-335, 2015.

(Received for publication March 15, 2017)

ベンゾピレンの末梢神経および脊髄感覚系シナプス伝達に 及ぼす作用に関する研究

¹⁾熊本保健科学大学 リハビリテーション学科

²⁾直方中村病院

申 敏 哲¹⁾, 吉 村 恵²⁾

Effects of Benzo [a] pyrene on Conduction Velocity of the Rat Dorsal Root and Synaptic Transmission in Substantia Gelatinosa (SG) Neurons of the Rat Spinal Dorsal Horn

Min-Chul SHIN¹⁾ and Megumu YOSHIMURA²⁾

¹⁾*Kumamoto Health Science University*

²⁾*Nogatanakamura Hospital*

Abstract

In the present study, we analyzed the effects of benzo[a]pyrene on conduction velocity (CV) of action potentials (APs) generated by electrical stimuli applied to the dorsal root in acutely isolated rat dorsal root ganglion (DRG) preparations using intracellular recordings. We also measured the effects of benzo [a] pyrene on spontaneous excitatory and inhibitory synaptic responses (sEPSC and sIPSC) and excitatory synaptic responses evoked by dorsal root stimuli in substantia gelatinosa (SG) neurons of the spinal dorsal horn, which receive inputs predominantly from A δ and C afferent fibers, using patch-clamp recordings. In the present results, benzo [a] pyrene did not affect on resting membrane potentials of A β , A δ and C neurons. In addition, benzo [a] pyrene did not exhibit any effect on conduction velocities of A δ and C fibers, but that of A β fiber was significantly decreased. The amplitude and frequency of both sEPSC and sIPSC in SG neurons of the spinal dorsal horn were not affected. In addition, the synaptic responses elicited by stimulation of A β , A δ and C afferents were not changed by benzo [a] pyrene. From the present results, benzo [a] pyrene causes a change in the conduction velocity of A β but not A δ and C afferent fibers, suggesting that this change causes paresthesia, such as numbness and loss of sensation. However, benzo [a] pyrene does not affect the synaptic transmission in SG of the spinal dorsal horn.

Key words : benzo [a] pyrene, nerve conduction velocity, synaptic response, dorsal root ganglion (DRG), substantia gelatinosa (SG) neuron

はじめに

1968年カネミ油症事件発生後40年以上経過し、初期に認められた激しい症状は消退傾向にあるが、現在でも瘡瘡様皮疹などの皮膚症状、咳嗽や喀痰過多などの呼吸器症状、しびれや頭重などの神経

症状、全身倦怠感などの全身症状など多彩な症状が残存している。油症の原因となったカネミオイルには Polychlorinated biphenyls (PCB), Polychlorinated quarterphenyls (PCQ) および Polychlorinated dibenzofirans (PCDF) を含む dioxin 類が混在していたことが明らかにされている¹⁾。

Corresponding author : Min-Chul Shin

Laboratory of Neuroscience, Kumamoto Health Science University, Izumimachi 325 Kumamoto, Japan 861-5533
TEL : + 81-96-275-2111 FAX : + 81-96-245-2175 E-mail : karosu94@kumamoto-hsu.ac.jp

Dioxin 類化合物による複合中毒であるカネミ油症患者では、約 6 割に自覚的感覚障害が存在するが末梢神経伝導速度検査や神経学的診察による客観的な検査では末梢神経障害を示すものは 2 割程度であり、自覚的な症状と他覚的なデータには乖離が見られる^{2)~4)}。その原因として末梢神経伝導検査やベッドサイドにおける末梢神経検査では明らかな変化として捉えることが出来ない小さな変化が自覚症状として表れている可能性が否定出来ない。多くの患者が訴える手足のしびれ感や感覚鈍麻の発生、自律神経失調症などの末梢神経障害や中枢神経障害などの発生機序については未だ明らかではないが、その原因の一つとして求心性末梢感覚神経の異常が考えられた。そこで今回の研究では、カネミ油症の発生原因の一つであるベンゾピレンを経口投与して 7 日後のモデルラットを用い、後根付き後根神経節標本作製し、神経節細胞から細胞内記録を行い、末梢神経の静止膜電位や伝導速度等を正常ラットのそれらと比較検討した。また、脊髄後角におけるシナプス応答の可塑的な変化について検討するため、脊髄スライスに後根を付した標本を用いて、膠様質の細胞から自発性興奮性後シナプス電流 (sEPSC)、自発性抑制性後シナプス電流 (sIPSC)、および第一次感覚神経誘起 EPSC を測定してベンゾピレンの感覚神経系に対する作用を検討した。

実 験 方 法

1) 実験動物

4~8 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを用いた。ラットは市販の飼料および水を自由に摂取させ、動物舎の照明は 12 時間ごとに明暗のコントロールし、室温と湿度は 22.0℃と 55 ± 5% の条件下で飼育した。1 週間の適応期間の後、正常ラット群では Corn oil を、ベンゾピレン群ではベンゾピレン 0.3 mg/kg, 30 mg/kg を 1 回のみ、経口投与器を用いて 200 μl を胃に直接投与した。

(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 14 - 016) を得て行った。全身麻酔下にラットの後根神経節を取り出し、直ちに過量のウレタンを腹腔内に追加投与した後、心臓・大血管を切開して失血死させたため痛みなどの侵襲は殆ど無い。

2) 後根神経節標本の作製と静止膜電位・活動電位記録

Corn oil 又はベンゾピレンをそれぞれ経口投与し、7 日後にウレタン (腹腔内投与: 1.2~1.5 g/kg) 麻酔下でラットから後根神経節に後根神経を付した標本作製した。後根神経節を覆う結合組織を注意深く除去し、記録用チェンバーに設置したシルガードに微細なピンで固定した。後根を刺激用の吸引電極に設置した後、記録用チェンバーを加温した Krebs 液 (36 ± 1℃) で持続的に灌流した。微小ガラス電極を用いて神経節細胞から細胞内記録を行い、静止膜電位や後根刺激によって誘起された活動電位の振幅と伝導速度を調べ、正常ラットから得られたものと比較検討した (Fig. 1)。神経節細胞は Aβ, Aγ および C ニューロンを含むため、各々のニューロンから記録を行い正常ニューロンとの相違を観察した。細胞内記録用電極は外径 1.5 mm, 内径 0.86 mm のガラス管 (Model BF150-86-10; Sutter Instrument) をパッチ電極作成機 (Model P-97; Sutter Instrument, Novato, California) にて作製した。使用した Krebs 液の組成 (mM) は、NaCl 117, KCl 3.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, glucose 11 と NaHCO₃ 25 からなり、95% O₂ - 5% CO₂ ガスで飽和した。細胞内液は 4M potassium acetate を使用した。すべての実験は 36 ± 1℃で行った。活動電位 (AP) は、Axoclamp2B (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いてブリッジモードで増幅した。そして、A/D コンバータ (Digidata 1440A; Axon Instruments, Foster City, CA) によってデジタル化し、PCLAMP10 ソフトウェア (Axon Instruments/Molecular Devices) により解析した。ニューロンから記録したデータの中で -50 mV 未満の静止膜電位と振幅が 60 mV より小さい AP は、本研究からは除外した。逆行性刺激 (持続時間 0.1 ms) は吸引電極を用いて行った。刺激強度は、デジタル出力アイソレータ (SS-202J, 日本光電, 東京, 日本) でモニターした。伝導速度は AP の潜時と後根の長さから算出した。

3) 脊髄スライス標本の作製と後根刺激誘起シナプス応答記録法

脊髄スライスの作製: 成熟 SD 系雄性ラット

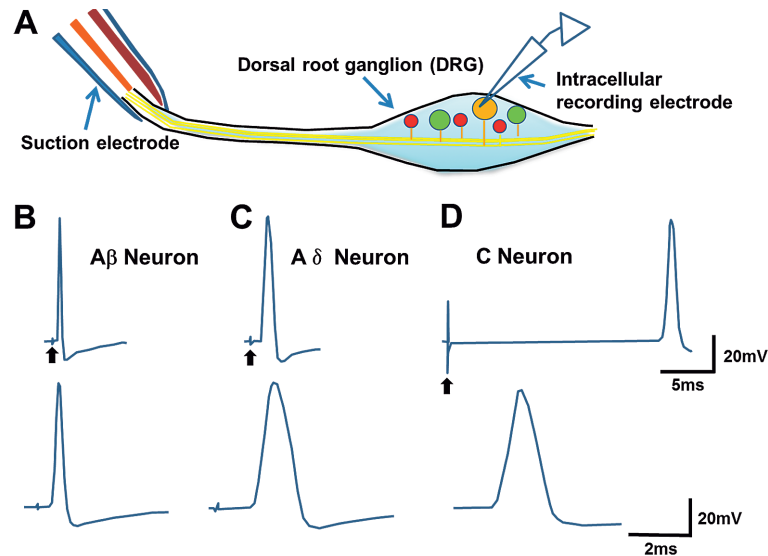


Fig. 1 Three types of DRG neurons classified by conduction velocity and stimulus intensity

A. Schematic representation of the intracellular recording. **B.** Typical traces of action potentials elicited in $A\beta$ type neurons (B). **C.** Typical traces of action potentials elicited in $A\delta$ type neurons. **D.** Typical traces of action potentials elicited in C type neurons.

(6~8 週齢) をウレタン (腹腔内投与: 1.2~1.5 g/kg) で深麻酔後, 腰仙部の椎弓切除を行った. 約 1.5~2.0 cm の長さで脊髄を摘出し, 冷却した酸素飽和クレブス液 (1~3°C) に入れた. 手術後直ちにラットに過量のウレタンを腹腔内に追加投与し, 心臓・大血管を切開して出血死させた. 実体顕微鏡下で, 硬膜やクモ膜, 軟膜を除去した後に, 寒天ブロックに設けた溝に置き, マイクロスライサーを用いて厚さ約 600 μm の横断スライスを作製した. 後根を付した標本を得る場合には, 一側の L5 の後根を残し, 他の前根や後根を全て切除し, また温存した後根の周囲を除きクモ膜と軟膜を除去した後に, 厚さ約 650 μm の横断スライスを作製した. このスライス標本を防振台上に固定した記録用チャンパー内のナイロンメッシュの上に置き, EM グリッドで軽く固定した後, 約 36°C に加温して酸素負荷したクレブス液で灌流 (15~20 ml/分) した. 下から脊髄スライスに透過光を当てると, 実体顕微鏡下において脊髄後角の膠様質は半透明なバンドとして容易に視認可能であった. この膠様質ニューロンにブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用して膜電流を記録した. パッチ電極内液の組成 (mM) について, 興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録する

際には K-gluconate 135, KCl 5, CaCl_2 0.5, MgCl_2 2, EGTA 5, HEPES 5, Mg-ATP 5 (pH = 7.2) を, 抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録する際には Cs-sulfate 110, CaCl_2 0.5, MgCl_2 2, EGTA 5, HEPES 5, TEA 5, Mg-ATP 5 (pH = 7.2) を用いて行った. EPSC は -70 mV (Cl⁻チャンネル電流の逆転電位近く) の保持膜電位で IPSC が記録されない条件下で行った. 一方, IPSC は 0 mV (EPSC の逆転電位近く) において EPSC が記録されない条件下で行った. 後根刺激誘起の EPSC を記録する際には, 吸引電極を用いてアイソレーターを介し刺激装置から持続時間 0.1 ms の矩形波の電気刺激を与えた. 局所刺激による IPSC を記録する時には, EPSC のブロッカーである CNQX (10 μM) 存在下に記録電極の近く (150 μm 以内) に刺激電極を留置して電気刺激を行った. これらの刺激は特別の場合を除き 0.2 Hz の頻度で行った. 刺激電極は手動式マイクロマニピレーターで目的とする位置に固定した (Fig. 2).

4) 統計解析

データは, 平均 \pm SEM として示した. グループ間の有意性は一元配置分散分析 (ANOVA) を

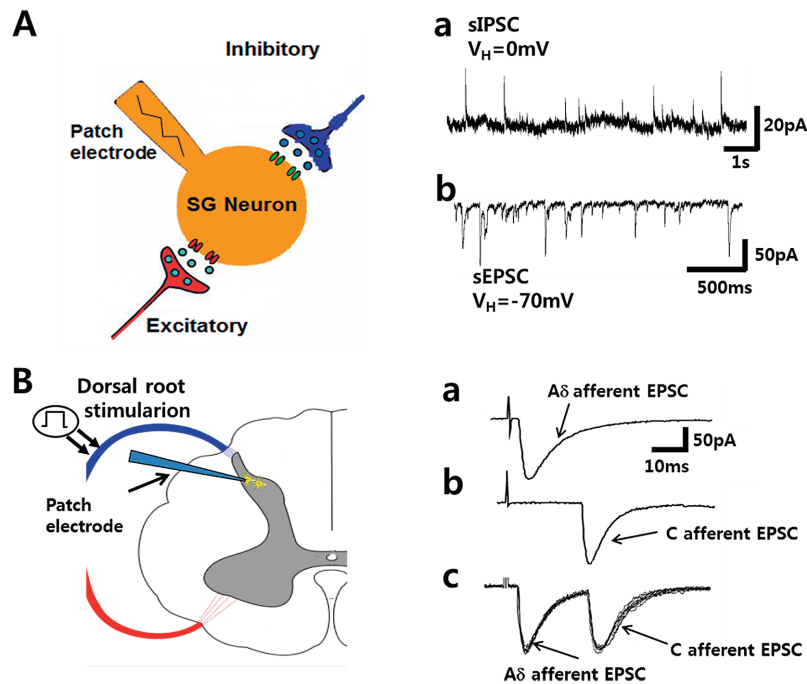


Fig. 2 Schematic representation of the patch clamp recording in substantia gelatinosa (SG) neurons of the spinal dorsal horn

A, Spontaneous excitatory and inhibitory synaptic responses (sEPSC and sIPSC) in SG neurons. Aa, sEPSC. Ab, sIPSC. **B**, Excitatory synaptic responses evoked by dorsal root stimuli in SG neurons of the spinal dorsal horn. The synaptic responses elicited by stimulation of A δ (Ba), C (Bb) and A δ , C (Bc) afferents.

し、事後検定として turkey 検定を用いた多重比較を行った。なお有意水準は 5% ($p < 0.05$) とした。

実験結果

1) ベンゾピレン投与が体重に及ぼす影響

ベンゾピレン投与が体重変化に及ぼす影響を検討した。Fig. 3 は corn oil 又はベンゾピレン投与したラットの体重の推移を示す。最終測定時に、各群 50 g 程度の増加を示し、各群間で有意な変化は見られなかった。

2) ベンゾピレン投与が後根神経節に及ぼす影響

後根神経節細胞から細胞内記録を行い、後根神経節に存在する 3 種類の大きさの細胞から静止膜電位、自発性活動電位を記録した。いずれの線維においても自発性の活動電位は記録されなかった。次いで、後根刺激によって誘起される活動電位の刺激からの潜時と刺激部位からの長さを指標にして伝導速度を算出した。正常ラット群では、A β

線維の静止膜電位は -68 ± 1.7 mV でその伝導速度は 20.9 ± 0.6 m/s であった。A γ 線維は静止膜電位が -68 ± 3.0 mV でその伝導速度は 8.8 ± 0.8 m/s であった。また、C 線維の静止膜電位および伝導速度はそれぞれ -71 ± 3.7 mV, 0.8 ± 0.8 m/s であった。

次いで、ベンゾピレンを経口投与したラットから摘出した後根神経節細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、0.3 mg/kg, 30 mg/kg ベンゾピレンを投与したラット群の静止膜電位には若干の差が見られるものの有意ではなかった。次に伝導速度を計測した。A β 線維の伝導速度では 0.3 mg/kg ベンゾピレン投与群で 15.8 ± 1 m/s ($p < 0.05$), 30 mg/kg ベンゾピレン投与群では 13.3 ± 0.1 m/s ($p < 0.05$) で有意に正常ラット群より遅かった。A γ 線維の伝導速度では 0.3 mg/kg ベンゾピレン投与群で 8.3 ± 0.6 m/s, 30 mg/kg ベンゾピレン投与群では 8.4 ± 0.4 m/s で有意な変化は認められなかった。また、C 線維でも A γ 線維と同様に 0.3 mg/kg ベンゾピレン投与群で 0.8 ± 0.4 m/s, 30 mg/kg ベンゾピレ

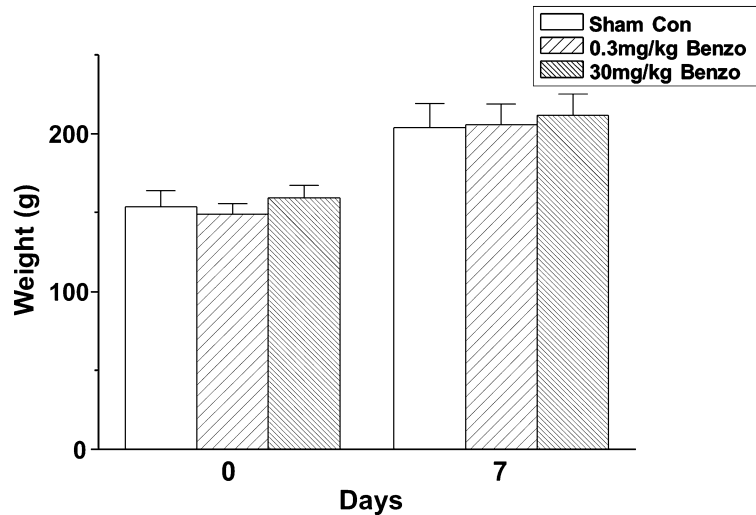


Fig. 3 The effects of benzo [a] pyrene on bodyweight
Sham Con, Sham Control ; Benzo, benzo [a] pyrene

Table 1 Comparison of electrophysiological properties between DRG neurons obtained from Sham control and benzo [a] pyrene treated rats

		RMP (mV)	CV (m/s)
Sham Control			
	Aβ neuron (n = 20)	-68±1.7mV	20.9±0.6m/s
	Aδ neuron (n = 15)	-65±3.0mV	8.8±0.8m/s
	C neuron (n = 10)	-71±3.7mV	0.8±0.8m/s
Benzo [a] pyrene			
0.3mg/kg Benzo	Aβ neuron (n = 13)	-66±2.6mV	15.8±1.0m/s*
	Aδ neuron (n = 14)	-69±1.0mV	8.3±0.6m/s
	C neuron (n = 11)	-68±1.4mV	0.8±0.4m/s
30mg/kg Benzo	Aβ neuron (n = 15)	-67±0.6mV	13.3±0.1m/s*
	Aδ neuron (n = 16)	-71±3.7mV	8.4±0.6m/s
	C neuron (n = 9)	-69±2.2mV	0.9±0.4m/s

RMP, resting membrane potential ; CV, conduction velocity ; Mean ± S.E. ; *, $p < 0.05$

ン投与群では 0.9 ± 0.4 m/s で有意な変化は認められなかった (Table. 1).

3) ベンゾピレン投与が膠様質細胞の自発性 EPSC (sEPSC) と IPSC (sIPSC) シナプス応答に及ぼす影響

脊髄後角において如何なる可塑的な変化が生じているかを検討した. 正常ラット膠様質細胞から記録を行い, 固定膜電位 -70 mV で sEPSC の頻度と振幅を 30 mg/kg ベンゾピレン投与ラットのそれらと比較検討したが, 有意な差は認められなかった. 次に膜電位 0 mV で sIPSC の比較を

行ったが, 振幅および頻度には有意な差は見られなかった (Fig. 4).

4) ベンゾピレン投与が後根誘起シナプス応答に及ぼす影響

自発性応答に加えて後根刺激によって誘起される興奮性応答の発現率を調べた. 3 種類の後根誘起シナプス応答の発現率では正常ラット群, ベンゾピレン投与群ともに発現率に有意な差は見られなかった (Fig. 5). また, 有髄の Aγ 線維や無髄の C 線維刺激によって誘起される EPSC を膠様質細胞から記録し, それぞれの振幅について検討

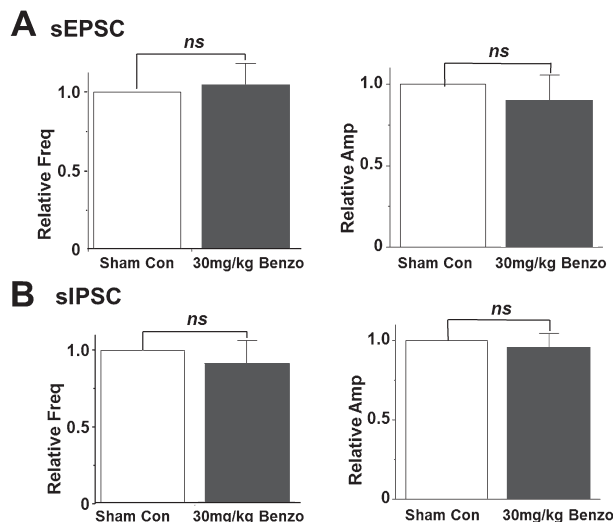


Fig. 4 The effects of benzo [a] pyrene on sEPSC and sIPSC

Sham Con, Sham Control ; Benzo, benzo [a] pyrene ; Freq, Frequency ; Amp, Amplitude ; ns, no significance ; Mean \pm S.E.

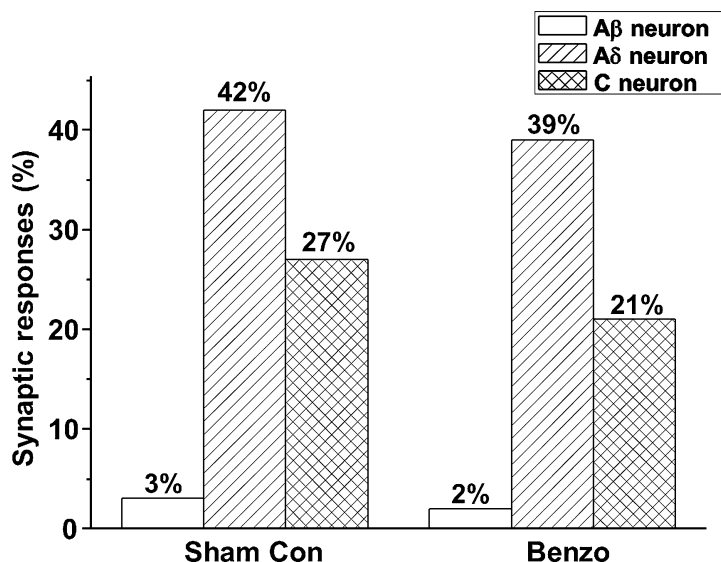


Fig. 5 The effects of benzo [a] pyrene on synaptic responses elicited by stimulation of A β , A δ and C afferents

Sham Con, Sham Control ; Benzo, benzo [a] pyrene ; Mean \pm S.E.

した。A γ 線維刺激によって潜時の短いEPSCが、C線維刺激によって線維の長いEPSCが記録された。それぞれの振幅と潜時を正常ラットのそれらと比較検討したが有意な差は認められなかった (Table. 2).

