

昭和29年11月5日第三種郵便物承認
令和元年6月25日
(年4回3, 6, 9, 12月の25日発行)
第1159号

Vol. 110 No. 2
June 2019

CODEN : FKIZA4
ISSN 0016-254X

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

第 110 卷 第 2 号 (通卷 1159 号)

令和元年6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 27 集

責任編集者 古江増隆

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

Editor Masutaka Furue

昭和二十九年十一月五日第三種郵便物承認
令和元年六月二十五日発行

第百十卷

第二号

Vol. 110 No. 2, June 2019

定価

二〇〇〇円

福岡医誌

Fukuoka Acta Med.

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 27 集

(福岡医学雑誌 第 110 巻 第 2 号 令和元年 6 月)

目 次

- 序 言 古江 増隆…59
- 油症認定患者及び未認定者の血液中ダイオキシン類濃度と傾向 (2001~2017 年度)
堀 就英, 安武 大輔, 平川 博仙, 戸高 尊, 広瀬 勇氣,
新谷 依子, 梶原 淳陸, 香月 進, 三苫 千景, 古江 増隆…61
- カネミ油症におけるダイオキシン類の排出速度は延長している
松本 伸哉, 赤羽 学, 神奈川芳行, 梶原 淳陸,
三苫 千景, 内 博史, 古江 増隆, 今村 知明…67
- 平成 16 および平成 26 年度に測定した油症患者血液中ダイオキシン類濃度の比較 (英文)
戸高 尊, 広瀬 勇氣, 上原口奈美, 千々和勝己,
池田 光政, 高尾 圭子, 三苫 千景, 古江 増隆…73
- 2,2',3,4',5,6,6'-七塩素化ビフェニル (CB188) のラットおよび
モルモット肝ミクロゾームによる代謝
太田 千穂, 山本 健太, 加藤 善久, 藤井由希子,
原口 浩一, 木村 治, 遠藤 哲也, 古賀 信幸…83
- 油症一斉検診における血液試料中の 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl (PCB183) のキラル分析
酒谷 圭一, 安武 大輔, 高橋 浩司, 堀 就英, 梶原 淳陸,
香月 進, 中野 武, 三苫 千景, 古江 増隆…91
- 油症患者におけるダイオキシン類毒性と不眠: 全国横断調査結果
近藤 英明, 三苫 千景, 前田 隆浩, 古江 増隆…97
- 油症における末梢血リンパ球亜集団に関する検討 辻 博, 松村 潔…109
- 上皮成長因子受容体阻害薬によって生じる芳香族炭化水素受容体の活性化について:
ざ瘡様発疹症の発症機序の可能性 (英文)
辻 学, 竹村 正規, 八谷 顕子, 古江 増隆, 中原 剛士…113
- 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin のダイオキシン毒性に対する拮抗作用
武田 知起, 人見 将也, 山田 英之, 石井 祐次…122
- 雌マウス肝臓におけるセレン結合性タンパク質 (SelenBP) の発現と 2,3,7,8-
Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 被誘導性: SelenBP1 欠損動物を用いた検討
宋 穎霞, 藤本 景子, 黒瀬 厚, 石田 卓巳,
古賀 貴之, 李 任時, 武田 知起, 武知 進士,
山田 英之, 田中 嘉孝, 石井 祐次…128

The Twenty-seventh Reports of the Study on Yusho
—PCBs and Dioxin-Related Compounds—
(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 110, No. 2, 2019)

CONTENTS

- Foreword M. Furue···59
- Blood Dioxin Concentrations and their Tendencies Examined in 2001–2017 Annual Inspections for Yusho
T. Hori, D. Yasutake, H. Hirakawa, T. Todaka, Y. Hirose, Y. Shintani, J. Kajiwara, S. Katsuki, C. Mitoma and M. Furue···61
- Half-Lives of Dioxin-Like-Compounds in Blood are Prolonged in Yusho Patients
S. Matsumoto, M. Akahane, Y. Kanagawa, J. Kajiwara, C. Mitoma, H. Uchi, M. Furue and T. Imamura···67
- Comparison of the Concentrations of Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins, Polychlorinated Dibenzofurans, and Polychlorinated Biphenyls in the Blood of Yusho Patients Measured in 2004 with those Measured in 2014
T. Todaka, Y. Hirose, N. Kamiharaguchi, K. Chijiwa, M. Ikeda, Y. Takao, C. Mitoma and M. Furue···73
- Metabolism of 2,2',3,4',5,6,6'-Heptachlorobiphenyl (CB188) by Rat and Guinea Pig Liver Microsomes
C. Ohta, K. Yamamoto, Y. Kato, Y. Fujii, K. Haraguchi, O. Kimura, T. Endo and N. Koga···83
- Enantiomeric Analysis of 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl in the Blood of Examinees Collected during Medical Check-up for Yusho
K. Sakatani, D. Yasutake, K. Takahashi, T. Hori, J. Kajiwara, S. Katsuki, T. Nakano, C. Mitoma and M. Furue···91
- Insomnia and Toxicity of Dioxin-Related Compounds among Yusho Patients : Japanese Nationwide Cross-Sectional Study
H. Kondo, C. Mitoma, T. Maeda and M. Furue···97
- Lymphocyte Subpopulations in Patients with Yusho H. Tsuji and K. Matsumura···109
- Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Induced by Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Human Keratinocytes and Sebocytes : A Possible Mechanism of Acneiform Eruption
G. Tsuji, M. Takemura, A. Hashimoto-Hachiya, M. Furue and T. Nakahara···113
- The effect of 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin on Dioxin Toxicity
T. Takeda, M. Hitomi, H. Yamada and Y. Ishii···122
- Hepatic Expression of Selenium Binding Protein (SelenBP) in Female Mice and Its Inducibility by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : Study with SelenBP1-Knockout Mice
Y. Song, K. Fujimoto, A. Kurose, T. Ishida, T. Koga, R. Li, T. Takeda, S. Takechi, H. Yamada, Y. Tanaka and Y. Ishii···128

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 2300 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 50 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 polychlorinated quarterphenyls (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 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 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 27 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 29 年度と平成 30 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（H30 - 食品 - 指定 - 005）によって刊行されています。深く感謝申し上げます。

油症認定患者及び未認定者の血液中ダイオキシン類濃度と傾向 (2001～2017年度)

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⁾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

堀 就英¹⁾, 安武大輔¹⁾, 平川博仙¹⁾, 戸高 尊²⁾, 広瀬勇氣²⁾, 新谷依子¹⁾,
梶原淳睦¹⁾, 香月 進¹⁾, 三苫千景³⁾⁴⁾, 古江増隆³⁾⁴⁾

Blood Dioxin Concentrations and their Tendencies Examined in 2001-2017 Annual Inspections for Yusho

Tsuguhide Hori¹⁾, Daisuke Yasutake¹⁾, Hironori Hirakawa¹⁾, Takashi Todaka²⁾,
Yuki Hirose²⁾, Yoriko Shintani¹⁾, Jumboku Kajiwara¹⁾, Susumu Katsuki¹⁾,
Chikage Mitoma³⁾⁴⁾ and Masutaka Furue³⁾⁴⁾

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

²⁾*Kitakyushu Life Science Center, Kitakyushu, Japan*

³⁾*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka, Japan*

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

Abstract

We performed congener specific analysis of dioxins using HRGC/HRMS and determined their concentrations in blood samples collected from approx. 1,700 persons during annual Yusho examinations between 2001 and 2017. When concentration of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) was compared in seven Yusho patients undergoing examinations among the seventeen years, the longitudinal concentrations in the respective individuals hardly changed over these years. Mean concentration of 2,3,4,7,8-PeCDF in blood from Yusho patients registered by annual inspections for Yusho was calculated as 110 pg/g, which was 80% higher than the mean value of 17 pg/g in normal controls, and the rates of persons with blood 2,3,4,7,8-PeCDF concentrations below 50 pg/g in the entire patients occupied approx. 60%. On the other hand, in a subset of Yusho patients registered by the supplemental criteria revised on 2012, it was found that the median values of concentration of 2,3,4,7,8-PeCDF were similar to the those of normal controls.

Key words : Yusho, Dioxin, PCB, Blood

はじめに

油症の原因物質は PCB とダイオキシン類であ

ることが明らかにされている。これらの物質は脂溶性が高く体外への排泄が困難であるため、当初の予想を超えて体内に長期残留する傾向が認めら

れている。油症診断では、患者の治療と観察、症状の緩和等の医学上の見地から、また患者認定を適正に行う行政の見地から、これらの原因物質の体内残留を科学的に定量化、客観化することが求められてきた。

油症原因物質の体内残留の把握は、採取が容易な血液を材料として試みられ、血液中 PCB の定量法は事件の発生から約 5 年後にほぼ確立された¹⁾。一方、血液に残留する微量のダイオキシン類を定量する実用的方法を確立するには長い年月を要した。測定技術の進歩により、1990 年代に入って高感度の二重収束型高分解能 GC/MS (HRGC/HRMS) が普及し始め、環境試料中のダイオキシン類測定が各所で行われるようになり、国際的なダイオキシン類の毒性評価体系も提案された²⁾。しかし血液試料を対象とした場合、目標定量下限値を得るためには大量の血液試料（少なくとも採血量 100 mL 以上）が必要とされ³⁾、必ずしも実用的な方法とはいえなかった。

そのような中で全国油症治療研究班による技術検討の結果、少量（約 5 g）の血液を用いて高感度かつ短期間でダイオキシン類を定量できる方法が確立され⁴⁾⁵⁾、2001 年度に福岡県の検診受診者を対象にパイロット的な測定が行われた。さらに 2002 年度以降は全国の受診者を対象にダイオキシン類測定を開始するに至った。2004 年には油症診断基準に血液中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) 値が追補として加えられた。この追補では、血液中の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度（脂肪重量当たり）30 pg/g 未満は通常、50 pg/g 以上は高い濃度と区分されている。その後研究班は血液中ダイオキシン類測定を継続し、2017 年度までにダイオキシン類を測定した血液試料数は約 5,300 件に上る。この 17 年間で蓄積されたデータは、ダイオキシン類と油症に特徴的な症状との関連性やダイオキシン類の体内半減期に関する解析等⁶⁾⁷⁾ に活用されてきたところである。本報告では 2001~2017 年度に認定患者または未認定者として油症検診を受診しダイオキシン類の測定対象となった約 1,700 名について、血液中ダイオキシン類濃度の傾向や特徴を解析した。

実 験 方 法

1. 試料

2001~2017 年度までの 17 年間に、全国油症一斉検診において採取した血液試料を対象にダイオキシン類の定量試験を行った。血液はヘパリン入り真空採血管を用いて採血し、分析まで 4℃ 以下で冷蔵保存した。測定の内部精度管理のため、コントロール試料として日水製薬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

既報⁴⁾⁸⁾ に記載された方法に従い分析を行った。有機溶媒類ならびに蒸留水は関東化学社製のダイオキシン分析用を使用した。硝酸銀シリカゲルは富士フィルム和光純薬社製のダイオキシン分析用を、活性炭カラムには活性炭（ナカライテスク社製）に無水硫酸ナトリウム（関東化学社製）を混合したものを使用した。ダイオキシン類の定量に使用する各種標準溶液（クリーンアップスパイク、シリンジスパイク及び検量線用混合溶液）は Wellington Laboratories 社製を用いた⁸⁾。

分析方法の基本的な工程は 17 年間で変更していない。血液 5 g を秤量した後、凍結乾燥処理を行い、クリーンアップスパイクを添加した。高速溶媒抽出装置 ASE-200 または 350 型（Thermo 社製）により脂肪抽出を行い、ロータリーエバポレーターで溶媒を完全に留去して脂肪重量を求めた。脂肪の全量をヘキサンで溶解し、硫酸処理を行った後、硝酸銀シリカゲルカラム及び活性炭カラム等で精製した。

測定には高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 HRGC/HRMS (Agilent 6890/Waters Auto-spec Premier 等) を使用した。少量の血液を用いて 2,3,4,7,8-PeCDF 等のダイオキシン類を安定的に検出、定量するために、大量注入装置を装着して大幅に感度を向上させた。SCLV (SGE 社製)、LVI (アイスティサイエンス社製) 等の大量注入装置を順次導入し、高感度測定を継続した。装置条件の詳細は既報⁸⁾⁹⁾ に記載されている。

ダイオキシン類の定量値はすべて脂肪重量当たり濃度で表記し、2,3,7,8-TeCDD 毒性等量 (TEQ) の算出には WHO による毒性等価係数 (WHO-2005) を用いた²⁾。定量下限値未満と

表1 検診認定者7名の血液中2,3,4,7,8-PentaCDF濃度の17年間の推移

認定者 No.	検 診 年 度																
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
P01	-	25	23	22	19	33	28	27	32	28	28	27	-	-	-	26	-
P02	-	27	22	24	28	22	28	26	29	27	25	25	-	-	-	-	-
P03	-	18	15	12	11	16	14	12	11	11	-	-	-	7.4	-	-	-
P04	-	-	-	14	12	16	19	17	20	17	17	17	-	-	-	21	-
P05	750	860	860	820	630	640	630	-	-	-	640	-	-	-	630	-	-
P06	-	3.1	2.6	2.9	3.2	3.3	3.7	-	-	-	-	3.7	3.5	-	-	-	4.1
P07	-	16	15	-	12	-	11	12	15	15	15	14	-	-	-	-	-

なった化合物の濃度は、定量下限値の1/2値として取り扱い、TEQを算出した。検診受診者のダイオキシン類濃度の集計では、17年間に1度しか測定していない場合はその濃度を、複数回測定している場合は最後に測定した濃度（最新の濃度）を、当該受診者の血液中ダイオキシン類濃度として選んだ。患者の年齢は採血時点での年齢を用いた。

結果及び考察

1. 認定患者の血液中ダイオキシン類濃度

(1) 油症検診受診結果による認定者（検診認定者）の血液中濃度

17年間の油症一斉検診で血液中ダイオキシン類濃度を分析した検体のうち、少なくとも2017年度末時点で油症検診受診結果によって認定された人（検診認定者）に該当する検査総数は2,987件であった。複数回受診した検診認定者が存在するため、検診認定者の実数は955名であった。これは2017年度末現在の油症認定患者総数2,327名の41%に相当する人数であった。

2017年度にダイオキシン類を測定した検診認定者は117名であった。性別の内訳は男性56名、女性61名であり、平均年齢は64.6歳（範囲：46～91歳）であった。2001～2017年度の17年間でダイオキシン類濃度を測定した検診認定者の中で測定回数が最も多かったのは12回（1名）であった。以下、11回が1名、10回が2名、9回が3名、8回が41名であった。測定回数9回以上の検診認定者7名の血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度の17年間の推移を表1に示した。2010年度以降、

認定患者の血中ダイオキシン類濃度測定は4年に1回の頻度で行われているため、近年は測定間隔が広がる傾向にあるが、油症診断基準の指標のひとつである血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度に17年間で顕著な変化は認められなかった。

表2(A)に検診認定者955名及び同(D)に福岡県内の一般住民（2004年度、127名）の血液中ダイオキシン類濃度を示した。検診認定者のTotal TEQ濃度は平均69 pg TEQ/g lipidで、対照群の一般住民の平均値（37 pg TEQ/g lipid）に対して約1.8倍高い値であった。同族体別に平均濃度を比較したところ、検診認定者の血液中濃度が一般住民と比べて2倍以上高い化合物は順に2,3,4,7,8-PeCDF（6.5倍）、1,2,3,4,7,8-HxCDF（5.4倍）、2,3,7,8-TeCDF（2.6倍）、3,3',4,4',5,5'-HxCB（2.6倍）及び1,2,3,6,7,8-HxCDF（2.1倍）の5化合物であった。一般住民と比較して血中濃度比が最も高い2,3,4,7,8-PeCDF濃度は油症診断基準に採用されている。検診認定者の血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度の分布は2.6～1,800 pg/g lipidと広範囲で、7名が1,000 pg/g lipidを超える高濃度であったが、検診認定者全体の約60%は50 pg/g lipid未満であった（表3）。

(2) 同居家族の条件による認定者（同居認定者）の血液中濃度

2012年12月に油症診断基準追補（同居家族の条件追補）が加わり、これまでに295名が本条件による患者として認定された（同居認定者）。2017年度までに血液中ダイオキシン類濃度測定を実施した同居認定者は203名で、測定件数はのべ567件であった。表2(B)に同居認定者の血液

表2 油症検査受診者 (2001~2017年度) の血液中ダイオキシン類濃度 (pg/g lipid)

同 族 体 名	(A)				(B)				(C)				(D)			
	検査認定者 (955名)				同居認定者 (203名)				未認定者 (538名)				一般住民 (127名)			
	平均	最小	最大	中央値	平均	最小	最大	中央値	平均	最小	最大	中央値	平均	最小	最大	
2,3,7,8-TeCDD	1.6	ND	8.6	1.4	1.4	ND	7.7	1.3	1.2	ND	8	1.0	1.9	ND	4.3	
1,2,3,7,8-PeCDD	9.0	ND	48	7.8	6.7	ND	28	6.2	6.0	ND	23	5.2	9.0	3.2	20	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.5	ND	15	2.2	2.3	ND	10	2.0	2.2	ND	18	1.0	3.6	ND	13	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	37	ND	320	26	22	2.9	91	17	19	ND	96	15	28	7.3	70	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	3.7	ND	26	3.0	3.7	ND	20	2.7	3.2	ND	28	2.6	4.5	ND	16	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	42	6.1	1,200	33	38	5.5	250	31	39	5.6	380	30	78	18	470	
OCDD	590	72	7,900	480	570	77	5,200	460	530	56	4,200	410	1,200	180	7,600	
2,3,7,8-TeCDF	2.5	ND	83	1.4	1.5	ND	7.4	1.0	1.6	ND	31	0.5	1.0	ND	4.5	
1,2,3,7,8-PeCDF	1.2	ND	13	0.5	1.0	ND	6.8	0.5	0.97	ND	9.3	0.5	0.67	ND	4.6	
2,3,4,7,8-PeCDF	110	2.6	1,800	38	24	2.8	440	15	14	1.3	58	11	17	6.0	63	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	27	ND	580	7.1	5.1	ND	89	3.1	3.4	ND	25	2.8	5.0	ND	20	
1,2,3,6,7,8-HxCDF	12	ND	170	5.8	4.4	ND	37	3.5	3.9	ND	28	3.3	5.7	ND	16	
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.2	ND	8.7	1.0	1.1	ND	6.6	1.0	1.2	ND	8.6	1.0	1.2	ND	5.2	
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0	ND	6.0	1.0	1.1	ND	13	1.0	1.0	ND	3.0	1.0	ND	-	-	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2.3	ND	36	1.0	1.8	ND	12	1.0	2.1	ND	46	1.0	2.2	ND	14	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.0	ND	2.7	1.0	1.1	ND	24	1.0	1.0	ND	6.1	1.0	ND	-	-	
OCDF	ND	-	-	-	2.2	ND	38	2.0	2.0	ND	8.5	2.0	2.1	ND	18	
3,4,4',5'-TeCB(PCB81)	5.6	ND	49	5.0	5.4	ND	18	5.0	5.5	ND	64	5.0	5.6	ND	24	
3,3',4,4'-TeCB(PCB77)	8.6	ND	150	5.0	7.4	ND	39	5.0	8.4	ND	160	5.0	8.4	ND	31	
3,3',4,4',5'-PeCB(PCB126)	97	ND	680	74	86	ND	510	67	76	ND	660	46	110	17	520	
3,3',4,4',5',5'-HxCB(PCB169)	170	10	1,300	130	90	11	390	71	66	ND	390	49	64	16	190	
Total PCDDs	690	99	9,200	570	650	100	5,600	510	600	73	4,600	470	1,300	210	8,200	
Total PCDFs	160	12	2,600	65	44	12	570	30	31	10	140	27	37	15	86	
Total PCDD/PCDFs	850	111	9,500	690	690	120	5,600	550	630	92	4,600	510	1,300	220	8,300	
Total Non-ortho PCBs	280	25	1,500	230	190	27	840	160	160	20	890	110	190	59	740	
Total Dioxins	1,100	161	9,700	960	880	180	6,300	730	790	140	5,200	650	1,500	280	9,000	
Total PCDDs-TEQ	16	1.8	77	13	11	1.8	48	10	10	1.5	40	9.0	16	5.1	35	
Total PCDFs-TEQ	39	1.3	610	14	8.7	1.3	140	5.4	5.3	0.89	24	4.4	6.6	2.3	14	
Total PCDDs/PCDFs-TEQ	54	3.4	690	28	20	3.6	180	16	15	2.4	53	14	22	7.4	50	
Total Non-ortho PCBs-TEQ	15	0.82	94	12	11	0.87	60	9.4	10	0.65	70	6.1	13	2.6	58	
Total Dioxins-TEQ	69	5.2	730	44	31	5.5	210	26	25	3.1	110	20	37	12	110	