考 察

油症はポリ塩化ビフェニールおよびダイオキシ

ン類が混入したカネミオイルを摂取して発症した複合中毒である。患者は痤瘡様皮疹、面皰、囊腫などの皮膚症状、眼瞼浮腫や眼脂過多などの眼症状、口腔粘膜や皮膚の色素沈着、痰や咳などの呼吸器症状、しびれや頭痛などの神経症状、全身倦怠感などの全身症状など多彩な症状を示した。油症の発生から45年以上経過しているが、いまでも何人かの患者が、ダイオキシシン類特有の症状に

Table 2 The effects of benzo [a] pyrene on EPSC amplitude elicited by stimulation of A β , A δ , and C afferents

	Sham control		Benzo [a] pyrene	
A β neuron	53pA	(n = 1)	43pA	(n = 1)
A δ neuron	50 \pm 46pA	(n = 30)	49 \pm 31pA	(n = 18)
C neuron	39 \pm 35pA	(n = 21)	42 \pm 32pA	(n = 18)

悩まされている。これら患者の血液中ポリ塩化ビフェニールやダイオキシン類濃度は健康人に比べて高濃度である¹⁾。Dioxin 類似化合物 (PCB, PCDF, dioxin 等) による神経障害は感覚神経障害が主であり、末梢神経障害によるものと考えられている。油症患者の神経検査において、末梢神経障害の客観的指標であるアキレス腱反射の低下を認める人数は発症時 34.8%、33 年後の最近では 17.4% と経時的に減少し、正常対照でのアキレス腱反射低下率は 14.6% に近づいている。一方、自覚的感覚異常は発症時には 39.1% であったものが、33 年後の最近には 59.4% と増加している。即ち、客観的に評価される末梢神経障害は改善しているのに、自覚的感覚障害は経時的に増悪するという乖離が認められる。この乖離の原因として、皮膚受容器の障害や中枢神経系レベルの変化が考えられる^{5)~7)}。カネミ油症患者では、神経のしびれ感や感覚鈍麻の発生などの末梢神経障害および中枢神経障害が多く報告されている⁴⁾。今回の実験ではベンゾピレンを経口投与した 7 日後のラットを用い、後根付き後根神経節標本から末梢神経の静止膜電位や伝導速度等を正常ラットのそれらと比較検討した。その結果、ベンゾピレン投与ラットの後根神経節の A β 線維で伝導速度が有意に低下している結果を得たが、A γ 線維と C 線維では若干の差は見られたが有意差は無かった。しかし、静止膜電位では群間有意な差を見いだすことは出来なかった。A β 線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感と関係が有る可能性がある。A β 線維は A γ や C 線維と比較して機械的な圧迫によって機能障害を容易に起こすことが知られている⁸⁾。末梢神経、特に太い感覚神経の伝導速度の低下は感覚鈍麻やしびれと密接に関連しており、正座時には太い線維から障害を受け、脚のしびれや感覚鈍麻を来す現象と類似する。これは油症患者が訴えるしびれ感や感覚鈍麻と良く一致しており、それらは主に末梢神経の機能異常によって発生している可能性が高いと考えられる。ここで問

題になるのは A β 線維にのみ有意な変化が惹起され、同じ有髄の A γ 線維には何ら有意な変化が見られなかったことである。この点についての検討は電気生理学的な手法では明らかにすることは不可能と考えられ、今後、神経化学的、分子生物学的な手法を用いた解明が必要と思われる。所で、今までの多くの基礎研究から末梢神経の異常は容易に脊髄内での可塑的な変化を引き起こすことが知られている。そのため脊髄内でも何らかの変化が惹起されているものと考えられた。従って、本研究では脊髄後角におけるシナプス応答の可塑的な変化について脊髄スライスに後根を付した標本を用いて検討した。しかし、sEPSC および sIPSC いずれも有意な変化を見いだすことは出来なかった。また、A γ および C 線維誘起 EPSC の振幅にも有意な変化はみられなかった。感覚異常は長期に渡って持続すること、脊髄内では可塑的な変化が見られないことから、末梢神経の伝導異常には、A β 線維を包む髄鞘における異常、例えば脱髄などの関与が考えられる。もう一つの可能性は、今回記録を行った膠様質細胞は主に A γ と C 線維の入力を受けており、A β 線維からの入力が少ない。実際に後根刺激によって誘起される興奮性応答の発現率をみると A β 線維の応答がほとんど記録できない。そのためスライス標本を用いた実験では A β 線維の伝導速度の低下による影響が少なく、膠様質における可塑的な変化を捉えることが出来なかった可能性がある。A β 線維は膠様質より III 層以下の深部に入力しているため、深層の細胞からの記録が必要と考えられる。今後、膠様質のみでなく深層の細胞からも記録を行い、脊髄内においても異常が惹起されているか否かを詳細に調べる必要がある。

結 論

正常ラットとベンゾピレン投与ラットの後根神経節細胞から細胞内記録を行った。その結果、A β 線維の伝導速度が有意に緩徐化していることを

見いだしたが、A γ やC線維には影響を与えなかった。しかし、静止膜電位では全ての群で有意な差を見いだすことは出来なかった。また、正常とダイオキシン投与ラットの脊髄スライス標本を用い、脊髄膠様質細胞から記録を行い、脊髄内での可塑的な変化を検討したが、少なくとも膠様質細胞では有意な変化は見られなかった。今回の結果からベンゾピレン投与はA β 線維の伝導速度の変化を起し、しびれなどの感覚異常を引き起こす可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業（カネミ油症に関する研究））（課題番号：H27-食品-指定-017）の助成を受けたものである。ここに記して謝辞を表します。

参 考 文 献

- 1) Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters—what we have learned from Yusho disease. *Environ Res.* 86 : 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, 三好甫, 藤井直樹, 吉良潤一 : 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) Chia LG and Chu FL : A clinical and electrophysiological study of patients with polychlorinated biphenyl poisoning. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 48 : 894-901, 1985.
- 6) Michalek JE, Akhtar FZ, Arezzo JC, Garabrant DH and Albers JW : Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation Ranch Hand. *Neurotoxicology* 22 : 479-490, 2001.
- 7) Thömke F, Jung D, Besser R, Röder R, Konietzko J and Hopf HC : Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans. *Acta Neurol. Scand.* 106 : 155-158, 2002.
- 8) 金谷邦人, 山下敏彦, 川口哲, 竹林庸雄, 片平弦一郎 : 腰椎椎間板ヘルニアにおける current perception threshold. *臨床整形外科* 38 : 301-305, 2003.

(Received for publication February 24, 2017)

血液中ダイオキシン類および PCB 濃度測定のカロスチェック (第2報)

¹⁾福岡県保健環境研究所

²⁾公益財団法人北九州生活科学センター

³⁾北海道大学環境健康科学研究教育センター

⁴⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

⁵⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

新谷 依子¹⁾, 堀 就英¹⁾, 安武大輔¹⁾, 平川博仙¹⁾, 小木曾俊孝¹⁾,
宮脇 崇¹⁾, 飛石和大¹⁾, 戸高 尊²⁾, 梶原淳睦¹⁾, 香月 進¹⁾,
岸 玲子³⁾, 三苦千景⁴⁾⁵⁾, 古江増隆⁴⁾⁵⁾

Inter-Laboratory Cross-Comparison Study of Dioxins and PCBs Analyses in Human Blood Samples (Part 2)

Yoriko SHINTANI¹⁾, Tsuguhide HORI¹⁾, Daisuke YASUTAKE¹⁾, Hironori HIRAKAWA¹⁾,
Toshitaka KOGISO¹⁾, Takashi MIYAWAKI¹⁾, Kazuhiro TOBIISHI¹⁾, Takashi TODAKA²⁾,
Jumboku KAJIWARA¹⁾, SUSUMU KATSUKI¹⁾, Reiko KISHI³⁾,
Chikage MITOMA⁴⁾⁵⁾ and Masutaka FURUE⁴⁾⁵⁾

¹⁾*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences*

²⁾*Kitakyushu Life Science Center, Public Interest Incorporated Foundation*

³⁾*Center for Environmental and Health Sciences, Hokkaido University*

⁴⁾*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University*

⁵⁾*Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital*

Abstract

We developed an analytical method for accurately determining the concentrations of dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs) in a blood volume of 5 g. Inter-laboratory cross-comparison is available for maintaining the quality of dioxins and PCBs analyses. We carried out the cross-comparison of dioxin and PCBs analyses in the blood with domestic analysis organizations. Two cross-comparison studies each of dioxins and PCBs analyses were carried out from 2012 through 2015. As a result, the findings of our analysis accorded well with the analyses of the other organizations. It was found that our analytical method is sufficiently reliable.

Key words : cross-comparison, dioxins, PCB, blood

はじめに

血液中のダイオキシン類およびポリ塩化ビフェニル (PCB) は、土壌や大気などの環境試料や焼却灰等と比べて低濃度であるため、特に微量分析が求められる。また、血液を対象に分析を実施す

る機関は少なく、精度管理を実施する機会がほとんどないのが現状であった。厚生省(当時)が2000年に公表した測定マニュアル¹⁾では、50g以上の血液を必要とするため受診者への負担が大きいことや、試験操作が煩雑である等の課題があった。そのため福岡県保健環境研究所(以下、

Corresponding author : Yoriko SHINTANI
Fukuoka Institute of Health Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan
E-mail : shintani@fihes.pref.fukuoka.jp

当所)では血液5gを用いたダイオキシン類およびPCB一斉分析法を開発し^{2)~4)}、2002年以降の日常分析に用いている。この分析法の妥当性を検証するため、2007年より国内の分析機関と同一の血液試料を用いたクロスチェックを実施してきた⁵⁾。今回、2012年から2015年までの4年間に実施したクロスチェックの結果について機関間の比較を行い、当所における血液中ダイオキシン類およびPCBの分析法の信頼性を検証した。

実験方法

1. 分析試料

厚生労働省により策定された「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づき、日本赤十字社から譲渡された血液を分析試料とした。これを各年2種類ずつ国内の複数の分析機関に配付し、ダイオキシン類(毒性等価係数(TEF)が設定されている29異性体)またはPCB(高濃度の30異性体以上)の測定を依頼した。配付した血液試料の量は各機関から申請された必要量とした。表1に各年の試料および測定対象項目を示した。

2. ダイオキシン類分析方法

当所における血液中ダイオキシン類の分析方法は、既報²⁾³⁾の通り血液5gを秤量した後、凍結乾燥処理を経てASEによる脂肪抽出を行い、硫酸処理の後、硝酸銀シリカゲルおよび活性炭によるカラム精製を行う方法を用いた。他の分析機関は各機関で通常行っている分析法を用いた(表2)。ダイオキシン類の毒性等量(TEQ)は、各機関の定量結果(脂肪重量あたり)からWHOが2005年に発表したTEF(WHO 2005)を用いて各分析機関が計算し、報告した。検出下限未満の異性体は検出下限値の1/2をその濃度として計算した値を集計に用いた。機関間の比較には変動係数(CV)およびZスコアを用いた。CV(%)およびZスコアの計算は次の式により行った。

変動係数

$$CV(\%) = s / \bar{x} \times 100$$

Zスコア

$$Z = (x - \bar{x}) / s$$

x : 各機関の分析結果

\bar{x} : 各機関の分析結果(x)の平均値

s : 各機関の報告値(x)の標準偏差(SD)

3. PCB分析方法

当所における血液中PCBの分析は、ダイオキシン類と同様の分析法を用いた²⁾⁴⁾。他の分析機関は各機関で通常行っている分析法を用いた(表3)。すべての機関がGC/MSによる測定を行い、得られたPCB異性体の検出下限、定量下限および定量結果(全血重量あたり)を報告した。定量下限未満の異性体の濃度はゼロとし、Total PCBs濃度や同族体ごとの濃度の集計は我々が行った。機関間の比較にはCVおよびZスコアを用いた。

(倫理面への配慮)

ダイオキシン類およびPCBの測定にはプールされた血液を使用しており、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倫理委員会による審査を受け承認されたものである(受付番号第28-3号(1)平成28年6月16日承認)。

実験結果と考察

1. 血液中ダイオキシン類濃度分析

血液中ダイオキシン類濃度測定のカロスチェックは、2012年に7機関、2014年に6機関においてそれぞれ2種類の試料を測定した結果を比較した。

2012年の血液中ダイオキシン類濃度の測定結果を表4に示す。血液中脂肪濃度(重量%)の7機関の平均値はSample 1が0.33%(範囲:0.28-0.38%)、Sample 2が0.45%(範囲:0.35-0.51%)であり、機関間のCVはそれぞれ14%および12%であった。Sample 1の血液中ダイオキシン類濃度の7機関の平均値は、Total PCDDs:1.9, PCDFs:1.1, non-ortho PCBs:1.1, mono-ortho PCBs:0.091, Total dioxins:4.1 pg-TEQ/g lipidであった。Sample 2の平均値は、Total PCDDs:2.8, PCDFs:1.0, non-ortho PCBs:2.1, mono-ortho PCBs:0.30, Total dioxins:15 pg-TEQ/g lipidであった。Sample 1および2のTotal dioxinsのCVは15%と13%であった。Sample 1および2のTotal dioxinsの \bar{X} 管理図を図1に示す。管理限界線をZスコア=±2とした場合、Sample 2の機関Bが上部管理限界線を超えていた。これは、機関BのSample 2における脂肪濃度(0.35%)が他機関(Bを除いた

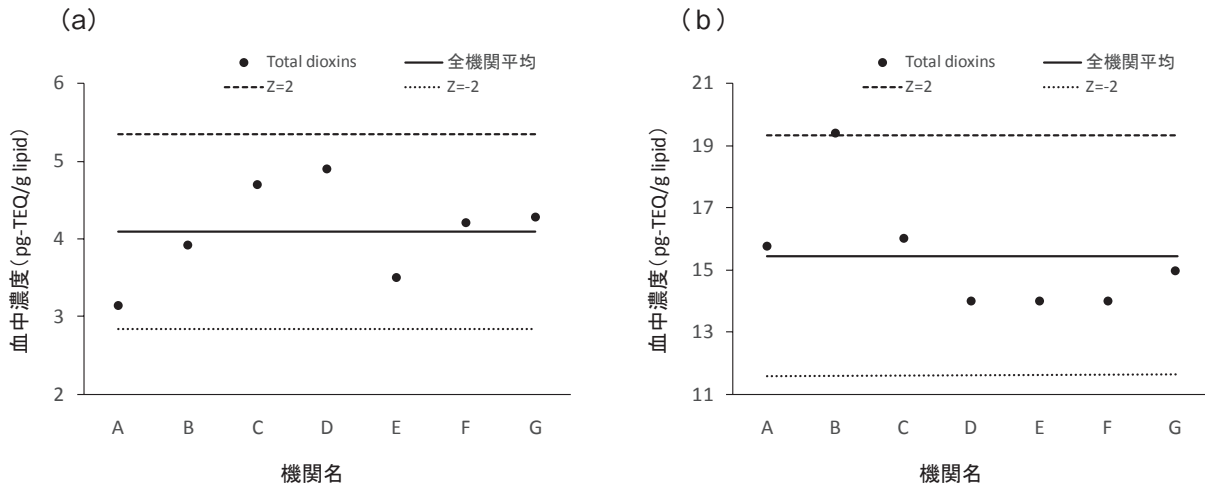


図1 機関別血液中ダイオキシン類濃度の \bar{X} 管理図 (2012年)

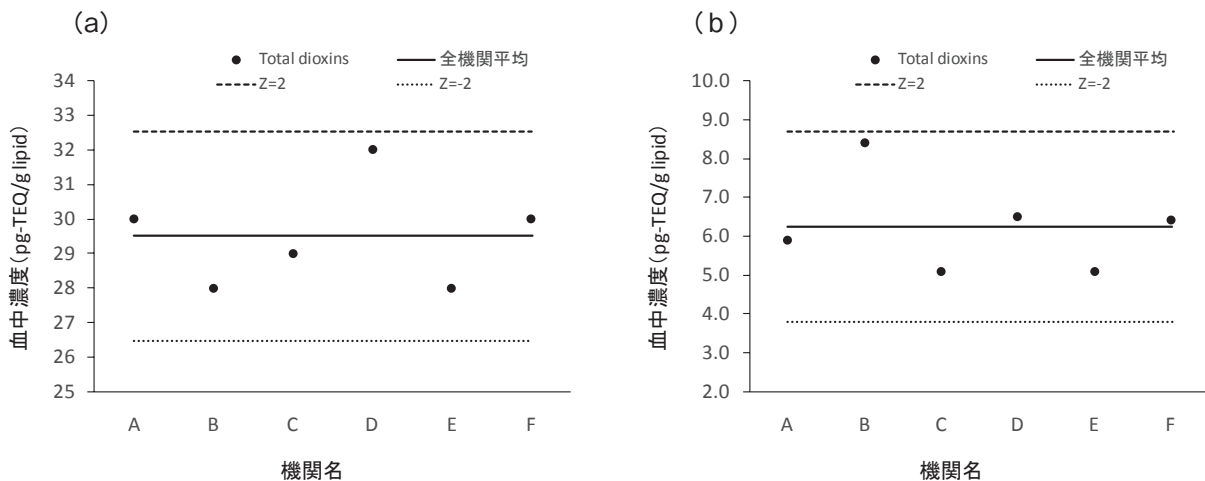


図2 機関別血液中ダイオキシン類濃度の \bar{X} 管理図 (2014年)

平均値：0.47%)よりも25%程度低かったことによるものと考えられる。Sample 1においては同様の傾向は認められず、何らかの原因により機関BのSample 2における脂肪重量の測定に問題があった可能性がある。

2014年の血液中ダイオキシン類濃度の測定結果を表5に示す。血液中脂肪濃度の6機関の平均値はSample 1が0.41% (範囲：0.36 - 0.46%)、Sample 2が0.33% (範囲：0.23 - 0.42%)であり、機関間のCVはそれぞれ12%および19%であった。比較的高濃度であったSample 1の血液中ダイオキシン類濃度の6機関の平均値は、Total PCDDs：6.2, PCDFs：18, non-ortho PCBs：4.2, mono-ortho PCBs：0.61, Total dioxins：29

pg-TEQ/g lipidであった。比較的低濃度であったSample 2の血液中ダイオキシン類濃度の平均値は、Total PCDDs：3.0, PCDFs：1.5, non-ortho PCBs：1.5, mono-ortho PCBs：0.17, Total dioxins：6.2 pg-TEQ/g lipidであった。Sample 1および2のTotal dioxinsのCVは5.1%と20%であった。Sample 1および2のTotal dioxinsの \bar{X} 管理図を図2に示す。管理限界線をZスコア ± 2 とした場合、Sample 1, 2ともに管理限界線を超えた機関はなかったが、Sample 2の機関BにおけるTotal dioxinsがやや高かった。機関BにおけるSample 2の脂肪濃度(0.23%)が他機関(Bを除いた平均値：0.34%)よりも低かったことに起因する可能性が考えられる。

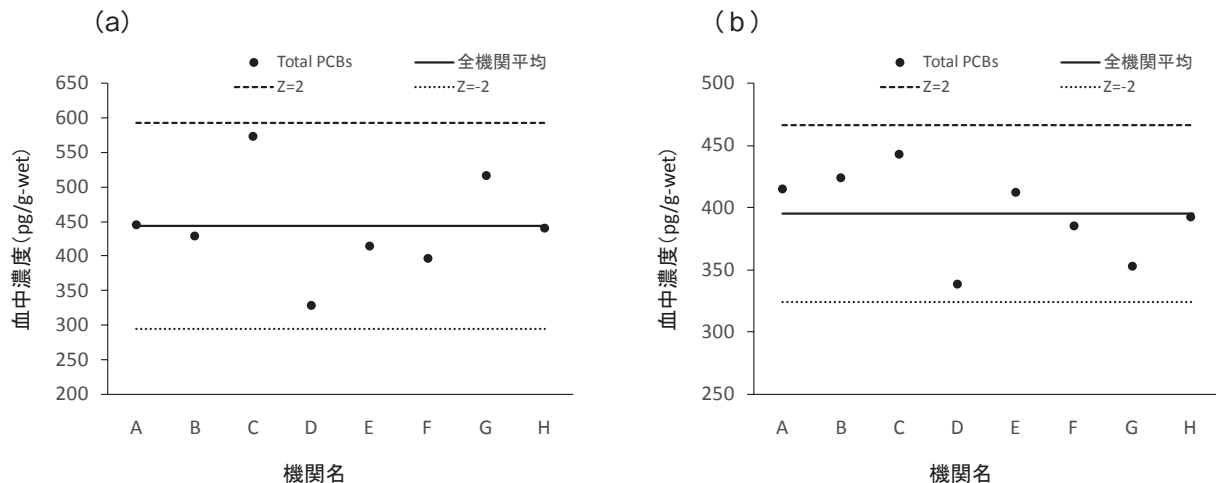


図3 機関別血液中PCB濃度の \bar{X} 管理図(2013年)

油症診断基準の一つである2,3,4,7,8-PeCDF濃度(脂肪重量あたり)について、当所の測定結果の妥当性を確認するためにZスコアを算出した。各年のSample 1および2のZスコアは2012年が-0.78および-0.34、2014年が-1.1および-0.84と、いずれも $|Z| \leq 2$ の範囲内であり良好な結果であった。

2012年および2014年に実施した血液中ダイオキシン類濃度測定のカロスチェックでは、どちらも脂肪重量測定に由来すると考えられる機関間のTotal dioxinsのばらつきが認められた。血液中ダイオキシン類の測定は脂肪重量あたりで評価されることが多く、脂肪濃度は抽出された脂肪重量を測定することで算出される。数十mgの微量の脂肪重量を正確に測定する必要があり、分析の際には細心の注意が必要である。脂肪抽出法の違い(溶媒抽出およびASE抽出)による脂肪濃度の差は今回特に認められなかった。

2. 血液中PCB濃度

血液中PCB濃度測定のカロスチェックは、2013年に8機関、2015年に6機関においてそれぞれ2種類の試料を測定した結果を比較した。

2013年の血液中PCB濃度の測定結果を表6および表7に示した。参加8機関のTotal PCBs濃度の平均値はSample 1が440 pg/g-wet、Sample 2が400 pg/g-wetであり、分析機関間のCVはそれぞれ17%と9.0%であった(表6)。Sample 1および2のTotal PCBs濃度の \bar{X} 管理図を

図3に示す。管理限界線をZスコア ± 2 とした場合、Sample 1, 2ともに管理限界線を超えた機関はなく、おおむね良好な結果であった。各分析機関のPCB同族体ごとの濃度についても比較した(表6)。主要な同族体(PeCBs - OcCBs)濃度のCVはPeCBsとHxCBsで20%を超えたが、HpCBsとOcCBsは比較的ばらつきは小さかった。今回の配付試料ではHxCBsがTotal PCBs濃度に占める割合が最も大きい同族体であり、HxCBs濃度の変動がTotal PCB濃度の変動に最も大きく影響していると考えられる。また、3機関はMoCBsを、2機関はDiCBsを、1機関はNoCBsとDeCBの定量を行っていなかった。これら同族体を合計してもTotal PCBs濃度に占める割合は低く、Total PCBs濃度の測定にはほとんど影響しないと考えられる。濃度が高かった上位10異性体でTotal PCBs濃度の80%近くを占めていた。各機関の主要異性体の濃度についても比較を行った(表7)。なお、#180/#193、#163/#164および#182/#187については未分離の異性体として報告した機関があったため、合算値として集計した。主要異性体の濃度およびCVは表7に示した通りであり、中にはCVが50%を超えている異性体もあった。機関Fの#146はSample 1, 2ともに不検出と報告されていたが、他機関と比較して定量下限が高く設定されていたために不検出となり、ばらつきが大きくなったと考えられる。また、血液試料の配付時に定量する異性体を「高濃度の30異性体以上」とし、具体的な異性体を指定

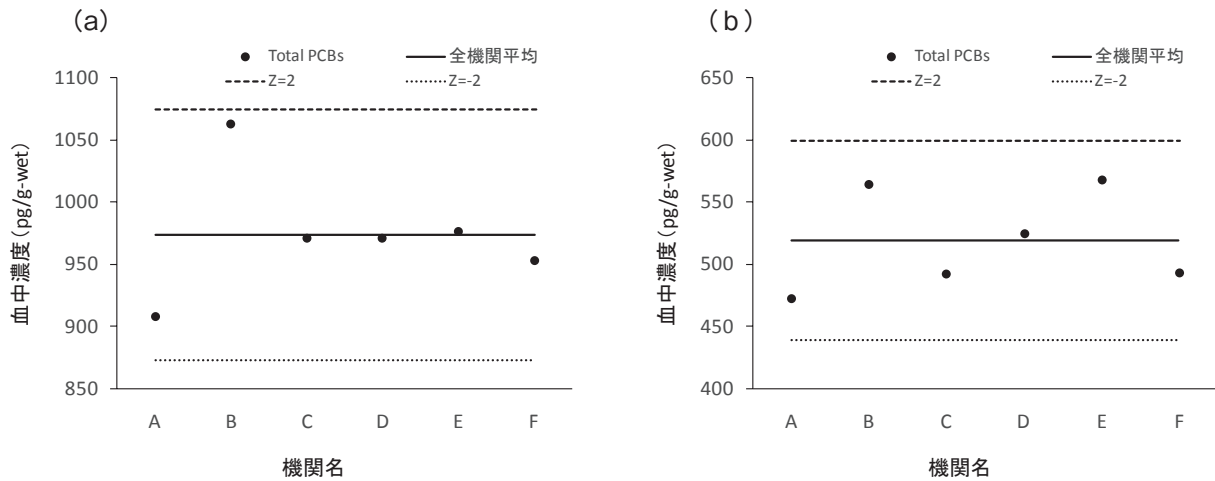


図4 機関別血液中 PCB 濃度の \bar{X} 管理図 (2015 年)

しなかったため、各機関がそれぞれ定量する異性体を 32~209 種選んでいた。その結果、今回の試料で高濃度であった異性体を定量していない機関があった。血液中に検出される PCB 異性体は 60 種程度であり、濃度の高い 30 異性体で約 90% 以上を占める⁶⁾が、機関間の比較のためには測定する異性体のある程度指定することも検討する必要があると考えられた。

油症診断および検診において PCB パターン判定に使用される 3 異性体 (#118, #153 および #156) 濃度について、当所の測定結果の Z スコアを算出した。Sample 1 における #118, #153 および #156 の Z スコアはそれぞれ -0.23, -0.041 および -0.0032, Sample 2 が -0.99, 0.17 および -0.31 と、いずれも $|Z| \leq 2$ の範囲内であり良好な結果であった。

2015 年の血液中 PCB 濃度の測定結果を表 8 および表 9 に示した。参加 6 機関の Total PCBs 濃度の平均値は Sample 1 が 970 pg/g-wet, Sample 2 が 520 pg/g-wet であり、分析機関間の CV はそれぞれ 5.2% および 7.7% であった。Sample 1 および 2 の Total PCBs 濃度の \bar{X} 管理図を図 4 に示す。管理限界線を Z スコア = ± 2 とした場合、Sample 1, 2 ともに管理限界線を超えた機関はなく、おおむね良好な結果であった。定量された同定ピーク数は各機関により異なり、Sample 1 が 38~102 本、Sample 2 では 33~93 本の範囲であり、6 機関中 2 機関が MoCBs と DiCBs を定量対象としていなかった。しかし、定量されなかった

異性体や同族体の Total PCB 濃度に占める割合は低く、値のばらつきにはほとんど影響がなかった。主要な PCB 同族体 (TeCBs - OcCBs) の濃度を比較すると、比較的高濃度であった Sample 1 の TeCBs と OcCBs で 10% を超えたが、PeCBs と HpCBs は 10% 未満でよく一致していた。低濃度の Sample 2 でややばらつきが大きくなり、TeCBs, HpCBs および OcCBs の CV は 11~20% を示したが、Total PCB 濃度の約 52% を占める PeCBs と HxCBs の CV はそれぞれ 7.4% および 5.5% であった。分析機関ごとに高濃度の上位 10 種異性体を選んで濃度を総和した値は、Total PCB 濃度の 72~77% を占めていた。主要異性体の濃度についても比較を行った (表 9)。なお、#180/#193, #163/#164 および #182/#187 については合算値として集計した。Sample 1 および 2 の PCB 異性体別濃度の CV は、#138 で 7.2 および 8.8%, #153 で 8.9 および 7.6%, #156 で共に 10%, #163/#164 で 12 および 11%, #170 で 16 および 18%, #180/#193 で 6.7 および 9.9% 等であった。濃度の高低に関わらず異性体種による違いが顕著であり、特に #163/#164 および #170 のばらつきが大きかった。主要な異性体の CV について、2013 年あるいは 2015 年の実施年ごとに Sample 1 と 2 の結果を比較すると、CV の大きい異性体は Sample 1 および 2 の間で共通していたが、2013 年と 2015 年の結果を比較すると、異性体種による傾向は特に認められなかった。

油症診断基準において使用される 3 異性体

(#118, #153 および #156) 濃度について、当所の測定結果の Z スコアを算出した。2015 年に当所で測定した Sample 1 の #118, #153 および #156 の Z スコアはそれぞれ -0.79, 0.59 および -1.3, Sample 2 が -1.4, -0.67 および -1.8 と、いずれも $|Z| \leq 2$ の範囲内であり良好な結果であった。

今回のクロスチェックにおいて、各機関からの結果報告はエクセルファイルにより行われたが、有効数字を指定しなかったため、異性体ごとに有効数字 1 桁で報告した機関や、エクセル上の書式のみで桁揃えを行っていた機関など、それぞれ対応が異なっていた。また、各機関からの報告は数値のみであり、クロマトグラム等の生データの提出を求めているなかったため、機関間のばらつきの原因等について詳細な分析を行うことができなかった。各機関からの結果報告の方法については今後の検討が必要であると考えられる。

総 括

2012 年～2015 年に血液中ダイオキシン類および PCB 濃度測定のカロスチェックを 2 回ずつ実施した。クロスチェックを実施した分析機関間で測定値は概ね一致していたが、一部脂肪重量の測定にばらつきが認められ、脂肪重量測定には注意が必要であると考えられた。分析法の違いによる血中ダイオキシン類および PCB 濃度の差は認められず、当所における分析法の妥当性が確認された。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金によるものである。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 厚生省：血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル，2000.
- 2) Todaka T, Hirakawa H, Tobiishi K and Iida T : New Protocol of Dioxin Analysis in Human Blood. Fukuoka Igaku Zasshi 94 : 148-157, 2003.
- 3) 戸高尊, 平川博仙, 堀就英, 飛石和大, 飯田隆雄：ヒト血液中ダイオキシン類の抽出・精製法の改良および油症患者血液中ダイオキシン類濃度, 福岡医誌 96 : 185-191, 2005.
- 4) 堀就英, 飛石和大, 芦塚由紀, 中川礼子, 戸高尊, 平川博仙, 飯田隆雄：ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 及び高分解能ガスクロマトグラフィー/高分解能質量分析計 (HRGC/HRMS) による血中 PCB 異性体別分析, 福岡医誌 96 : 220-226, 2005.
- 5) 梶原淳陸, 戸高尊, 平川博仙, 堀就英, 安武大輔, 宮脇崇, 飛石和大, 高尾佳子, 平田輝昭, 内博史, 古江増隆：血液中ダイオキシン, PCB 類濃度測定のカロスチェック, 福岡医誌 104 : 104-109, 2013.
- 6) Todaka T, Hori T, Hirakawa H, Kajiwara J, Yasutake D, Onozuka D, Iida T and Furue M : Congener-specific analysis of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 127 elderly residents in Nakagawa Town, Fukuoka Prefecture, Japan. Chemosphere. 73 : 865-872, 2008.

(Received for publication March 28, 2017)

表1 各年のクロスチェック実施概要

実施年	分析対象化学物質	参加機関数
2012	ダイオキシン類	7
2013	PCB	8
2014	ダイオキシン類	6
2015	PCB	6

表2 各機関の血液中ダイオキシン類分析法

No.	分析フロー概要	2012年	2014年
1	溶媒抽出→多層シリカゲルカラム精製→活性炭カラム精製→GC/MS測定	A, C, D, E, F	A, B, C, E
2	溶媒抽出→アルカリ分解→ヘキサン抽出→硫酸処理→DMSO処理→カラムクロマト精製→GC/MS測定	B	D
3	高速溶媒抽出 (ASE) →硫酸処理→カラムクロマト精製→GC/MS測定	G	F

表3 各機関の血液中PCB分析法

No.	分析フロー概要	2013年	2015年
1	アルカリ分解→溶媒振とう抽出→多層シリカゲルカラム精製→GC/MS測定	A, B, D, G	C
2	溶媒抽出→多層シリカゲルカラム精製→活性炭カラム精製→GC/MS測定	C, E	B, E
3	アルカリ分解→溶媒振とう抽出→シリカゲルカラム精製→DMSO処理→GPC精製→GC/MS測定	F	A
4	高速溶媒抽出 (ASE) →硫酸処理→カラムクロマト精製→GC/MS測定	H	D, F

表4 血液中ダイオキシン類濃度測定結果 (2012年)

	分析機関ごとの測定値 (pg-TEQ/g lipid)							7機関の集計				
	A	B	C	D	E	F	G	Mean	SD	Min	Max	CV (%)
Total PCDDs	1.2	1.4	2.1	2.1	1.6	2.1	2.5	1.9	0.43	1.2	2.5	23
Total PCDFs	0.77	1.1	1.0	1.2	0.82	1.4	1.1	1.1	0.22	0.77	1.4	21
Total non-ortho PCBs	1.0	1.2	1.4	1.5	1.0	0.65	0.65	1.1	0.34	0.65	1.5	31
Total mono-ortho PCBs	0.082	0.097	0.10	0.11	0.074	0.085	0.090	0.091	0.012	0.074	0.11	13
Total dioxins	3.1	3.9	4.7	4.9	3.5	4.2	4.3	4.1	0.63	3.1	4.9	15
脂肪濃度 (%)	0.36	0.30	0.29	0.29	0.38	0.38	0.28	0.33	0.044	0.28	0.38	14
試料採取量 (g)	10.41	52.54	10.00	10.68	9.41	5.01	6.01					
Total PCDDs	2.4	2.8	3.1	2.4	2.8	2.8	3.1	2.8	0.29	2.4	3.1	10
Total PCDFs	11	14	10	9.3	8.9	9.2	9.7	10	1.6	8.9	14	16
Total non-ortho PCBs	2.2	2.6	2.2	2.1	1.9	1.9	1.8	2.1	0.28	1.8	2.6	13
Total mono-ortho PCBs	0.32	0.36	0.30	0.30	0.25	0.28	0.30	0.30	0.033	0.25	0.36	11
Total dioxins	16	19	16	14	14	14	15	15	1.9	14	19	13
脂肪濃度 (%)	0.43	0.35	0.48	0.47	0.51	0.49	0.42	0.45	0.054	0.35	0.51	12
試料採取量 (g)	10.24	51.16	9.97	10.50	9.84	5.02	6.07					

表5 血液中ダイオキシン類濃度測定結果 (2014年)

	分析機関ごとの測定値 (pg-TEQ/g lipid)										6機関の集計			
	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Min	Max	CV (%)			
Total PCDDs	6.0	5.3	5.0	6.2	6.5	8.0	6.2	1.1	5.0	8.0	17			
Total PCDFs	19	19	20	20	16	16	18	1.7	16	20	10			
Total non-ortho PCBs	4.9	3.8	3.4	4.4	4.2	4.3	4.2	0.53	3.4	4.9	13			
Total mono-ortho PCBs	0.63	0.61	0.52	0.71	0.54	0.68	0.61	0.076	0.52	0.71	12			
Total dioxins	30	28	29	32	28	30	29	1.5	28	32	5.1			
脂肪濃度 (%)	0.38	0.46	0.46	0.36	0.46	0.36	0.41	0.052	0.36	0.46	12			
試料採取量 (g)	10.80	10.33	29.78	50.98	5.05	5.58								
Total PCDDs	2.8	3.7	2.0	3.1	2.6	3.7	3.0	0.66	2.0	3.7	22			
Total PCDFs	1.4	2.0	1.6	1.7	1.3	1.3	1.5	0.3	1.3	2.0	18			
Total non-ortho PCBs	1.6	2.4	1.4	1.6	1.0	1.3	1.5	0.48	1.0	2.4	31			
Total mono-ortho PCBs	0.16	0.24	0.14	0.17	0.13	0.16	0.17	0.040	0.13	0.24	24			
Total dioxins	5.9	8.4	5.1	6.5	5.1	6.4	6.2	1.2	5.1	8.4	20			
脂肪濃度 (%)	0.33	0.23	0.35	0.30	0.42	0.32	0.33	0.062	0.23	0.42	19			
試料採取量 (g)	9.98	10.53	29.46	52.72	5.08	6.05								

表6 血液中PCB濃度測定結果 (同族体別, 2013年)

	分析機関ごとの測定値 (pg/g-wet)										8機関の集計			
	A	B	C	D	E	F	G	H	Mean	SD	Min	Max	CV (%)	
Total MoCBs	N/A	0.48	0	0	0	0	N/A	N/A	0.10	0	0	0.48		
Total DiCBs	N/A	1.2	1.1	0.43	0	0	0	N/A	0.46	0	0	1.2		
Total TriCBs	1.2	1.4	1.8	1.3	0	0	6.7	0.62	1.6	2.1	0	6.7	130	
Total TeCBs	11	10	14	8.8	6.0	8.0	21	11	11	4.5	6.0	21	40	
Total PeCBs	35	30	45	27	31	28	61	40	37	11	27	61	30	
Total HxCBs	250	220	300	150	200	200	270	230	230	46	150	300	20	
Total HpCBs	130	140	180	110	140	140	160	130	140	19	110	180	14	
Total OcCBs	20	21	31	24	28	26	N/A	21	24	4.0	20	31	16	
Total NoCBs	2.6	2.6	3.4	2.6	2.8	0	N/A	2.5	2.4	1.1	0	3.4	46	
DeCB	1.0	1.1	1.1	0.93	1.0	0	N/A	0.51	0.81	0.41	0	1.1	51	
Total PCBs	450	430	570	330	410	400	520	440	440	74	330	570	17	
Total MoCBs	N/A	2.6	4.2	3.2	2.5	0	N/A	N/A	2.5	0	0	4.2		
Total DiCBs	N/A	1.9	1.6	1.6	0	0	0	N/A	0.85	0	0	1.9		
Total TriCBs	1.5	1.2	1.9	1.8	0	0	10	0.61	2.1	3.2	0	9.8	150	
Total TeCBs	8.5	9.0	11	8.2	5.6	6.0	10	9.5	8.6	2.0	5.6	11	23	
Total PeCBs	29	26	34	29	27	23	48	30	31	7.7	23	48	25	
Total HxCBs	180	160	180	120	150	150	150	162	160	19	120	180	12	
Total HpCBs	160	170	160	130	170	160	140	150	150	15	130	170	9.7	
Total OcCBs	34	39	43	42	50	43	N/A	35	41	5.3	34	50	13	
Total NoCBs	5.1	5.0	5.2	4.9	5.6	1.0	N/A	4.8	4.5	1.6	1.0	5.6	35	
DeCB	2.5	2.5	2.4	2.8	2.3	0	N/A	1.7	2.0	1.0	0	2.8	47	
Total PCBs	420	420	440	340	410	390	350	390	400	36	340	440	9.0	

N/A: not available.

表7 血液中 PCB 濃度測定結果 (主要異性体別, 2013 年)

	分析機関ごとの測定値 (pg/g-wet)													8 機関の集計			
	A	B	C	D	E	F	G	H	Mean	SD	Min	Max	CV (%)				
#153	95	87	120	60	79	83	130	93	94	23	60	130	24				
#180/#193	58	63	75	49	61	61	79	60	63	9.5	49	79	15				
#138	49	52	58	30	45	43	100	49	53	20	30	100	38				
#156	22	23	38	18	23	22	34	26	26	6.7	18	38	26				
#163/#164	45	23	32	16	20	21	N/A	23	26	9.8	16	45	38				
#182/#187	23	27	28	20	25	25	33	24	26	4.0	20	33	16				
#170	23	20	32	17	24	24	36	25	25	6.2	17	36	25				
#99	14	13	16	12	14	13	18	15	14	2.1	12	18	14				
#146	15	14	19	9.2	12	0	N/A	16	12	6.1	0	19	51				
#118	11	9.9	14	11	9.9	11	16	11	12	2.2	9.9	16	19				
#153	88	76	88	56	72	78	86	80	78	11	56	88	14				
#180/#193	77	88	78	63	80	79	73	74	77	7.0	63	88	9.2				
#138	31	33	28	20	29	30	51	28	31	8.7	20	51	28				
#182/#187	29	33	31	24	31	31	32	28	30	2.7	24	33	9.0				
#170	23	21	25	16	24	24	26	23	23	3.0	16	26	13				
#163/#164	26	20	24	16	18	18	N/A	19	20	3.7	16	26	18				
#118	16	16	17	17	14	14	16	14	15	1.2	14	17	8.1				
#194	13	14	12	11	15	14	N/A	14	13	1.4	11	15	11				
#146	13	12	14	8.6	11	0	N/A	13	10	4.8	0	14	47				
#156	9.0	10	12	8.1	10	10	10	9.5	9.9	1.1	8.1	12	11				

N/A: not available.

表8 血液中 PCB 濃度測定結果 (同族体別, 2015年)

	分析機関ごとの測定値 (pg/g-wet)						6 機関の集計				
	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Min	Max	CV (%)
Total MoCBs	0	0	0.060	N/A	0	N/A	0.015		0	0.060	
Total DiCBs	0	0	0.40	N/A	0	N/A	0.10		0	0.90	
Total TriCBs	0	4.6	4.9	2.4	2.4	6.4	3.4	2.3	0	6.4	67
Total TeCBs	16	25	28	22	19	30	23	5.3	16	30	23
Total PeCBs	62	89	76	88	79	85	80	9.9	62	89	12
Total HxCBs	420	500	490	460	440	460	460	30	420	500	6.4
Total HpCBs	340	360	310	310	340	290	330	25	290	360	7.8
Total OcCBs	73	71	55	74	76	63	69	8.0	55	76	12
Total NoCBs	0	7.2	7.2	8.0	8.3	7.7	6.4	3.2	0	8.3	49
DeCB	0	3.5	3.1	3.2	3.1	3.2	2.7	1.3	0	3.5	49
Total PCBs	910	1100	970	970	980	950	970	50	910	1100	5.2
Total MoCBs	0	0	0	N/A	0	N/A	0		0	0	
Total DiCBs	0	1.0	0.36	N/A	0	N/A	0.090		0	0.36	
Total TriCBs	0	3.6	3.6	3.3	2.0	7.9	3.4	2.6	0	7.9	76
Total TeCBs	11	18	20	15	14	24	17	4.4	11	24	26
Total PeCBs	33	51	44	50	47	49	46	6.7	33	51	15
Total HxCBs	210	250	220	220	240	210	230	14	210	250	6.2
Total HpCBs	180	190	160	170	210	160	180	19	160	210	11
Total OcCBs	41	44	33	52	51	36	43	7.9	33	52	18
Total NoCBs	0.0	4.8	4.3	4.9	5.8	5.1	4.1	2.1	0	5.8	50
DeCB	0.0	3.7	2.9	3.3	3.4	2.8	2.7	1.4	0	3.7	50
Total PCBs	470	560	490	520	570	490	520	40	470	570	7.7

N/A: not available.

表9 血液中 PCB 濃度測定結果 (主要異性体別, 2015 年)

	分析機関ごとの測定値 (pg/g-wet)						6 機関の集計					
	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Min	Max	CV (%)	
#153	170	210	190	180	170	200	190	17	170	210	8.9	
#180/#193	160	160	140	150	150	140	150	9.9	140	160	6.7	
#138	95	95	93	110	100	98	99	7.1	93	110	7.2	
#182/#187	54	58	56	51	58	51	55	3.4	51	58	6.2	
#170	57	64	38	56	58	52	54	8.8	38	64	16	
#156	47	59	58	53	53	46	53	5.4	46	59	10	
#163/#164	45	55	57	43	45	49	49	5.8	43	57	12	
#146	29	34	30	33	27	29	30	2.8	27	34	9.1	
#99	28	30	26	33	31	32	30	2.5	26	33	8.3	
#118	29	32	30	32	28	28	30	1.7	28	32	5.8	
#153	100	120	100	100	110	100	110	8.0	100	120	7.6	
#180/#193	87	88	77	84	94	71	83	8.3	71	94	9.9	
#138	45	43	38	49	46	42	44	3.8	38	49	8.8	
#182/#187	35	36	33	32	41	33	35	3.2	32	41	9.2	
#170	31	29	19	25	30	24	26	4.6	19	31	18	
#163/#164	23	29	26	22	25	24	25	2.6	22	29	11	
#118	21	23	21	22	21	19	21	1.2	19	23	5.7	
#156	17	19	18	17	18	14	17	1.8	14	19	10	
#146	17	18	14	17	16	14	16	1.6	14	18	9.9	
#194	15	13	9.4	15	17	13	14	2.6	9.4	17	19	

2014-2016 年度油症検診における血液中 ポリ塩化クアテルフェニルの分析

¹⁾福岡県保健環境研究所

²⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

³⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

小木曾俊孝¹⁾, 安武大輔¹⁾, 佐藤 環¹⁾, 高橋浩司¹⁾, 堀 就英¹⁾,
梶原淳睦¹⁾, 香月 進¹⁾, 三苫千景²⁾, 古江増隆²⁾³⁾

Analysis of Polychlorinated Quaterphenyl in Yusho Diagnosis from 2014 to 2016

Toshitaka KOGISO¹⁾, Daisuke YASUTAKE¹⁾, Tamaki SATOH¹⁾, Koji TAKAHASHI¹⁾,
Tsuchihide HORI¹⁾, Jumboku KAJIWARA¹⁾, Susumu KATSUKI¹⁾,
Chikage MITOMA²⁾ and Masutaka FURUE²⁾³⁾

¹⁾*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39, Mukaizano,
Dazaifu-shi, Fukuoka 818-0135*

²⁾*Department of Dermatology, Graduate school of medical Science, Kyushu University
Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582*

³⁾*Research and Clinical center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital
Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582*

Abstract

Concentration of polychlorinated quaterphenyl (PCQ) in blood is an important chemical diagnostic standard in Yusho. In this study, we examined improvement of analytical method, and blood analysis was performed using this method. New method made it possible to analyze more quickly than our usual method. During the period of 2014 to 2016, a total of 143 bloods PCQ were analyzed. As a result, PCQ was detected from a total of 19 persons, and the range of PCQ concentrations were 0.02-6.15 ppb. From the time course of the PCQ concentration determined in blood of Yusho patients, PCQ is found not to be eliminated than PCB. The concentration of PCQ is an important knowledge for diagnosis of Yusho-disease and it is thought that it's necessary to continuously analyze in the future.

Key words : Yusho, PCQ, Blood

はじめに

ポリ塩化クアテルフェニル (PCQ) は油症患者が摂取したライスオイル中に高濃度に検出される化合物であり, ポリ塩化ビフェニル (PCB) が加熱媒体として使用される間に生成したと考えられ

ている¹⁾. PCQ は魚からごく微量検出されることが報告されているが, 健常者の血液ではほとんど検出されていない (平均で 0.02 ppb 未満)²⁾. 一方で, 油症患者の血液では明らかに高濃度の PCQ が検出されている³⁾. これらの知見から, 1981 年に血液中 PCQ 濃度が油症診断基準に追加

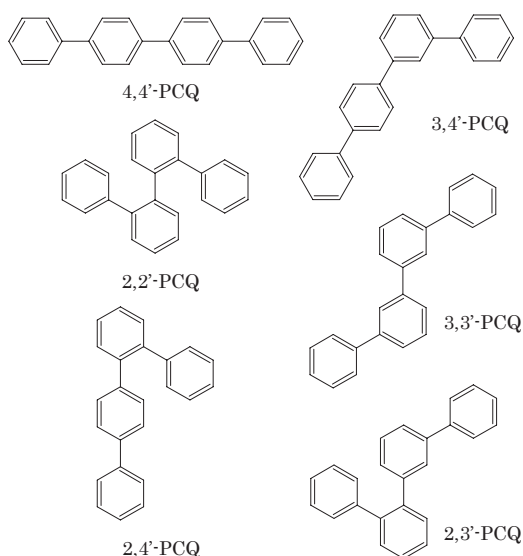


Fig. 1 Six basic skeletons of PCQ

された。PCQ は、血液中濃度が 0.1 ppb 以上の場合は「異常に高い濃度」、0.03-0.09 ppb が「境界領域濃度」、0.02 ppb 以下が「通常見られる濃度」とそれぞれ区分されている。

PCQ は PCB が二量体化した構造をしており、結合部位の違いにより 6 種類の基本骨格がある (Fig. 1)。さらに、置換する塩素の数や位置の違いにより数十万という異性体が存在することが知られており、個別に定量することは不可能である。PCQ の分析法は前田らにより PCQ を完全塩素化し骨格の異なる 6 種類のオクタデカクロロクアテルフェニル (ODCQ) として電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ (ECD/GC) で定量する方法が確立されている⁴⁾。また、飯田らはキャピラリーカラムを用いた高感度分析法を開発し⁵⁾、芦塚らは使用する血液の少量化と検査の迅速化を報告している⁶⁾。当所ではこれらの報告を参考に PCQ の分析を行っているが、実験操作が長く、使用する器具の洗浄など操作以外の工程にも時間を要し、改良の余地があった。

今回著者らは、検査法の改良と、2014-2016 年に行われた油症一斉検診における PCQ の分析結果について報告する。

実験方法

1. 試料

2014-2016 年に行われた油症一斉検診における、PCQ の測定対象者 87 名 (延べ 143 名) の血液に

ついて測定を実施した。

2. 試薬・器具

ヘキサン、エタノール、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、無水硫酸ナトリウムは関東化学製の残留農薬試験・PCB 試験用を用いた。蒸留水 (ヘキサン洗浄品) は関東化学製の残留農薬試験用を用いた。水酸化カリウム、酒石酸ナトリウム二水和物、炭酸水素ナトリウムは和光純薬製の特級を用いた。クロロホルムは和光純薬製の残留農薬・PCB 分析用、硫酸は同社製の有害金属分析用、20%塩酸は同社製の精密分析用を用いた。発煙硫酸 25% (液状) はキシダ化学製の特級を用いた。ノナンは CALEDON 製の Distilled in Grass グレードを用いた。五塩化アンチモンはアルドリッチ製の PCB 分析用を用いた。フロリジルは和光純薬製のカラムクロマトグラフィー用であり、5%ジエチルエーテル/ヘキサンを加え超音波で 20 分間洗浄し、130℃で 3 時間活性化したものを用いた。活性アルミナ 90 (中性) は MERCK 製であり、130℃で 3 時間活性化後、精製水を 2% 加えよく混合したものを用いた。