(ND: 定量下限値未満)

表3 血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度の度数分布

2,3,4,7,8-PeCDF 濃度範囲 (pg/g lipid)	検診認定者	同居認定者	未認定者
以上 未満			
1,500	1	-	-
1,000~1,500	6	-	-
900~1,000	3	-	-
800~ 900	3	-	-
700~ 800	7	-	-
600~ 700	13	-	-
500~ 600	10	-	-
400~ 500	22	1	-
300~ 400	41	1	-
200~ 300	62	-	-
100~ 200	103	3	-
90~ 100	20	1	-
80~ 90	23	2	-
70~ 80	28	2	-
60~ 70	29	3	-
50~ 60	40	3	2
40~ 50	59	7	9
30~ 40	85	8	31
20~ 30	108	32	76
10~ 20	186	87	175
0~ 10	106	53	245
人数計	955	203	538

中ダイオキシン類濃度を示した。同居認定者と一般住民の同族体別の平均濃度及び平均 TEQ 濃度は同等の値であった。同居認定者の血液中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均値は 24 pg/g lipid で認定者の 110 pg/g lipid より低く、一般人の 17 pg/g lipid に近い値を示した。一方、同居認定者の血液中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の分布は 2.8~440 pg/g lipid であり、油症診断基準で「高い濃度」に区分される 50 pg/g lipid を超える受診者が 16 名存在した (表 3)。

油症認定認定者の血液中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度を男女間で比較すると、年齢層を問わず女性が高くなる傾向が認められている¹⁰⁾。同居認定者 203 名のうち男性 86 名と女性 117 名の平均2,3,4,7,8-PeCDF 濃度を比較すると、男性は 16 pg/g lipid 及び女性は 30 pg/g lipid となり、女性が高くなっていた。これは女性の同居認定者に比較的高

濃度の患者が含まれ、平均値を押し上げていると考えられ、中央値を比較すると男性 14 pg/g lipid、女性は 16 pg/g lipid となり、ほぼ同等となっていた。

2. 未認定者の血液中ダイオキシン類濃度

2017 年度にダイオキシン類を測定した未認定者は 127 名であった。性別の内訳は男性 55 名、女性 72 名で、平均年齢は 57.9 歳 (範囲: 8~89 歳) であった。2001~2017 年度にダイオキシン類濃度を分析した未認定者の血液件数は 1,623 件であり、重複を考慮した対象者数は 538 名であった。このうち約半数の未認定受診者の受診回数は 1 回であるが、油症の診定には油症検診を受診することが必須であり、最大で 16 回受診した未認定者が 2 名認められた。複数回受診した未認定者の血液中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の変動は概して少な

く、濃度変化は殆ど認められなかった。未認定者538名全体の2,3,4,7,8-PeCDF平均濃度は14 pg/g lipidであり、一般人と同等のレベルであったが、50 pg/gを超える実測値が2010年度と2017年度に一例ずつ2名で認められた(表2(C)及び表3)。

総 括

少量(約5g)の血液から2,3,4,7,8-PeCDFを含むダイオキシン類を定量する技術を維持し、2001年度から17年間継続して測定を行った。血液中ダイオキシン類の濃度推移をみたところ、認定、未認定の区分にかかわらず総じて変化は認められなかった。患者体内に蓄積しているダイオキシン類には複数の排泄経路(糞中排泄や皮脂からの放出など)があり、原因油に由来する体内のダイオキシン類は微量ながら日々排出されていると考えられる。一方、ダイオキシン類は環境汚染物質として自然界に存在し、ヒトは日常的に食事を介して摂取しており¹¹⁾、これらの寄与も考慮する必要がある。

同居認定者の血液中ダイオキシン類濃度の現状を調べたところ、油症診断基準で「高い濃度」に該当する受診者が少数認められたが、同居認定者の多くは一般人と同様の濃度を示し、ダイオキシン類による健康リスクは一般人と同等のレベルにあると考えられた。

謝 辞

本研究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)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) 増田義人, 香川梨絵, 鳥村京子, 高田真由美, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人の血液中のポリ塩化ビフェニール. 福岡医誌 65 : 25-27, 1974.
- 2) Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, DeVito M, Farland, W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N and Peterson RE : The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. Toxicol. Sci. 93 : 223-241, 2006.
- 3) 厚生省: 血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル, 2000.
- 4) Todaka T, Hirakawa H, Tobiishi K and Iida T : New protocol for dioxin analysis of human blood. Fukuoka Acta Med. 94 : 148-157, 2003.
- 5) 戸高尊, 平川博仙, 堀就英, 飛石和夫, 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.
- 6) 松本伸哉, 赤羽学, 神奈川芳行, 梶原淳陸, 内博史, 古江増隆, 今村知明: 油症患者におけるダイオキシン類異性体ごとの症状ならびに異性体間の濃度と半減期の関係. 福岡医誌 104 : 78-84, 2013.
- 7) 松本伸哉, 赤羽学, 神奈川芳行, 梶原淳陸, 三苦千景, 内博史, 古江増隆, 今村知明: カネミ油症におけるダイオキシン類の排泄速度研究の進展. 福岡医誌 108 : 118-123, 2017.
- 8) 安武大輔, 飛石和夫, 平川博仙, 新谷依子, 小木曾俊孝, 堀就英, 梶原淳陸, 香月進, 三苦千景, 古江増隆: 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. 福岡医誌 108 : 102-110, 2017.
- 9) Todaka T, Uchi H, Hirakawa H, Kajiwara J and Furue M : Development of a large-volume injection system for dioxin determinations in blood of Yusho patients. Fukuoka Acta Med. 104 : 110-117, 2013.
- 10) 梶原淳陸: 油症患者の血液中PCDF濃度の測定. 古江増隆, 赤峰昭文, 山田英之, 吉村健清編: 油症研究Ⅱ—治療と研究の最前線—. pp. 34-39, 九州大学出版会, 2010.
- 11) 堤智昭: 食品の塩素化ダイオキシン類, PCB等の摂取量推定及び汚染実態の把握に関する研究. 平成29年度厚生労働行政推進調査事業費補助金, 食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発に関する研究分担研究報告書. 2018.

(Received for publication March 27, 2019)

カネミ油症におけるダイオキシン類の排出速度は延長している

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

松本伸哉¹⁾, 赤羽 学¹⁾, 神奈川芳行¹⁾, 梶原 淳睦²⁾,
三苫千景³⁾, 内 博史³⁾, 古江増隆³⁾, 今村 知明¹⁾

Half-Lives of Dioxin-Like-Compounds in Blood are Prolonged in Yusho Patients

Shinya MATSUMOTO¹⁾, Manabu AKAHANE¹⁾, Yoshiyuki KANAGAWA¹⁾, Junboku KAJIWARA²⁾,
Chikage MITOMA³⁾, Hiroshi UCHI³⁾, Masutaka FURUE³⁾ 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 Sciences, Kyushu University*

Abstract

Yusho, the mass food poisoning, occurred in western Japan in 1968. PCBs and dioxin like compounds such as 2,3,4,7,8-PeCDF were detected as causal chemicals for Yusho. Our group have measured blood concentrations of dioxin-like compounds and analyzed their half-lives. In our previous studies, we have found two groups ; one group has 7-10 years of half-lives as reported by other researchers, and the other group has near infinite half-lives. In addition, the number of patients in group showing 7-10 years of half-lives decreased and the number in group with near infinite half-lives increased. However, those changes were not evaluated in individual patient since follow-up period was relatively short to analyze the individual half-life. Therefore, we now intend to evaluate the long-term change of half-life in individual patient. Our preliminary analysis indicates that the half-life of 2,3,4,7,8-PeCDF appears to be prolonged in each patient. Considering the recent low levels of environmental contamination of dioxins and their related compounds, the prolonged half-life of blood concentration of 2,3,4,7,8-PeCDF points its deteriorated excretion.

Key words : Yusho, Dioxins, Half-life

はじめに

1968年に、北部九州を中心に食用油の製造過程で混入したダイオキシン類による健康被害（食中毒）が発生した¹⁾²⁾。当初はPCBが原因と考えられていたが、研究の結果、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、長期にわたり健康被害が発生する。

ダイオキシン類の排出速度は、体内負荷量（体内の総量）に比例して排出されることを想定して、半分になるまでの期間を半減期として評価している。ダイオキシン類の半減期は非常に長く、年単

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

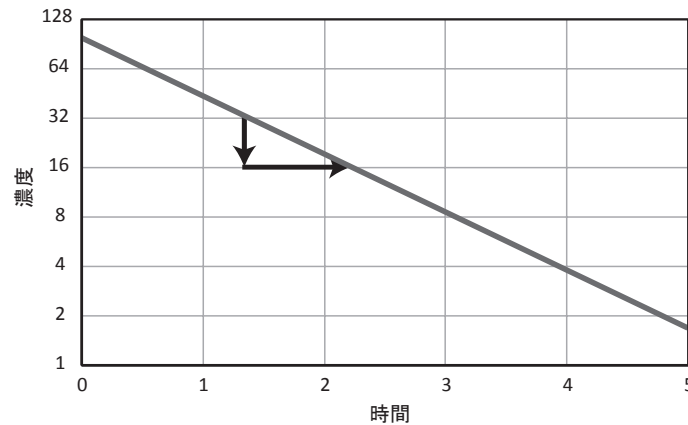


図1

位で評価される。ダイオキシン類は体内から排出されるだけでなく、環境中に存在するものが食物とともに新たに摂取され、半減期に影響する。体外への排出による減少速度を「排出半減期」と呼ぶのに対し、血液検査等の測定結果から計算される半減期を「見かけの半減期」と呼ばれる。見かけの半減期は、排出とともに摂取の影響を受けるだけでなく、測定時点における体重変動などの影響も受ける。

本稿では、これまでに我々が分析してきた血中のダイオキシン類濃度の半減期（見かけの半減期）の研究について解説する。

半減期の計算方法

薬物動態の教科書で半減期の計算式として記載されている式は、自然対数を用いており煩雑になっている。

消失速度 K_e は、1回目の測定時刻 t_1 における濃度 C_1 と、2回目の測定 t_2 における濃度 C_2 を用いて次の式で計算される。

$$K_e = -\frac{\ln C_2 - \ln C_1}{t_2 - t_1}$$

半減期 $t_{1/2}$ は、消失速度 K_e から次の式で計算する。

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_e} = \frac{0.693}{K_e}$$

より精緻に現象をとらえるためには、摂取時の増加や、体内での分布などを考慮する必要がある、さらに複雑な式が必要である。

通常、対数を使用する場合には、 e を底とする自然対数や、10 を底とする常用対数が用いられる。

自然対数は微分や積分を行っても形が変わらないため、自然科学で多く用いられる。常用対数は、10進数と相性がよいため、経済的な解析などでよく用いられる。底はなんでもよく、濃度などが半分になることを表現することができる。ここで、測定濃度を2を底とする対数をとることで、簡便に表すことができる。この軸上では1減ることが半分になることを表す。図1において、Y軸の濃度の対数で一目盛下がるのが半分になることを表す。半分になるまでの時間が半減期である。つまり、直線の傾きの逆数に負をかけたものが半減期である。直線の傾きを求めることは線形回帰により可能である。

測定回数が少ない場合には、測定ごとの状態の変化が傾きに影響を与える。測定回数が多いと測定ごとの変化は誤差項に含まれるようになり、本質的な傾きが得られるようになる。つまり、適切な半減期が得られるようになる。体重の増加は体内の脂肪量の増加を招く。ダイオキシン類は脂質に分布するため、脂質量の増加はダイオキシン類の濃度の低下となる。測定回数が2回の場合には、線形回帰を実施しても傾きに体重変動などの測定時の影響が含まれる。測定回数が3回以上の場合には、線形回帰を実施すると、体重変動などの測定ごとに増加したり減少したりする変動は線形回帰における残差として処理される。傾きはより正確な傾きを推定可能である。ただし、成長期などの継続的な体重増加は、濃度の減少をもたらすため、見かけの半減期と排出半減期の分離は困難である。

環境中のダイオキシン類濃度が減少している状

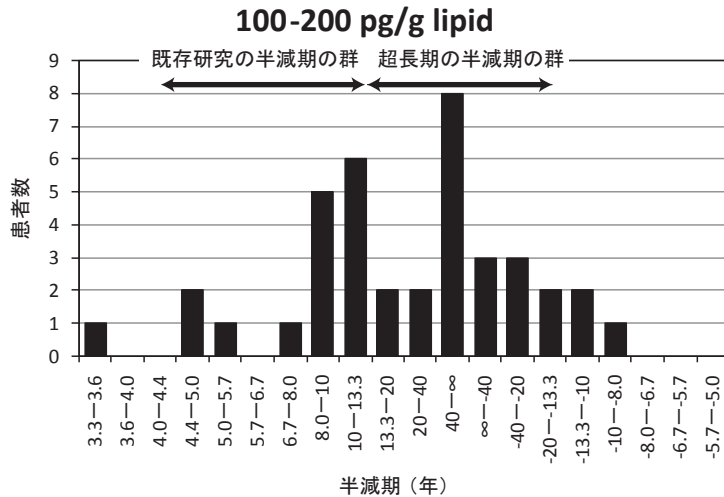


図 2

況においては、継続的な摂取量も減少する。環境中の減少速度が排出速度よりも遅いならば、環境中の減少速度が律速段階となり、「見かけの排出速度」は、個人の排出速度によらず、環境中の減少速度に収束する。逆に、排出速度のほうが遅いならば、「見かけの排出速度」は、個人の排出速度に収束する。そして、環境中のダイオキシン類濃度が高い時期に環境から曝露した高齢の方のほうが、濃度が高くなる⁶⁾。

半減期が 10 年程度とほとんど排出しない 二つのグループが存在⁷⁾

2001 年より、油症一斉検診において、ダイオキシン類の濃度を計測している⁸⁾。ダイオキシン類の計測期間が、既存研究における半減期を超えたことより、安定的に半減期が推定できると考えられたため、油症の各患者における濃度の変化率（半減期）の推定を行い、分析結果を 2009 年に Chemosphere に発表した⁷⁾。

図 2 は油症の認定基準の 50 pg/g lipid よりも高い、100~200 pg/g lipid の範囲の患者の濃半減期を示している。既存研究で報告されていた、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超長期の半減期の患者の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。しかしながら、摂取濃度は油症の認定基準よりも極めて低

い濃度であり、摂取の影響とは考えにくい。また、濃度が変化しなかった患者は、一定濃度で推移しており、一定濃度を維持するための一定量を摂取し続けていなければ発生しない現象である。2,3,4,7,8-PeCDF を油症の認定基準を超える量に維持する量を継続的に摂取する状況は現実的ではなく、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、二つのグループを生み出すような要因は存在しない。二つのグループは、濃度の変化率だけではなく、排出速度が個人ごと異なり、ほとんど排出しない個人が存在する事が考えられた。

半減期が 10 年程度のグループが減少し、 ほとんど排出しないグループが増加⁹⁾

半減期に二つのグループが存在することを指摘⁷⁾した後、検診結果の積み重ねを待って、半減期の分布が変化したのか、変化したとすればどのように変化したのかを再解析した。

図 3 は、顕著な変化がみられた濃度群における変化を示している。図中の白い棒は、[7] の論文において推定した半減期を示している。半減期が 7~10 年のグループと、超長期の半減期を有するグループが存在していた。黒い棒は、[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超長期の半減期のグループが増加していた。つまり、半減期が延長していることを示している。

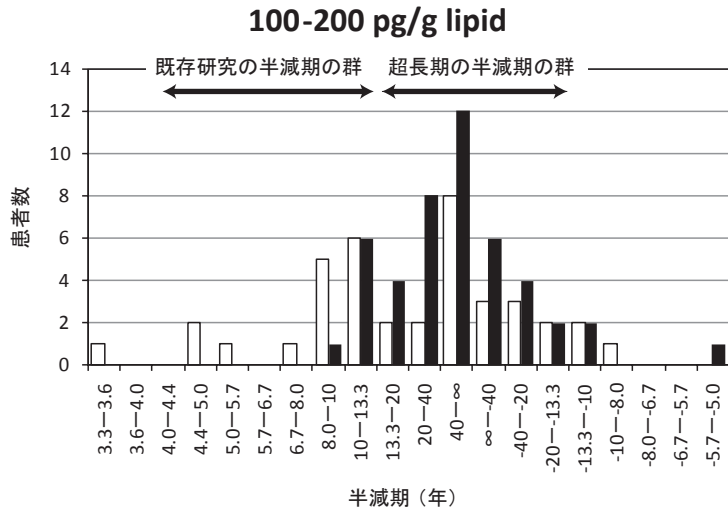


図3

表1 2,3,4,7,8-PeCDFの半減期の前後の比較

		後半 (2008~2016) における半減期													対象外	計	
		>-10	-13.33~-10.00	-20.00~-13.33	-40.00~-20.00	-∞~-40.00	40.00~+∞	20.00~40.00	13.33~20.00	10.00~13.33	8.00~10.00	6.67~8.00	5.71~6.67	5.00~5.71			
前半 (2001~2007) における半減期	-6.67~-5.71															1	1
	-10.00~-8.00															1	1
	-13.33~-10.00								1							2	3
	-20.00~-13.33						1	1			1					2	5
	-40.00~-20.00							1								7	8
	-∞~-40					1	3	2	3							8	17
	40.00~+∞	1			1	4	5	4	3							11	29
	20.00~40.00						9	9								12	30
	13.33~20.00					1	2	1	4			1				6	15
	10.00~13.33	1					4	2	1							5	13
	8.00~10.00					2	3	2	2	1						2	12
	6.67~8.00						1	1								3	5
	5.71~6.67															1	1
	5.00~5.71						1										1
	< 5 years						2		1	1							4
計	2			1	8	31	23	15	2	1	1				61	145	

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、第1のグループの人数が減り、第2のグループの人数が増加したと考えた。すなわち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、この研究ではグループとしての評価であり、患者個人内の変化を直接観察しているわけではなかった。

測定時期による患者個人の半減期の影響 [最新の研究成果]

先に述べたようにこれまでの我々の研究では、異なる半減期を示す二つのグループが存在する。そのうえ興味深いことに、既存研究で報告されている7~10年程度の半減期を示す患者群が減少し、ほとんど血中ダイオキシン濃度が減少しない患者群が増加していた。しかしながら、これらの結果は患者個人を評価して得られたものではなく、患者群（グループ）を対象にして得られた結果であるため、患者個人の半減期の変化に着眼した研究が必要である。

油症一斉検診が継続して実施され血中ダイオキシン濃度の測定結果も長期間にわたって蓄積されてきたため、患者個人の半減期がどのように変化したかを観察することが可能になった。現在我々は、油症一斉検診における測定期間（2001年~2016年）を前半（2001年~2007年）と後半（2008年~2016年）の二つの期間に分割し、それぞれの期間で、各患者の半減期を求める研究を行っているのでその一部を紹介する。

表1は各患者の前半での半減期と後半での半減期の分布の関係を示している。この表の対角線（網掛け部分）に存在すれば、前半と後半で半減期が同じであることを示しているが、左下側に存在すれば、前半において半減期が短く、後半において半減期が長くなっている状況を示している。今回の我々の分析結果では、表1の左下側に存在する患者が多くみられ、個人内でも確かに半減期が伸びていることが示唆された。