ガラス器具や試薬は可能な限りダイオキシンプリーオープン (アルプ製, KKD-45F 型) で 450℃、4 時間の条件で加熱処理したものを用いた。血液試料のアルカリ分解にはアドバンテック製の定温乾燥機 (DRN420DB 型) を用いた。

3. 使用機器及び測定条件

使用機器及び測定条件を Table 1 に示した。

4. 分析法

均一化した血液試料約 2 g を 10 mL の共栓丸底試験管に秤量した。1.5 N の水酸化カリウム/エタノール溶液 3.5 mL を加えよく混合した後、30℃に設定したオープンに入れ、終夜でアルカリ分解した。次に、ヘキサン 2 mL を加え振とう抽出し、3,000 rpm で 1 分間遠心分離した。ヘキサン層を別の 10 mL 共栓スピッツ管に移し、残渣に再度ヘキサン 2 mL を加え振とう抽出、遠心分離しヘキサン層を回収した。この抽出を合計 3 回行った。集めたヘキサン層に蒸留水 2 mL を加え攪拌洗浄し、3,000 rpm で 1 分間遠心分離した。ヘキサン層は無水硫酸ナトリウム (1.5 g) を充填

Table 1 Measurement conditions of ECD/GC

Instrument	Agilent 7890B (63Ni-ECD)
Capillary column	Quadrex 007-65HT 0.25 mm I.D. × 25 m, Film thickness 0.1 μm
Column temp.	80 °C (5min) -30 °C/min-320 °C
Inlet temp.	300 °C
Detector temp.	350 °C
Carrier gas	Helium, 16 psi
Make up gas	Nitrogen
Injection volume	4 μL

したパスツールピペットに通して脱水し、ヘキサン 1 mL で 2 回洗い込んだ。ヘキサン溶液は窒素気流下乾固し、ヘキサン 1 mL で再溶解した。続いて、活性化したフロリジル (0.5 g)、無水硫酸ナトリウム (0.2 g) を積層したパスツールピペットに負荷し、5% ジエチルエーテル/ヘキサン 1 mL で 3 回洗い込んだ後、さらに 4 mL で溶出した。溶出液を窒素気流下乾固し、ヘキサン 2 mL に溶解させた。次に濃硫酸で 10% に希釈した発煙硫酸を 1 mL 加え、よく攪拌し、3,000 rpm で 1 分間遠心分離した。発煙硫酸層を取り除き、同様の工程を発煙硫酸層が透明になるまで 3 回程度繰り返した。ヘキサン層をガラス製の反応管に移し、ヘキサン 0.5 mL で 3 回洗い込んだ。硫酸処理したヘキサン層を窒素気流下乾固し、減圧下終夜で乾燥した。次に、五塩化アンチモンを 0.5 mL 加え、封管した後、200 °C で 3 時間加熱し完全塩素化した。室温まで冷却した後、開管し水浴で冷却しながら、クロロホルム 2 mL を加えてよく攪拌した。さらに、冷却下 20% 塩酸 0.5 mL を加え攪拌し、さらに 20% 塩酸 2 mL を加えてよく攪拌した。3,000 rpm で 1 分間遠心分離し、塩酸層を取り除き、同様に 20% 塩酸 2 mL で 2 回洗浄した。同様の操作で、蒸留水 2 mL、5% 酒石酸水溶液 2 mL、5% 炭酸水素ナトリウム 2 mL、蒸留水 2 mL の順で各 1 回ずつ洗浄した。得られたクロロホルム層は無水硫酸ナトリウム (1.5 g) を充填したパスツールピペットに通して脱水し、ヘキサン 1 mL で 2 回洗い込んだ後、さらにヘキサン 4 mL で溶出した。溶出液を窒素気流下乾固し、ヘキサン 1 mL に溶解させた。この溶液を活性化したアルミナ (0.25 g)、無水硫酸ナトリウム (0.2 g) を積層したパスツールピペットに負荷し、2% ジク

ロロメタン/ヘキサン 1 mL で 2 回洗い込んだ後、4 mL で溶出した。溶出液は 10 mL の先細スピッツ管にとり、窒素気流下乾固した。ノナン 0.2 mL を加えて攪拌し、最終検液とした (Fig. 2)。

実験結果及び考察

1. 分析法の改良、添加回収試験及び定量下限値

分析法は芦塚らの報告をもとにさらなる簡便化を試みた。簡便化を行う上ではまず、アルカリ分解に着目した。これまで用いてきたアルカリ分解は血液試料に高濃度塩基を加え加熱還流する手法であるが、冷却管を用いるため一度に処理できる件数が限られること、また、加熱中に突沸が起りやすいなどの課題があった。これに対して、堀らは血液中 PCB の分析におけるアルカリ分解の温度を検討し、30 °C で分解を行う低温アルカリ分解法を報告している⁷⁾。そこで、PCQ の分析においても低温アルカリ分解法が適応可能と考えた。30 °C、終夜でアルカリ分解を行った結果、ECD/GC のクロマトグラムにアルカリ分解温度の違いによる変化は見られず、低温アルカリ分解法が適応可能であることが確認でき、これまでの倍以上の検体を同時に処理することが可能となった。使用する器具や無水硫酸ナトリウムはダイオキシンフリーオーブンをを用いて加熱処理することができた。また、これまで最終検液はヘキサン溶液としてきたが、溶媒の揮発による濃縮が懸念されるため、1日に測定する件数を制限してきた。そこで、最終検液を高沸点のノナン溶液へと変更し、長時間の連続分析が可能か検討した。その結果、溶媒の違いによる定量値の違いは見られ

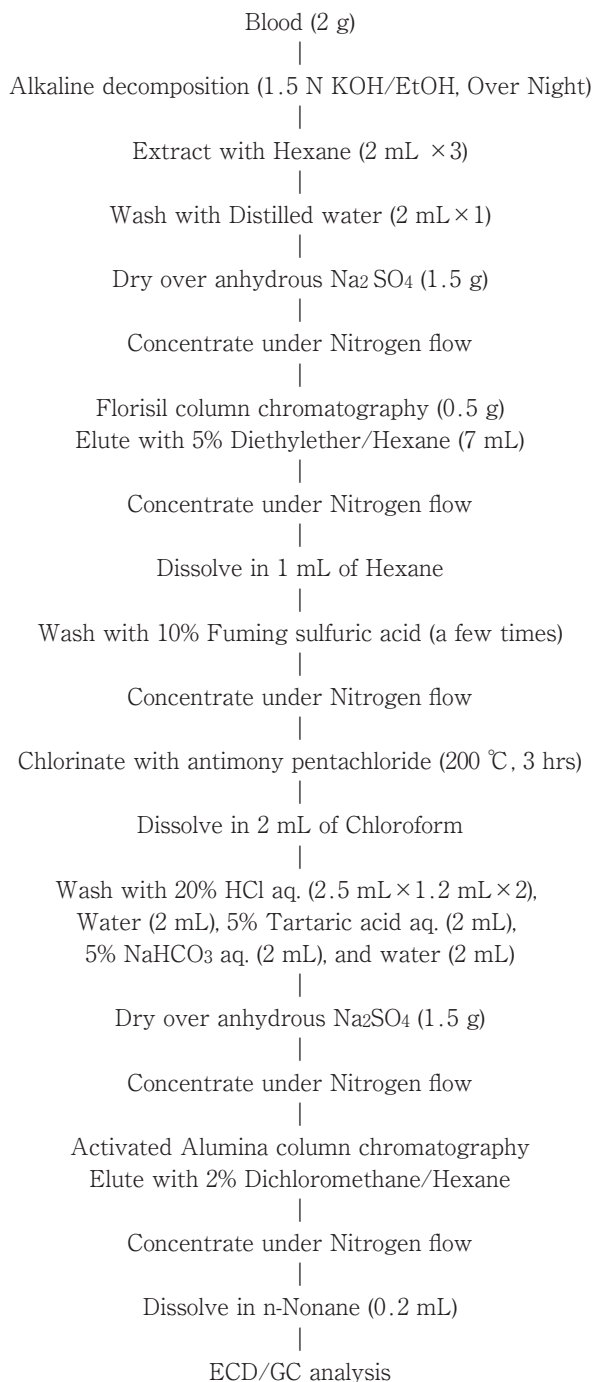


Fig. 2 Analysis procedure of PCQ

ず、長時間の連続分析でも溶媒の揮発による濃縮は見られなかった。これらの改良を行うことで、検査の全体的な効率を向上させることができた。

次に、分析法の精度を確認するため、PCQ が検出されていない保存血液 (< 0.02 ppb) を用いて添加回収試験を行った。添加回収試験では被験者によって血液の成分組成が異なることを考慮して、3名の血液に対し、血液中濃度が 0.02 ng/g と

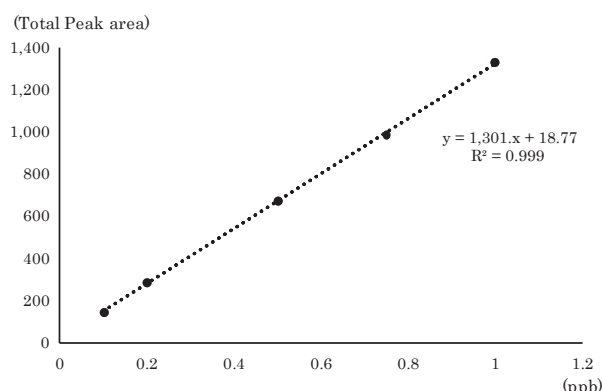
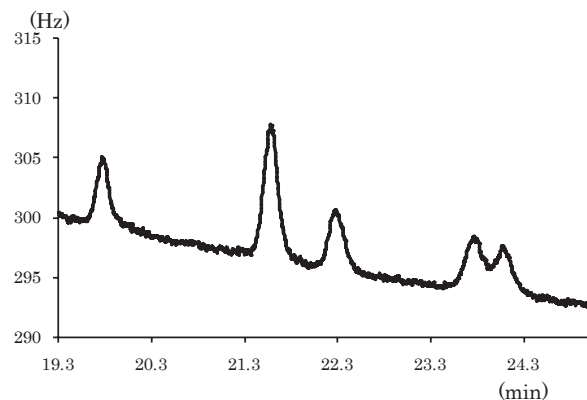


Fig. 3 ECD/GC chromatogram of PCQ standard of quantitation lower limit (0.2 ppb) and calibration curve (0.1–1.0 ppb, 5 points).

るように PCQ 標準溶液を添加し試験を実施した。その結果、回収率は平均 110.8% (100.1–127.2%) で、良好な結果が得られた。

油症検診における PCQ 測定においては少なくとも 0.2 ppb (血液中濃度換算で 0.02 ppb) を定量できる精度が必要となる。そこで、定量下限値付近の標準溶液を繰り返し測定し、推定検出限界値を見積もった。その結果、99%信頼区間として算出した推定検出限界値は 0.026 ppb (血液中濃度換算で 0.0026 ppb) であり、油症検診に求められる定量下限値は十分に満たしていると考えられた。また、ECD/GC で測定した 0.2 ppb 標準溶液 (血液中濃度換算で 0.02 ppb) のシグナルは十分な感度 (S/N 比 > 10) が得られており、検量線は 0.1–1.0 ppb の範囲で良好な直線性を示した (Fig. 3)。

2. PCQ 測定結果

2014–2016 年度に実施された油症一斉検診では 87 名 (延べ 143 名) の PCQ 分析を実施した。そ

の中で PCQ が検出されたのは 11 名（認定患者 1 名，未認定者 10 名）であり，血液中の濃度範囲は認定患者で 5.49-6.15 ppb，未認定者で 0.02-0.07 ppb であった。

次に，受診者の血液中 PCQ 濃度を PCB パターン別に解析を行った。PCB パターンは 4 つに分類されており，A パターンは油症に典型的，C パターンは一般人と同様であり，B パターンは A パターンと C パターンの中間，BC パターンは B パターンと C パターンの中間（一般人との区別が困難）とされている。各年度における PCB パターン及び PCQ 濃度のまとめを Table 2 に示した。A パターンの受診者は 1 名（延べ 3 回測定）でポジティブコントロールとして毎年測定を行っている認定患者であり，血液中 PCQ 濃度は平均 5.78 ppb (5.49-6.15 ppb) と極めて高濃度であった。B パターンや BC パターンの受診者は 12 名（延べ 18 回測定）で，うち 2 名（延べ 4 回測定）から PCQ が検出された。血液中濃度は全て同じで 0.02 ppb であった。C パターンの受診者は 74 名（延べ 122 回測定）で，うち 8 名（延べ 12 回測定）から PCQ が検出された。血液中濃度は平均 0.03 ppb (0.02-0.07 ppb) であった。

これらの結果から，典型的な油症患者では今もなお高い PCQ 濃度が検出されることが示された。一方で，PCB が B パターンのような一般人とは異なるパターンを示す場合でも PCQ が検出されないまたは，検出されても低濃度である事例がほとんどであった。また，PCB が C パターンであるにも関わらず，PCQ 濃度が 0.07 ppb と比較的高い濃度で検出される事例も見られた。

3. PCQ の構造異性体割合の違い

ECD/GC で PCQ を測定すると 5 本のピークに分離されて検出される (Fig. 4)。これら 5 本のピーク面積の比率は，原因ライスオイルから抽出した PCQ スタンダードと血液から抽出したものとで異なることが測定上の知見として得られている。すなわち，PCQ スタンダードのピーク面積比率はおおよそ，2,2'-PCQ : 2,3'-PCQ : 2,4'-PCQ : 3,3'-PCQ : 3,4'-PCQ = 1 : 2 : 1 : 1 : 1 であるのに対して，血液中 PCQ ではおおよそ 1 : 2 : 1 : 1 : 2 となっており，3,4'-PCQ の比率が相対的に高く，この傾向は PCQ が検出された全ての血液で認め

られた。このように比率が異なる要因を考察するうえで，竹中らは 6 種類全ての骨格の PCQ をラットに経口投与し，その薬物動態について報告している⁸⁾。その中で，それぞれの PCQ に対する，血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) と平均滞留時間 (MRT) は Table 3 に示す結果であり，骨格の違いにより薬物動態が大きく異なる知見を得ている。

また，Mochiike らは油症原因ライスオイルの分析を行い，6 種類の骨格の異なる PCQ の異性体割合が，2,2'-PCQ : 2,3'-PCQ + 2,4'-PCQ : 4,4'-PCQ : 3,3'-PCQ : 3,4'-PCQ = 9.2 : 57.8 : 0.6 : 16.2 : 16.2 であり，4,4'-PCQ の比率が低いことを報告している⁹⁾。

これらの報告から，3,4'-PCQ は原因油中に比較的多く含まれ，他の構造異性体と比較し体内に吸収されやすく，血液中に長く留まる性質を持っていると考えられた。このため，血液中では 3,4'-PCQ の割合が多く，油症原因ライスオイルを摂取し，体内に PCQ が取り込まれた所見として特徴的なものだと考えられた。一方で，4,4'-PCQ は AUC, MRT 共に最も値の高い構造異性体であったが，原因ライスオイル中の含有量が低いため，検出されにくいと考えられた。

4. PCB 濃度と PCQ 濃度の推移

ポジティブコントロールとして毎年測定を行っている油症認定患者 (1 名) の PCB 及び PCQ 濃度の経年推移を Fig. 5 に示した。PCB 濃度は各年に多少の増減があるが全体的に減少傾向を示し，当初の 40 年間で約 80% の減少が見られた。しかし直近 10 年間ではほぼ一定であり，減少傾向は見られなかった。PCQ 濃度については当初の 30 年間で約 30% の減少が見られたが，PCB と比較し減少速度がかなり遅いことが明らかとなった。また，直近 20 年間ではほとんど減少傾向が見られなかった。

油症原因ライスオイルには PCB よりも PCQ の方が 0.89-3.46 倍多く含有しており，油症患者は PCQ を多く摂取していたことが分かっている³⁾。一方で，油症検診の結果から血液中では多くの場合 PCB 濃度の方が PCQ 濃度よりも数十倍高濃度であることが分かっている。また，マウスに PCB や PCQ を経口投与した実験では吸収

Table 2 Relationship between PCB pattern and PCQ concentration.

PCQ Conc. (ppb)	PCB Pattern											
	2014				2015				2016			
	A	B	BC	C	A	B	BC	C	A	B	BC	C
0.1 <	1				1				1			
0.02-0.1		1		3		2		3		1		6
ND (0.02 <)		2	2	50		3	1	34		1	5	26

Table 3 AUC and MRT parameter of PCQ congeners⁸⁾.

	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$)	MRT (hr)
4,4'-PCQ	1.24	1,760
3,4'-PCQ	0.111	159
3,3'-PCQ	0.015	84.7
2,4'-PCQ	0.022	52.8
2,3'-PCQ	0.007	92.9
2,2'-PCQ	0.041	64.0

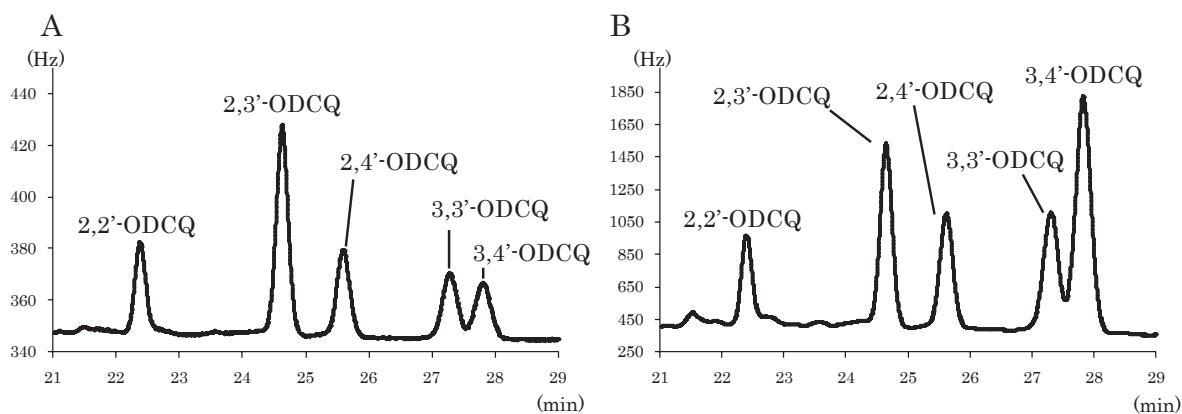
**Fig. 4** ECD/GC chromatograms of PCQ standard (A) and PCQ in blood (B).**Fig. 5** Time course of PCB and PCQ concentration in positive control blood.

Table 4 Time course of concentration ratio of PCB and PCQ in patient.

Year	PCB Conc. (ppb)	PCQ Conc. (ppb)	PCB : PCQ Ratio
1985	26	8.3	100 : 32
1986	25	8.1	100 : 32
1987	31	8.5	100 : 27
1988	32	9.4	100 : 29
1991	17.5	7.4	100 : 43
1992	19.3	7.7	100 : 40
1993	25.9	7.3	100 : 28
1994	24	7.2	100 : 30
1996	13.5	6.4	100 : 47
1997	9.0	9.0	100 : 100
1999	13.3	5.7	100 : 43
2000	13.8	5.3	100 : 38
2001	11.4	5.1	100 : 45
2004	5.8	4.2	100 : 72
2011	6.9	3.9	100 : 57
2013	7.9	5.4	100 : 68
2014	5.8	5.7	100 : 99
2015	5.9	5.5	100 : 93
2016	6.0	6.2	100 : 102

Conc. : concentration

Table 5 Concentration ratio of PCB and PCQ in ten of Yusho-suspected persons.

	Age	PCB Pattern	PCB Conc. (ppb)	PCQ Conc. (ppb)	PCB : PCQ Ratio
A	46	C	0.31	0.02	100 : 6.5
B	55	C	0.25	0.07	100 : 28
C	57	B	0.46	0.02	100 : 4.4
D	57	C	1.2	0.05	100 : 4.2
E	59	C	1.0	0.05	100 : 4.8
F	62	C	0.65	0.02	100 : 3.1
G	71	C	0.88	0.03	100 : 3.4
H	73	C	1.0	0.02	100 : 2.0
I	76	C	0.54	0.03	100 : 5.5
J	89	B	2.4	0.02	100 : 0.85

Conc. : concentration

率はPCBの方が高く、PCQは6日間で96.7%が排出されたことが報告されている¹⁰⁾。これらの結果を総合的に考えると、PCQは経口摂取してもほとんどが吸収されず体外へ排出されるが、一度吸収されると排出が困難な化合物と考えられた。

次に、この油症認定患者のPCBとPCQの濃度比についてまとめた結果をTable 4に示した。樫本らは油症原因ライスオイル暴露後11年が経過した油症認定患者の血液中PCB:PCQ比は平均100:34であり、健常者では平均100:<1であったことを報告している³⁾。本研究で測定した暴露

後約17年経過時の油症認定患者のPCB:PCQ比は100:32であり、報告値と同様であった。また、濃度比の経年変化を見ると両者の比率は徐々に近づき、現在ではほぼ1:1になっていることが分かった。このことは、Fig. 5の考察と同様に両化合物の排出速度の違いによるものと考えられる。

また、2014-2016年度の油症検診でPCQが検出された受診者のPCB:PCQ比をまとめた結果をTable 5に示した。PCB:PCQ比は平均100:6.3であり、油症認定患者と比較すると割合が低いが、健常者とは異なる比率であった。受診者の

1名 (Table 5 の B) は PCB パターンが C パターンで, PCB : PCQ 比は 100 : 28 と PCQ の割合が高い事例であった。一方で, J のように PCB パターンが B パターンで PCB : PCQ 比が 100 : 0.85 と低い事例も見られた。PCB は高齢になるほど濃度が高くなる年齢との相関が報告されているが¹¹⁾, PCQ については年齢との相関があるとは考えられなかった。PCB : PCQ 比についても年齢との相関は確認できず, さらなる調査が必要であると考えられた。

総 括

PCQ 分析法の改良では, 低温アルカリ分解法を新たに用い, 器具の加熱処理など分析法全体を見直すことで迅速化を行うことができた。

2014-2016 年度に実施された油症一斉検診受診者 87 名 (延べ 143 名) の PCQ 検査を実施した結果, 11 名 (延べ 19 名) から PCQ が検出された。PCB パターンが B パターンや BC パターンのように一般人とは異なるパターンが見られる場合でも, 0.1 ppb を超える高い濃度は検出されなかった。

典型的な油症認定患者の PCQ 濃度経年変化を見ると, 若干の減少傾向が見られるものの, 油症発生後まもなく 50 年が経過するという今日でも高濃度に残留していることが分かった。このことから, 血液中 PCQ 濃度は PCB や PCDF 濃度と同様に油症診断を確実なものとする化学的知見として重要な役割を有すると考えられた。

様々な臨床的知見と PCQ などの化学的知見を長期的かつ総合的に解析することは, 油症認定患者ならびに検診受診者の健康状態を把握し, 症状緩和のための知見となり得るため, 今後も継続的に調査を行っていくことが重要であると思われる。

謝 辞

本研究は, 厚生労働科学研究費補助金に負うものである。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克巳, 増田義人: 油症原因油および油症患者血液中の PCB, PCQ および PCT, 福岡医誌 70 : 126-131, 1985.
- 2) 飯田隆雄, 竹中重幸, 中川礼子, 深町和美, 高橋克巳, 旭正一: 正常者の血液中ポリ塩化クアテルフェニル濃度, 福岡医誌 78 : 305-308, 1987.
- 3) 榎本隆: 油症と環境汚染における Polychlorinated Quaterphenyl (PCQ) の挙動, ファルマシア 17 : 512-517, 1981.
- 4) 前田浩一郎, 榎本隆: 大阪府立公衆衛生研究所報告 食品衛生編, 9, 89, 1978.
- 5) 飯田隆雄, 深町和美, 竹中重幸, 中川礼子, 高橋克巳: ポリ塩化クアテルフェニルのキャピラリーガスクロマトグラフィーによる定量, 分析化学 37 : 230-235, 1988.
- 6) 芦塚由紀, 中川礼子, 平川博仙, 堀就英, 飯田隆雄: 油症検診における血液中ポリ塩化クアテルフェニルの分析, 福岡医誌 96 : 227-231, 2005.
- 7) 堀就英, 山本貴光, 石黒靖尚, 飯田隆雄, 梶原淳睦, 平田輝昭, 内博史, 古江増隆: 血液中 PCB 異性体分離分析におけるアルカリ分解温度の検討, 福岡医誌 104 : 152-160, 2013.
- 8) Takenaka S, Takahashi K and Masuda Y : Pharmacokinetics of polychlorinated quaterphenyl congeners in rats after an oral dose, Chemosphere 15 : 739-745, 1986.
- 9) Mochiike A, Sakamoto I and Hoshita N : Synthesis of Octadecachloroquaterphenyls and ratio of six types of polychlorinated quaterphenyl isomers in the blood of "Yusho" patients, Chem. Pharm. Bull. 31 : 3994-4000, 1983.
- 10) 堀伸二郎, 榎本隆, 国田信治: ラットにおける PCQ (Polychlorinated Quaterphenyl) の生体内分布および排せつ, 食衛誌 21 : 294-300, 1980.
- 11) 堀就英, 安武大輔, 芦塚由紀, 高橋浩司, 梶原淳睦, 平田輝昭, 内博史, 古江増隆: 福岡県油症検診 (2007-2010 年度) 受診者における血液中 PCB 濃度と傾向, 福岡医誌 102 : 134-139, 2011.