ま と め

既存研究では、ダイオキシン類の排出半減期は、15年を超えないと推定されてきた¹⁰⁾¹¹⁾。しかしながら、我々がこれまでに行った分析結果では、

半減期が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。このような結果はこれまでは報告されておらず、主たる要因が何であるかも特定できていない。今後さらに追加分析を行い、半減期に影響を与える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. (Suppl. 1)*, 3-10, 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* 101 : 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). *福岡医学雑誌* 94 : 126-135, 2003.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Shirai JH and Kissel JC : Uncertainty in half-

- lives of PCBs in human : impact in exposure assessment. *Sci Total Environ.* 187 : 199-210, 1996.
- 11) Ritter R, Scheringer M, MacLeod M, Moeckel C, Jones KC and Hungerbuhler 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 28, 2019)

Comparison of the Concentrations of Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins, Polychlorinated Dibenzofurans, and Polychlorinated Biphenyls in the Blood of Yusho Patients Measured in 2004 with those Measured in 2014

Takashi TODAKA¹⁾, Yuki HIROSE¹⁾, Nami KAMIHARAGUCHI¹⁾, Katsumi CHIJIWA¹⁾, Mitsumasa IKEDA¹⁾, Yoshiko TAKAO²⁾, Chikage MITOMA³⁾ and Masutaka FURUE³⁾⁴⁾

¹⁾*Kitakyusyu Life Science Center, Public Interest Incorporated Foundation, Nakabarushinmachi 1-4, Tobata-ku, Kitakyusyu-shi, Fukuoka 804-0003*

²⁾*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39, Mukaizano, Dazaifu-shi, Fukuoka 818-0135*

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

⁴⁾*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences, Kyusyu University, Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582*

Abstract

We have been measuring the concentrations of PCDDs (polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins), PCDFs (polychlorinated dibenzofurans), and dioxin-like PCBs (polychlorinated biphenyls) in blood collected from Yusho patients in medical health examinations since 2002. The present study extends our previous studies by reporting changes in the concentrations of individual congeners of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood of Yusho patients from 2004 to 2014. Out of 243 and 246 Yusho patients who received medical health examinations in 2004 and 2014, respectively, there were 118 patients in whom the blood concentrations of these dioxin like-compounds were measured in both years. The concentrations of individual congeners of PCDDs, PCDFs, and PCBs in the blood of these 118 Yusho patients measured in 2004 were compared with those measured in 2014. The total toxicity equivalence (TEQ) concentrations of PCDDs, PCDFs, non-*ortho* PCBs, and mono-*ortho* PCBs in the blood of 118 Yusho patients in 2004 and 2014 were 5.2–533 (mean : 80, median : 52) and 11–545 (mean : 78, median : 73) pg TEQ g⁻¹ lipid, respectively. Among the individual congeners of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs, most congeners did not significantly decrease from 2004 to 2014. Though the concentrations of 1,2,3,6,7,8-hexaCDD, 2,3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-hexaCDF, and 1,2,3,6,7,8-hexaCDF—all considered characteristic congeners in the blood of Yusho patients—decreased significantly from 2004 to 2014, the decreasing ratios of these congeners tended to decrease slightly. These findings suggest that the half-lives of individual congener concentrations of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in the blood are proving to be long to near infinity in the majority of Yusho patients.

Keywords : Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, Polychlorinated dibenzofurans, Polychlorinated biphenyls, Human blood, Yusho

Introduction

The 1968 Yusho poisoning accident affected

over 1,800 people in western Japan, and was caused by the accidental ingestion of rice bran oil containing PCBs, PCDFs, PCDDs, polychlorinated

Corresponding author : Takashi TODAKA
Kitakyusyu Life Science Center, Public Interest Incorporated Foundation, Nakabarushinmachi 1-4, Tobata-ku, Kitakyusyu-shi, Fukuoka 804-0003
Tel : +81-93-881-8282 Fax : +81-93-881-8333
E-mail : todaka@klsc.or.jp

quarterphenyls (PCQs), and polychlorinated terphenyls (PCTs)¹⁾. Since the Yusho outbreak, the National Study Group for the Therapy of Yusho has carried out medical care and health examinations of the affected population. In 2001, technological advances made it possible to measure PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs in small amounts of blood^{2)–4)}. We have measured the concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood collected from Yusho patients in medical health examinations since 2002^{5)–7)}. Moreover, we have conducted a congener-specific analysis of non-dioxin-like PCBs in the blood of these patients since 2004^{8)–10)}. Based on these results, 2,3,4,7,8-pentaCDF has been recognized as the most important causative agent for the subjective symptoms of Yusho¹¹⁾. We also reported that Yusho patients continue to have higher concentrations of PCDFs in their blood than unaffected people, and that the concentration of PCDFs in the blood is significantly correlated with the intensity of Yusho symptoms¹²⁾¹³⁾. To provide useful information related to the health risks of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in Yusho patients, we previously reported on changes in the individual congener concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood of Yusho patients¹⁴⁾. The objective of this study was to extend our previous studies.

Out of 243 and 246 Yusho patients who received medical health examinations in 2004 and 2014, respectively, there were 118 patients in whom the blood concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs were measured both years. In these 118 Yusho patients, we compared the individual congener concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood measured in 2004 with those measured in 2014.

Materials and Methods

1. Sampling

Medical health examinations have been performed annually on Yusho patients to determine their health status since the Yusho incident. The

medical health examination is open not only to those persons officially registered as Yusho patients but also to Yusho-suspected persons who regard themselves as potential victims. Both officially registered Yusho patients and Yusho-suspected persons are examined based on the “Diagnostic Criteria for Yusho”¹¹⁾. The blood samples examined in this study were collected from 243 and 246 participants who received medical health examinations in 2004 and 2014, respectively, each of whom gave informed consent to participate in this study. Blood samples of 10 ml were collected using a vacuum blood-collecting tube containing heparin and were stored at 4°C until analyses for the concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs.

2. Materials

Native congeners of PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs, and non-dioxin-like PCBs were purchased from Wellington Laboratories (Guelph, Canada). [¹³C₁₂]–congeners of PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs, and non-dioxin-like PCBs as internal standards were also purchased from Wellington Laboratories. Active carbon columns were prepared as follows: active carbon was purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan), refluxed with toluene for 1 hour 3 times, and dried in vacuum, after which 500 mg of the active carbon was mixed with 500 g of anhydrous sodium sulfate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan). A silver nitrate/silica gel was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. All reagents and solvents used in this experiment were of the analytic grade of dioxin that is commercially available.

3. Analysis of PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs, and non-dioxin-like PCBs

The extraction and purification of PCDDs, PCDFs, non-*ortho* PCBs, and mono-*ortho* PCBs from blood samples were performed using a previously reported method²⁾⁸⁾. Concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs and concen-

trations of 58 non-dioxin-like PCB congeners were determined by a previously reported method²⁾⁸⁾.

4. Quality control

To evaluate the accuracy and reliability of the analysis of PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs, and non-dioxin-like PCBs, our laboratory participated quality control studies of the analysis of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in 2013, 2015, 2017, and 2019 and non-dioxin-like PCBs in 2014, 2016, and 2018. Each quality control study involved the participation of various laboratories that perform measurements for these compounds in human blood in Japan. In each quality control study, our results were compared with those of participating laboratories, and tests confirmed that the average variation among values obtained by each organization performing the analysis was within 10%. These results indicated that our laboratory's analytical methods regarding PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs, and non-dioxin-like PCBs in human blood provided accurate results.

5. Data analysis

To estimate the toxicity equivalence (TEQ) concentrations, we introduced ND (less than the detection limit) values to half values of the detection limit and calculated based on the toxic equivalency factor (TEF) values proposed by the WHO¹⁵⁾. Statistical analysis was conducted using the Wilcoxon signed-rank test in the software programs from IBM SPSS Statistics 24 (Advanced Analytics, Inc). Significant probabilities (p values) were calculated for the respective number of samples analyzed.

Results and Discussion

The objective of the present study was to extend our previous studies by reporting the changes in the individual congener concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood of Yusho patients from 2004 to 2014¹⁴⁾. Out of 243 and 246 Yusho patients who received

medical health examinations in 2004 and 2014, respectively, there were 118 patients in whom the blood concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs were measured both years. In these 118 Yusho patients, the individual congener concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood samples measured in 2004 were compared with those measured in 2014 (Table 1). The total TEQ concentrations of PCDDs, PCDFs, non-*ortho* PCBs, and mono-*ortho* PCBs in the blood of 118 Yusho patients in 2004 and 2014 were 5.2–533 (mean : 80, median : 52) and 11–545 (mean : 78, median : 73) pg TEQ g⁻¹ lipid, respectively. The TEQ concentrations of PCDDs, PCDFs, non-*ortho* PCBs, and mono-*ortho* PCBs in the blood of Yusho patients were 16, 51, 12, and 1.7 pg TEQ g⁻¹ lipid in 2004, respectively, and 16, 45, 14, and 2.0 pg TEQ g⁻¹ lipid in 2014, respectively, indicating that the concentrations of PCDFs in the blood of Yusho patients significantly decreased from 2004 to 2014 ($p < 0.001$).

We previously reported that the concentrations of 1,2,3,6,7,8-hexaCDD, 2,3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-hexaCDF, and 1,2,3,6,7,8-hexaCDF in the blood of Yusho patients were higher than those of normal controls⁸⁾. These can be considered the characteristic congeners in the blood of Yusho patients. Of these four congeners, the concentrations of 1,2,3,6,7,8-hexaCDD, 2,3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-hexaCDF, and 1,2,3,6,7,8-hexaCDF were 46, 151, 37, and 15 pg g⁻¹ lipid in 2004, respectively, and 41, 137, 25, and 12 pg g⁻¹ lipid in 2014, respectively, indicating that these congeners decreased significantly from 2004 to 2014 ($p < 0.001$). In addition, the concentrations of 1,2,3,7,8,9-hexaCDD, 1,2,3,4,6,7,8-heptaCDD, octaCDD, and 1,2,3,4,6,7,8-heptaCDF showed a trend of decrease from 2004 to 2014 ($p < 0.001$). However, among individual congeners of dioxin-like PCBs, most congeners did not significantly decrease from 2004 to 2014.

Among the 118 patients, the blood concentrations of 2,3,4,7,8-pentaCDF were under

Table 1 Concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood of 118 Yusho patients

Congeners	Concentration (pg/g lipid)										Ratio	
	2004					2014						
	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	2014/2004	<i>p</i> Values
2,3,7,8-TetraCDD	1.3	1.3	0.7	4.4	0.5	1.6	0.9	1.5	4.2	0.5	1.2	< 0.001
1,2,3,7,8-PentaCDD	8.7	8.1	4.3	33	1.0	9.6	5.4	8.9	41	1.9	1.1	0.001
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	2.5	2.4	1.5	8.3	1.0	2.2	1.6	2.1	12	1.0	0.9	0.011
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	46	37	35	247	4.8	41	35	29	248	3.0	0.9	< 0.001
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	4.3	3.3	3.4	23	1.0	3.2	3.0	2.6	18	1.0	0.7	< 0.001
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	49	44	25	196	16	37	24	33	208	11	0.8	< 0.001
OctaCDD	714	624	359	2,305	181	511	292	424	1,779	95	0.7	< 0.001
Total PCDDs	825	741	393	2,459	205	605	318	517	1,930	138	0.7	< 0.001
2,3,7,8-TetraCDF	1.6	1.3	1.3	7.2	0.5	2.6	5.5	1.4	43	0.5	1.6	0.329
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.8	0.5	0.7	4.1	0.5	1.1	1.1	0.5	5.6	0.5	1.4	0.002
2,3,4,7,8-PentaCDF	151	79	192	1,240	4.1	137	180	67	1,261	5.8	0.9	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	37	14	63	514	1.0	25	48	8.6	402	1.0	0.7	< 0.001
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	15	8.2	20	176	1.0	12	19	6.9	174	1.0	0.8	< 0.001
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	ND					ND						
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	ND					ND						
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	2.5	1.5	2.6	24	1.0	1.8	2.3	1.0	21	1.0	0.7	< 0.001
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	ND					ND						
OctaCDF	ND					ND						
Total PCDFs	213	109	273	1,946	13	186	244	101	1,875	16	0.9	< 0.001
TriCB-77	ND					ND						
TriCB-81	ND					ND						
PentaCB-126	82	66	62	441	5.0	91	65	77	428	17	1.1	< 0.001
PentaCB-169	121	105	79	361	11	180	124	149	677	23	1.5	< 0.001
Total Non- <i>ortho</i> PCBs	219	193	120	696	26	283	161	254	856	50	1.3	< 0.001
PentaCB-105	3,111	2,239	2,425	15,888	563	3,197	2,503	2,654	19,926	606	1.0	0.134
PentaCB-114	1,721	1,339	1,363	8,660	208	2,033	1,712	1,622	10,177	234	1.2	< 0.001
PentaCB-118	14,872	11,534	11,468	80,220	2,355	16,238	14,513	12,544	133,844	2,853	1.1	0.005
PentaCB-123	265	195	220	1,385	5.0	249	223	196	1,502	16	0.9	0.150
HexaCB-156	23,217	17,570	19,537	90,316	5.0	28,518	27,967	19,752	175,909	1,961	1.2	< 0.001
HexaCB-157	6,639	4,980	5,510	25,277	351	7,332	7,635	5,311	47,932	318	1.1	0.050
HexaCB-167	3,057	2,360	2,108	13,497	483	3,957	2,838	3,318	20,467	541	1.3	< 0.001
HeptaCB-189	3,402	2,629	2,720	11,402	5.0	4,276	3,843	3,261	23,833	137	1.3	< 0.001
Total Mono- <i>ortho</i> PCBs	56,283	45,958	34,608	159,176	5,971	65,802	47,855	56,430	268,679	6,767	1.2	< 0.001
TEQ from PCDDs	16	14	8.3	63	2.4	16	9.2	15	72	3.7	1.0	0.288
TEQ from PCDFs	51	26	66	442	1.7	45	60	23	437	2.7	0.9	< 0.001
TEQ from PCDDs/PCDFs	67	40	72	505	4.1	62	68	38	509	6.4	0.9	< 0.001
TEQ from non- <i>ortho</i> PCBs	12	10	7.4	50	0.8	14	8.6	13	52	2.4	1.2	< 0.001
TEQ from mono- <i>ortho</i> PCBs	1.7	1.4	1.0	4.8	0.2	2.0	1.4	1.7	8.1	0.2	1.2	< 0.001
TEQ from dioxin-like PCBs	14	12	8.2	54	1.0	16	9.7	15	57	2.6	1.2	< 0.001
Total TEQ	80	52	75	533	5.2	78	73	54	545	11	1.0	0.288

ND (less than the determination limit) values introduced to half values of the detection limit.

SD : standard deviation.

CDD : chlorinated dibenzo-*p*-dioxin.

CDF : chlorinated dibenzofuran.

CB : chlorinated biphenyl.

100 pg g⁻¹ lipid in 67 patients and over 100 pg g⁻¹ lipid in 51 patients. In the 51 over 100 pg g⁻¹ lipid group, the arithmetic mean TEQ concentrations of PCDDs, PCDFs, non-*ortho* PCBs, and mono-*ortho* PCBs in the blood were 21, 101, 13, and 2.2 pg TEQ g⁻¹ lipid in 2004, respectively, and 22, 90, 17, and 2.7 pg TEQ g⁻¹ lipid in 2014, respectively, with the total TEQ concentrations of these dioxin-like compounds ranging from 50 to 533 (mean : 137, median : 84) and 47 to 545 (mean : 132, median : 83) pg TEQ g⁻¹ lipid in 2004 and 2014, respectively (Table 2). With respect to the characteristic congeners in the blood of Yusho patients, the concentrations of 1,2,3,6,7,8-hexaCDD, 2,3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-hexaCDF, and 1,2,3,6,7,8-hexaCDF were found to decrease slightly from year to year. These results in the high-2,3,4,7,8-pentaCDF patients were almost the same as those in the total 118 Yusho patients.

Of the 118 Yusho patients, 61 were men and 57 were women. The arithmetic mean TEQ concentrations of PCDDs, PCDFs, non-*ortho* PCBs, and mono-*ortho* PCBs in the blood of the 61 men were 5.2 – 252 (mean : 60, median : 45) in 2004 and 11 – 249 (mean : 58, median : 43) pg TEQ g⁻¹ lipid in 2014 (Table 3). The concentrations in the 57 women were 12 – 533 (mean : 102, median : 93) in 2004 and 15 – 545 (mean : 100, median : 91) pg TEQ g⁻¹ lipid in 2014, indicating that the total TEQ concentrations in women in 2004 and 2014 were significantly higher than those in men (Table 4). Regarding the characteristic congeners in the blood of Yusho patients, the concentrations of 1,2,3,6,7,8-hexaCDD, 2,3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-hexaCDF, and 1,2,3,6,7,8-hexaCDF showed a trend of decrease from 2004 to 2014 in both men and women. The decreasing ratios of individual congener concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from 2004 to 2014 in women were almost the same as those in men, suggesting that there is probably no sex difference regarding the enzyme that catalyzes the metabolism of dioxin-like compounds in

humans.

According to the results of the present study, among the individual congeners of PCDDs, PCDFs, and PCBs, most congeners of these compounds did not significantly decrease from 2004 to 2014. However, the concentrations of 1,2,3,6,7,8-hexaCDD, 2,3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-hexaCDF, and 1,2,3,6,7,8-hexaCDF in the blood of Yusho patients significantly decreased from 2004 to 2014. In addition, the concentrations of 1,2,3,7,8,9-hexaCDD, 1,2,3,4,6,7,8-heptaCDD, octaCDD, and 1,2,3,4,6,7,8-heptaCDF were also showed a trend of decrease from 2004 to 2014.

Although over 50 years have passed since the outbreak of Yusho, many patients still suffer various symptoms such as chloracne, general fatigue and neuropathy. There are patients who continue to have much higher concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in their blood than unaffected persons. The investigations conducted in the present study suggest that the PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs that have remained in the bodies of Yusho patients are very difficult to excrete from the body, and that the half-lives of individual congener concentrations of these dioxin like-compounds in the blood are proving to be long to near infinity in the majority of Yusho patients.