(Received for publication March 10, 2017)

Deans Switch 型 SilFlow を用いた血中ダイオキシン類測定における ソルベントカット大量注入法の開発

¹⁾福岡県保健環境研究所

²⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

³⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

安武大輔¹⁾, 飛石和大¹⁾, 平川博仙¹⁾, 新谷依子¹⁾, 小木曾俊孝¹⁾,
堀 就英¹⁾, 梶原淳睦¹⁾, 香月 進¹⁾, 三苦千景²⁾³⁾, 古江増隆²⁾³⁾

Development of Solvent-Cut Large-Volume Injection System using Deans Switch Type SilFlow for Dioxin Determinations in Blood

Daisuke YASUTAKE¹⁾, Kazuhiro TOBISHI¹⁾, Hironori HIRAKAWA¹⁾, Yoriko SHINTANI¹⁾,
Toshitaka KOGISO¹⁾, Tsuguhide HORI¹⁾, Jumboku KAJIWARA¹⁾, SUSUMU KATSUKI¹⁾,
Chikage MITOMA²⁾³⁾ and Masutaka FURUE²⁾³⁾

¹⁾*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, Fukuoka, Japan*

²⁾*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka, Japan*

³⁾*Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan*

Abstract

We developed solvent-cut large-volume injection system (SCLV) using Deans switch type SilFlow in dioxins measurement of human blood. The SilFlow worked in the same mechanism as the conventional SCLV for dioxins measurement, showed high reproducibility in dioxins measurement of the standard solution and the control sample. Since the SilFlow has very small dead volume as compared with the conventional method, the influence of contamination is small, and the handling is easy. In this study, we proved that SilFlow is available for an alternative to SCLV in blood dioxins analysis.

Key words : Yusho, Dioxin, SCLV, SilFlow

はじめに

1968年に発生した油症はポリ塩化ビフェニル(PCB)およびダイオキシン類による複合中毒事件である。事件から40年以上経過した近年でも、2012年9月に「カネミ油症患者に関する施策の総合的な推進に関する法律」が施行され、同年12月に油症診断基準に「同居家族の油症患者に関する条件」が追補され、油症を取り巻く環境は大きく

変遷している。

Polychlorodibenzofuran (PCDF)は毒性が高く油症の主な原因物質であり、2004年に血液中の2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF)値が油症診断基準に追加され、油症検診において血中ダイオキシン類の測定が行われている。

ダイオキシン類測定では高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(以下、HRGC/HRMS)が使用

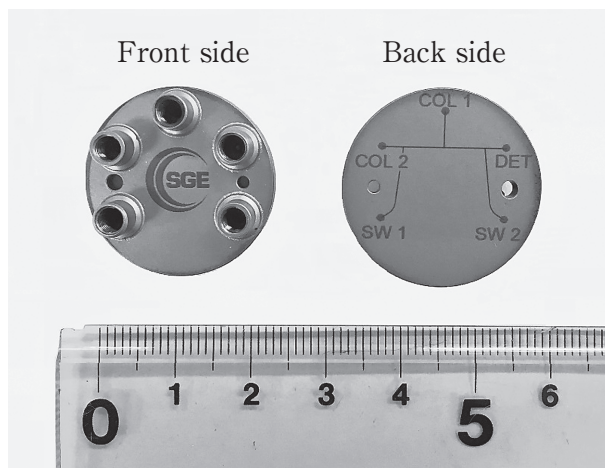


Fig. 1 Deans switch type SilFlow

されている。戸高らはSGE社製溶剤カット大量注入システム（以下、SCLV）を備えたHRGC/HRMSを用いて高感度なダイオキシン類測定を実現させ、少量の血液からのダイオキシン類の測定を可能とした¹⁾。さらに、戸高らはアイステイサイエンス社製胃袋型インサート付大量注入装置（以下、LVI）とSCLVを組み合わせ（以下、LVI-SCLV）、装置への注入量を20倍に向上させ、血中ダイオキシン類測定のさらなる簡略化、高感度化を可能とした²⁾。上記したように、SCLVは油症検診における血中ダイオキシン類測定のキーデバイスの一つである。

LVI-SCLVでは、下記の4つの工程で試料をMSに導入する仕組みになっている。①LVIにより導入された試料はプレカラムで保持され、②GCオープンの昇温により、プレカラムにダイオキシン類を保持させたまま大量な溶媒や低沸点化合物をパージラインから排出させる。③パージラインを閉止し、ダイオキシン類をコールドトラップへ導入する。④すべてのダイオキシン類をコールドトラップした後、パージラインを開放し、プレカラムに残存した夾雑物を排出する。同時に、オープンを降温させ、コールドトラップを解除し、再度、オープンを昇温することでダイオキシン類をMS部に導入する。しかし、LVI-SCLVシステムではキャピラリーカラム等の接続箇所が多く、漏れの可能性が高く、漏れが生じた場合、その原因を除去することに多くの労力を必要とする。また、SCLVが販売中止となっているため、血中の

ダイオキシン類を高感度に測定するには、SCLVに代わる代替システムが必要である。

Deans Switchは圧力バランスによるバルブレススイッチであり、複数のカラムを用いた分析、特定成分のハートカットやGC分取、および2つのカラムへの流路切り替えに利用可能である³⁾⁴⁾。近年、半導体技術の応用によってガスクロマトグラフに利用可能なマイクロフローデバイスが開発されている。Deans Switch型のマイクロフローチャンネルデバイスも販売されており、その応用例も報告されている⁵⁾。我々は、Deans Switch型マイクロフローチャンネルデバイスとしてFig. 1に示すようなTrajan社製のDeans Switch型SilFlow（以下、SilFlow）を使用し、SCLVと同等な血中のダイオキシン類の高感度測定が可能か検討した。

実験方法

1. 試薬

ダイオキシン類分析に使用した有機溶媒およびその他の試薬類は関東化学社製のダイオキシン類分析用を用いた。活性炭カラムは、ナカライテスク社から購入した活性炭と無水硫酸ナトリウムを混合し、調製された。ダイオキシン類分析のクリーンアップスパイクとして毒性等価係数（TEF）を持つダイオキシン類の¹³C₁₂-ラベル化体を用いた。これらはWellington Laboratories社から購入した。シリンジスパイクとして1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-¹³C₁₂（Welling-

ton Laboratories 社製) を用いた. さらに, ダイオキシン類の定量用標準物質として Wellington Laboratories 社製混合標準溶液を用いた. また, コントロール試料として日水製薬社製の精度管理用凍結プール血清, L-コンセーラ II を使用した.

2. 分析方法

ヒト血中のダイオキシン類の抽出, 精製は戸高らの報告に従って実施した¹⁾. 試料約 5 g を精秤し, クリーンアップスパイクを添加し, 高速溶媒抽出により血液からダイオキシン類を抽出した. 抽出液を硫酸処理, 硝酸銀シリカゲルカラムにより精製した. 次いで, 活性炭カラムにより不純物を除去し, トルエンによりダイオキシン類を分画した. 溶出したトルエンを濃縮し, シリンジスパイクを添加し, 約 200 μL のトルエン溶液を測定検液とした.

ダイオキシン類濃度測定には高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC/HRMS), HP6890

(Agilent Technologies 社製) / Autospec Premier (Waters 社製) を用いた. GC 注入口には胃袋型インサートを用いた大量注入装置であるアイスティサイエンス社製の LVI-S200 (以下, LVI) を使用した. また, ソルベントカット大量注入法として LVI および SilFlow を結合させた HRGC/HRMS の測定システム (以下, LVI-SilFlow) を用いた. LVI-SCLV では, プレカラムには SGE 社製の BPX-5 (ϕ 0.25 mm \times 7 m, 膜厚 0.25 μm), 分析カラムには SGE 社製の BPX-Dioxin-I (ϕ 0.15 mm \times 30 m) を使用した. ダイオキシン類の測定条件を Table 1 に示す. ダイオキシン類測定では, 測定検液 100 μL を LVI に導入し, 分解能 10,000 以上で定量した.

結果および考察

1. LVI-SilFlow と LVI-SCLV (従来法) の比較

Fig. 2 に LVI-SilFlow の概略図を示す. LVI-

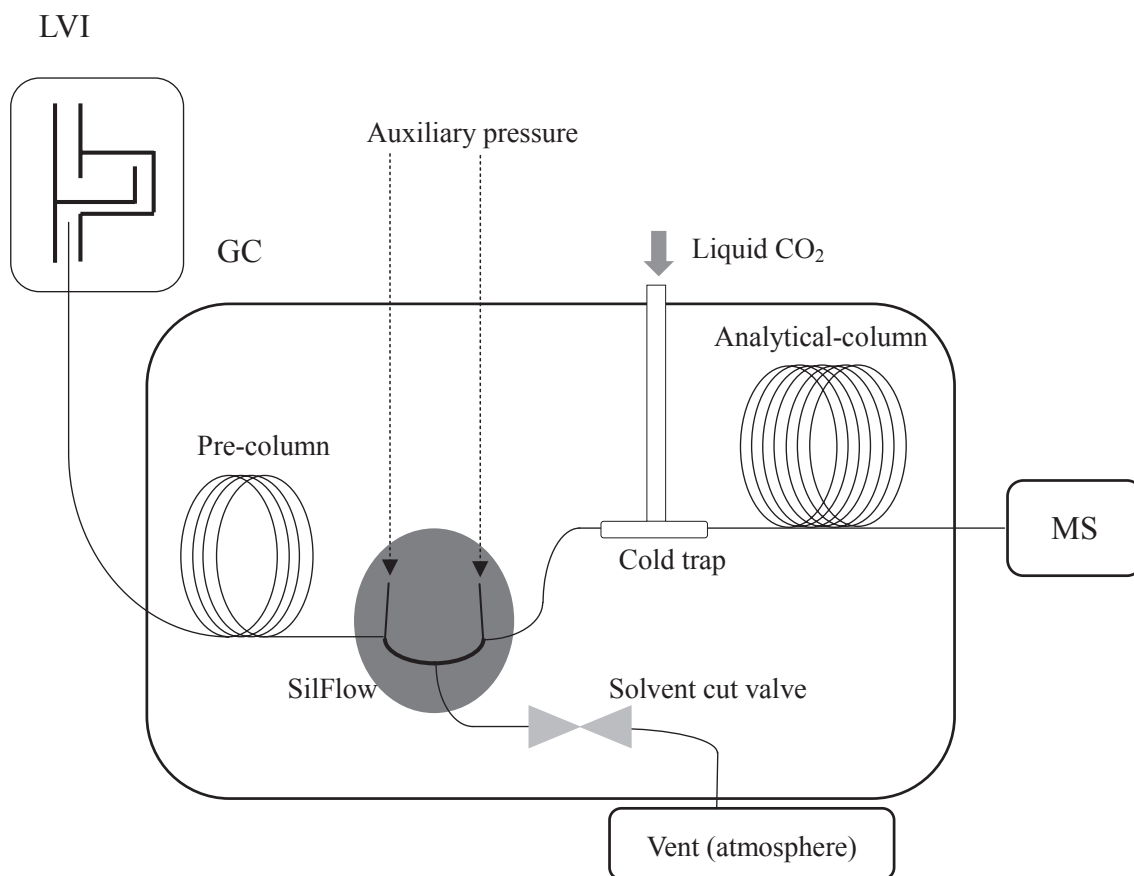


Fig. 2 Principle of LVI-SilFlow system

Table 1 Condition of LVI, SilFlow, and GC/MS

PTV conditons					
PTV	LVI-S200 (AiSTI science Co. Ltd.)				
Purge time	1 min				
Vent flow	300 mL/min				
Programmed temperature		Rate	Temperature	Hold	
	1st		120°C	1 min	
		120 °C/min	290 °C	20.3 min	
GC conditions					
Gas chromatograph	Model 7890A (Agilent Technologies Ltd.)				
Pre-column	BPX-5 (SGE Ltd.) (7 m × 0.25 mm I.D. × φ 0.25 mm)				
Analytical column	BPX-DIOXIN-I (SGE Ltd.) (30 m × 0.15 mm I.D.)				
Carrier gas	He				
Oven temperature		Rate (°C/min)	Temperature (°C)	Hold (min)	
			160	4.5	
	1st	20	300	12	
	2nd	70	195	0.5	
	3rd	3.5	300	1.5	
Inlet pressure		Rate (kPa/min)	Pressure (kPa)	Hold (min)	
			469	4.5	
	1st	302	620	18.5	
	2nd	112	508	1	
	3rd	3.73	620	1.5	
Auxiliary pressure #1		Rate (kPa/min)	Pressure (kPa)	Hold (min)	
			445	4.5	
	1st	333	610	18.5	
	2nd	128	482	1	
	3rd	4.25	690.5	1.5	
Auxiliary pressure #2		Rate (kPa/min)	Pressure (kPa)	Hold (min)	
			443.5	4.5	
	1st	333	610	18.5	
	2nd	128	482	1	
	3rd	4.27	610		
MS conditions					
Mass Spectrometer	AutoSpec Premier (Waters Co. Ltd.)				
Ion source temperature	280°C				
Ionization voltage	28 eV				
ionization current	750 μA				
Ionization mode	EI +				
Accelerating voltage	8 kV				
Resolution	> 100000				
		Native		Labeled	
	TeCDDs	319.8965	321.8936	331.9368	333.9339
	PeCDDs	353.8576	355.8546	365.8978	367.8949
	HxCDDs	387.8186	389.8156	399.8589	401.8559
	HpCDDs	423.7767	425.7737	435.8169	437.814
	OCDD	457.7377	459.7348	469.778	471.775
Monitor ion	TeCDFs	303.9016	305.8987	315.9419	317.9389
(m/z)	PeCDFs	339.8597	341.8568	351.9	353.897
	HxCDFs	373.8207	375.8178	385.861	387.858
	HpCDFs	407.7818	409.7788	419.822	421.8191
	OCDF	441.7428	443.7398	453.783	455.7801
	TeCBs	289.9224	291.9194	301.9626	303.9597
	PeCB	323.8834	325.8804	335.9237	337.9207
	HxCB	357.8444	359.8415	369.8847	371.8817

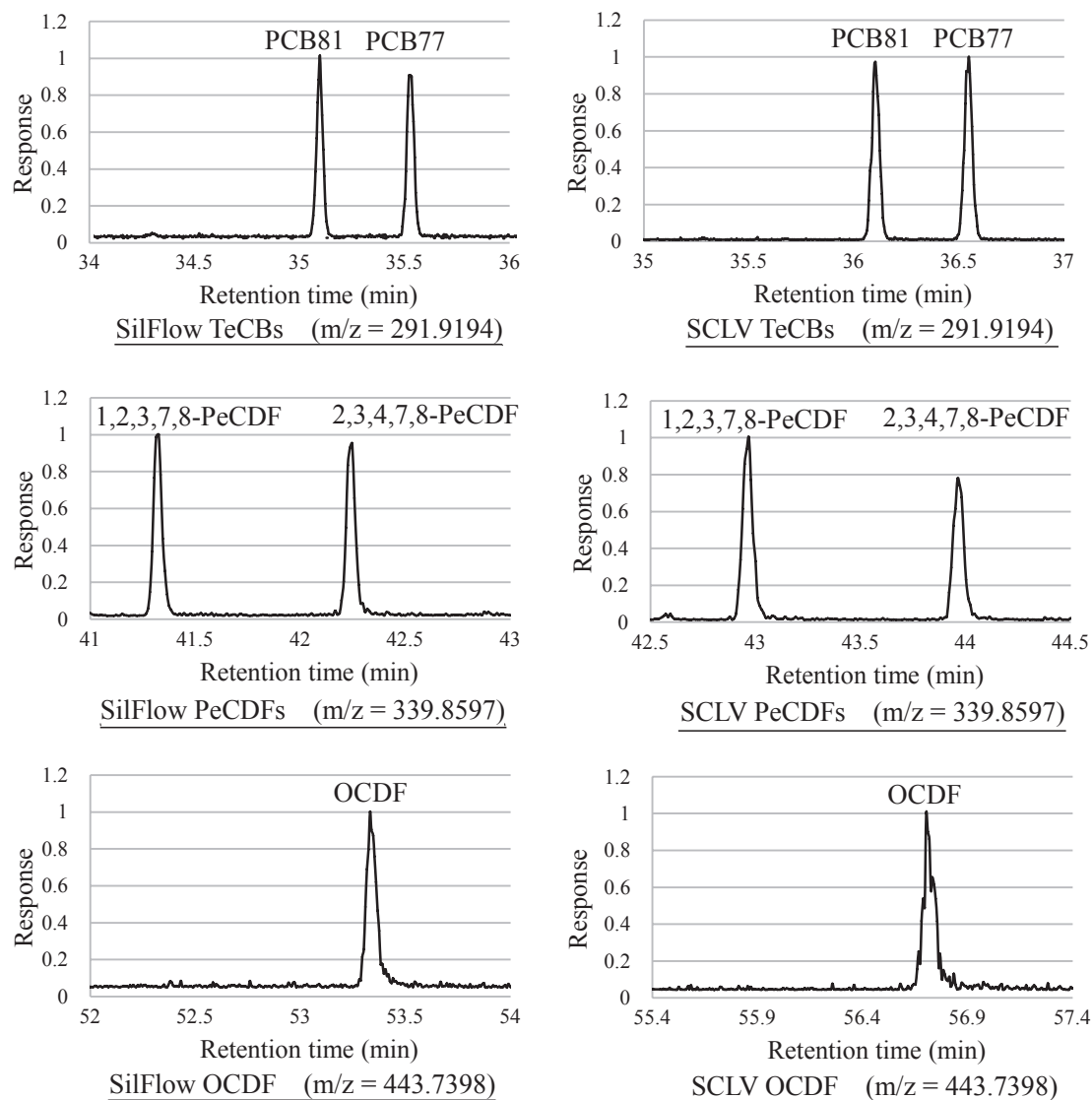


Fig. 3 Mass chromatograms of TeCBs, PeCDFs, and OCDF

SilFlow では、装置に注入された試料は先に述べた LVI-SCLV と同様に 4つの工程を経て MS 部に導入される。

LVI-SilFlow システムにおいて 0.0025 ng/mL のダイオキシン類標準溶液を 100 μ L 注入して得られたマスクロマトグラムと、LVI-SCLV システムにおいて得られたマスクロマトグラムを Fig. 3 に示す。なお、Fig. 3 では測定対象のダイオキシン類で最初に検出される tetrachlorobiphenyls (TeCBs)、診断基準に使用されている pentachlorodibenzofurans (PeCDFs) および最後に検出される octachlorodibenzofuran (OCDF) のマスクロマトグラムを示した。両システムの比較が容易なように同じ m/z のマスクロマトグラムを並

列して記載した。Fig. 3 に示すように両システムとも同様なマスクロマトグラムが得られた。一般的なキャピラリーカラムでは、測定対象物質の中で 3,4,4',5-tetrachlorobiphenyl (以下、PCB81) が最も早くプレカラムから溶出し、OCDF が最後に溶出する。SCLV では、プレカラムから溶出する PCB81 から OCDF までを分析カラムへ導き、それ以外の夾雑物は系外へ排出される。Fig. 3 に示すように両システムとも同様なマスクロマトグラムが得られたことから、SilFlow でも SCLV と同じ機構で作動していることが分かった。両システムでは大量な溶媒を注入しているため、溶媒蒸気が質量分析計の真空度に影響を与える可能性があるが、両システムとも真空度の変動が非常に少

なく、SilFlowにおいても溶媒カットが機能していることが分かった。

SilFlowの流路の内壁は高不活性化処理されており、ダイオキシン類が吸着しにくい。また、Silflowではデッドボリウムが非常に小さい構造となっており、キャピラリーカラムとの接続には金属製フェラルのSilTiteが使用されているため、コンタミネーションのリスクが低減された。さらに、SilTite FingerTiteにより手締めで簡単に接続が可能であり、SCLVと比較して接続部分が少なく、測定システムでの漏れのリスクが低減された。

2. LVI-SilFlowを用いた標準物質およびコントロール試料中のダイオキシン類測定における再現性の評価

我々は、血中ダイオキシン類の測定において1バッチあたりコントロール試料を含む24試料を同時に抽出、精製を行い、HRGC/HRMSで分析している。その際、毎回、標準物質およびコントロール試料をHRGC/HRMSで測定し、解析結果から各測定の妥当性を評価している。ここでは、LVI-SilFlowシステムを用いて8バッチの血中ダイオキシン類を測定したときの各バッチの標準物質の相対感度係数(以下、RRF)をTable 2に、各バッチのコントロール試料の測定結果をTable 3に示す。なお、コントロール試料の濃度は、脂肪量測定における誤差を除外するため、湿重量ベースで算出した。

血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル⁶⁾では、RRFの変動は前回の測定時と比較して±20%以内であることと規定されている。Table 2では、8バッチの標準物質の測定結果から得られた各同族体のRRFの平均値も示し、各測定におけるRRFは平均値と比べ-10.5%~12.5%の範囲内にあり、±20%以内であった。したがって、SilFlowにおいても再現性良くダイオキシン類の安定な測定が可能であった。

Table 3では8バッチ分のコントロール試料の測定結果に加えて、各同族体の平均値、標準偏差(SD)および相対標準偏差(CV)を示す。血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアルでは、二重測定の結果は各同族体の実測濃度と実測濃度の平均値との差が50%以内であることを要求してい

る。Table 3に示すように各同族体のCVは最小で4.1%、最大で12.1%であり、SilFlowでも再現性の良い血中ダイオキシン類測定が可能であった。SilFlowではハートカットのタイミングのズレによりPCB81およびOCDF濃度が減少する可能性があるが、これらの同族体においても変動は小さかった。また、TEFを持つダイオキシン類の総濃度および毒性等価量(TEQ)の相対標準偏差はそれぞれ3.0%および3.2%であり、高い再現性を示した。また、このコントロール試料は戸高らがLVI-SCLVで測定し報告したのと同様であり、そのダイオキシン類濃度は0.063 pg-TEQ/gであり²⁾、今回我々が報告した濃度(0.067 pg-TEQ/g)と同等であった。以上のことから、SilFlowはこれまで使用してきたSCLVに代替可能であり、血中のダイオキシン類の測定に適用できると考えられる。

総 括

Deans Switch型SilFlowを使用し、SCLVと同様な血中のダイオキシン類の高感度測定が可能か検討した。血中のダイオキシン類測定においてDeans Switch型SilFlowは、従来から使用しているSCLVと同様な機構で作動し、標準物質およびコントロール試料の測定でも再現性の高い結果が得られた。SilFlowは従来法と比べて、非常に小さいデッドボリウムのため、コンタミネーションの影響が小さく、取り扱いも容易であり、SCLVの代替として適用可能であることが証明できた。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)に負うものである。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Todaka T: New protocol of dioxins analysis in human blood. Fukuoka Acta Med. 94: 148-157, 2003.
- 2) Todaka T, Uchi H, Hirakawa H, Kajiwara J and Furue M: Development of a newly large-volume injection system for dioxin determinations in blood of yusho patients. Fukuoka Acta Med. 104: 110-117, 2013

Table 2 Reproducibility of relative response factor using LVI-SilFlow system in dioxin measurement

Congener	Relative Response Factor (RRF)										Average	Min. RRF/ Average (%)	Max. RRF/ Average (%)
	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5	n = 6	n = 7	n = 8	Average				
2,3,7,8-TCDD	1.013	0.995	1.039	1.006	0.884	0.986	1.001	0.976	0.988	0.988	89.5	105.2	
1,2,3,7,8-PeCDD	0.923	0.888	0.907	0.821	0.952	0.903	0.882	0.890	0.896	0.896	91.6	106.3	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.908	0.987	0.937	0.948	0.969	0.904	0.885	1.005	0.943	0.943	93.9	106.6	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.786	0.819	0.857	0.920	0.880	0.845	0.805	0.905	0.852	0.852	92.2	107.9	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.794	0.903	0.899	0.895	0.877	0.908	0.920	1.008	0.901	0.901	88.1	112.0	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1.160	1.040	1.094	1.102	1.170	1.187	1.081	1.087	1.115	1.115	93.2	106.5	
OCDD	0.990	1.033	1.046	1.088	0.971	1.011	1.053	1.197	1.049	1.049	92.6	114.2	
2,3,7,8-TCDF	0.920	1.118	0.925	0.999	0.976	1.003	0.964	0.971	0.984	0.984	93.4	113.6	
1,2,3,7,8-PeCDF	0.934	0.912	0.932	1.022	0.911	1.012	0.921	0.898	0.943	0.943	95.3	108.4	
2,3,4,7,8-PeCDF	1.068	1.008	0.995	0.955	1.058	1.104	0.981	1.043	1.026	1.026	93.1	107.5	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.956	1.063	1.007	1.000	0.939	0.968	0.945	0.992	0.984	0.984	95.4	108.0	
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.912	0.935	1.008	0.932	0.988	0.924	0.974	0.909	0.948	0.948	95.9	106.4	
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.038	1.041	1.006	1.032	1.014	1.121	1.044	1.180	1.060	1.060	94.9	111.4	
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.049	1.065	1.086	0.999	1.097	1.028	1.046	1.070	1.055	1.055	94.7	104.0	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.927	1.003	0.944	1.013	0.917	1.046	0.896	0.939	0.961	0.961	93.3	108.9	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.049	1.014	1.094	1.066	0.974	0.989	0.984	0.949	1.015	1.015	93.5	107.8	
OCDF	0.952	0.978	1.061	0.902	0.901	0.985	0.896	0.870	0.943	0.943	92.2	112.5	
3445-TCB (PCB81)	0.936	0.950	0.916	0.947	0.916	0.950	0.932	0.966	0.939	0.939	97.5	102.9	
3344'-TCB (PCB77)	1.025	1.025	1.021	1.019	1.046	1.006	1.027	1.062	1.029	1.029	97.8	103.2	
33'44'5-PerCB (PCB126)	1.132	1.037	1.110	1.102	1.063	1.084	0.979	1.066	1.072	1.072	91.3	105.6	
33'44'55'-HxCB (PCB169)	0.926	0.845	0.954	0.927	0.888	0.995	0.897	0.973	0.926	0.926	91.3	107.5	

Table 3 Reproducibility of dioxin concentration in control sample using LVI-SilFlow system

Congeners	Concentrations (pg/g)								Mean	SD	CV
	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5	n = 6	n = 7	n = 8			
2,3,7,8-TCDD	0.0042	0.0043	0.0046	0.0040	0.0046	0.0042	0.0045	0.0040	0.0043	0.00022	5.0%
1,2,3,7,8-PeCDD	0.016	0.019	0.017	0.020	0.018	0.016	0.019	0.018	0.018	0.0012	6.7%
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.021	0.017	0.022	0.020	0.018	0.019	0.017	0.022	0.020	0.0018	9.3%
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.15	0.18	0.17	0.14	0.15	0.15	0.16	0.14	0.16	0.013	8.5%
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.026	0.027	0.024	0.024	0.029	0.027	0.032	0.025	0.027	0.0025	9.2%
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.37	0.39	0.37	0.33	0.40	0.35	0.47	0.47	0.40	0.048	12.1%
OCDD	2.4	2.4	2.5	2.3	2.5	2.4	2.3	2.2	2.4	0.099	4.1%
2,3,7,8-TCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,2,3,7,8-PeCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2,3,4,7,8-PeCDF	0.015	0.016	0.020	0.018	0.019	0.020	0.015	0.018	0.018	0.0018	10.4%
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.020	0.023	0.027	0.021	0.022	0.026	0.023	0.021	0.023	0.0023	10.3%
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.020	0.022	0.023	0.018	0.021	0.021	0.019	0.018	0.020	0.0016	7.8%
2,3,4,6,7,8-HxCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.042	0.049	0.054	0.044	0.048	0.045	0.048	0.052	0.048	0.0039	8.1%
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
344'5-TCB(PCB81)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
33'44'-TCB(PCB77)	0.097	0.091	0.10	0.083	0.098	0.094	0.100	0.083	0.093	0.0066	7.0%
33'44'5-PenCB(PCB126)	0.062	0.063	0.073	0.059	0.060	0.066	0.070	0.057	0.064	0.0052	8.2%
33'44'55'-HxCB(PCB169)	0.050	0.058	0.062	0.058	0.061	0.055	0.057	0.054	0.057	0.0036	6.4%
Total PCDDs	3.0	3.1	3.1	2.9	3.1	3.0	3.0	2.9	3.0	0.086	2.9%
Total PCDFs	0.12	0.13	0.14	0.12	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.0074	5.7%
Total PCDDs/PCDFs	3.1	3.2	3.3	3.0	3.3	3.1	3.1	3.0	3.1	0.092	2.9%
Total Non-ortho-PCBs	0.22	0.23	0.25	0.21	0.23	0.23	0.24	0.21	0.23	0.013	5.5%
Total	3.4	3.4	3.5	3.2	3.5	3.4	3.4	3.2	3.4	0.10	3.0%
TEQ from PCDDs	0.045	0.050	0.048	0.046	0.047	0.045	0.050	0.047	0.047	0.0017	3.6%
TEQ from PCDFs	0.010	0.011	0.012	0.011	0.012	0.012	0.011	0.011	0.011	0.00072	6.4%
TEQ from PCDDs/PCDFs	0.056	0.061	0.060	0.057	0.059	0.057	0.060	0.058	0.059	0.0017	3.0%
TEQ from Non-ortho-PCBs	0.0077	0.0081	0.0091	0.0077	0.0078	0.0083	0.0088	0.0073	0.0081	0.00058	7.1%
Total-TEQ	0.063	0.069	0.069	0.065	0.067	0.065	0.069	0.065	0.067	0.0021	3.2%

- 3) Deans D R : An improved technique for back-flushing gas chromatographic columns. *J. Chromatogr. A.* 18 : 477-481, 1965.
- 4) Deans D R : Use of heart cutting in gas chromatography : A review. *J. Chromatogr. A.* 203 : 19-28, 1981.
- 5) Boeker P, Leppert J, Mysliwietz B, and Lammer P : Comprehensive theory of Deans' switch as a variable flow splitter : fluid mechanics, mass balance, and system behavior. *Anal. Chem.* 85 : 9021-9030, 2013.
- 6) 厚生労働省医薬局審査管理課 : 血液中のダイオキシン類暫定マニュアル (平成 12 年 12 月)

(Received for publication March 10, 2017)

油症における甲状腺機能の検討

¹⁾西日本短期大学 社会福祉学科

²⁾若杉病院西日本総合医学研究所

³⁾若杉病院内科

辻 博¹⁾²⁾, 蓮尾 裕³⁾

Thyroid Function in Patients with Yusho

Hiroshi TSUJI¹⁾²⁾ and Yutaka HASUO³⁾

¹⁾Faculty of Social Welfare, Nishi-nippon Junior College

²⁾Nishinippon Research Institute of Medical Science, Wakasugi Hospital

³⁾Department of Internal Medicine, Wakasugi Hospital

Abstract

To investigate chronic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) on thyroid functions, serum concentrations of thyroid stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄) and free T₄ were studied in serum of 197 patients with Yusho and 42 control subjects in 2015. Serum levels of T₃ were decreased in patients with Yusho compared with controls. A significant relationship between concentrations of PCB in the blood and serum levels of T₃ was observed, while there was no correlation between blood PCB concentrations and TSH, T₄ or free T₄ levels. Serum levels of T₃ were significantly decreased in the subjects with high PCB concentrations compared with those with low PCB concentrations. Furthermore, serum levels of T₃ were significantly decreased in the subjects with high 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) concentrations compared with those with low 2,3,4,7,8-PeCDF concentrations. We conclude that serum T₃ levels decrease in patients with Yusho, and it may be associated with PCBs and 2,3,4,7,8-PeCDF in the blood.

Key words : Yusho, thyroid function, PCB, PCDF

はじめに

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³⁾。油症発生以来40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)~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攪乱物質として正常なホルモン作用を攪乱し、生殖機能の

Corresponding author : Hiroshi TSUJI
Faculty of Social Welfare, Nishi-nippon Junior College, Fukuoka 1-3-1, Chuo-ku, Fukuoka 810-0066, Japan
Tel : + 81-92-721-1141 Fax : + 81-92-721-1536
E-mail : tsuji@nishitan.ac.jp

障害、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⁾。油症患者における甲状腺機能については油症発生16年後の1984年度福岡県油症一斉検診において対照者に比ベトリヨードサイロニンおよびサイロキシンの上昇を認めることが報告されている¹⁰⁾。さらに、1996年度福岡県油症一斉検診では血中PCB濃度が高値の油症患者において抗サイログロブリン抗体が高頻度に認められた¹¹⁾。抗サイログロブリン抗体は慢性甲状腺炎やGraves病などの自己免疫性甲状腺疾患に高率に出現することより、油症患者では甲状腺機能の経過を注意深く追跡する必要があると考えられた。

今回、2015年度福岡県油症一斉検診において油症における甲状腺機能の経過を追跡するために甲状腺機能検査を行い、油症原因物質であるPCBおよび2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF)の甲状腺機能に対する慢性的影響について検討した。

対象および方法

2015年度福岡県油症一斉検診の受診者245例にアンケートによるインフォームドコンセントを実施し、甲状腺機能検査に同意が得られた239例を対象者とした。採血は午前中の空腹時に行った。甲状腺機能検査として甲状腺刺激ホルモン(TSH)、トリヨードサイロニン(T_3)、サイロキシン(T_4)および遊離サイロキシン(Free T_4)は電気化学発光免疫測定(Electrochemiluminescence Immunoassay: ECLIA)法(エクルーシス試薬TSH, エクルーシス試薬 T_3 , エクルーシス試薬 T_4 IIおよびエクルーシス試薬FT $_4$, ロシュ・ダイアグノスティックス社)によりモジュラーアナリティクスE170(日立ハイテクノロジーズ社)にて測定した。

PCBの測定は福岡県保健環境研究所、福岡市保健環境研究所、北九州市環境科学研究所および北九州生活科学センターで、2,3,4,7,8-PeCDFの測定は福岡県保健環境研究所で行った。血中PCB濃度は2015年度福岡県油症一斉検診において測定した239例の測定値を用い、血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度は2015年度福岡県油症一斉検診に最も近い時期に測定した2012年度21例、2013年度73例、2014年度69例、2015年度76例の計

239例の測定値を用い、TSH、 T_3 、 T_4 およびFree T_4 との関連について検討した。

結果は平均±標準偏差(mean ± S.D.)で表し、平均値の比較については t 検定で、異常値の出現頻度の比較は χ^2 検定で行った。

結 果

2015年度福岡県油症一斉検診を受診し、甲状腺機能検査に同意が得られた239例の内訳は女性132例、男性107例、平均年齢は63.4 ± 14.9(8-96)歳であり、油症患者172例、油症発生当時に油症患者と同居し、カネミ倉庫製のPCB等が混入していた当時の米ぬか油を摂取した油症患者(同居家族)25例、未認定患者41例、観察者1例であった。血中PCB濃度と年齢の間に有意の正の相関($r=0.5479$, $P < 0.001$)を、血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度と年齢の間に有意の正の相関($r=0.3524$, $P < 0.001$)を認めた。

同居家族を含む油症患者197例について観察者を含む未認定患者42例を対照者としてTSH、 T_3 、 T_4 およびFree T_4 の異常値の出現頻度について検討した。TSH値の上昇は油症患者13例(6.6%)、対照者5例(11.9%)に、低下は油症患者4例(2.0%)、対照者2例(4.7%)に、 T_3 値の上昇は油症患者2例(1.0%)、対照者3例(7.1%)に、低下は油症患者6例(3.0%)、対照者2例(4.8%)に認め、いずれも出現頻度に差をみなかった。 T_4 値の上昇は油症患者、対照者ともにみられなかった。 T_4 値の低下を油症患者19例(9.6%)と最も多く認めたが、対照者2例(4.8%)と出現頻度に差をみなかった。Free T_4 値の上昇は油症患者1例(0.5%)、対象者1例(2.4%)に、低下は油症患者5例(2.5%)、対照者1例(2.4%)に認め、いずれも出現頻度に差をみなかった。TSH、 T_3 、 T_4 あるいはFree T_4 のいずれか1項目以上の異常値を認めたものは油症患者35例(17.8%)、対照者11例(26.2%)であり、出現頻度に差をみなかった。そして、TSH値の上昇およびFree T_4 値の低下を認める甲状腺機能低下症は油症患者に4例(2.0%)、対照者に1例(2.4%)が認められ出現頻度に差をみなかった。また、TSH値の低下およびFree T_4 値の上昇を認める甲状腺機能亢進症は油症患者にはみられず、対照者の1例(2.4%)に認められた。

Table 1 TSH, T₃, T₄ and Free T₄ levels in patients with Yusho and in controls

No.		Yusho 197	Controls 42
TSH	(μ IU/ml)	2.56 \pm 1.76	7.32 \pm 31.66
T ₃	(ng/ml)	1.09 \pm 0.18*	1.21 \pm 0.34
T ₄	(μ g/dl)	7.71 \pm 1.28	7.99 \pm 1.54
Free T ₄	(ng/dl)	1.21 \pm 0.16	1.21 \pm 0.25

* $P < 0.05$ compared with controls.**Table 2** Correlation coefficients between TSH or thyroid hormone levels and PCB concentration in blood

	r
TSH	0.053
T ₃	- 0.206*
T ₄	- 0.065
Free T ₄	- 0.108

* $P < 0.005$.**Table 3** TSH and thyroid hormone levels in subjects with high and low PCB concentrations

No.		PCB concentration	
		≥ 1.0 ppb 95	< 1.0 ppb 144
TSH	(μ IU/ml)	4.79 \pm 21.05	2.47 \pm 1.91
T ₃	(ng/ml)	1.06 \pm 0.16*	1.15 \pm 0.25
T ₄	(μ g/dl)	7.81 \pm 1.22	7.73 \pm 1.40
Free T ₄	(ng/dl)	1.19 \pm 0.18	1.22 \pm 0.19

* $P < 0.001$ vs. blood PCB concentration < 1.0 ppb.

油症患者 197 例および対照者 42 例の甲状腺機能について検討した (Table 1). TSH 値は油症患者において $2.56 \pm 1.76 \mu\text{IU/ml}$ と対照者 $7.32 \pm 31.66 \mu\text{IU/ml}$ に比べ低い傾向を認めたが両群間に差をみなかった. T₃ 値は油症患者において $1.09 \pm 0.18 \text{ ng/ml}$ と対照者 $1.21 \pm 0.34 \text{ ng/ml}$ に比べ有意の低下を認めた ($P < 0.05$). T₄ 値は油症患者 $7.71 \pm 1.28 \mu\text{g/dl}$, 対照者 $7.99 \pm 1.54 \mu\text{g/dl}$ であり, Free T₄ 値は油症患者 $1.21 \pm 0.16 \text{ ng/dl}$, 対照者 $1.22 \pm 0.25 \text{ ng/dl}$ であり, ともに両群間に差を認めなかった.

2015 年度福岡県油症一斉検診受診者 239 例について血中 PCB 濃度と甲状腺機能の関連について検討した (Table 2). 血中 PCB 濃度と TSH 値

との間に相関はみられず ($r=0.053$), T₃ 値との間に有意の負の相関を認めた ($r=-0.206$, $P < 0.005$). 血中 PCB 濃度と T₄ 値 ($r=-0.065$), Free T₄ 値 ($r=-0.108$) との間に相関をみなかった.

血中 PCB 濃度 1.0 ppb 以上の 95 例を PCB 高濃度群, 血中 PCB 濃度 1.0 ppb 未満の 144 例を PCB 低濃度群として両群間の甲状腺機能について検討した (Table 3). PCB 高濃度群の平均血中 PCB 濃度は 1.72 ± 0.87 ppb, PCB 低濃度群の平均血中 PCB 濃度は 0.52 ± 0.26 ppb であった. TSH 値は PCB 高濃度群において $4.79 \pm 21.05 \mu\text{IU/ml}$, PCB 低濃度群において $2.47 \pm 1.91 \mu\text{IU/ml}$ と両群間に差をみなかった. T₃ 値は PCB

Table 4 TSH and thyroid hormones levels in subjects with high and low PCB concentrations, born in or before 1968

No.		PCB concentration	
		≥ 1.0 ppb 95	< 1.0 ppb 117
TSH	(μ IU/ml)	4.79±21.05	2.64±1.93
T ₃	(ng/ml)	1.06± 0.16*	1.11±0.19
T ₄	(μ g/dl)	7.81± 1.22	7.73±1.36
Free T ₄	(ng/dl)	1.19± 0.18	1.20±0.17

* $P < 0.05$ vs. blood PCB concentration < 1.0 ppb.**Table 5** TSH and thyroid hormone levels in subjects with high and low 2,3,4,7,8-PeCDF concentrations

No.		2,3,4,7,8-PeCDF concentration	
		≥ 30 pg/g lipids 95	< 30 pg/g lipids 144
TSH	(μ IU/ml)	2.62±1.80	3.90±17.16
T ₃	(ng/ml)	1.07±0.16*	1.14±0.25
T ₄	(μ g/dl)	7.62±1.26	7.86±1.37
Free T ₄	(ng/dl)	1.21±0.17	1.20±0.19

* $P < 0.005$ vs. blood PCB concentration < 30

高濃度群において 1.06 ± 0.16 ng/ml と PCB 低濃度群 1.15 ± 0.25 ng/ml に比べ有意の低下を認められた ($P < 0.001$). T₄ 値は PCB 高濃度群において 7.81 ± 1.22 μ g/dl, PCB 低濃度群において 7.73 ± 1.40 μ g/dl, Free T₄ 値は PCB 高濃度群において 1.19 ± 0.18 ng/dl, PCB 低濃度群において 1.22 ± 0.19 ng/dl であり, ともに両群間に差をみなかった. そして, 油症が発生した 1968 年および以前に誕生した 2015 年度福岡県油症一斉検診の受診者 212 例について血中 PCB 濃度 1.0 ppb 以上の 95 例を PCB 高濃度群, 血中 PCB 濃度 1.0 ppb 未満の 117 例を PCB 低濃度群として両群間の甲状腺機能について検討した (Table 4). PCB 高濃度群の平均血中 PCB 濃度は 1.72 ± 0.87 ppb, PCB 低濃度群の平均血中 PCB 濃度は 0.59 ± 0.24 ppb であった. TSH 値は PCB 高濃度群において 4.79 ± 21.05 μ IU/ml, PCB 低濃度群において 2.64 ± 1.93 μ IU/ml と両群間に差をみなかった. T₃ 値は PCB 高濃度群において 1.06 ± 0.16 ng/ml と PCB 低濃度群 1.11 ± 0.19 ng/ml に比べ有意の低下を認められた ($P < 0.05$). T₄ 値は PCB 高濃度群において 7.81 ± 1.22 μ g/dl, PCB 低濃

度群において 7.73 ± 1.36 μ g/dl, Free T₄ 値は PCB 高濃度群において 1.19 ± 0.18 ng/dl, PCB 低濃度群において 1.20 ± 0.17 ng/dl であり, ともに両群間に差をみなかった.

2015 年度福岡県油症一斉検診受診者 239 例について血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と甲状腺機能の関連について検討した. 血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と TSH 値 ($r = -0.009$), T₃ 値 ($r = -0.078$), T₄ 値 ($r = -0.007$), Free T₄ 値 ($r = -0.066$) との間に相関をみなかった.

血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 30 pg/g lipids 以上の 95 例を血中 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群, 30 pg/g lipids 未満の 144 例を低濃度群として両群間の甲状腺機能について検討した (Table 5). 血中 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群の平均血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 192.8 ± 212.9 pg/g lipids, 低濃度群の平均血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 13.6 ± 6.9 pg/g lipids であった. TSH 値は 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群において 2.62 ± 1.80 μ IU/ml, 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群において 3.90 ± 17.16 μ IU/ml と 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群に高い傾向を認められたが両群間に差をみなかつ

た。T₃値は2,3,4,7,8-PeCDF高濃度群において1.07±0.16 ng/mlと2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群1.14±0.25 ng/mlに比べ有意の低下を認めた(P < 0.005)。T₄値は2,3,4,7,8-PeCDF高濃度群において7.62±1.26 μg/dl、2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群において7.86±1.37 μg/dl、Free T₄値は2,3,4,7,8-PeCDF高濃度群において1.21±0.17 ng/dl、2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群において1.20±0.19 ng/dlであり、ともに両群間に差をみなかった。

考 察

甲状腺機能へのPCBの影響についてはPCBを投与した実験動物に甲状腺機能低下や甲状腺腫がみられることが報告されている。PCB (Aroclor 1254)を投与したラットに¹²⁵I-T₄を投与すると対照に比べ血中¹²⁵I-T₄値が速やかに低下し、胆汁中に主としてグルクロン酸抱合を受けた¹²⁵I-T₄の排泄が増加することが報告されている¹²⁾。そして、PCB投与による血中T₄値の低下は下垂体のTSH分泌を促進し、血中TSH値の上昇により甲状腺重量の増加が認められることが報告されている¹³⁾。さらに、PCBを投与したラットや marmoset monkey において甲状腺ろ胞細胞の腫大、過形成、甲状腺ろ胞の縮小などの組織学的変化が報告されており¹⁴⁾¹⁵⁾、血中TSH値の上昇によるものと考えられる。しかし、PCBの投与による甲状腺機能低下や甲状腺の組織学的変化は可逆的なものであり、投与中止により改善することが報告されている¹⁶⁾。PCB投与による甲状腺の機能低下および組織学的変化は、PCBの投与中止により改善する急性あるいは亜急性中毒症状と考えられる。また、PCBによる甲状腺機能低下の機序としてPCBやPCDFの水酸化体とT₄との構造類似性によるT₄結合蛋白質への結合が阻害されることが報告されている¹⁷⁾。

油症患者における甲状腺機能に対する慢性的影響について、油症発生16年後の1984年度福岡県油症一斉検診において油症患者124例と対照者43例を比較し油症患者にT₃値およびT₄値の有意の上昇を認めることが報告されている¹⁰⁾。そして、油症発生28年後の1996年度福岡県油症一斉検診において油症患者81例を対象に甲状腺機能を検討し、TSH値の低下を2例(2.5%)に、上

昇を7例(8.6%)に、T₃値の低下を1例(1.2%)に、T₄値の低下を1例(1.2%)に、上昇を1例(1.2%)に認めた¹¹⁾。血中PCB濃度が3.0 ppb未満の油症患者40例と3.0 ppb以上の41例の甲状腺機能異常および甲状腺自己抗体の出現頻度を比較しTSH値、T₃値およびT₄値には差をみなかったが、血中PCB濃度が3.0 ppb以上の油症患者に有意に高頻度の抗サイログロブリン抗体の出現を認めた。抗サイログロブリン抗体陽性者の血中TSH値は陰性者に比べ高く、血中TSH値の上昇を認める抗サイログロブリン抗体陽性者では原発性甲状腺機能低下症に陥る頻度が高いとの報告がみられる¹⁸⁾¹⁹⁾。血中PCB高濃度の油症患者において抗サイログロブリン抗体を有意に高頻度に認めることより、甲状腺機能の経過を注意深く追跡する必要があると考えられた。そして、油症発生34年後の2002年度福岡県油症一斉検診において油症患者115例を対象に甲状腺機能検査所見を検討し、TSH値、T₃値あるいはT₄値のいずれか1項目以上の異常を認めたものは20例(17.4%)であり、TSH値の低下を6例(5.2%)に、上昇を13例(11.3%)と最も多く認め、T₄値の上昇を1例(0.9%)に認めた。TSH値の上昇を認めた13例では全例T₃値およびT₄値は正常であり潜在性の甲状腺機能低下状態と考えられた²⁰⁾。

油症における甲状腺機能の経過を追跡するために2015年度福岡県油症一斉検診受診者239例において甲状腺機能を検討した。同居家族を含む油症患者において対照者に比べT₃値の有意の低下を認めた。そして、血中PCB濃度とT₃値の間に有意の負の相関を認めた。また、2015年度福岡県油症一斉検診受診者239例において血中PCB濃度1.0 ppb以上の群では1.0 ppb未満の群に比べT₃値の有意の低下を認めた。T₃値は加齢とともに低下することが報告されている²¹⁾。血中PCB濃度と年齢の間には正の相関を認めることよりPCB高濃度群におけるT₃値の低下は加齢による可能性も考えられる。しかしながら、油症が発生した1968年以前に誕生した212例についての甲状腺機能の検討においても血中PCB濃度1.0 ppb以上の群では1.0 ppb未満の群に比べT₃値の有意の低下を認めた。PCBのT₃に対する慢性的影響については、2011年度福岡県油症一斉検診