Acknowledgment

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for scientific research from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

References

- 1) Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura Y and Masuda Y : Yusho : a human disaster caused by PCBs and related compounds. Fukuoka : Kyushu University Press, 1996.
- 2) Todaka T, Hirakawa H, Tobiihi K and Iida T : New protocol for dioxin analysis of human blood. Fukuoka Igaku Zasshi. 94 : 148-157, 2003.
- 3) Iida T and Todaka T : Measurement of dioxins in human blood : improvement of analytical

Table 2 Concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood of 51 Yusho patients

Congeners	Concentration (pg/g lipid)										Ratio	
	2004					2014						
	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	2014/2004	<i>p</i> Values
2,3,7,8-TetraCDD	1.4	0.8	1.3	4.4	0.5	1.8	0.8	1.7	4.0	0.5	1.2	0.003
1,2,3,7,8-PentaCDD	11	5	11	33	4.1	13	6.1	11	41	5.0	1.1	0.010
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	2.67	1.33	2.61	6.74	1.00	2.4	1.4	2.3	6.3	1.0	0.9	0.042
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	69	39	61	247	23	64	40	49	248	17	0.9	0.001
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	5.0	4.1	3.6	23	1.0	3.9	3.5	3.0	18	1.0	0.8	< 0.001
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	48	19	44	98	16	35	14	33	84	13	0.7	< 0.001
OctaCDD	687	297	612	1,760	265	542	254	493	1,317	107	0.8	< 0.001
Total PCDDs	825	330	738	1,973	324	662	269	653	1,463	161	0.8	< 0.001
2,3,7,8-TetraCDF	2.22	1.64	1.92	7.20	0.50	2.3	2.5	1.8	16	0.5	1.1	0.687
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.95	0.69	0.50	3.10	0.50	1.1	1.0	0.5	4.8	0.5	1.2	0.256
2,3,4,7,8-PentaCDF	301	211	231	1,240	106	273	203	211	1,261	87	0.9	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	76	81	49	514	14	52	64	29	402	3.7	0.7	< 0.001
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	27	26	20	176	6.6	23	26	15	174	2.8	0.8	< 0.001
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	ND					ND						
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	ND					ND						
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	2.5	1.8	2.0	8.4	1.0	2.0	2.9	1.0	21	1.0	0.8	0.002
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	ND					ND						
OctaCDF	ND					ND						
Total PCDFs	415	314	333	1,946	135	359	290	262	1,875	112	0.9	< 0.001
TriCB-77	ND					ND						
TriCB-81	ND					ND						
PentaCB-126	78	55	64	354	27	92	56	79	323	24	1.2	< 0.001
PentaCB-169	174	78	156	361	49	264	128	241	677	79	1.5	< 0.001
Total Non- <i>ortho</i> PCBs	268	119	256	696	91	367	161	333	856	132	1.4	< 0.001
PentaCB-105	2,761	1,988	2,180	12,894	941	2,977	1,665	2,607	9,721	909	1.1	0.694
PentaCB-114	2,516	1,493	1,964	8,660	848	3,065	1,769	2,474	10,177	837	1.2	0.001
PentaCB-118	13,441	9,333	10,335	59,893	4,613	15,409	8,394	12,698	47,970	4,863	1.1	< 0.001
PentaCB-123	223	198	180	1,268	5.0	219	149	168	827	64	1.0	0.023
HexaCB-156	36,739	20,764	31,628	90,316	7,320	46,431	32,682	38,547	175,909	9,250	1.3	< 0.001
HexaCB-157	10,130	5,947	8,477	25,277	1,996	12,335	8,943	10,501	47,932	2,437	1.2	< 0.001
HexaCB-167	3,444	2,031	2,626	10,040	1,002	4,467	2,038	3,956	10,483	1,655	1.3	0.001
HeptaCB-189	5,035	2,718	4,422	11,402	960	6,539	4,243	5,543	23,833	1,348	1.3	< 0.001
Total Mono- <i>ortho</i> PCBs	74,289	35,228	68,154	159,176	22,680	91,442	49,916	79,465	268,679	28,912	1.2	< 0.001
TEQ from PCDDs	21	9.1	20	63	7.5	22	10	20	72	8.0	1.0	0.238
TEQ from PCDFs	101	73	79	442	34	90	69	67	437	28	0.9	< 0.001
TEQ from PCDDs/PCDFs	122	81	107	505	44	112	78	87	509	38	0.9	< 0.001
TEQ from non- <i>ortho</i> PCBs	13	6.8	12	43	4.7	17	8.0	16	41	6.2	1.3	< 0.001
TEQ from mono- <i>ortho</i> PCBs	2.2	1.1	2.0	4.8	0.7	2.7	1.5	2.4	8.1	0.9	1.2	< 0.001
TEQ from dioxin-like PCBs	15	7.7	14	48	5.5	20	9.2	18	45	7.5	1.3	< 0.001
Total TEQ	137	84	119	533	50	132	83	113	545	47	1.0	0.023

ND (less than the determination limit) values introduced to half values of the detection limit.

SD : standard deviation.

CDD : chlorinated dibenzo-*p*-dioxin.

CDF : chlorinated dibenzofuran.

CB : chlorinated biphenyl.

Table 3 Concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood of 61 men

Congeners	Concentration (pg/g lipid)										Ratio 2014/2004 <i>p</i> Values	
	2004					2014						
	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum		
2,3,7,8-TetraCDD	1.3	0.8	1.3	4.4	0.5	1.6	0.8	1.5	3.8	0.5	1.2	0.004
1,2,3,7,8-PentaCDD	7.8	3.4	7.7	18	1.0	8.4	4.0	7.9	21	1.9	1.1	0.018
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	2.5	1.6	2.4	8.3	1.0	2.3	1.8	2.1	12	1.0	0.9	0.267
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	40	28	34	132	4.8	33	26	25	115	3.0	0.8	< 0.001
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	4.0	3.1	3.1	19	1.0	2.7	2.6	2.1	17	1.0	0.7	< 0.001
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	48	28	41	196	16	40	31	34	208	11	0.8	0.001
OctaCDD	705	376	594	1,811	181	531	335	422	1,779	107	0.8	< 0.001
Total PCDDs	809	418	712	2,135	205	619	369	504	1,930	161	0.8	< 0.001
2,3,7,8-TetraCDF	1.6	1.2	1.3	7.2	0.5	3.0	5.5	1.3	28	0.5	1.8	0.178
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.8	0.7	0.5	4.1	0.5	1.3	1.3	0.5	5.0	0.5	1.6	0.003
2,3,4,7,8-PentaCDF	92	107	55	541	4.1	81	93	50	479	5.8	0.9	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	20	33	10	234	1.0	12	22	6	164	1.0	0.6	< 0.001
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	10	12	7.2	85	1.0	8.1	9.5	5.6	70	1.0	0.8	< 0.001
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	ND					ND						
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	ND					ND						
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	2.8	3.4	2.0	24	1.0	1.8	1.7	1.0	12	1.0	0.7	0.001
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	ND					ND						
OctaCDF	ND					ND						
Total PCDFs	133	150	78	871	13	113	122	75	725	16	0.8	< 0.001
TriCB-77	ND					ND						
TriCB-81	ND					ND						
PentaCB-126	91	78	69	441	5.0	96	77	80	428	17	1.1	0.180
PentaCB-169	118	73	107	361	11	169	116	146	677	23	1.4	< 0.001
Total Non- <i>ortho</i> PCBs	225	137	182	696	26	278	171	237	856	50	1.2	< 0.001
PentaCB-105	3,424	2,733	2,890	15,888	563	3,290	2,355	2,709	12,923	606	1.0	0.028
PentaCB-114	1,378	997	1,101	5,098	208	1,505	1,181	1,269	6,021	244	1.1	0.717
PentaCB-118	15,612	11,372	13,364	62,223	2,355	15,995	11,383	12,318	62,596	2,853	1.0	0.053
PentaCB-123	289	244	231	1,385	5.0	255	227	202	1,484	17	0.9	0.558
HexaCB-156	20,945	17,096	16,866	90,316	393	24,609	24,675	18,604	161,802	1,961	1.2	< 0.001
HexaCB-157	5,927	4,867	4,691	23,883	351	6,062	6,562	4,545	43,561	318	1.0	0.006
HexaCB-167	2,988	2,269	2,323	13,497	483	3,765	2,768	3,327	18,126	541	1.3	0.957
HeptaCB-189	3,352	2,654	2,654	11,402	311	4,080	3,898	2,940	23,833	137	1.2	0.001
Total Mono- <i>ortho</i> PCBs	53,915	34,349	44,754	159,176	5,971	59,560	43,870	48,702	268,340	6,767	1.1	0.026
TEQ from PCDDs	14	6.8	13	33	2.4	14	7.0	13	37	3.7	1.0	0.838
TEQ from PCDFs	31	36	18	195	1.7	27	31	16	168	2.7	0.9	< 0.001
TEQ from PCDDs/PCDFs	46	41	33	225	4.1	41	36	33	204	6.4	0.9	< 0.001
TEQ from non- <i>ortho</i> PCBs	13	9.1	10	50	0.8	15	10	13	52	2.4	1.2	< 0.001
TEQ from mono- <i>ortho</i> PCBs	1.6	1.0	1.3	4.8	0.2	1.8	1.3	1.5	8.1	0.2	1.1	0.026
TEQ from dioxin-like PCBs	14	10	12	54	1.0	16	11	14	57	2.6	1.2	< 0.001
Total TEQ	60	45	49	252	5.2	58	43	48	249	11	1.0	0.200

ND (less than the determination limit) values introduced to half values of the detection limit.

SD : standard deviation.

CDD : chlorinated dibenzo-*p*-dioxin.

CDF : chlorinated dibenzofuran.

CB : chlorinated biphenyl.

Table 4 Concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood of 57 women

Congeners	Concentration (pg/g lipid)										Ratio	
	2004					2014						
	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	2014/2004	<i>p</i> Values
2,3,7,8-TetraCDD	1.3	0.6	1.3	3.1	0.5	1.5	0.9	1.5	4.2	0.5	1.2	0.006
1,2,3,7,8-PentaCDD	9.7	5.0	8.3	33	3.3	11	6.3	9.7	41	2.8	1.1	0.014
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	2.5	1.3	2.4	6.8	1.0	2.1	1.3	2.2	6.3	1.0	0.8	0.013
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	52	40	43	247	6.4	49	41	40	248	8.1	0.9	0.010
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	4.6	3.8	3.8	23	1.0	3.7	3.4	2.9	18	1.0	0.8	< 0.001
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	50	20	47	104	16	34	14	30	80	12	0.7	< 0.001
OctaCDD	722	341	630	2,305	242	489	234	424	1,251	95	0.7	< 0.001
Total PCDDs	843	364	762	2,459	306	590	253	568	1,366	138	0.7	< 0.001
2,3,7,8-TetraCDF	1.7	1.4	1.3	5.8	0.5	2.3	5.6	1.5	43	0.5	1.4	0.925
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.8	0.6	0.5	2.9	0.5	0.9	0.8	0.5	5.6	0.5	1.2	0.400
2,3,4,7,8-PentaCDF	213	238	136	1,240	5.3	197	225	136	1261	8.5	0.9	0.034
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	55	80	29	514	1.0	39	62	17	402	2.2	0.7	< 0.001
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	20	25	11	176	1.0	17	25	9.3	174	1.0	0.9	< 0.001
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	ND					ND						
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	ND					ND						
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	2.2	1.4	1.0	5.8	1.0	1.8	2.8	1.0	21	1.0	0.8	0.003
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	ND					ND						
OctaCDF	ND					ND						
Total PCDFs	298	340	178	1,946	14	264	309	166	1,875	20	0.9	< 0.001
TriCB-77	ND					ND						
TriCB-81	ND					ND						
PentaCB-126	72	37	64	157	25	85	47	76	211	22	1.2	< 0.001
PentaCB-169	124	84	104	361	23	191	130	164	588	36	1.5	< 0.001
Total Non- <i>ortho</i> PCBs	211	98	198	493	61	287	150	268	712	69	1.4	< 0.001
PentaCB-105	2,776	1,989	2,180	13,355	843	3,098	2,649	2,607	19,926	773	1.1	0.896
PentaCB-114	2,087	1,588	1,736	8,660	272	2,599	1,989	2,034	10,177	234	1.2	< 0.001
PentaCB-118	14,081	11,517	10,573	80,220	4,180	16,499	17,241	12,698	133,844	4521	1.2	< 0.001
PentaCB-123	239	187	187	1,178	5.0	243	219	189	1,502	16	1.0	0.008
HexaCB-156	25,647	21,586	18,613	83,648	5.0	32,702	30,557	26,711	175,909	3,292	1.3	< 0.001
HexaCB-157	7,400	6,031	5,596	25,277	770	8,691	8,427	6,797	47,932	694	1.2	< 0.001
HexaCB-167	3,132	1,917	2,376	9,186	736	4,162	2,897	3,251	20,467	982	1.3	0.005
HeptaCB-189	3,455	2,788	2,615	11,211	5.0	4,487	3,773	3,736	19,231	460	1.3	< 0.001
Total Mono- <i>ortho</i> PCBs	58,818	34,705	51,520	158,563	13,428	72,481	50,941	62,139	268,679	14,193	1.2	< 0.001
TEQ from PCDDs	18	9.4	16	63	6.2	18	11	16	72	4.7	1.0	0.214
TEQ from PCDFs	72	82	45	442	2.1	65	76	43	437	3.3	0.9	0.001
TEQ from PCDDs/PCDFs	89	90	60	505	8.3	84	85	61	509	9.4	0.9	0.030
TEQ from non- <i>ortho</i> PCBs	11	4.8	11	23	3.5	14	6.9	13	30	3.3	1.3	< 0.001
TEQ from mono- <i>ortho</i> PCBs	1.8	1.0	1.5	4.8	0.4	2.2	1.5	1.9	8.1	0.4	1.2	< 0.001
TEQ from dioxin-like PCBs	13	6	12	28	3.9	16	8.1	15	36	3.8	1.3	< 0.001
Total TEQ	102	93	70	533	12	100	91	73	545	15	1.0	0.790

ND (less than the determination limit) values introduced to half values of the detection limit.

SD : standard deviation.

CDD : chlorinated dibenzo-*p*-dioxin.

CDF : chlorinated dibenzofuran.

CB : chlorinated biphenyl.

- method. *Ind Health*. 41 : 197-204, 2003.
- 4) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K and Iida T : Improvement in dioxin analysis of human blood and their concentrations in blood of Yusho patients. *J. Dermatol. Sci.* 1 : 21-28, 2005.
 - 5) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K and Iida T : Follow-up survey of dioxins concentrations in the blood of Yusho patients in 2002-2003. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 96 : 249-258, 2005.
 - 6) Todaka T, Hirakawa H, Kajiwara J, Hori T, Tobiishi K, Onozuka D, Iida T, Yoshimura T and Furue M : Dioxin concentration in the blood of patients collected during medical check-up for Yusho in 2004-2005. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 98 : 222-231, 2007.
 - 7) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Iida T and Furue M : Concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-*ortho* and mono-*ortho* polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. *Chemosphere*. 66 : 1983-1989, 2007.
 - 8) 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.
 - 9) Todaka T, Hori T, Hirakawa H, Kajiwara J, Yasutake D, Onozuka D, Iida T and Furue M : Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients over 35 years after the incident. *Chemosphere*. 74 : 902-909, 2009.
 - 10) 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 2004-2007. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 100(5) : 156-165, 2009.
 - 11) Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T and Kuwabara M : Overview of Yusho. *J. Dermatol. Sci.* 1 : 3-10, 2005.
 - 12) Imamura T, Kanagawa Y, Matsumoto S, Tajima B, Uenotsuchi T, Shibata S and Furue M : Relationship between clinical features and blood levels of pentachlorodibenzo-Furan in patients with Yusho. *Environ Toxicol*. 22 : 124-131, 2007.
 - 13) 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 : 47-57, 2008.
 - 14) Todaka T, Uchi H, Hirakawa H, Takao Y, Kajiwara J and Furue M : The changes in dioxin concentrations in the blood of Yusho patients from 2004 to 2010. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 104 (4) : 118-127, 2013.
 - 15) Van den Berg M, Birnbaum L, Denison M, DeVito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N and Peterson R.E : The 2005 World Health Organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Tox. Sci.* 93 : 223-241, 2006.

(Received for publication March 15, 2019)

(和文抄録)

平成 16 および平成 26 年度に測定した油症患者血液中 ダイオキシン類濃度の比較

¹⁾公益財団法人北九州生活科学センター

²⁾福岡県保健環境研究所

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

戸高 尊¹⁾, 広瀬 勇氣¹⁾, 上原口奈美¹⁾, 千々和勝己¹⁾, 池田 光政¹⁾,
高尾 圭子²⁾, 三 苦 千 景³⁾, 古 江 増 隆³⁾⁴⁾

平成 16 および平成 26 年度, その両年度に油症検診を受診した 118 名の血液中ダイオキシン類濃度の比較を行い, 各異性体の濃度推移を調べた. 今回調査した異性体の中で, 最も濃度が減少していたのは 1,2,3,4,7,8-hexaCDF で, 約 30%の濃度低下が認められた. 油症の主要原因物質である 2,3,4,7,8-pentaCDF は約 10%濃度が減少していた. 男女間での比較では, 女性の方が高い値を示したが, 10 年間の濃度推移に関しては, 男女間での相違は認められなかった.

キーワード: ポリ塩化ジベンゾダイオキシン, ポリ塩化ジベンゾフラン, ポリ塩化ビフェニル, ヒト血液, 油症

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

- ¹⁾中村学園大学栄養科学部 食品学研究室
²⁾中村学園大学栄養科学部 食品衛生学研究室
³⁾徳島文理大学香川薬学部 薬物動態学講座
⁴⁾第一薬科大学 分析化学教室
⁵⁾北海道医療大学薬学部 病院薬学講座
⁶⁾北海道医療大学薬学部 衛生薬学講座

太田千穂¹⁾, 山本健太¹⁾, 加藤善久³⁾, 藤井由希子⁴⁾, 原口浩一⁴⁾,
木村 治⁵⁾, 遠藤哲也⁶⁾, 古賀信幸²⁾

Metabolism of 2,2',3,4',5,6,6'-Heptachlorobiphenyl (CB188) by Rat and Guinea Pig Liver Microsomes

Chiho OHTA¹⁾, Kenta YAMAMOTO¹⁾, Yoshihisa KATO³⁾, Yukiko FUJII⁴⁾, Koichi HARAGUCHI⁴⁾,
Osamu KIMURA⁵⁾, Tetsuya ENDO⁶⁾ and Nobuyuki KOGA²⁾

¹⁾²⁾*Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University, 5-7-1, Befu,
Johnan-ku, Fukuoka 814-0198*

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

⁴⁾*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 22-1 Tamagawa-cho,
Minami-ku, Fukuoka 815-8511*

⁵⁾⁶⁾*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido,
1757 Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293*

Abstract

The metabolism of a 2,4,6-trichloro-substituted PCB, 2,2',3,4',5,6,6'-heptachlorobiphenyl (CB188), by rat and guinea pig liver microsomes was compared to that of a 2,4,5-trichloro-substituted PCB, 2,2',3,4',5,5',6'-heptachlorobiphenyl (CB187) using liver microsomes of untreated, phenobarbital (PB)-treated and 3-methylcholanthrene (MC)-treated rats and guinea pigs. Two metabolites, M1 and M2, were produced only by liver microsomes of PB-treated rats with rates of 554 and 187 pmol/hr/mg protein, respectively, but no metabolite by liver microsomes of untreated and MC-treated rats. In addition, no metabolite was observed by all kinds of guinea pig liver microsomes used in this study. GC-MS revealed that both M1 and M2 were mono-hydroxylated CB188. Also, the methylated M1 almost completely agreed with a synthesized authentic 3'-methoxy-CB188 in terms of the retention times and mass fragmentation. These results suggest that 3'-OH-CB188 is a major metabolite formed by PB-inducible CYP2B enzymes in rats and that the 2,4,6-trichloro-substituted PCBs are metabolized much more easily than the 2,4,5-trichloro-substituted PCBs.