を受診した 190 例について甲状腺機能検査を行い、血中 PCB 濃度と T_3 の間に有意の負の相関を認め、血中 PCB 濃度 1.0 ppb 以上の群では 1.0 ppb 未満の群に比べ T_3 の有意の低下を認めた²²⁾。今回の検討においても血中 PCB 濃度と T_3 値の間に有意の負の相関を認め、PCB 高濃度群では PCB 低濃度群に比べ T_3 値の有意の低下を認めたことより、その機序は不明であるが PCB の T_3 に対する慢性的影響が示唆される。

血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と甲状腺機能の関連について血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と TSH 値、 T_3 値、 T_4 値、Free T_4 値との間に相関をみななかったが、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 30 pg/g lipids 以上の高濃度群において 30 pg/g lipids 未満の低濃度群に比べ TSH 値、 T_4 値および Free T_4 値は両群間に差をみななかったが、 T_3 値は 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群において 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ有意の低下を認めた。2,3,4,7,8-PeCDF の T_3 に対する慢性的影響が示唆される。

2015 年度福岡県油症一斉検診受診者における甲状腺機能の検討において油症患者において対照者に比べ T_3 値の有意の低下を認め、血中 PCB 濃度と T_3 値の間に有意の負の相関を認めた。そして、血中 PCB 濃度あるいは血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の 2015 年度福岡県油症一斉検診受診者において T_3 値の低下を認めた。しかしながら、油症患者における T_3 値の基準値未満の低下は対照者と出現頻度に差をみななかったことより血中 PCB 濃度あるいは血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者に認められる T_3 値の低下の多くは潜在性のものと考えられる。PCB および 2,3,4,7,8-PeCDF の T_3 に対する慢性的影響が示唆されるがその機序は不明であった。油症患者における甲状腺機能の追跡およびさらなる検討が必要と思われる。

総 括

2015 年度福岡県油症一斉検診の受診者 239 例 (油症患者 172 例、油症患者 (同居家族) 25 例、未認定患者 41 例、観察者 1 例) において甲状腺機能検査として TSH、 T_3 、 T_4 および Free T_4 を測定した。同居家族を含む油症患者 197 例において対照者 42 例に比べ T_3 値の有意の低下を認めた。

そして、血中 PCB 濃度と T_3 値の間に有意の負の相関を認めた。また、福岡県油症一斉検診受診者において血中 PCB 濃度 1.0 ppb 以上の群では血中 PCB 濃度 1.0 ppb 未満の群に比べ T_3 値の有意の低下を認めた。1968 年以前に誕生した福岡県油症一斉検診受診者についても血中 PCB 濃度 1.0 ppb 以上の群では血中 PCB 濃度 1.0 ppb 未満の群に比べ T_3 値の有意の低下を認めた。血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と TSH 値、 T_3 値、 T_4 値、Free T_4 値との間に相関をみななかったが、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 30 pg/g lipids 以上の群において 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 30 pg/g lipids 未満の群に比べ T_3 値の有意の低下を認めた。

参 考 文 献

- 1) Masuda Y and Yoshimura H : Polychlorinated biphenyls and dibenzo-furans in patients with Yusho and their toxicological significance : A Review. Amer. J. Ind. Med. 5 : 31-44, 1984.
- 2) Oishi S, Morita M and Fukuda H : Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 43 : 13-22, 1978.
- 3) Gonzalez FJ, Liu SY and 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, 飛石和夫, 松枝隆彦, 堀就英, 中川礼子, 古江増隆 : 油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査 (2001 年). 福岡医誌 94 : 126-135, 2003.
- 8) Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP and Becker JL : Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Fundam. Appl. Toxicol. 21 : 433-441, 1993.
- 9) Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y and Kato S : Modulation of oestrogen receptor signalling by association

- with the activated dioxin receptor. *Nature* 423 : 545-550, 2003.
- 10) 村井宏一郎, 辻 博, 梶原英二, 赤木公博, 藤島正敏 : 油症患者の甲状腺機能. *福岡医誌* 76 : 233-238, 1985.
 - 11) 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.
 - 12) Bastomsky CH : Effects of a polychlorinated biphenyl mixture (Aroclor 1254) and DDT on biliary thyroxine excretion in rats. *Endocrinology* 95 : 1150-1155, 1974.
 - 13) Bastomsky CH : Goitres in rats fed polychlorinated biphenyls. *Can J Physiol Pharmacol* 55 : 288-292, 1977.
 - 14) Collins Jr WT, Capen CC, Kasza L, Carter C and Dailey RE : Effect of polychlorinated biphenyl (PCB) on the thyroid gland of rats. Ultra-structural and biochemical investigations. *Am J Pathol* 89 : 119-136, 1977.
 - 15) Van den Berg KJ, Zurcher C and Brouwer A : Effects of 3,4,3',4'- tetrachlorobiphenyl on thyroid function and histology in marmoset monkeys. *Toxicol Lett* 41 : 77-86, 1988.
 - 16) Collins Jr WT, Capen CC, Kasza L, Carter C and Dailey RE : Effect of polychlorinated biphenyl (PCB) on the thyroid gland of rats. Ultra-structural and biochemical investigations. *Am J Pathol* 89 : 119-136, 1977.
 - 17) Brouwer A : Inhibition of thyroid hormone transport in plasma of rats by polychlorinated biphenyls. *Arch Toxicol (Suppl)* 13 : 440-445, 1989.
 - 18) Gordin A, Heinonen OP, Saarinen P and Lamberg BA : Serum-thyrotrophin in symptomless autoimmune thyroiditis. *Lancet* 1 : 551-554, 1972.
 - 19) Tunbridge WMG, Brewis M, French JM, Appleton D, Bird T, Clark F, Evered DC, Evans JG, Hall R, Smith P, Stephenson J and Young E : Natural history of autoimmune thyroiditis. *Br Med J* 282 : 258-262, 1981.
 - 20) 辻 博, 伊東靖夫 : 油症患者における甲状腺機能の検討. *福岡医誌* 94 : 103-107, 2003.
 - 21) Peeters RP : Thyroid hormones and aging. *Hormones (Athens)* 7 : 28-35, 2008.
 - 22) 辻 博 : 油症における甲状腺機能および自己抗体の検討. 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業「食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究」平成 21~23 年度総合研究報告書, 平成 23 年度総括・分担研究報告書 (研究代表者: 古江増隆) pp. 98-103, 2012.

(Received for publication March 21, 2017)

カネミ油症におけるダイオキシン類の排出速度研究の進展

¹⁾奈良県立医科大学 公衆衛生学講座

²⁾福岡県保健環境研究所

³⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

⁴⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

松本伸哉¹⁾, 赤羽 学¹⁾, 神奈川芳行¹⁾, 梶原淳睦²⁾,
三苦千景³⁾⁴⁾, 内 博史³⁾, 古江増隆³⁾⁴⁾, 今村知明¹⁾

The Progress of Excretion Rate of Dioxin-Like-Compounds in Yusho

Shinya MATSUMOTO¹⁾, Manabu AKAHANE¹⁾, Yoshiyuki KANAGAWA¹⁾, Jumboku KAJIWARA²⁾,
Chikage MITOMA³⁾⁴⁾, Hiroshi UCHI³⁾, Masutaka FURUE³⁾⁴⁾ and Tomoaki IMAMURA¹⁾

¹⁾Department of Public Health, Health Management and Policy, Nara Medical
University School of Medicine

²⁾Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

³⁾Department of Dermatology, Graduate School of Medical Science, Kyushu University

⁴⁾Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital

Abstract

Yusho, the mass food poisoning, occurred in western Japan in 1968. PCBs and dioxin like compounds such as PCDDs and PCDFs were detected as causal chemicals of Yusho. The Yusho Study Group has conducted annual check-ups for Yusho victims for more than 45 years. Measurement of blood concentration of dioxins became possible on 2002. In this paper, we report the latest findings of the Yusho study regarding the half-lives of dioxins, and discuss the prospects for study of dioxin half-lives in Yusho victims.

Key words : Yusho, Dioxins, Half-life,

はじめに

1960年代のカネミ油症事件、1970年代の台湾 Yu-Cheng と、食品中に混入したダイオキシン類による健康被害が発生している¹⁾²⁾。当初は PCB が原因と考えられていたが、研究の結果、現在では、2,3,4,7,8-PeCDF が原因であると考えられている^{1)~5)}。原因物質であるダイオキシン類は、いったん体内に取り込まれると排出されにくく、長期に亘り健康被害が持続している。

体内に取り込まれたダイオキシン類の排泄速度

は、濃度や体内総量に比例して代謝・排泄されるものと想定されることから、半分になるまでの期間を半減期として評価している。1年間で減少する割合の逆数に定数をかけたものが半減期である。

筆者らのグループは、油症患者におけるダイオキシン類の排出速度に関する研究を行ってきた^{6)~8)}。その結果、既存の研究とは、排出速度が異なることを報告してきた。本論文では、我々のグループが行ってきた排出速度の研究について、解説を行う。

Corresponding author : Shinya MATSUMOTO

Department of Public Health, Health Management and Policy, Nara Medical University School of Medicine Faculty of Medicine, 840 Shijocho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan

Tel : + 81-744-22-3051 Fax : + 81-744-22-0037



図1 ダイオキシン類の摂取と排出の模式図

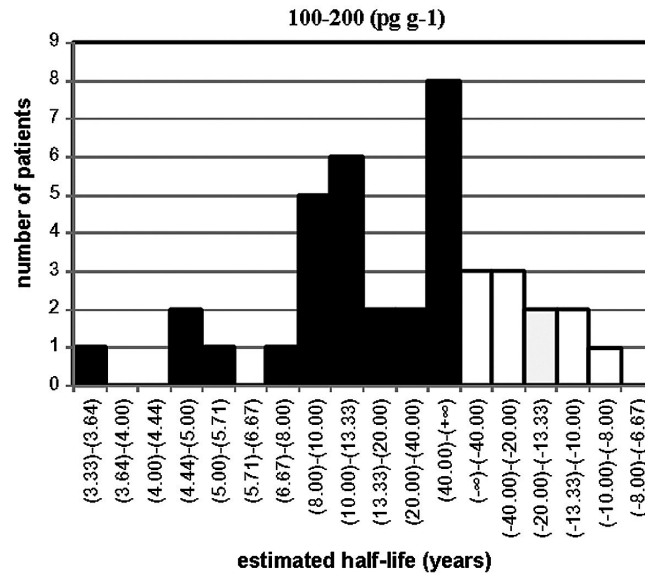


図2 2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度 100~200 pg/g · lipid の患者の濃度の変化率（半減期）の分布

既存の研究

ダイオキシン類 (Dioxins and dioxin-like compounds) は、ポリ塩化ジベンゾパラジオキシン (PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF)、ダイオキシン様ポリ塩化ビフェニル (DL-PCB) の総称である。これらは塩素で置換された2つのベンゼン環という共通の構造を持ち、類似した毒性を示す。

ダイオキシン類は、化学的に安定しており、工業的に利用されていた。その後、油症事件を含むいくつかの事件などを踏まえて、ダイオキシン類の毒性が明らかになり、その使用等が規制されるようになったが、規制されるまでの間には、環境中にダイオキシン類は放出されていた。

体内のダイオキシン類の量 (体内負荷量) は、油症事件のように、一時的な暴露だけではなく、PCB 類を生産する現場などの従業員も暴露されていた。そして、体内のダイオキシンは徐々に排

出されていく一方で、食事などを通して、環境から新たに体内に摂取されていた (図1)。

排出の半減期は、事故などで大きな暴露を受けたすぐ後では、2年程度の半減期であり、その後は、7年程度の半減期であると報告されてきた^{10)~12)}。

二つの半減期グループ⁶⁾

2001年より、油症一斉検診において、血中ダイオキシン類濃度を計測している¹³⁾。ダイオキシン類の計測期間が、既存研究における半減期 (7~10年) を超えたことより、安定的に半減期が推定できると考えられた。このことから、油症の各患者における血中ダイオキシン類濃度の変化率 (半減期) の推定を行った。

各油症患者を血中濃度別に濃度の変化率 (半減期の逆数) の分布を確認した。図2 (Chemosphere 2009, Fig. 4 (C)) は、油症の診断基準【50 pg/g · lipid】よりも高い、100~200 pg/g ·

表1 個人の症状に基づく、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の変化率の推定

	Items correlated with a high excretion rate (shortened PeCDF half-life)	F-value	Equation to estimate the rate of change (x indicates an item)	p value	R squared
1	Increased red blood cell count	6.607	$0.1577034 - 0.0004599 \cdot x$	0.01232	0.08738
2	Black comedones	5.243	$-0.001301 - 0.026198 \cdot x$	0.02510	0.07061
3	Positive results for viscous secretions from the meibomian glands	4.701	$-0.006176 - 0.027205 \cdot x$	0.03359	0.06379
4	Cedar pollen allergy	4.421	$-0.036677 - 0.015482 \cdot x$	0.03914	0.06022
5	Increased bone mineral density	3.960	$0.0129792 - 0.0007208 \cdot x$	0.05056	0.05428
6	Male sex	2.791	$-0.08383 + 0.02491 \cdot x$	0.09931	0.03888
7	Smoking status	2.741	$-0.01588 - 0.02062 \cdot x$	0.10230	0.03821
8	General fatigue	2.500	$-0.05342 - 0.01971 \cdot x$	0.11840	0.03497
9	Past pigmentation	2.159	$-0.08726 + 0.02774 \cdot x$	0.14630	0.03034

lipid の範囲の患者の濃度の減少率を示している⁶⁾。今まで報告されていた、7~10年を示す患者のグループと、ほとんど減少していない患者のグループの二グループが存在した。

濃度の変化は、排出による減少の影響だけではなく、摂取による増加の影響も受ける。また、体重の変化は、濃度を求める分母の変化となるので、濃度の変化にも影響を与える。さらに、測定値は、測定誤差の影響を受ける。一般人は摂取の影響により油症診断基準まで上昇する可能性は少なく、油症の診断基準よりも高い濃度の患者では、摂取の影響による濃度を維持しているとは考えにくい。また、一定濃度で推移しているグループでは、摂取の影響があるとも考えられるが、一定量の摂取がなければ、この推移は発生しないと考えられる。しかし、2,3,4,7,8-PeCDF を油症の診断基準を超える量に維持するほどの量を定常的に摂取することは困難であり、摂取の影響であるとは考えにくい。他の要因もいくつか想定できるが、二つのグループが生み出されるような外的要因は存在しない。

以上の事から、半減期が二つのグループに分かれた要因として、濃度の変化率は、個人毎に（あるいは内因的に）異なっているものと推察された。

半減期と症状の関係⁷⁾

以前の論文において、血中ダイオキシン類の半減期については、7~10年の半減期を示すグループと、ほとんど濃度が変化しないグループが存在

することを示した⁶⁾。これらの違いを決定する要因を見つけ出すために、体の状態（自覚症状や診察所見、検査データ、生活習慣等）と半減期の間の関係を求めることを行った。

その結果、表1 (Chemosphere 2013, Table 2)⁷⁾のように、「赤血球の数」「黒色面皰」「マイボーム腺からのチーズ様物質圧出」「杉アレルギー」「骨密度」「男性」「喫煙」「全身倦怠感」「色素沈着」が、半減期と関係が強いという結果が得られた⁷⁾。

油症特有の症状としては皮膚・眼科症状があり、杉アレルギーや赤血球も含まれていた。「黒色面皰」は皮脂との関連があり、「マイボーム腺からのチーズ様物質圧出」は目脂との関連があり、「杉アレルギー」は、咳・痰などと関連がある。皮脂、目脂、痰など、体液を体外に排出する際に、その体液に含まれる脂質に含まれる形で、ダイオキシン類が排出されることが想定された。さらに、性と年齢による半減期の違いでは、図3 (Chemosphere 2013, Fig. 2)⁷⁾のように年齢とともに半減期が伸びていく傾向が見られた⁷⁾。

半減期の延長⁸⁾

血中ダイオキシン濃度の半減期に2つのグループが存在していた (Chemosphere 2009)⁶⁾が、時間経過に伴い、半減期の分布の変化の有無や、変化の状態を確認した。

図4 (Environmental Health 2015, Fig. 3 (C))⁸⁾は、2015年論文で同様の検討を行ったものであるが、顕著なダイオキシン類濃度の変化があった濃

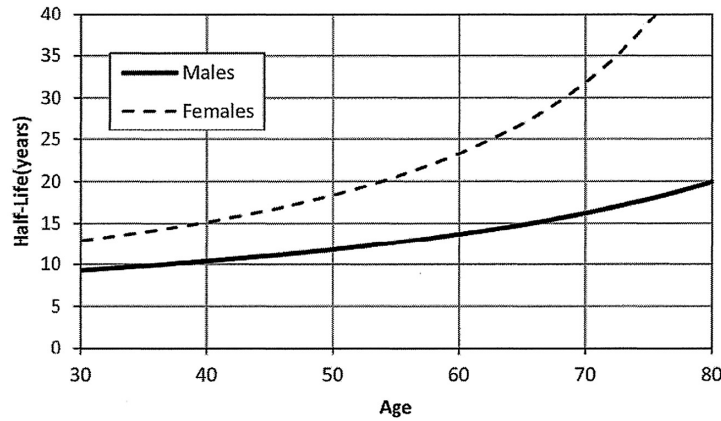


図3 性と年齢による、半減期の推定値

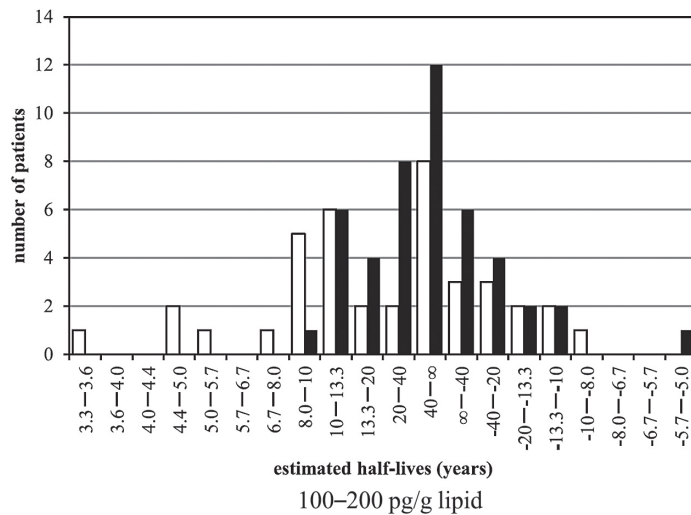


図4 2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度 100~200 pg/g · lipid の患者の濃度の変化率（半減期）の分布の経年変化

度群における半減期の変化を示している⁸⁾。白い棒は、以前（2009年）の論文⁶⁾で求められた半減期を示している。半減期が7~10年のグループと、無限大の半減期を有するグループが存在していた。黒い棒は、この論文（2015年）⁸⁾で新たに推定した濃度の変化率（半減期）である。半減期が7~10年のグループが減少し、ほとんど排出しない無限大の半減期のグループが増加していた。

7~10年のグループの人数が減少し、無限大の半減期のグループの人数が増加していたということは、半減期が延長していることを示している。グループの中心となる半減期が移動しているのではなく、二つのグループの人数が増えたり、減ったりしていた。単純に半減期が徐々に伸びている

のではなく、急激に半減期が伸びていく可能性を示していた。

しかし、グループとしての評価をしており、患者個人の変化を評価しておらず、異なる患者を評価している可能性を否定できなかった。

濃度変化の変化⁹⁾

松本らの2015年論文では、患者全体として、半減期のグループの状況の変化を報告している⁸⁾。しかし、各患者が、どのように変化をしているかは評価できていなかった。そこで次の研究では、環境中のダイオキシン類の濃度が減少していることを前提に、摂取量の変化を含めて定式化し、各患者の濃度変化の変化を確認した。濃度の変化率

表2 2,3,4,7,8-PeCDF 体内負荷量の見かけの変化率と変化率の変化

Concentration range (pg/g lipid)	Second-order (equivalent to minus change in apparent elimination rate in 2006)		First-order (equivalent to minus apparent elimination rate)	
	coefficient	p-value	coefficient	p-value
0-10	-0.000596	0.599665	-0.004032	0.165814
10-20	0.000464	0.463854	-0.000462	0.786707
20-50	0.000643	0.182574	0.001669	0.229181
50-100	0.002124	7.99×10^{-5}	-0.005452	0.000216
> 100	0.001436	9.68×10^{-7}	-0.008294	$< 2 \times 10^{-16}$

は、半減期の逆数である。濃度の変化率の変化を計算することで、半減期の変化を評価することができる。

表2 (Environmental Health 2016, Table 2) は、血中 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度別の、濃度変化の割合と、濃度変化の変化割合を示している。高濃度の患者で、半減期が伸びていることが示された⁹⁾。

これまでは、半減期が伸びていることの原因として、食事などからの摂取によって定常状態へ近づいていることが原因と考えられてきた。濃度の低い患者の半減期が食事などからの摂取によって半減期が伸びていることは、定常状態に近づいていることで説明可能である。しかし、高濃度の患者においても、半減期が伸びているが見つかった。これは、食事などからの摂取では説明することはできず、何らかの作用により、半減期が伸びていると考えられる。

ま と め

ダイオキシン類の排出半減期は、従来は、15年を超えないと推定されてきた¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、我々の研究の結果、半減期は伸びていく傾向があり、半減期が100年を超えるようにゆっくりと排出する患者も存在していた。

この結果は、今までには報告されていない結果であり、その主たる要因が何であるかは特定されていない。今後、その要因を明らかにしていくことが必要である。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金によるものである。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Yoshimura T : Yusho in Japan. Ind. Health 41 : 139-148, 2003.
- 2) Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T and Kuwabara M : Overview of Yusho. J. Dermatol. Sci. 1 : S3-S10, 2005.
- 3) 今村基雄, 増田義人, 平山千里 : 絶食による血液 PCB 濃度の変化. 医学のあゆみ 2 : 78-79, 1977.
- 4) 豊田正武, 内部博泰, 柳俊彦, 河野洋一, 堀就英, 飯田隆雄. 日本における食事経由の PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs の摂取量. 食品衛生学雑誌, 40 : 98-110, 1999.
- 5) 飯田隆雄, 戸高尊, 平川博仙, 飛石和夫, 松枝孝彦, 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.
- 6) Matsumoto S, Kanagawa Y, Koike S, Akahane M, Uchi H, Shibata S, Furue M and Imamura T : Variation in half-life of penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) blood level among Yusho patients. Chemosphere. 77 : 658-662, 2009.
- 7) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Kajiwara J, Todaka T, Yasukawa F, Uchi H, Furue M and Imamura T : Individuals' half-lives for 2,3,4,7,8-penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) in blood : Correlation with clinical manifestations and laboratory results in subjects with Yusho. Chemosphere. 92 : 772-777, 2013.
- 8) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Kajiwara J, Mitoma C, Uchi H, Furue M and Imamura T : Unexpectedly long half-lives of blood 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) levels in Yusho patients. Environmental Health. 14 : 76, 2015.
- 9) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Kajiwara J, Mitoma C, Uchi H, Furue M and

- Imamura T : Change in decay rates of dioxin-like compounds in Yusho patients. *Environmental Health*, 15 : 95, 2016.
- 10) 増田義人, 吉村健清, 梶原淳陸. 油症発生より38年間の患者血液中 PCBs, PCDFs の濃度変遷. *福岡医誌*. 98 : 182-195, 2007.
- 11) Ryan JJ, Levesque D, Panopio LG, Sun WF, Masuda Y and Kuroki H : Elimination of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from human blood in the Yusho and Yu-Cheng rice oil poisonings. *Arch Environ Contam Toxicol*. 24 : 504-512, 1993.
- 12) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 森田邦正, 濱村研吾, 中山樹一郎, 堀嘉昭, 郭育良, 張峰鳴, 蕭博文, 林克召, 余梅琳, 頼徳仁, 陳信昭, 徐澄清 : 台湾 Yu-Cheng 患者における PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs の血液中濃度および糞便中排泄量. *福岡医誌* 86 : 234-240, 1995.
- 13) Tokunaga S, Iida T, Furue M and Study Group for Yusho : The concepts of the new criteria for Yusho poisoning. *Journal of Dermatological Science Supplement*, 1 : S95-S104, 2005.
- 14) Shirai JH and Kissel JC : Uncertainty in half-lives of PCBs in human : impact in exposure assessment. *Sci Total Environ*. 187 : 199-210, 1996.
- 15) Ritter R, Scheringer M, MacLeod M, Moeckel C, Jones KC and Hungerbuehler K : Intrinsic human elimination half-lives of polychlorinated biphenyls derived from the temporal evolution of cross-sectional biomonitoring data from the United Kingdom. *Environ Health Perspect*. 119 : 225-231, 2011.