Key words : PCB, metabolism, rat, guinea pig

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs) は、代表的な高残留性有機汚染物質 (POPs, persistent organic pollutants) の1つである。その高い脂溶性のため、ヒトをはじめとする多くの哺乳動物の血液、脂肪組織および肝臓に高濃度で検出されている¹⁾。特に、塩素数が6個以上で、さらに2,4,5-三塩素置換ベンゼン環、あるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼン環を有する PCB 異性体、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、ヒト健常者血中から高濃度で検出されている²⁾⁻⁶⁾。一方、カネミ油症事件発生後37年を経過した油症患者の血液中からは、前述の CB153、CB138 および CB180 に加え、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) も高濃度検出され、さらに CB180、CB170 および 2,3,3',4,4',5'-hexaCB (CB156) については、ヒト健常者の2.2~3.9倍多いことも報告されている⁷⁾。これらの事実は、上記のような高塩素化 PCB 異性体がほとんど代謝されず、その結果、体内に長期にわたり残留していることを示唆している。

さらに、4-hydroxy (OH)-CB187、4-OH-CB146、4-OH-2,3,3',4',5'-pentachlorobiphenyl (pentaCB) (CB107) および 3-OH-CB153 などの PCB 代謝物もヒト血液中や肝臓中から比較的高濃度で検出されている²⁾⁻⁶⁾⁸⁾。これらは、肝小胞体のチトクロム P450 (CYP) によって、水酸化されたものの、依然として高い脂溶性を有しているため⁹⁾、あるいは生体成分との高い親和性から¹⁰⁾¹¹⁾、容易に体外に排泄されないものと考えら

れる。

最近、当研究室では2,2',3,4,4',5,6'-heptaCB (CB182) のラットおよびモルモット肝ミクロゾーム (Ms) による代謝を調べ、いずれの動物肝 Ms も代謝物として3'-OH-CB182を生成すること、さらに、phenobarbital (PB) 前処理ラット肝 Ms では、前出の CB187、CB180 および 2,2',3,4,4',5,6'-heptaCB (CB183) などの heptaCB と比べ、数10倍高い活性で代謝されることを明らかにした¹²⁾。この結果は、2,4,6-三塩素置換 PCB が、2,4,5-三塩素置換 PCB よりはるかに代謝されやすいことを示唆している。

そこで、本研究ではこの点をより明確にする目的で、2,4,6-三塩素置換ベンゼン環を有する別の PCB 異性体として、2,2',3,4',5,6,6'-heptaCB (CB188) を用いて、ラットおよびモルモット肝 Ms による代謝を調べ、2,4,5-三塩素置換 PCB の CB187 と比較した (Fig. 1)。また、CB188 代謝に関与する CYP 分子種についての情報を得るため、CYP 誘導剤の 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、1,2,4,5-tetrachlorobenzene、2,3,5,6-tetrachloroaniline、2,4,6-trichloroanisole、tetrachloroethylene および isopentyl 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)、PB、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

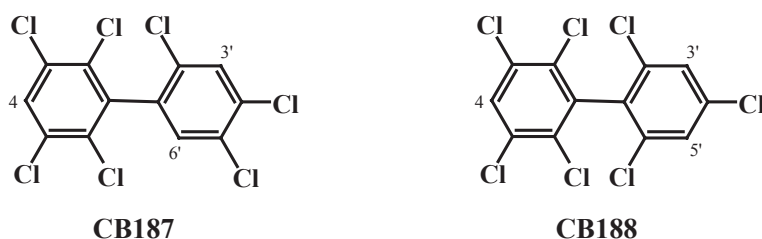


Fig. 1 Chemical structures of CB187 and CB188

は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, USA) から購入した。

(2) CB188 の合成

CB188 は Cadogan の方法¹³⁾ で合成した。すなわち、2,4,6-trichloroaniline 1.6 g および 1,2,4,5-tetrachlorobenzene 1.3 g を tetrachloroethylene 10 mL で溶解し、さらに isopentyl nitrite 1.0 mL を加えて、110°C で 24 時間反応させた。反応物はアルミナカラム (100 g, Merck 製) およびシリカゲルカラム (100 g, Merck 製) で部分精製した後、分取用 HPLC で精製した。CB188 は、保持時間 13.80 min に溶出されたので、このピークを分取し濃縮したところ、白色結晶が得られた。GC-MS の結果、分子量 392 であり、同位体ピークから 7 つの塩素が置換されていることを確認した。収量は 3.6 mg で、純度はほぼ 100% であった (データ未掲載)。以下、これを用いて、代謝研究を行った。

分取用 HPLC の条件は次の通りである。カラム, Inertsil ODS-HL カラム (250 × 10 mm i.d., S-5 μm, GL-Sciences 製); プレカラム, Inertsil ODS-A プレカラム (5 × 10 mm i.d., S-5 μm, GL-Sciences 製); 移動相, acetonitrile; 流速, 5 mL/min; 検出波長, 254 nm。CB188 の分子量は, GCMS2010 (島津製作所製) を用いて, EI モードで測定した。GC-MS の分析条件は次の通りである。カラム, DB-1 フュ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)。

CB188 : MS (EI) *m/z* (relative intensity, %) : 392 (100) [M⁺], 394 (234) [M⁺+2], 396 (214) [M⁺+4], 398 (110) [M⁺+6], 400 (37) [M⁺+8], 357 (6) [M⁺-Cl], 322 (92) [M⁺-Cl₂], 287 (18) [M⁺-Cl₃], 252 (68) [M⁺-Cl₄].

(3) 代謝物の合成

CB188 代謝物として、3'-OH 体を想定し、そのメチル誘導体 3'-methoxy (MeO)-CB188 の合成を、Cadogan の方法¹³⁾ で行った。すなわち、2,3,5,6-tetrachloroaniline 1.0 g および 2,4,6-trichloroanisole 1.3 g を tetrachloroethylene 10 mL で溶解し、さらに isopentyl 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*-hexane 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 (65 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-MS にて行った。

3'-MeO-CB188 : MS (EI) *m/z* (relative intensity, %) : 422 (100) [M⁺], 424 (225) [M⁺+2], 426 (219) [M⁺+4], 428 (112) [M⁺+6], 430 (39) [M⁺+8], 407 (55) [M⁺-CH₃], 379 (35) [M⁺-COCH₃], 372 (10) [M⁺-CH₃Cl], 309 (64) [M⁺-COCH₃Cl₂].

(4) 実験動物と薬物処理

Wistar 系雄性ラット (体重約 200 g) および Hartley 系雄性モルモット (体重約 280 g) を、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 4 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、また、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。

2. 肝 Ms による代謝

ラットおよびモルモット肝 Ms による CB188 の代謝は既報¹⁴⁾ に準じて行った。すなわち、40 μM CB188 を、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-PD 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ および動物肝 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、37°C で 60 min インキュベートした。反応後、chloroform-methanol (2:1) 0.5 mL と *n*-hexane 1.5 mL を加えて反応を停止させた後、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-MS に付した。代謝物の定量は、CB188 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¹⁵⁾ 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。

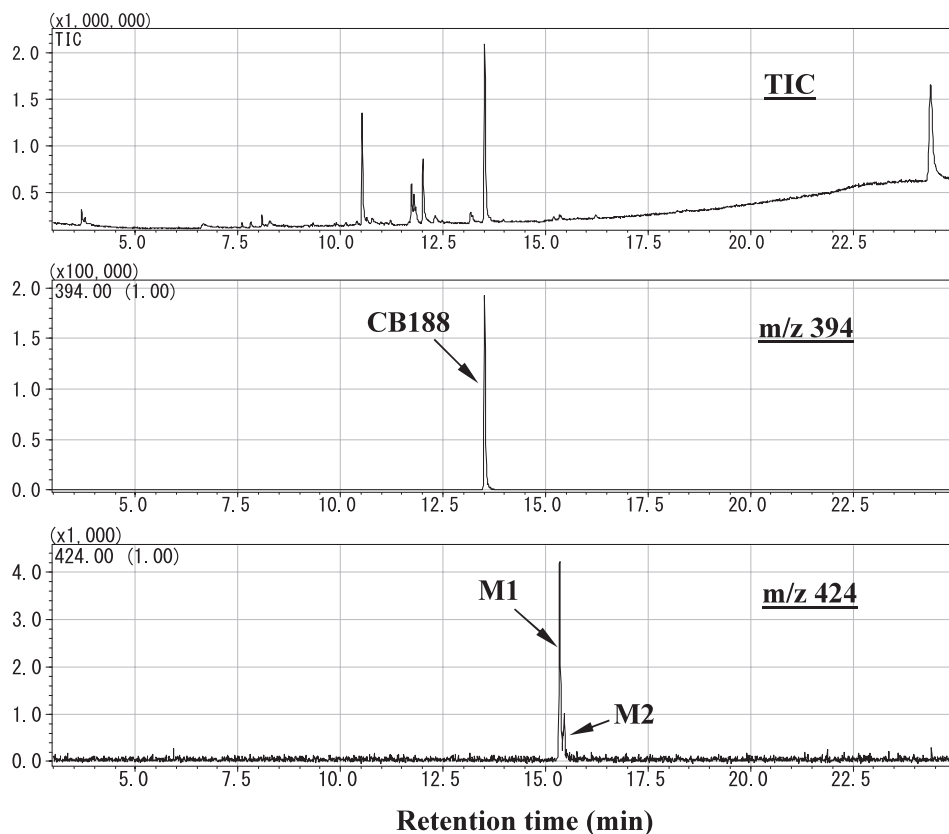


Fig. 2 GC-MS chromatograms of the methylated derivatives of CB188 metabolites produced by liver microsomes of PB-treated rats.

実験結果

1. ラット肝 Ms により生成された代謝物の化学構造

CB188 を, NADPH 存在下, 好氣的にラット肝 Ms とともに, 37°C, 60 min 反応させた. Fig. 2 には, PB 前処理ラット肝 Ms により生成された CB188 代謝物 (メチル誘導体) のガスクロマトグラムを示す. CB188 (保持時間 13.53 min) に引き続き, 2 種類の代謝物が保持時間 15.36 min と 15.47 min に検出された. 以下, それぞれ M1 と M2 とした.

GC-MS の結果, M1 および M2 のメチル誘導体は, 分子量 422 であり, 親化合物 CB188 の分子量より m/z 30 多かった (Fig. 3). この結果から, M1 および M2 はいずれも一水酸化体であることが明らかとなった. 次に, M1 (メチル誘導体) のマススペクトルをみると, 2 つのフラグメントイオン m/z 407 [$M^+ - 15$] および m/z 379 [$M^+ - 43$] が多く検出された (Fig. 3, Table 2). さらに,

別途, 予想代謝物として 3'-MeO-CB188 を合成し, M1 (メチル誘導体) と比較したところ, 両者は GC-MS における保持時間およびマススペクトルがいずれもほとんど完全に一致した. 一方, M2 (メチル誘導体) のマススペクトルは, M1 に比べ, フラグメントイオン m/z 407 [$M^+ - 15$] が半分以下であった. CB188 の化学構造から, もう 1 つは 4-OH 体であると考えられるが, この点は現在不明である. 以上の結果から, M1 は, 3'-OH-CB188 であることが示唆された.

2. ラットおよびモルモット肝 Ms による CB188 の代謝

次に, ラットおよびモルモット肝 Ms により生成される CB188 代謝物の M1 および M2 の定量を試みた (Table 2). ラットの場合, M1 および M2 は PB 前処理肝 Ms でのみ生成され, 代謝活性はそれぞれ 554 および 187 pmol/hr/mg protein であった. この代謝活性を, 既報¹⁴⁾ の CB187 の場合と比べると, 約 7 倍の高さであった. なお,

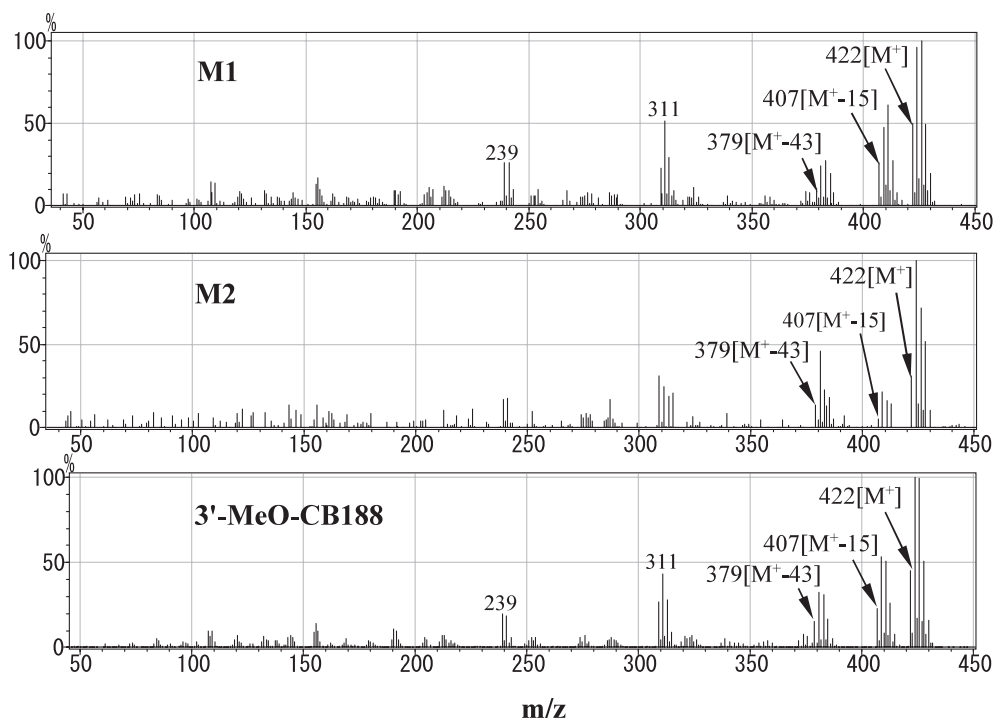


Fig. 3 Mass spectra of a synthetic 3'-MeO-CB188 and the methylated derivatives of M1 and M2.

Table 1 Mass spectral data and retention times of the methylated derivatives of two CB188 metabolites

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min) in GC-MS
		[M ⁺]	[M ⁺ - 15]	[M ⁺ - 35]	[M ⁺ - 43]	[M ⁺ - 50]	[M ⁺ - 70]	
CB188	392	100	-	6	-	-	92	13.53
M1	422	100	50	-	23	8	-	15.36
M2	422	100	18	-	62	-	-	15.47
3'-MeO-CB188	422	100	54	-	35	10	-	15.36

-, not detected.

両代謝物は未処理および MC 前処理ラット肝 Ms では全く生成されなかった。一方、モルモットの場合、CB187 代謝では、ラットより高い代謝活性が PB 前処理モルモット肝 Ms でみられたが、CB188 ではいずれのモルモット肝 Ms でも代謝物は全く生成されなかった。

考 察

本研究では、2,4,6-三塩素置換 PCB である CB188 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 を用いた。その結果、PB 前処理ラット肝 Ms によってのみ、2 種類の代謝

物 (M1, M2) が生成された。なお、未処理と MC 前処理ラット肝 Ms および未処理、PB 前処理および MC 前処理モルモット肝 Ms のいずれでも、代謝物は全く生成されなかった。GC-MS での結果、M1 と M2 はいずれも一水酸化体であること、さらに M1 は合成標品との比較から、3'-OH 体であることが明らかになった。M2 の化学構造は、親化合物 CB188 の構造から、4-OH 体であろうと推定されるが、現在検討中である。Fig. 3 に CB188 の推定代謝経路を示した。

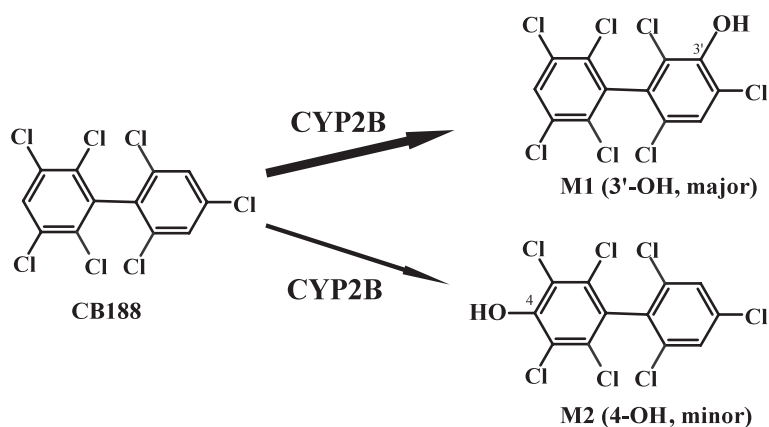
2,4,6-三塩素置換 PCB の CB188 は、PB 前処理ラット肝 Ms で比較すると、2,4,5-三塩素置換 PCB の CB187 よりも、はるかに水酸化されやす

Table 2 Metabolism of CB188 and CB187 by liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated rats and guinea pigs

PCB	Metabolite	Metabolite formed (pmol/hr/mg protein)		
		Untreated	PB-treated	MC-treated
Rat				
CB188	M1 (3'-OH)	N.D.	554±30	N.D.
	M2 (4-OH)	N.D.	187±21	N.D.
CB187 ¹⁴⁾	M1 (4'-OH-CB151)	N.D.	N.D.	N.D.
	M2 (4'-OH-CB178)	N.D.	87±14	N.D.
	M3 (4-OH-CB187)	N.D.	14±1	N.D.
Guinea pig				
CB188	M1 (3'-OH)	N.D.	N.D.	N.D.
	M2 (4-OH)	N.D.	N.D.	N.D.
CB187 ¹⁴⁾	M1 (4'-OH-CB151)	18±6	35±14	7±1
	M2 (4'-OH-CB178)	37±3	125±23	12±2
	M3 (4-OH-CB187)	15±4	10±0	17±2

N.D., not detected.

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

**Fig. 4** Postulated metabolic pathways of CB188 in rat liver

いことが明らかになった (Table 2). 当研究室では、これまでに CB187 代謝を調べ、1) 3 種類の代謝物が生成されること、2) それらの生成はいずれも PB で誘導されること、さらに、3) 主代謝物 4'-OH-CB178 の生成活性は PB 前処理ラット肝 Ms で 101 pmol/hr/mg protein, また、PB 前処理モルモット肝 Ms で 135 pmol/hr/mg protein であることを報告した¹⁴⁾. 今回、PB 前処理ラット肝 Ms による M1 と M2 の生成活性は、それぞ

れ 554 と 187 pmol/hr/mg protein であることから、CB187 代謝より、7.3 倍も高かった. 2,4,6-三塩素置換 PCB として、CB182 と CB188 以外に、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) などもあるが、これらはヒト組織中で検出されていない. 恐らく、ヒトにおいても容易に水酸化され、体外へ排泄されるものと考えられる.

PCB 水酸化機構としては、直接水酸化で進行する場合と、epoxide 中間体を經由して進行する場合の2つが考えられている⁹⁾。CB187 代謝では、主な代謝物として、4' 位の塩素原子が3' 位に NIH 転位したものが生成されたが、3'-OH 体は観察されていない。興味あることに、有吉らは PB 前処理イヌ肝 Ms による 2,2',4,4',6,6'-hexaCB (CB155) の代謝を調べ、主代謝物の 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'-hexaCB や 4-OH-2,2',4',6,6'-pentaCB を報告した¹⁶⁾。この結果から、イヌ肝においては、両方の水酸化機構が共存することが示唆される。本研究の CB188 代謝では、CB182¹²⁾と同様に、直接 3' 位水酸化が起こっていると考えられる。

今回、CB188 代謝において、ラットとモルモットで大きな種差が観察された。すなわち、CB188 代謝は、PB 前処理ラットでのみ促進されたが、モルモットでは全く代謝物が生成されなかった。この事実は、PB 誘導性のラット CYP2B1¹⁷⁾ は CB188 を代謝できるが、一方、PB 誘導性のモルモット CYP2B18¹⁸⁾ は CB188 を代謝できないことを示唆している。ところで、CB187 代謝ではラット CYP2B1 およびモルモット CYP2B18 の強い関与が示唆されている¹⁴⁾。本研究で見られた CB188 代謝の種差は、CB188 と CB187 の化学構造の違いが原因であるかもしれない。すなわち、CB187 は 2 (2') 位と 6 (6') 位に 3 個の塩素が置換された tri-ortho-PCB であるが、CB188 は 4 個の塩素が置換された tetra-ortho-PCB である。このように、CB188 は CB187 に比べ、よりかさばった立体構造を有するため、CYP2B18 の活性部位に接近できず、触媒活性が低くなったものと思われる。なお、PCB 代謝に関与するヒト CYP 分子種としては、これまでに、CYP2B6¹⁹⁾²⁰⁾ および CYP2A6²¹⁾²²⁾ が報告されている。もし、ヒトにおいて CB188 の 3' 位水酸化が起こった場合、CYP2B6 が強く関与していると考えられるが、この点は今後の課題である。

総 括

1. 2,4,6-三塩素置換 PCB の CB188 のラットおよびモルモット肝 Ms による代謝を調べ、2,4,5-三塩素置換 PCB の CB187 と比較した。
2. ラットでは、PB 前処理肝 Ms でのみ、2 種類

の代謝物 (M1, M2) が生成された。その生成活性は、M1 および M2 が、それぞれ 554 および 187 pmol/hr/mg protein であった。一方、モルモットでは、いずれの前処理肝 Ms でも代謝物は生成されなかった。

3. GC-MS の結果、M1 および M2 は、いずれも一水酸化体であることが判明した。また、M1 (メチル誘導体) は、別途合成した 3'-methoxy-CB188 とマススペクトルおよび保持時間がほとんど完全に一致した。
4. 以上の結果から、CB188 は、CB187 に比べ、容易に代謝されること、また、PB 誘導性のラット CYP2B 酵素によって触媒され、主に 3'-OH 体へと代謝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, H30-食品-指定-005 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. 18K11660 加藤善久; 基盤研究 (C), No. 17K00870 木村治) 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。