(Received for publication March 30, 2017)

油症の治療—歴史と展望—

九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

三 苦 千 景

Therapeutic Strategies for *yusho* —History and Outlook for the Future—

Chikage MITOMA

Research and Clinical Center for Yusho Dioxin, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan

Abstract

The Yusho incident is an unprecedented mass food poisoning that occurred in the western area of Japan in 1968. The causal rice bran oil contained a various dioxins and dioxins-like compounds (dioxins). No less than 2,000 people took orally the oil, and have suffered from characteristic mucocutaneous manifestations associated with non-specific systemic, respiratory, and neurological symptoms since its onset. Nowadays, the severe symptoms seen in the acute phase had faded in the majority of the patients ; however, there are the patients who have still suffered from various symptoms probably caused by dioxins retaining in the body. The Yusho Group has been researching effective treatments for Yusho patients. Several clinical trials that could accelerate the excretion of dioxins from the body had failed to relieve symptoms of *yusho*. Dioxins-induced toxicity is considered to be induced by activation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling pathway. It has been revealed that a variety of phytochemicals and herbal extracts possess biological activities that suppress AHR activation, which suggests that these chemicals might be promising candidates of therapy for Yusho patients. We here describe the history of therapeutic strategies for Yusho patients and discuss prospects for treatments.

Key words : *yusho*, *kampo*, aryl hydrocarbon receptor, *keishibukuryogan*

はじめに

1968年、福岡や長崎を中心に西日本一帯に発生した油症は、発生後約50年が経過したが、現在もなお、多くの患者が苦しんでいる。原因となった食用ライスオイルには、加熱脱臭時の熱媒体に含まれていた polychlorinated biphenyl (PCB)、高熱下で新たに生成された polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDD) 類や polychlorinated dibenzofuran (PCDF) 類などダイオキシン類似化合物 (以下、ダイオキシン類) が含まれていた¹⁾。その中でも PCDF 類に属する 2,3,4,7,8-penta-

chlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF) は、油症患者の体内でのダイオキシン類としての毒性指標である TEQ (Toxicity Equivalency Quantity : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 換算量, TEF (Toxicity Equivalency Factor) と存在量との積) が全体の約70%と最も高く、発症への寄与が最も高い²⁾³⁾。しかし、血液中のダイオキシン類はごく微量であるため、患者血液中の濃度を精確に、再現性をもって測定することは長年困難であった。2002年に検診時に採取した患者検体を用いて高分解能ガスクロマトグラフィー/高分解能質量分析 (HRGC/HRMS) により血液中

Corresponding author : Chikage MITOMA
Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital, Fukuoka 812-8582, Japan
Tel : + 81-92-642-5211 Fax : + 81-92-642-5201

ダイオキシン類濃度を測定できるようになった⁴⁾。その後の油症班の解析により、血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は皮膚粘膜症状など油症に特徴的な症状の有無と関連していることが明らかになった⁵⁾⁶⁾。油症発生当初、脂溶性のダイオキシン類の排泄促進を期待して様々な治療法が行われた。体外への排泄量が増加した治療法もあったが、残念ながら症状の改善には至らなかった。ダイオキシン類の毒性作用はその大部分が aryl hydrocarbon 受容体 (AHR) を介して生じている⁷⁾⁸⁾。また、転写因子 nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (NRF2) は AHR 活性に続き、もしくは単独に活性化し、ダイオキシン類による酸化ストレス反応に拮抗する抗酸化作用を発揮する⁹⁾¹⁰⁾。そこで、AHR 活性を抑制する薬剤が油症の治療にとって有効ではないかと考えられ、基礎的研究が進められている。ここで、これまでの治療の変遷、ダイオキシン類の毒性機構の知見、今後の治療法の展望について述べる。

1. ダイオキシン類排泄の試み

ダイオキシン類は脂溶性で、生体内で代謝されにくく長期間にわたり高濃度で残存する。このダイオキシン類を体内から排泄する、もしくは毒性のない代謝物に変換するのが理想的な治療法といえる。PCDF 類を実験動物に投与して生体内の代謝を調べた研究では、約 70% の 2,3,4,7,8-PeCDF が小腸で再吸収され、肝臓に高濃度でとどまっていた¹¹⁾。他の研究でも、糞便中に排泄される PCDD 類や PCDF 類は摂取量の 1/3 から 1/2 にすぎず、一度取り込まれたダイオキシン類は生体内に長期間残存することを示している¹²⁾。

基礎的研究では、パラフィン¹²⁾ やスクアレンが配合された飼料¹³⁾¹⁴⁾ によりラットの糞便中の PCB 量が増加したという研究報告がある。そこで、油症班でもスクアレンや charcoal bead をダイオキシン類に曝露したラットに経口投与したところ、対照群と比べて糞便中の 2,3,4,7,8-PeCDF 量が 2 から 5 倍に増加した¹⁵⁾¹⁶⁾。ついでカネミ油を投与したラットに対して食物繊維が含まれた飼料 (10% 米ぬか繊維, 5% コレスチラミン, 1% スクアレン) を含む飼料を 8 から 21 日投与したところ、対照群と比べて糞便中の 2,3,4,7,8-PeCDF 量は 4 倍増加し、PCDD 類の排泄量も増

加した¹⁷⁾。コレスチミド、コレスチラミンはともに高脂血症に対する薬剤である。コレスチミドを投与したラットでは、2,3,4,7,8-PeCDF の吸収は抑制されたが、再吸収は抑制されなかった¹⁸⁾。

油症患者には発生当初よりいろいろな治療法が行われてきた。1970 年代、油症患者を対象に絶食療法も行われた¹⁹⁾。絶食療法により神経症状の改善をみたが、油症の主たる症状である皮膚症状には変化がみられなかった。1990 年代、少人数の患者を対象に米ぬか繊維、コレスチラミンを投与する臨床試験が実施された²⁰⁾。コレスチラミン 4 g を含む米ぬか繊維を 1 日 3 回、1 もしくは 2 週間投与したところ、2,3,4,7,8-PeCDF や 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzofurans の排泄量は増えたが、症状の改善はみられなかった。続いて 37 名の油症患者を対象にコレスチミド 3 g、6 ヶ月間投与する臨床試験が実施された。そのうち 9 名が便秘と腹部膨満感により途中で脱落した。しかし、血液中 PCB/ダイオキシン類濃度は変化しなかった²¹⁾。このようにダイオキシン類排泄を促し、さらに油症患者の症状を改善する薬剤は現在までのところ見つかっていない。

2. ダイオキシン類毒性の知見

1980 年代より実験動物を用いてダイオキシン類の毒性の検証が行われてきた。ダイオキシン類曝露により westing syndrome, 癌化, 胎児奇形が生じることは古くより知られている²²⁾。その後、AHR が欠損したマウスが TCDD⁸⁾ に曝露すると、その毒性の大半が消失したという研究結果⁸⁾ より、ダイオキシン類の毒性は AHR を介した生物学的反応であることが明らかになった。AHR は免疫細胞、皮膚の表皮細胞など様々な細胞に発現し²³⁾²⁴⁾、さらにリガンド、細胞特異的に毒性のみならず、分化²⁵⁾、色素産生²⁶⁾、免疫反応の修飾²⁷⁾ など多彩な生物学的反応を誘導することが明らかになった。

AHR のリガンドは多種多彩である。ダイオキシン類だけでなく、多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) であるベンゾピレン⁷⁾ などの環境汚染物質、生体内に存在するインドール [indol-3-carbinol, 3,3'-diindolylmethane and indolo [3,2-b] carbazole]²⁸⁾ やトリプトファン代謝産物である 6-formylindolo

[2,3-*b*]carbazole (FICZ)²⁹⁾も AHR のリガンドである。これらのリガンドが結合すると、細胞質内の AHR は核内へ移動し、arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) と結合し AHR-ARNT-リガンドの複合体が形成される。この複合体は様々な AHR 標的遺伝子の発現調節部位に結合し、遺伝子の転写が促進もしくは抑制される²³⁾。代表的な標的遺伝子は薬剤代謝酵素である cytochrome P4501A1 (CYP1A1) で、他の CYP 遺伝子も同様に化学物質を代謝し、活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) が産生され酸化ストレス反応が生じる³⁰⁾。その一方、抗酸化ストレス反応の中心を担うのが転写因子の nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (NRF2) である³¹⁾。AHR シグナル経路と独立して、もしくは協調してリガンド依存性に NRF2 シグナル経路が活性化する⁹⁾¹⁰⁾。

3. 抗酸化食物成分

代謝、排泄されにくいダイオキシン類にさらされている油症患者に対する治療は長期間に及ぶため、治療法の選択には留意を要する。フラボンやフラバノールが動物実験において TCDD の毒性から生体を防御することは古くから知られている³²⁾。他にも AHR のアゴニストもしくは拮抗剤として働く phytochemical の報告が相次いでいる³³⁾³⁴⁾。また、AHR の活性を介して NRF2 シグナル経路を活性化する食物性植物成分があることも明らかになった。アーティチョークの主成分、シナロピクリン³⁵⁾ やウチワサボテンの主成分³⁶⁾ がそうである。動物実験においても、ポリフェノールの 1 種クルクミン³⁷⁾ やレスベラトロール³⁸⁾ は TCDD によっておこる westing syndrome を抑制した。

さて、古来中国より伝わった複数の生薬が配合された漢方方剤はどうであろうか。油症患者にみられる全身倦怠感、皮膚症状、神経症状、呼吸器症状に対する効能を有する漢方方剤、その生薬がヒト表皮細胞においてベンゾピレンによる AHR 活性を抑制するかどうか検証したところ、桂枝茯苓丸とその主成分シナムアルデヒドが強く AHR 活性を強く抑制した³⁹⁾。

4. 臨床試験

油症患者を対象に実施された最初の漢方方剤の臨床試験では、油症特有の症状 (全身倦怠感、皮膚症状、呼吸器症状、神経症状) への効能を期待して、麦門冬湯、荊芥連翹湯、牛車腎気丸、補中益気湯の 4 種の方剤が投与された⁴⁰⁾。27 名の油症患者 (女性 11 名、男性 16 名) が参加し、2 種の方剤を半年ずつ内服した。投与前後の自覚症状 (visual analogue scale, VAS) と生活の質 (quality of life, QOL) を SF-36⁴¹⁾ で評価した。24 名 (92.6%) が試験を完遂した。そのうち麦門冬湯は呼吸器症状と QOL のうち活力 (vitality) を他の方剤と比べて有意に改善した。一方、補中益気湯の投与により身体的機能と vitality が障害された。なお、どの方剤も投与前後で血液中 PCB/ダイオキシン類濃度は有意に変化しなかった。

先に述べた基礎的研究の結果³⁹⁾ をもとに、油症患者を対象に桂枝茯苓丸の臨床試験を行い、現在解析中である。短腕非盲検試験であるためその解釈に慎重にならないといけないが、投与前後で一部の VAS, QOL の改善がみられており、治療法の一つになるかもしれない。

おわりに

油症が発生して約 50 年が経過した。一斉検診で血液中ダイオキシン類濃度を測定することができるようになり 15 年あまり経過した。脂溶性のダイオキシン類の排泄促進は容易でなく、生体内に残存するダイオキシン類の毒性をいかに抑制するかが、有効な治療法につながる。今後もダイオキシン類の毒性、生体内での動態の検証を継続すると同時に、ダイオキシン類受容体を介した生物学的反応を抑える薬剤の探求に努めたい。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業) (課題番号: H 27-食品-指定-017) によった。ここに謝辞を表します。

臨床試験は九州大学病院倫理審査委員会の承認を得て、参加者には記述による同意を得た上で実施した。また、ヘルシンキ宣言及び厚生労働省の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」

に従って本試験を実施した。

参 考 文 献

- 1) Masuda Y. The Yusho rice oil poisoning incident. In : Schechter A, ed., Dioxin and Health, New York : Plenum Press. 633-59, 1994.
- 2) Nagayama J, Kuratsune M and Masuda Y. Determination of chlorinated dibenzofurans in kanechlors and "yusho oil". Bull Environ Contam Toxicol. 15 : 9-13, 1976.
- 3) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M. Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with 'yusho'. Food Cosmet Toxicol. 15 : 195-198, 1977.
- 4) Iida T and Todaka T. Measurement of dioxins in human blood : improvement of analytical method. Ind Health. 41 : 197-204, 2003.
- 5) Kanagawa Y, Matsumoto S, Koike S, Tajima B, Fukiwake N, Shibata S, Uchi H, Furue M and Imamura T. Association of clinical findings in Yusho patients with serum concentrations of polychlorinated biphenyls, polychlorinated quarterphenyls and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran more than 30 years after the poisoning event. Environ Health. 7 : 47. doi : 10.1186/1476-069X-7-47, 2008.
- 6) Imamura T, Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Koike S, Tajima B, Matsuya S, Uchi H, Shibata S and Furue M. Cutaneous symptoms such as acneform eruption and pigmentation are closely associated with blood levels of 2,3,4,7,8-penta-chlorodibenzofurans in Yusho patients, using data mining analysis. BMC Res Notes. 25 ; 2 : 27, 2009. doi : 10.1186/1756-0500-2-27.
- 7) Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y and Ishikawa T. Benzo [a] pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 97 : 779-782, 2000.
- 8) Mimura J and Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. Biochim Biophys Acta. 1619 : 263-268, 2003.
- 9) Miao W, Hu L, Scrivens PJ and Batist G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway : direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. J Biol Chem. 280 : 20340-20348, 2005.
- 10) Köhle C and Bock KW. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. Biochem Pharmacol. 72 : 795-805, 2006.
- 11) Kuroki H, Masuda Y, Yoshihara S and Yoshimura H. Accumulation of polychlorinated dibenzofurans in the livers of monkeys and rats. Food Cosmet toxicol. 18 : 387-392, 1980.
- 12) Rohde S, Moser QA, Pöpke O and McLachlan MS. Clearance of PCDD/Fs via the gastrointestinal tract in occupationally exposed persons. Chemosphere. 38 : 3397-3410, 1999.
- 13) Richter E, Lay JP, Klein W and Korte F. Paraffin-stimulated excretion of 2,4,6,2',4'-pentachlorobi [14C] phenyl by rats. Toxicol Appl Pharmacol. 50 : 17-23, 1979.
- 14) Richter E, Schäfer SG and Fichtl B. Stimulation of the faecal excretion of 2,3,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl in rats by squalene. Xenobiotics. 13 : 337-343, 1983.
- 15) 吉村英敏, 神村英利, 小栗一太, 佐伯清太郎. 高毒性 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (PenCDF) のラット糞中排泄に及ぼすスクアランの効果. 福岡医誌. 76 : 184-189, 1985.
- 16) Kamimura H, Koga N, Oguri N, Yoshimura H, Honda Y and Nakano M. Enhanced faecal excretion of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran in rats by a long-term treatment with activated charcoal beads. Xenobiotica. 18 : 585-592, 1988.
- 17) 森田邦正, 平川博仙, 松枝隆彦, 飯田隆雄, 常盤寛. ラットにおける食物繊維の PCDF 及び PCDD 排泄促進効果. 福岡医誌. 84 : 273-281, 1993.
- 18) 石田卓巳, 坂井雄一, 石井祐次, 古江増隆, 山田英之. Cholebine による 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran 排泄促進. 福岡医誌 100 : 210-216, 2009.
- 19) 今村基雄. 絶食療法を実施した油症患者の追跡調査. 福岡医誌. 66 : 646-648, 1975.
- 20) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 森田邦正, 常盤 寛, 辻 博, 中山樹一郎, 堀 嘉昭. 油症患者における米ぬか繊維とコレステラミンの併用投与による Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) の糞便中へ排泄促進の試み. 福岡医誌. 84 : 257-262, 1993.
- 21) Todaka T, Honda A, Imaji M, Takao Y, Mitoma C and Furue M. Effect of colestimide on the concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. Environ Health. 15 : 63, 2016. doi : 10.1186/s12940-016-0150-z.

- 22) Poland A and Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22 : 517-554, 1982.
- 23) Denison MS, Soshilov AA, He G, DeGroot DE and Zhao B. Exactly the same but different : promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci.* 124 : 1-22, 2011.
- 24) Furue M, Takahara M, Nakahara T and Uchi H. Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch Dermatol Res.* 306(9) : 769-779, 2014.
- 25) Loertscher JA, Lin TM, Peterson RE and Allen-Hoffmann BL. In utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes accelerated terminal differentiation in fetal mouse skin. *Toxicol Sci.* 68 : 465-472, 2002.
- 26) Jux B, Kadow S, Luecke S, Rannug A, Krutmann J and Esser C. The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *J Invest Dermatol.* 131 : 203-210, 2011.
- 27) Tsuji G, Takahara M, Uchi H, Takeuchi S, Mitoma C, Moroi Y and Furue M. An environmental contaminant, benzo (a) pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *J Dermatol Sci.* 62 : 42-49, 2011.
- 28) Bjeldanes LF, Kim JY, Grose KR, Bartholomew JC and Bradfield CA. Aromatic hydrocarbon-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo : comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88 : 9543-9547, 1991.
- 29) Fritsche E, Schäfer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hübenthal U, Cline JE, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz LO, Rannug A, Fürst P, Hanenberg H, Abel J and Krutmann J. Lightning up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 104 : 8851-8856, 2007.
- 30) Park JY, Shigenaga MK and Ames BN. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo (3,2-b) carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93 : 2322-2327, 1996.
- 31) Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Med.* 36 : 1199-1207, 2004.
- 32) Ashida H, Fukuda I, Yamashita T and Kanazawa K. Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transcription of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS let.* 476 : 213-217, 2000.
- 33) Zhang S, Qin C and Safe SH. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists : effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect.* 111 : 1877-1882, 2003.
- 34) Vrba J, Kren V, Vacek J, Papouskova B and Ulrichova J. Quercetin : quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and CYP1A1 expression in HepG2 cells. *Phytother Res.* 26 : 1746-1752, 2012.
- 35) Nakahara T, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Takahara M, Tsuji G, Uchi H, Yan X, Hachisuka J, Chiba T, Esaki H, Kido-Nakahara M and Furue M. Antioxidant opuntia ficus-indica extract activates AHR-NRF2 signaling and upregulates filaggrin and loricrin expression in human keratinocytes. *J Med Food.* 18 : 1143-1149, 2015.
- 36) Takei K, Hashimoto-Hachiya A, Takahara M, Tsuji G, Nakahara T and Furue M. Cynaropicrin attenuates UVB-induced oxidative stress via the AhR-Nrf2-Nqo1 pathway. *Toxicol Lett.* 234 : 74-80, 2015.
- 37) 石井祐次, 石田卓巳, 武藤純平, 山田英之, 小栗一太. ダイオキシン類の毒性を安全に軽減できる化合物の候補 : 油症治療を目指した検討. *福岡医誌* 96 : 204-213, 2005.
- 38) Ishida T, Takeda T, Koga T, Yahara M, Ike A, Kuramoto C, Taketoh J, Hashiguchi I, Akamine A, Ishii Y and Yamada H. Attenuation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity by resveratrol : A comparative study with different routes of administration. *Biol Pharm Bull.* 32 : 876-881, 2009.
- 39) Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, Mitoma C and Furue M. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 85 : 36-43, 2017.
- 40) Uchi H, Tokunaga S, Mitoma C, Shibata S, Hamada N, Nakanishi Y, Kajiwara J, Yoshimura T and Furue M. A clinical trial of kampo formulae for the treatment of symptoms of yusho, a poisoning caused by dioxins and related organochlorine compounds. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011 : 589724, 2011. doi : 10.1093/ecam/nep209, 2011.
- 41) Fukuhara S, Ware JE Jr, Kosinski M, Wada S

and Gandek B. Psychometric and clinical tests of validity of the Japanese SF-36 Health Survey. J Clin Epidemiol, 51 : 1045-1053, 1998.

(Received for publication March 13, 2017)

福岡医学雑誌投稿規定

1. 本誌には原著論文、症例報告、総説、学会報告等を掲載する。
2. 原著論文は、和文の場合は英文抄録、はじめに、実験方法、実験結果、考察、総括または結論、謝辞、文献の順とし、英文の場合は、Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, の順で記すものとする。ただし、短報の場合は、この区別をつけなくともよい。図、表の標題、説明文は、英文とすることが望ましい。
3. 和文原著には英文の抄録を、欧文原著には和文抄録を付けることとし、それぞれ本誌印刷1ページ以内とする。
4. 和文は現代かなづかい、平がなまじりの横書きとする。外国語は typewriter を使用するか、あるいは block letter で鮮明に記すことが必要である。
5. 数字は算用数字を用い、度量衡の単位は、cm, mm, μm , nm, g, mg, μg , ng, ml, dl, μl , cm^2 など、一般的に用いられる略字を使用する。
6. 原稿の第1ページには、標題、著者の所属（必要あれば指導者名付記）、著者名のみを記し、印刷所要部数を赤で付記する。ランニングタイトルを20字以内（欧文の場合は40文字以内）で鉛筆で付記する。
7. 引用した文献は末尾に一括して番号を付けて記載し、その順序は引用した順とする。著者名は全員併記する。本文の引用箇所には上付きで¹⁾²⁾と記す。なお総説等の場合、重要なものについて5~10程度に○をつけて読者の便宜を図る。記載の形式は次の例による。
 - 1) 雑誌の場合：著者名、論文表題、雑誌名、巻：最初最終頁、発行年、とする。
原著の first and middle name の省略のピリオドは用いない。
(例) Hatch TP, Miceli M and Silverman JA : Synthesis of protein in host-free reticulate bodies of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. J. Bacteriol. 162 : 938-942, 1985.
(例) 神村英利, 吉村英敏 : 油症原因物質の排泄促進, 福岡医誌 78 : 266-280, 1987.
 - 2) 単行本の場合：著者名、書名、第何版、引用頁、発行社、発行地、発行年。
(例) Bloom W and Fawcett DW : A Textbook of Histology 10th ed. pp. 179-227, Saunders Co. Philadelphia, 1975.
 - 3) 分担執筆の場合：著者名、章の表題、編者、書名、第何版、最初最終頁、発行者、発行地、発行年。
(例) Yamada Y : Far-storing cells, In Yamakawa I (ed) : Structure and Function of the Liver. 1st ed. pp. 188-202, Nanzando Tokyo, 1980.
8. 写真原稿は鮮明なものでなければならない。表は1ページに組める大きさであることを要する。
9. 英文原稿については、文法上の誤りが無い正確なものを提出できるよう、原則として native speaker 等による校閲を受けること。
10. 人を対象とした研究については、ヘルシンキ宣言を遵守したものであること、また症例を提示する際（症例報告）は、患者さんのプライバシーの保護やインフォームドコンセントなどに関する倫理的な問題に十分配慮されていること。
11. 定期号のほかに補冊を刊行することがある。教室論文集等を補冊とすることの可否は幹事会で決定する。
12. 投稿時には原稿を4部揃えて福岡医学雑誌編集室へ提出する。
13. 本誌に掲載する論文は、2名のレフリーによる査読を原則とし、その採否は編集幹事が決定する。
笹栗俊之* (臨床薬理学), 池田典昭* (法医学), 中西洋一* (呼吸器内科学), 前原喜彦* (消化器・総合外科学), 古江増隆* (皮膚科学), 野中和明* (歯・小児口腔医学), 森元 聡* (薬・生薬学), 中村誠司 (歯・顎顔面腫瘍制御学), 吉開泰信 (生医研・感染制御学), 池松秀之*, 馬場園 明* (医療経営・管理学), 鮎澤純子 (医療経営・管理学), 佐々木雅之* (医保・医用量子線科学), 鳩野洋子 (医保・看護学)

(* : 編集幹事)

本誌に掲載された原著論文、症例報告、総説、学会報告・図版等の著作権は福岡医学会に帰属する。

Copyright, right of publication, right of reproduction and public token of all articles printed and published in the Fukuoka Acta Medica (Fukuoka Igaku Zasshi) lies with the Fukuoka Medical Association.

平成 29 年 3 月 25 日 発行

発行所 **福岡医学会**

〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1番1号(九州大学医学部内)

TEL ダイヤルイン (092) 642-6896

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/famed/>

(日本出版協会準会員番号 B211042 振替 01750-2-2233)

編集兼発行者 笹栗俊之

印刷所 ダイヤモンド秀巧社印刷株式会社
福岡市東区松田3丁目9-32

本会の会費には、本学会の「福岡医学雑誌」(FUKUOKA ACTA MEDICA)購読料を含む。