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 — 治療と研究の最前線一, pp. 200-218, 九州大学出版会, 2010.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Hovander L, Malmberg T, Athanasiadou M, Athanassiadis 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.
- 5) 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.
- 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) Bergman Å, Klasson-Wehler E and Kuroki H : Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ. Health Perspect.* 102 : 464-469, 1994.
- 9) 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.
- 10) Brouwer A : Role of biotransformation in PCB-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone metabolism in laboratory and wildlife species. *Biochem. Soc. Trans.* 19 : 731-737, 1991.
- 11) 北村繁幸 : 環境化学物質の内分泌攪乱活性発現における代謝活性変動の影響. *薬学雑誌* 138 : 693-713, 2018.
- 12) 太田千穂, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 木村治, 遠藤哲也, 古賀信幸 : 2,2',3,4,4',5,6'-七塩素化ビフェニル (CB182) のラット, モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝. *福岡医誌* 108 : 51-57, 2017.
- 13) Cadogan JIG : A convenient new method of aromatic arylation. *J. Chem. Soc.* : 4257-4258, 1962.
- 14) 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.
- 15) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 16) 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.
- 17) 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 : 1985-1904, 1998.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) McGraw SrJE and Waller DP : Specific human CYP450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC#101). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344 : 129-133, 2006.
- 22) 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 March 15, 2019)

油症一斉検診における血液試料中の2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl (PCB183) のキラル分析

¹⁾福岡県保健環境研究所

²⁾大阪大学 環境安全研究管理センター

³⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

酒谷 圭一¹⁾, 安武 大輔¹⁾, 高橋 浩司¹⁾, 堀 就英¹⁾, 梶原 淳睦¹⁾,
香月 進¹⁾, 中野 武²⁾, 三苦 千景³⁾, 古江 増隆³⁾

Enantiomeric Analysis of 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl in the Blood of Examinees Collected during Medical Check-up for Yusho

Keiichi SAKATANI¹⁾, Daisuke YASUTAKE¹⁾, Koji TAKAHASHI¹⁾, Tsuguhide HORI¹⁾,
Jumboku KAJIWARA¹⁾, Susumu KATSUKI¹⁾, Takeshi NAKANO²⁾,
Chikage MITOMA³⁾ and Masutaka FURUE³⁾

¹⁾*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences*

²⁾*Research Center for Environmental Preservation, Osaka University*

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

Abstract

Among 209 Polychlorinated biphenyl (PCB) congeners, 19 congeners are known to have enantiomers. In this study, we analyzed 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl (PCB183) in the human blood enantioselectively, and quantified the enantiomer-specific accumulation. The samples were collected during medical check-up for Yusho from 2015 through 2017. The average enantiomeric fraction (EF) of PCB183 in samples were 0.718. This fact indicates that PCB183(+) has greater bioaccumulation potential than PCB183(-) in human body. In addition, we analyzed statistical relationships between EFs and diagnostic criteria of Yusho. As the result, it was suggested that the EFs for PCB183 is not related to sex, age, concentration of 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF) and the gas chromatographic pattern of blood PCBs.

Key words : Enantiomeric analysis, 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl, Yusho, Human blood

はじめに

1968年、カネクロールが混入したライスオイルを摂食することで油症が発症した¹⁾。カネクロールはライスオイル製造中の脱臭工程で熱媒体として使用されていたポリ塩化ビフェニール (PCB) の製品であり、油症発生直後に測定された典型的な油症患者の血液中 PCB 濃度は一般人に対して

2~3 倍の値であった²⁾。

PCB は化学構造の異なる 209 種類の異性体の混合物であり、このうち 19 種類には鏡像異性体 (キラル体) が存在する³⁾⁴⁾。一般的に、キラル体は製剤中では右旋性 (+) と左旋性 (-) が 1:1 のラセミの状態が存在し、拡散、分配、蒸発などの物理化学的プロセスではその存在割合は変化しないことが知られている⁵⁾⁶⁾。一方、生体内変化や

Corresponding author : Keiichi SAKATANI
Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan
E-mail : sakatani@fihes.pref.fukuoka.jp

Table 1 High-resolution gas chromatography-high-resolution mass spectrometry conditions

GC (7890A, Agilent Technologies Inc.)	
Column	BGB172, 30 m × 0.25 mm i.d. Film thickness: 0.18 μm
Oven temp.	Initial temperature at 120 °C hold for 2 min → heat up to 250°C at 2°C/min → hold at 250°C for 23 min
Injection port temp.	230°C
Injection mode and volume	Splitless (Purge time is 1 min), 1 μL
Carrier gas	Helium gas with a purity of greater than 99.999% 1.0 mL/min constant flow
MS (JMS-800D UltraFOCUS™, JEOL)	
Resolution	Equal to or greater than > 10,000 (10% valley)
Ionization voltage	38 eV
Ionization current	500 μA
Temperature of ion source	260°C
Accelerating voltage	10kV

タンパク質結合などの生物学的プロセスによりキラル選択的蓄積が起こることが示唆されており⁷⁾⁸⁾, 油症患者の体内においてもPCBがキラル選択的に蓄積されている可能性がある. そこで本研究では, キラル体を有するPCBのうち, ヒト血液中で比較的高濃度で存在する2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl (PCB183) について調査を行った.

実 験 方 法

1. 試料

2015年度から2017年度に福岡県油症一斉検診を受診しインフォームド・コンセントを得た受診者のうち, 後述する統計解析を考慮し64名(認定者47名, 未認定者17名)の血液を試料として抽出した.

2. 試薬

アセトン, ヘキサン, ジクロロメタン, トルエン, n-ノナンは関東化学製のダイオキシン類分析用を, 無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験・PCB分析用を用いた. 10%硝酸銀シリカゲルは富士フィルム和光純薬工業製のダイオキシン類分析用を, 硫酸は精密分析用を用いた. 活性炭はナカライテスク製を用いた. 標準試薬(ダイオキシン類

のネイティブ体および¹³C₁₂-ラベル化体)はWellington製を用いた.

3. 装置および測定条件

PCB183キラル体の測定にはオートインジェクタ(Agilent, 7693A)を取り付けた高分解能ガスクロマトグラフ質量分析装置(Agilent, 7890A/日本電子, JMS-800D UltraFOCUS™)を用いた. PCB183(+)とPCB183(-)の分離はBGB Analytik製のBGB 172(30 m × 0.25 mm i.d., 0.18 μm film thickness)によって行った. 測定条件をTable 1に示す.

4. 試料の調製

試料の調製は既報⁹⁾¹⁰⁾に従った. すなわち, 試料5gを秤量した後, 凍結乾燥処理を経て高速溶媒抽出法による抽出を行った. 続いて, 硫酸処理の後, 10%硝酸銀シリカゲルおよび活性炭によるカラム精製を行った.

5. EF値の算出とキラル選択的蓄積性の検証

PCB183がキラル選択的に蓄積されているか検証するため, PCB183キラル体を測定して得られたマスキロマトグラムからPCB183(+)およびPCB183(-)のエリア値を求め, (1)式を用いてEF

値を算出した。

$$EF = \frac{\text{Peak area of PCB183 (+)}}{\text{Peak area of PCB183 (+) and Peak area of PCB183 (-)}} \quad (1)$$

(1)式より、 $EF = 0.5$ であれば PCB183 はラセミの状態が存在しキラル選択的蓄積はなし、 $EF > 0.5$ であれば PCB183 (+) が選択的に蓄積されている、 $EF < 0.5$ であれば PCB183 (-) が選択的に蓄積されているものと判断した。

なお、各試料は2回測定し、(1)式を用いて算出した EF 値の平均値をその試料の EF 値とした。

6. 統計解析

現在、油症の診断は発病条件と症状、各種所見(年齢・性別についても勘案した血液 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF) の濃度の異常や、血液 PCB の性状および濃度の異常などを参考に、受診者の年齢および時間的経過を考慮の上、総合的に判断することとなっている。そこで、(1)性別、(2)年齢、(3)2,3,4,7,8-PeCDF 濃度、(4)PCB の性状をパラメータとして以下の解析を行った。

(1) 性別

男性、女性の2群間で EF 値の比較を行った。Shapiro-Wilk 検定により各群が正規分布に従うことを確認した後、Welch の t 検定を行った。

(2) 年齢

EF 値と年齢に相関があるか確認した。Shapiro-Wilk 検定により EF 値および年齢が正規分布に従うことを確認した後、Pearson の積率相関検定を行った。

(3) 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度

2,3,4,7,8-PeCDF について、高濃度とされる 50 pg/g lipid 以上の群と、一般健常者で通常みられる濃度である 30 pg/g lipid 未満の群で、 EF 値の比較を行った。Shapiro-Wilk 検定により各群が正規分布に従うことを確認した後、Welch の t 検定を行った。

(4) PCB の性状

血液 PCB の性状については一般健常者と大きく異なる場合を A、区別できない場合を C、その中間タイプを B または BC というパターンに分類としている¹¹⁾。本研究では BC パターンの試料数が3と少なかったため、BC を除く A、B およ

び C パターンの3群間で EF 値の比較を行った。Shapiro-Wilk 検定により各群が正規分布に従うことを確認した後、一元配置分散分析を行った。

実験結果と考察

1. EF 値とキラル選択的蓄積性

PCB183 キラル体を測定して得られたマスキロマトグラムを Fig. 1 に示す。標準試薬について、 EF 値は平均 0.497 ($n = 8$) であり、PCB183 はラセミの状態で存在した。一方、血液試料について、 EF 値は平均 0.718 (最大 0.800, 最小 0.585) であり、PCB183 (+) が選択的に蓄積される傾向にあった。日本人が食事から摂取する PCB の給源の大半は魚介類であるが¹²⁾、魚介類の体内では PCB183 はラセミに近い状態で存在するとの報告があることから¹³⁾、ヒト体内中での生物学的プロセスにより PCB183 (+) のキラル選択的蓄積が起こっていることが示唆された。また、この傾向はヒト母乳で確認された結果¹³⁾ と同様であった。

2. EF 値と各種パラメータの関連性

(1) 性別

男性、女性の2群間で EF 値の比較を行った (Fig. 2)。試料数は男性の群が 28、女性の群が 36 であり、 EF 値はそれぞれの群で平均 0.716 (最大 0.795, 最小 0.585) と 0.720 (最大 0.800, 最小 0.631) であった。Shapiro-Wilk 検定を行った結果、男性の群については $W = 0.957$, $p = 0.299$ 、女性の群については $W = 0.980$, $p = 0.743$ であり、ともに正規分布に従うことを確認した。この結果をふまえ、Welch の t 検定を行った結果、 $t = 0.320$, $p = 0.751$ であり、2群間の EF 値には有意差が認められないことが分かった。

(2) 年齢

EF 値と年齢の間に相関関係があるか確認した (Fig. 3)。年齢は 55~93 歳であった。Shapiro-Wilk 検定を行った結果、 EF 値については $W = 0.973$, $p = 0.166$ 、年齢については $W = 0.971$, $p = 0.132$ であり、ともに正規分布に従うことを確認した。この結果をふまえ、Pearson の積率相関検定を行った結果、 $t = 1.77$, $r = 0.219$, $p = 0.0822$ であり、両者に有意な相関関係は確認されなかった。

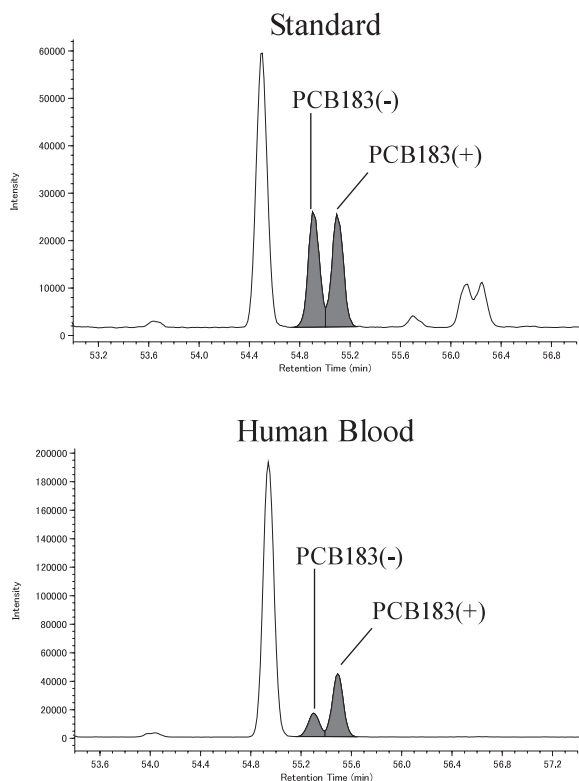


Fig. 1 Chromatograms of enantioselective analysis of PCB183.

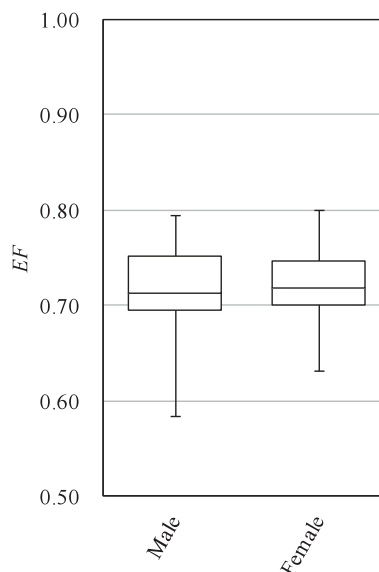


Fig. 2 Comparison of enantiomeric fractions (*EFs*) of 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl (PCB183) between male and female.

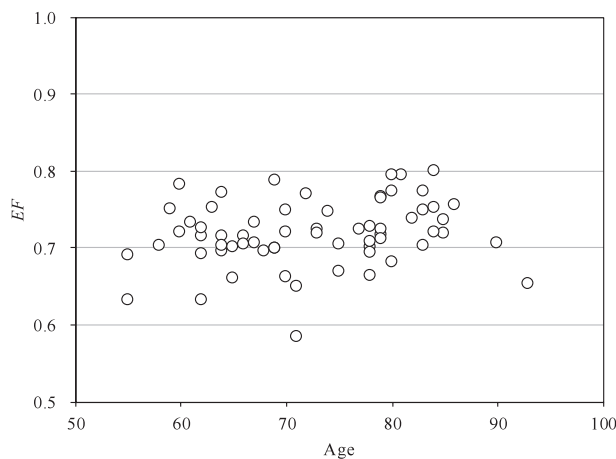


Fig. 3 Enantiomeric fractions (*EFs*) of 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl (PCB183) as a function of age.

(3) 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度

2,3,4,7,8-PeCDF について、高濃度とされる 50 pg/g lipid 以上の群と、一般健常者で通常みられる濃度である 30 pg/g lipid 未満の群で、*EF* 値の比較を行った (Fig. 4)。試料数は 50 pg/g lipid 以上の群が 32、30 pg/g lipid 未満の群が 32 であ

り、*EF* 値はそれぞれの群で平均 0.726 (最大 0.800, 最小 0.649) と 0.711 (最大 0.795, 最小 0.585) であった。Shapiro-Wilk 検定を行った結果、50 pg/g lipid 以上の群については $W = 0.975$, $p = 0.652$, 30 pg/g lipid 未満の群については $W = 0.968$, $p = 0.445$ であり、ともに正規分布に従う

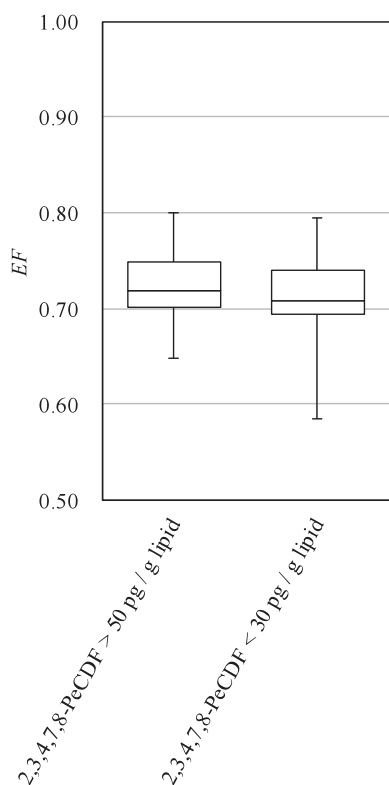


Fig. 4 Relationship between enantiomeric fractions (*EFs*) of 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl (PCB183) with concentration of 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF).

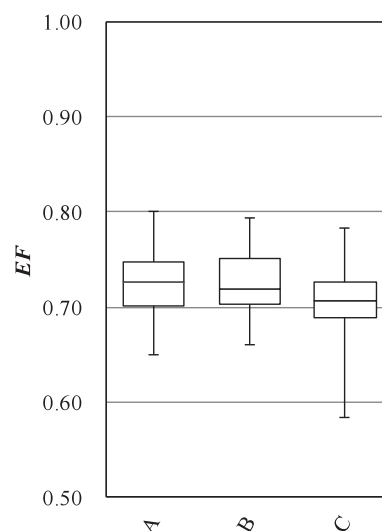


Fig. 5 Relationship between enantiomeric fractions (*EFs*) of 2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl (PCB183) with the gas chromatographic pattern of blood poly chlorinated biphenyls (PCBs).

ことを確認した。この結果をふまえ、Welch の *t* 検定を行った結果、 $t = 1.41$ 、 $p = 0.164$ であり、2 群間の *EF* 値には有意差が認められないことが分かった。

(4) PCB の性状

PCB の性状について、A、B および C パターンの 3 群間で *EF* 値の比較を行った (Fig. 5)。試料数は A パターンの群が 12、B パターンの群が 21、C パターンの群が 28 であり、*EF* 値はそれぞれの群で平均 0.727 (最大 0.800、最小 0.649)、0.726 (最大 0.795、最小 0.691) および 0.705 (最大 0.783、最小 0.585) であった。Shapiro-Wilk 検定を行った結果、A パターンの群については $W = 0.979$ 、 $p = 0.978$ 、B パターンの群については $W = 0.974$ 、 $p = 0.822$ 、C パターンの群については $W = 0.956$ 、 $p = 0.278$ であり、いずれも正規分布に従うことを確認した。この結果をふまえ、一元配置分散分析を行った結果、 $F = 2.00$ 、 $df = 30.0$ 、 $p =$

0.154 であり、3 群間の *EF* 値には有意差が認められないことが分かった。

総 括

2015 年度から 2017 年度の福岡県油症一斉検診受診者のうち 64 名の血液を試料として PCB183 キラル体を分析し、*EF* 値を算出した。その結果、*EF* 値は平均 0.718 (最大 0.800、最小 0.585) であり、PCB183 (+) がキラル選択的に蓄積されていることを確認した。また、*EF* 値について性別、年齢、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度および PCB の性状をパラメータとした統計解析を行ったが、いずれも *EF* 値との間に明瞭な関係性はみられなかった。ただし、今回の調査では試料数が限られたことや、油症発症後 50 年近い時間が経過していることを考慮し、さらに多くの知見を集めて解析する必要があると考える。

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) 塚元久雄：油症患者が使用したライスオイル中の有毒物質の化学的検索 油症研究班分析部会報告書（油症（塩化ビフェニール中毒）特集）。福岡医学雑誌 60：496-512, 1969.
- 2) 増田義人：油症患者および一般体内のポリ塩化ビフェニール（油症とPCBに関する研究報告集-4-）。福岡医学雑誌 65：17-24, 1974.
- 3) Karumbati A, Espandiari P, Festag M, Robertson LW and Ludewig G : PCBs : Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects. 2001.
- 4) Kania-Korwel I and Lehmler HJ : Toxicokinetics of chiral polychlorinated biphenyls across different species--a review. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 23 : 2058-2080, 2016.
- 5) Jamshidi A, Hunter S, Hazrati S and Harrad : Concentrations and Chiral Signatures of Polychlorinated Biphenyls in Outdoor and Indoor Air and Soil in a Major U.K. Conurbation. Environ. Sci. Technol. 41 : 2153-2158, 2007.
- 6) Asher BJ, Ross MS and Wong CS : Tracking chiral polychlorinated biphenyl sources near a hazardous waste incinerator : fresh emissions or weathered revolatilization? Environ. Toxicol. Chem. 31 : 1453-1460, 2012.
- 7) Muller TA and Kohler HP : Chirality of pollutants--effects on metabolism and fate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64 : 300-316, 2004.
- 8) Lehmler HJ, Harrad SJ, Hühnerfuss H, Kania-Korwel I, Lee CM, Lu Z and Wong CS : Chiral polychlorinated biphenyl transport, metabolism, and distribution : a review. Environ. Sci. Technol. 44 : 2757-2766, 2010.
- 9) Todaka T : New protocol of dioxins analysis in human blood. Fukuoka Acta Med 94 : 148-157, 2003.
- 10) 戸高尊, 平川博仙, 堀就英, 飛石和夫, 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（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20集））。福岡医学雑誌 96：185-191, 2005.
- 11) Masuda Y : Health status of Japanese and Taiwanese after exposure to contaminated rice oil. Environ. Health Perspect. 60 : 321-325, 1985.
- 12) 立川涼, 川北啓子, 脇本忠明：食事から摂取するPCB量。家政学雑誌 24 : 466-473, 1973.
- 13) Konishi Y, Kakimoto K, Nagayoshi H and Nakano T : Trends in the enantiomeric composition of polychlorinated biphenyl atropisomers in human breast milk. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 23 : 2027-2032, 2016.

(Received for publication March 19, 2019)

油症患者におけるダイオキシン類毒性と不眠：全国横断調査結果

¹⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

²⁾長崎大学病院 総合診療科

³⁾済生会長崎病院 睡眠医療センター

近藤 英明^{1)~3)}, 三苦 千景¹⁾, 前田 隆浩²⁾, 古江 増隆¹⁾

Insomnia and Toxicity of Dioxin-Related Compounds among Yusho Patients : Japanese Nationwide Cross-Sectional Study

Hideaki KONDO^{1)~3)}, Chikage MITOMA¹⁾, Takahiro MAEDA²⁾ and Masutaka FURUE¹⁾

¹⁾Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan

²⁾Department of General Medicine, Nagasaki University Hospital, Nagasaki, Japan

³⁾Center for Sleep Medicine, Saiseikai Nagasaki Hospital, Nagasaki, Japan

Abstract

Background : Our previous pilot study suggested high rates of insomnia among 140 patients with Yusho, a condition caused by exposure to dioxins and dioxin-like compounds. Moreover, higher blood concentrations of dioxin were associated with lower subjective sleep quality.

Objectives : In this cross-sectional study, we analyze data from a Japanese nationwide survey that was designed to investigate the relationship between insomnia and dioxin toxicity among patients with Yusho.

Methods : For this study, 899 participants (46.3% men, median age [IQR] : 66 [58-78] years) were recruited. Symptoms related to insomnia were assessed. Toxicity of dioxins and dioxin-like compounds was evaluated with the total toxic equivalent quantity (TEQ), which is the summation of each TEQ calculated from the blood concentrations of 21 congeners of dioxin and dioxin-like compounds. Logistic regression analysis for insomnia were adjusted by age, sex, body mass index, habitual drinking, and smoking status.

Results : The number of participants with difficulty initiating and/or maintaining sleep (DIMS) was 753 (53.4%). Total TEQ was categorized on the following quartiles : first quartile (Q1) < 20 (reference, second quartile (Q2) = 20-35, third quartile (Q3) = 35-62, and fourth quartile (Q4) ≥ 62 pg-TEQ/g lipid). Adjusted odds ratios (95% confidence interval) for DIMS of Q2-4 were 1.89 (1.23-2.89), 1.62 (1.02-2.57), and 2.09 (1.24-3.53), respectively.

Conclusions : Insomnia was frequent among patients with Yusho. Insomnia was associated with not only the apparently high level of total TEQ, but also the level of total TEQ observed among general population. In the pathophysiology of insomnia, dioxins and dioxin-like compounds, which persist in environment and human body for a long time, might be one of the environmental factors among patients with Yusho and general population.

Key words : Dioxin, Yusho, Insomnia, Toxic equivalent quantity

はじめに

2017年に我々が行った油症患者140人を対象とした睡眠障害の調査では、不眠症状は高率であった。また、高いダイオキシン類血中濃度は睡眠の質の低下に影響を及ぼしていた¹⁾。この研究は、ダイオキシン類が睡眠の質の低下に関わりうることを示した世界で初めての報告であったが、油症の主要原因物質の2,3,4,7,8-PeCDFのみとの関連性を検討しており、その他の異性体を含めた毒性との関連は評価していなかった。また、対象者は一部の地域の140人のみであった。

そこで、今回、ダイオキシンの毒性と不眠との関連性をより多数例で明らかにするために本研究を計画した。毎年行われている全国の油症認定患者を対象とする実態調査に不眠症状を質問する項目を追加して、1,410人から回答・同意を得た。ダイオキシン類の血中濃度はこれまでに測定されている21異性体の測定結果を今回のデータと突合した。その結果、ダイオキシン類の毒性は油症患者で認められる明らかに高い範囲だけでなく、一般住人でも観察されるより低いレベルにおいても、入眠困難や睡眠維持困難と関連していることが明らかとなった。

方法

1. 対象および倫理面への配慮

各都道府県が把握している2018年3月時点の油症認定患者1,588を対象に郵送で調査協力を依頼し、研究参加の同意と質問票の回答が得られた1,410人(男性665人,女性745人)のなかで、これまでダイオキシン類血中濃度測定が行われていた899人を解析対象とした。解析対象は男性416人,女性483人であった。本研究は九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った(許可番号30-384)。

2. 評価項目

質問票の回答から得られた、年齢、性別、body mass index (BMI)、飲酒習慣、喫煙習慣、1日の歩行時間、運動習慣、1日の野菜摂取量、1日の果物摂取量、睡眠時間、不眠症状、及び日中の眠気を解析に使用した。習慣性飲酒者は週3回以上、1回に純エタノール換算で20g以上の飲酒者とし

た。

不眠症状は入眠困難(difficulty initiating sleep: DIS)、睡眠維持困難(difficulty maintaining sleep: DMS)、及び早朝覚醒(wake up too early: WE)の有無について尋ねた。DIS、DMS、及びWEのいずれかの症状を訴える者を不眠症状ありとした。また、DISもしくはDMSのいずれかの症状を有する者をdifficulty initiating and/or maintaining sleep (DIMS)群とした。

ダイオキシン類の血中濃度測定は高分解能ガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析(high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry: HRGC/HRMS)を用いて行った²⁾。WHOはpolychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD)、polychlorinated dibenzofuran (PCDF)、及びpolychlorinated biphenyl (PCB)のうちダイオキシン類特有の毒性を有するものをダイオキシン類と定めている。ダイオキシン類の各異性体の毒性(毒性等量(toxic equivalent quantity: TEQ))は最も毒性が強いダイオキシンである2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinに対する毒性相対値を示す毒性等価係数(toxic equivalency factors: TEFs)に基づき計算される³⁾。今回の検討では2005年にWHOが発表したTEFsを用いた。各異性体のTEQは脂肪重量当たりの定量結果にTEFを乗じて算出し、ダイオキシン類の総合的な毒性評価は、その総和(総TEQ)が用いられる。今回は21の異性体のTEQから総TEQを計算した。油症患者におけるダイオキシン類血中濃度は3年に1回測定されているが、その排出半減期は予想以上に長く、最近の研究では特に血中濃度が高値であるもので半減期が延長している例も確認されている^{4)~6)}。そのため、本研究では間近の調査で得られたダイオキシン類血中濃度⁷⁾と突合して検討した。

3. 統計処理

データ解析はR ver. 3.4.1とEZR ver. 1.36⁸⁾を用いて行った。正規性の検定はShapiro-Wilk検定を行った。連続変数である年齢、BMI、ダイオキシン類血中濃度及びTEQは正規性を認めなかったため、代表値とそのばらつきはmedian(interquartile range: IQR)で示した。2群間の比較はMann-WhitneyのU検定を行った。3群間

の比較は Kruskal-Wallis の検定を行い, post-hoc test は Steel-Dwass の多重比較を用いた. 名義変数間の独立性の検定は Fisher の正確確率検定を行った. 3 群以上を有する名義変数間の独立性の検定は Fisher の正確確率検定では計算が困難であり, χ^2 検定を用いた. その際に数が 10 未満と少ないセルが存在する場合には 2 つの群を加算処理して検定を行った. 有意水準は 0.05 とした.

DIMS に対するダイオキシン類毒性の影響はロジスティック回帰分析を用いて解析した. 総 TEQ は四分位数毎 (< 20 (reference : ref), 20-35, 35-62, ≥ 62 pg-TEQ/g lipid) にカテゴリー化した. 単変量解析を行った後に, 性別, 年齢, BMI, 習慣性飲酒, 及び喫煙状況で調整したオッズ比 (95% confidence interval : CI) を算出した. 年齢は 4 分位数毎 (< 57 (ref), 57-64, 64-76, ≥ 76) にカテゴリー化し, BMI は BMI < 25 kg/m² (ref), BMI ≥ 25 kg/m² に 2 分割した. 習慣性飲酒は非習慣性飲酒を, 喫煙習慣は喫煙習慣がなかった者を reference とした.

結 果

1. 不眠有症状率 (Table 1)

DIS, DMS, 及び WE はそれぞれ 273 人 (30.4%), 402 人 (44.7%), 及び 283 人 (31.5%) に認められた. いずれかの不眠症状を有する者は 584 人 (65.0%) と高率で, 508 人 (56.5%) は DIS もしくは DMS を有していた. 日中の眠気を自覚している者は 387 人 (43.0%) であった.

2. 性差 (Table 1, 2)

男性と女性の年齢の中央値 (interquartile range : IQR) はそれぞれ 65 (58-77), 67 (59-78) で有意な男女差は認めなかった ($p = 0.15$). 男女の BMI の中央値 (IQR) はそれぞれ 23.0 (21.5-25.4), 22.2 (20.1-24.6) kg/m² と男性が高値であった ($p < 0.001$). 男性では習慣性飲酒者, 飲酒者が多く ($p < 0.001$), 女性では野菜や果物摂取量が多かった ($p < 0.001$). 1 日に 90 分以上歩行している者や, 運動習慣は有意な性差を認めなかった (それぞれ $p = 0.05$, $p = 0.21$).

睡眠時間は女性が男性と比較して短時間睡眠者が多い傾向であったが統計学的に有意ではなかった ($p = 0.06$). DIS と DMS を訴える者は女性で

有意に多いものの (それぞれ $p < 0.001$, $p = 0.01$), WE は有意な性差を認めなかった ($p = 0.67$).

女性のダイオキシン類血中濃度は男性と比較して有意に高値であった. 油症の主たる原因物質である 2,3,4,7,8-PeCDF の中央値 (IQR) は男性と女性でそれぞれ 20.5 (11.0-44.0), 38.3 (15.4-115.7) pg/g lipid であった ($p < 0.001$). 総 TEQ の中央値 (IQR) は男性と女性でそれぞれ 30 (18-51), 40 (23-76) pg-TEQ/g lipid であった ($p < 0.001$).

3. ダイオキシン類血中濃度 (Table 2, 3)

PCDDs, PCDFs, 及び PCBs のそれぞれの TEQ の中央値は総 TEQ の中央値の概ね 1/3 を占めていた. 総 TEQ は四分位数毎 (Q1-Q4 : < 20, 20-35, 35-62, ≥ 62 pg-TEQ/g lipid) にカテゴリー化した. Q4 では男性が少なくなり ($p < 0.001$), 習慣性飲酒者と喫煙者が少なかった (それぞれ $p = 0.001$, $p < 0.001$). 年齢は総 TEQ が高値となるほど高値となっていた ($p < 0.001$). 1 日の野菜摂取量と果物摂取量は総 TEQ が高値の群で多くなる傾向が認められた ($p < 0.001$).

睡眠時間は総 TEQ が高値となると長くなる傾向が認められた ($p < 0.001$). DIS と DMS を訴える者は Q4 で有意に多いものの ($p < 0.001$), WE は有意差を認めなかった ($p = 0.88$). また, 一般住民でも認められる Q2 においても DIS や DMS は Q3 と同程度に高率であった.

4. 不眠症状 (Table 4, 5)

DIS, DMS, 及び WE のいずれの不眠症状の有無よりも, DIMS の有無で 2 群にカテゴリー化することで 2 群間の差異が明瞭であったため, DIMS の有無の 2 群間で比較検討した. DIMS 群では男性が少なく ($p < 0.001$), 年齢は高値であった ($p < 0.001$). 身体活動性や野菜摂取量との関連は認めなかったが, 非 DIMS 群では果物摂取量が少ない傾向が認められた ($p = 0.002$). DIMS 群では短時間睡眠傾向が認められ ($p < 0.001$), 日中の眠気を自覚している者が多かった ($p = 0.001$). ダイオキシン類の血中濃度は 2,3,4,7,8-PeCDF をはじめとしてほとんどの異性体で DIMS 群が有意に高値であった. 総 TEQ の中

Table 1 対象者背景

	Total	Men	Women	p value
N	899	416	483	
Age, median (IQR)	66 (58-78)	65 (58-77)	67 (59-78)	0.15
BMI kg/m ² , median (IQR)	22.7 (20.7-25.1)	23.0 (21.5-25.4)	22.2 (20.1-24.6)	< 0.001
Habitual drinker, n (%)	187 (21.0)	152 (37.0)	35 (7.3)	< 0.001
Smoking status				
Never, n (%)	557 (62.7)	151 (36.7)	406 (85.3)	< 0.001
Past, n (%)	175 (19.7)	142 (34.5)	33 (6.9)	
Current, n (%)	156 (17.6)	119 (28.9)	37 (7.8)	
Walking				
≥ 60 min / day, n (%)	440 (49.2)	189 (45.7)	251 (52.2)	0.05
Exercise				
≥ 2 times /week, n (%)	340 (38.0)	166 (40.2)	174 (36.1)	0.21
Vegetable intake				
70-140 g / day, n (%)	432 (48.9)	239 (58.6)	193 (40.6)	< 0.001
140-280 g / day, n (%)	358 (40.5)	143 (35.0)	215 (45.3)	
≥ 280 g / day, n (%)	93 (10.5)	26 (6.4)	67 (14.1)	
Fruit intake				
< 50 g /day, n (%)	429 (48.5)	229 (55.9)	200 (42.1)	< 0.001
50-100 g /day, n (%)	248 (28.0)	98 (23.9)	150 (31.6)	
≥ 100 g / day, n (%)	208 (23.5)	83 (20.2)	125 (26.3)	
Sleep time				
< 5 hours, n (%)	85 (9.6)	36 (8.7)	49 (10.3)	0.06
5-6 hours, n (%)	214 (24.0)	85 (20.6)	129 (27.0)	
6-7 hours, n (%)	293 (32.9)	136 (32.9)	157 (32.9)	
7-8 hours, n (%)	162 (18.2)	79 (19.1)	83 (17.4)	
8-9 hours, n (%)	90 (10.1)	52 (12.6)	38 (8.0)	
> 9 hours, n (%)	46 (5.2)	25 (6.1)	21 (4.4)	
Insomnia symptoms, n (%)	584 (65.0)	256 (61.5)	328 (67.9)	0.05
DIS, n (%)	273 (30.4)	90 (21.6)	183 (37.9)	< 0.001
DMS, n (%)	402 (44.7)	167 (40.1)	235 (48.7)	0.01
DIS and/or DMS, n (%)	508 (56.5)	205 (49.3)	303 (62.7)	< 0.001
WE, n (%)	283 (31.5)	134 (32.2)	149 (30.8)	0.67
Daytime sleepiness, n (%)	387 (43.0)	181 (43.5)	206 (42.7)	0.84

BMI, body mass index ; DIS, difficulty initiating sleep ; DMS, difficulty maintaining sleep ; IQR, interquartile range ; WE, wake up too early.

Table 2 男女別ダイオキシン類血中濃度 (pg/g lipid)

	Total	Men	Women	p value
N	899	416	483	
2,3,7,8-TCDD	1.3 (0.5-1.9)	1.2 (0.5-1.8)	1.4 (0.5-2.0)	0.002
1,2,3,7,8-PeCDD	6.8 (4.5-10.2)	6.0 (3.8-9.1)	7.5 (5.0-11.1)	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.1 (1.0-3.1)	1.0 (1.0-2.9)	2.2 (1.0-3.3)	0.009
1,2,3,6,7,8-HxCDD	21.5 (13.4-37.8)	18.5 (11.5-30.9)	25.5 (15.9-46.1)	< 0.001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2.8 (1.0-4.5)	2.4 (1.0-3.9)	3.0 (1.0-5.1)	< 0.001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	31.6 (21.6-46.5)	29.5 (20.5-44.3)	32.9 (22.4-49.1)	0.007
OCDD	441.0 (279.5-682.3)	425.7 (272.1-682.1)	454.7 (284.7-682.4)	0.22
Total PCDDs	518.5 (335.4-779.9)	489.0 (312.7-773.8)	539.8 (352.2-797.1)	0.04
2,3,7,8-TCDF	1.4 (0.5-2.6)	1.4 (0.5-2.6)	1.4 (0.5-2.6)	0.72
1,2,3,7,8-PeCDF	0.5 (0.5-1.5)	0.5 (0.5-1.6)	0.5 (0.5-1.4)	0.08
2,3,4,7,8-PeCDF	27.0 (13.3-74.1)	20.5 (11.0-44.0)	38.3 (15.4-115.7)	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	5.0 (2.8-12.5)	3.9 (2.4-7.5)	7.4 (3.3-19.0)	< 0.001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4.6 (2.8-8.6)	4.0 (2.5-6.4)	5.7 (3.3-11.6)	< 0.001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.40
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.88
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.0 (1.0-2.5)	1.0 (1.0-2.4)	1.0 (1.0-2.6)	0.24
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.04
OCDF	2.0 (2.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	0.06
Total PCDFs	47.9 (28.2-107.3)	38.9 (25.0-72.1)	64.5 (31.6-161.8)	< 0.001
3,4,4',5-TCB (#81)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	< 0.001
3,3',4,4'-TCB (#77)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	0.15
3,3',4,4',5-PeCB (#126)	67.8 (38.2-114.3)	66.9 (38.2-123.3)	69.2 (38.2-109.1)	0.75
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	103.7 (58.7-184.7)	110.2 (61.2-178.4)	100.7 (55.5-191.5)	0.31
Total Non-ortho PCBs	193.2 (116.1-319.8)	198.1 (116.6-321.2)	187.6 (115.5-316.7)	0.79
Total	846.5 (522.9-1275.4)	784.7 (500.0-1185.3)	887.6 (538.0-1338.6)	0.004
Total PCDDs-TEQ	12 (8-17)	10 (7-15)	13 (8-20)	< 0.001
Total PCDFs-TEQ	10 (5-25)	7 (4-15)	13 (6-38)	< 0.001
Total Non-ortho PCBs-TEQ	11 (6-18)	11 (6-18)	11 (6-17)	0.99
Total TEQ	35 (20-62)	30 (18-51)	40 (23-76)	< 0.001

CB, chlorinated biphenyl ; CDD, chlorinated dibenzo-p-dioxins ; CDF, chlorinated dibenzofurans ; Hx, hexa ; Hp, hepta ; OCDD, octachlorodibenzo-p-dioxin ; OCDF, octachlorodibenzofurans ; PCB, polychlorinated biphenyl ; PCDD, polychlorinated dibenzo-p-dioxin ; PCDF, polychlorinated dibenzofuran ; Pe, penta ; TCB, tetrachlorobiphenyl ; TCDD, tetrachlorodibenzo-p-dioxin ; TCDF, tetrachlorodibenzofuran ; TEQ, toxic equivalent quantity.

Table 3 総 TEQ 四分位毎の背景因子, 不眠症状の比較

TEQ pg-TEQ /g lipid	< 20, n = 225	20-35, n = 225	35-62, n=224	>=62, n=225	p value
Men, n (%)	128 (56.9)	108 (48.0)	113 (50.4)	67 (29.8)	< 0.001
Age, median (IQR)*	56 (51-62)	64 (58-73)	69 (62-80)	78 (70-84)	< 0.001
BMI kg/m ² , median (IQR)	22.6 (20.3-24.9)	22.4 (20.9-24.8)	23.0 (21.3-25.2)	22.7 (20.3-25.1)	0.199
Habitual drinker, n (%)	48 (21.4)	57 (25.7)	55 (24.7)	27 (12.2)	0.001
Smoking status					
Never, n (%)	100 (44.6)	133 (59.6)	139 (62.9)	185 (84.1)	< 0.001
Past, n (%)	55 (24.6)	49 (22.0)	49 (22.2)	22 (10.0)	
Current, n (%)	69 (30.8)	41 (18.4)	33 (14.9)	13 (5.9)	
Walking					
>= 60 min / day, n (%)	132 (58.7)	133 (59.4)	93 (41.7)	82 (36.8)	< 0.001
Exercise					
>= 2 times /week, n (%)	72 (32.0)	94 (42.0)	84 (37.7)	90 (40.4)	0.138
Vegetable intake					
70-140 g / day, n (%)	121 (54.3)	112 (50.7)	106 (48.0)	93 (42.7)	0.34
140-280 g / day, n (%)	81 (36.3)	87 (39.4)	93 (42.1)	97 (44.5)	
>= 280 g / day, n (%)	21 (9.4)	22 (10.0)	22 (10.0)	28 (12.8)	
Fruit intake					
< 50 g /day, n (%)	142 (63.7)	107 (48.4)	92 (41.3)	88 (40.4)	0.34
50-100 g /day, n (%)	46 (20.6)	75 (33.9)	65 (29.1)	62 (28.4)	
>=100 g / day, n (%)	35 (15.7)	39 (17.6)	66 (29.6)	68 (31.2)	
Sleep time					
< 5 hours, n (%)	23 (10.4)	20 (9.0)	16 (7.2)	26 (11.7)	< 0.001
5-6 hours, n (%)	69 (31.1)	52 (23.3)	46 (20.6)	47 (21.2)	
6-7 hours, n (%)	79 (35.6)	84 (37.7)	78 (35.0)	52 (23.4)	
7-8 hours, n (%)	34 (15.3)	32 (14.3)	51 (22.9)	45 (20.3)	
8-9 hours, n (%)	12 (5.4)	24 (10.8)	20 (9.0)	34 (15.3)	
> 9 hours, n (%)	5 (2.3)	11 (4.9)	12 (5.4)	18 (8.1)	
Insomnia symptoms, n (%)					
DIS, n (%)	46 (20.4)	67 (29.8)	66 (29.5)	94 (41.8)	< 0.001
DMS, n (%)	74 (32.9)	105 (46.7)	107 (47.8)	116 (51.6)	< 0.001
DIS and/or DMS, n (%)	96 (42.7)	133 (59.1)	128 (57.1)	151 (67.1)	< 0.001
WE, n (%)	69 (30.7)	74 (32.9)	73 (32.6)	67 (29.8)	0.88
Daytime sleepiness, n (%)	96 (42.7)	101 (44.9)	99 (44.2)	91 (40.4)	0.79

* すべての群間で p < 0.001. BMI, body mass index ; DIS, difficulty initiating sleep ; DMS, difficulty maintaining sleep ; IQR, interquartile range ; TEQ, toxic equivalent quantity ; WE, wake up too early.

Table 4 入眠困難もしくは睡眠維持困難のいずれかの不眠症状の有無による背景因子の比較

	Non-DIMS	DIMS	p value
N	391	508	
Men, n (%)	211 (54.0)	205 (40.4)	< 0.001
Age, median (IQR)	64 (57-76)	68 (60-79)	< 0.001
BMI kg/m ² , median (IQR)	22.9 (21.0-25.0)	22.5 (20.4-25.1)	0.14
Habitual drinker, n (%)	89 (23.1)	98 (19.4)	0.21
Smoking status			
Never, n (%)	220 (57.0)	337 (67.1)	0.001
Past, n (%)	77 (19.9)	98 (19.5)	
Current, n (%)	89 (23.1)	67 (13.3)	
Walking			
>= 60 min / day, n (%)	204 (52.6)	236 (46.5)	0.08
Exercise			
>= 2 times /week, n (%)	138 (35.6)	202 (39.8)	0.21
Vegetable intake			
70-140 g / day, n (%)	192 (50.5)	240 (47.7)	0.34
140-280 g / day, n (%)	144 (37.9)	214 (42.5)	
>= 280 g / day, n (%)	44 (11.6)	49 (9.7)	
Fruit intake			
< 50 g /day, n (%)	210 (55.1)	219 (43.5)	0.002
50-100 g /day, n (%)	90 (23.6)	158 (31.3)	
>=100 g / day, n (%)	81 (21.3)	127 (25.2)	
Sleep time			
< 5 hours, n (%)	16 (4.2)	69 (13.7)	< 0.001
5-6 hours, n (%)	82 (21.3)	132 (26.1)	
6-7 hours, n (%)	122 (31.7)	171 (33.9)	
7-8 hours, n (%)	89 (23.1)	73 (14.5)	
8-9 hours, n (%)	52 (13.5)	38 (7.5)	
> 9 hours, n (%)	24 (6.2)	22 (4.4)	
Daytime sleepiness, n (%)	144 (36.8)	243 (47.8)	0.001

BMI, body mass index ; DIMS, difficulty initiating and/or maintaining sleep ; IQR, interquartile range.

Table 5 入眠困難もしくは睡眠維持困難のいずれかの不眠症状の有無によるダイオキシン類血中濃度の比較

	Non-DIMS	DIMS	p value
N	391	508	
2,3,7,8-TCDD	1.3 (0.5-1.9)	1.4 (0.5-2.0)	0.003
1,2,3,7,8-PeCDD	6.0 (3.8-9.3)	7.5 (5.0-10.8)	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.0 (1.0-2.9)	2.2 (1.0-3.2)	0.002
1,2,3,6,7,8-HxCDD	19.4 (12.7-32.2)	23.4 (14.7-41.7)	< 0.001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2.6 (1.0-4.1)	3.0 (1.0-4.8)	0.04
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	29.4 (20.5-44.7)	32.6 (22.8-49.1)	0.01
OCDD	412.3 (266.9-647.9)	468.0 (289.9-700.4)	0.02
Total PCDDs	476.7 (320.6-740.6)	557.9 (355.8-805.6)	0.006
2,3,7,8-TCDF	1.3 (0.5-2.3)	1.5 (0.5-2.9)	0.02
1,2,3,7,8-PeCDF	0.5 (0.5-1.4)	0.5 (0.5-1.6)	0.15
2,3,4,7,8-PeCDF	21.9 (11.2-51.2)	33.2 (14.9-92.5)	< 0.001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	4.4 (2.6-9.3)	5.8 (2.9-15.0)	< 0.001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4.2 (2.6-6.6)	5.5 (3.0-10.2)	< 0.001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.36
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.08
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.0 (1.0-2.5)	1.0 (1.0-2.6)	0.67
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.75
OCDF	2.0 (2.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	0.68
Total PCDFs	40.9 (25.4-80.1)	58.1 (30.2-130.3)	< 0.001
3,4,4',5-TCB (#81)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-5.0)	0.50
3,3',4,4'-TCB (#77)	5.0 (5.0-5.0)	5.0 (5.0-10.4)	0.09
3,3',4,4',5-PeCB (#126)	59.9 (34.3-104.5)	73.8 (41.6-121.7)	0.001
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	90.3 (51.8-172.7)	112.4 (64.4-200.2)	< 0.001
Total Non-ortho PCBs	174.0 (100.2-293.1)	212.9 (125.9-339.8)	< 0.001
Total	741.2 (488.3-1153.6)	907.6 (551.2-1328.2)	< 0.001
Total PCDDs-TEQ	10 (7-16)	13 (8-19)	< 0.001
Total PCDFs-TEQ	8 (4-18)	12 (6-31)	< 0.001
Total Non-ortho PCBs-TEQ	10 (5-15)	11 (7-18)	< 0.001
Total TEQ	30 (17-51)	39 (23-71)	< 0.001

CB, chlorinated biphenyl ; CDD, chlorinated dibenzo-p-dioxins ; CDF, chlorinated dibenzofurans ; DIMS, difficulty initiating and/or maintaining sleep ; Hx, hexa ; Hp, hepta ; OCDD, octachlorodibenzo-p-dioxin ; OCDF, octachlorodibenzofurans ; PCB, polychlorinated biphenyl ; PCDD, polychlorinated dibenzo-p-dioxin ; PCDF, polychlorinated dibenzofuran ; Pe, penta ; TCB, tetrachlorobiphenyl ; TCDD, tetrachlorodibenzo-p-dioxin ; TCDF, tetrachlorodibenzofuran ; TEQ, toxic equivalent quantity.

Table 6 Logistic 回帰分析による DIMS に対するダイオキシン類総 TEQ 四分位範囲のオッズ比

	Unadjusted		Adjusted*	
	p value	Odds ratio (95% CI)	p value	Odds ratio (95% CI)
Total TEQ				
Q1 : < 20 pg-TEQ/g lipid		1		1
Q2 : 20-35 pg-TEQ/g lipid	< 0.001	1.94 (1.34-2.83)	0.004	1.89 (1.23-2.89)
Q3 : 35-62 pg-TEQ/g lipid	0.02	1.79 (1.23-2.60)	0.04	1.62 (1.02-2.57)
Q4 : ≥ 62 pg-TEQ/g lipid	< 0.001	2.74 (1.87-4.02)	0.006	2.09 (1.24-3.53)

* 年齢, 性別, BMI, 習慣性飲酒, 及び喫煙状況で調整した. ダイオキシン類血中濃度の総 TEQ は Q1, Q2, Q3 及び Q4 の四分位に分割した. DIMS, difficulty initiating and/or maintaining sleep ; TEQ, toxic equivalent quantity.

中央値 (IQR) は DIMS 群と Non-DIMS 群でそれぞれ 39 (23-71), 30 (17-51) pg-TEQ/g lipid と DIMS 群で有意に高値であった ($p < 0.001$).

5. 不眠症状に対するロジスティック回帰分析 (Table 6)

DIMS に対するダイオキシン類の総 TEQ の影響を明らかにするために, 年齢, 性別, BMI, 習慣性飲酒, 及び喫煙状況で調整したロジスティック回帰分析を行った. 総 TEQ の Q1 の < 20 pg-TEQ/g lipid を reference とするといずれの四分位も DIMS に対するオッズ比 (odds ratio : OR) は有意に高値であった. 総 TEQ の Q4 の ≥ 62 pg-TEQ/g lipid の DIMS に対する OR (95% CI) が 2.09 (1.24-3.53) と高いだけでなく, 一般住民でも認められることがある Q2 の 20-35 pg-TEQ/g lipid においても DIMS の OR は 1.89 (1.23-2.89) と関連性が認められた.

考 察

本研究はダイオキシンの被害者である油症患者における全国規模で行った初めての不眠に関する調査である. ダイオキシン類の毒性が高いことは入眠困難や睡眠維持困難といった不眠のリスクを高めるだけでなく, 一般住民でも観察される範囲の血液中のダイオキシン類レベルにおいても不眠のリスクを高めていることは注目すべきである.

油症患者における不眠の有症状率は日本人成人と比較すると明らかに高率である. 今回の対象者と同年齢層である 50 歳以上の日本人成人の DIS

と DMS はそれぞれ男性では 6.4~16.1%, 13.5~29.0%, 女性では 13.5~31.5%, 16.2~32.3%と報告されている⁹⁾¹⁰⁾. 140 人の油症患者に直接聞き取り調査を行った結果では, 中等症以上の重度の DIS と DMS の有症状率が今回の結果とほぼ同じであった. 軽症例まで含めると DIS と DMS はそれぞれ 54.0%と 65.0%とさらに高率であった¹⁾. 今回は不眠症状の重症度までは質問していないが, 不眠の重症度まで確認すると有症状率は今回の調査でもさらに高率となるかもしれない.

ダイオキシン類血中濃度が高まり, その毒性の指標である TEQ が高値となると不眠症状が顕在化していることは注目に値する. ダイオキシン類が直接中枢神経における睡眠・覚醒に影響を及ぼしているかどうかについての基礎的な研究は行われていない. しかしながら, 複数の研究成果がダイオキシン類の睡眠・覚醒系へ影響する可能性を示している.

ダイオキシン類の核内受容体である aryl hydrocarbon receptor (AHR) は視床下部から脳幹の神経系に発現している¹¹⁾. ダイオキシン類は AHR を介して異物代謝に関わる遺伝子を含む様々な遺伝子発現を調節している¹²⁾. モノアミン系ではダイオキシン投与でチロシン合成酵素発現が高まり¹³⁾¹⁴⁾, 脳内のドパミン, ノルアドレナリン, セロトニンの増加が実験的に確認されている¹⁵⁾. モノアミン系は覚醒時に活動し, 睡眠時には活動が低下する¹⁶⁾. ダイオキシン曝露はモノアミン系の活性化を介して不眠症における過覚醒

状態^{17)~19)}をもたらすことが懸念される。

時計遺伝子と AHR とのクロストークも不眠の病態に影響する可能性がある。AHR 系の活性化は視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus : SCN) における時計遺伝子発現の振幅を減少させる。逆に、AHR 系の抑制は SCN における発振機構の振幅を増加させる²⁰⁾。睡眠・覚醒リズムは時計遺伝子群の発現の発振機構による概日リズムプロセスにより調整されている²¹⁾。ダイオキシン類はこの概日リズム形成の発振機構を減弱させることで不眠に影響することが推察される。

今回の研究において一般住民、健常者でも確認されるダイオキシン類血中濃度範囲内⁷⁾²²⁾でも、総 TEQ が高まると不眠のリスクを高めていた。平均年齢 (± SD) 68.1 ± 5.4 歳の一般住民 127 人の総 TEQ の中央値 (最小値~最大値) は 31 (12~100) pg-TEQ/g lipid と報告されている⁷⁾。今回の油症認定患者における総 TEQ の中央値 (最小値~最大値) は 35 (5~564) pg-TEQ/g lipid であった。健常者と比較すると油症患者の総 TEQ は著しく高値の者が認められる一方で、一般住民と同程度の結果の者も認められた。総 TEQ 値が Q2 の範囲でも不眠のリスクが高まっていることは、一般住民の不眠の病態にダイオキシンの影響が無視できない。

本研究は限界として、まず、油症患者における生活状況については回答されていたが、併存する精神・身体疾患についての情報は不十分な状態で、今回の解析に利用できなかった。油症患者では一般住民と比較すると慢性の身体・精神疾患が高率である²³⁾。当然ながら不眠の問題は併存疾患により影響を受けることが予想される。多変量解析において主要な併存疾患の影響も考慮される必要がある。また、服用している薬剤についても確認されていない。睡眠薬だけでなく、多数の薬剤が不眠には影響する。服用中の薬剤情報も考慮される必要がある。さらに、今回は油症患者対象に行われた調査であり、健常者との比較は行われていない。一般住民においてもダイオキシン類血中濃度や TEQ が不眠を含む睡眠・覚醒障害と関わるのかについても検討される必要がある。

結論および今後の課題

油症患者における不眠の有症状率は高率であり、

ダイオキシン類血中濃度から算出した毒性が最も高い群でそのリスクは最大であった。さらに、一般住民でも確認されるダイオキシン類血中濃度範囲内でも、総 TEQ が高まると不眠のリスクを高めていた。ダイオキシン類は、人工的に合成されるのみならず、住宅火災、森林火災、火山噴火により生成されている²⁴⁾²⁵⁾。ダイオキシン類は古来より自然界にも存在し、生体内には異物代謝システムを構築して対応している。ダイオキシンと多くの疾患との関連が精力的に検討されてきたが、睡眠・覚醒を含めた中枢神経系に対するダイオキシン類の影響についてはほとんど検討されていない。ダイオキシン類と睡眠・覚醒との諸問題は、油症患者だけでなく一般住民の不眠を含めた睡眠・覚醒障害の病態生理の一部として基礎と臨床の両面での研究が必要とされている。

謝 辞

本研究に関してはデータ提供に関して、厚生労働省並びに福岡県保健環境研究所管理部企画情報管理課の新谷俊二氏に御協力頂いた。九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター看護師の中村優子氏にはデータの匿名化作業に関わって頂いた。同センターメディカルソーシャルワーカーの谷尾恵子氏には立案の際に御協力頂いた。同センターの勝野裕子氏と九州大学医学部皮膚科学教室の梶嶋啓子氏には各種事務手続きでお世話になった。最後に、本研究に御協力頂いた油症認定患者さん、及び御関係の皆様へ深く感謝申し上げる。なお、本研究は厚生労働科学研究費補助金「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」(課題番号: H30-食品-指定-005) に負うものである。ここに記して謝意を表す。

参 考 文 献

- 1) Kondo H, Tanio K, Nagaura Y, Nagayoshi M, Mitoma C, Furue M and Maeda T : Sleep disorders among Yusho patients highly intoxicated with dioxin-related compounds : A 140-case series. Environmental research. 166 : 261-268, 2018.
- 2) Iida T and Todaka T : Measurement of dioxins in human blood : improvement of analytical method. Industrial health. 41 : 197-204, 2003.

- 3) Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N and Peterson RE : The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci.* 93 : 223-241, 2006.
- 4) 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 : a global access science source.* 15 : 95, 2016.
- 5) 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 : a global access science source.* 14 : 76, 2015.
- 6) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Koike S, Yoshimura T, Mitoma C, Shibata S, Uchi H, Furue M and Imamura T : Variation in half-life of penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) blood level among Yusho patients. *Chemosphere.* 77 : 658-662, 2009.
- 7) 香月進, 梶原淳陸, 堀就英, 平川博仙, 安武大輔, 新谷依子, 小木曾俊孝, 中西加奈子, 佐藤環, 高橋浩司, 塚谷裕子, 酒谷圭一, 片宗千春, 田中義人, 新谷俊二, 高尾佳子, 宮脇崇, 平川周作 : 油症患者血液中のPCDF類実態調査. pp. 56-70, 2018.
- 8) Kanda Y : Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone marrow transplantation.* 48 : 452-458, 2013.
- 9) Doi Y, Minowa M, Okawa M and Uchiyama M : Prevalence of sleep disturbance and hypnotic medication use in relation to sociodemographic factors in the general Japanese adult population. *Journal of epidemiology.* 10 : 79-86, 2000.
- 10) Kaneita Y, Ohida T, Uchiyama M, Takemura S, Kawahara K, Yokoyama E, Miyake T, Harano S, Suzuki K, Yagi Y, Kaneko A, Tsutsui T and Akashiba T : Excessive daytime sleepiness among the Japanese general population. *Journal of epidemiology.* 15 : 1-8, 2005.
- 11) Petersen SL, Curran MA, Marconi SA, Carpenter CD, Lubbers LS and McAbee MD : Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem. *The Journal of comparative neurology.* 427 : 428-439, 2000.
- 12) Wu D and Rastinejad F : Structural characterization of mammalian bHLH-PAS transcription factors. *Current opinion in structural biology.* 43 : 1-9, 2016.
- 13) Akahoshi E, Yoshimura S, Uruno S and Ishihara-Sugano M : Effect of dioxins on regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by aryl hydrocarbon receptor : a neurotoxicology study. *Environmental health : a global access science source.* 8 : 24, 2009.
- 14) Tanida T, Tasaka K, Akahoshi E, Ishihara-Sugano M, Saito M, Kawata S, Danjo M, Tokumoto J, Mantani Y, Nagahara D, Tabuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Kawata M and Hoshi N : Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin transactivates aryl hydrocarbon receptor-responsive element III in the tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons of the mouse midbrain. *Journal of applied toxicology : JAT.* 34 : 117-126, 2014.
- 15) Byers JP, Masters K, Sarver JG and Hassoun EA : Association between the levels of biogenic amines and superoxide anion production in brain regions of rats after subchronic exposure to TCDD. *Toxicology.* 228 : 291-298, 2006.
- 16) Scammell TE, Arrigoni E and Lipton JO : Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron.* 93 : 747-765, 2017.
- 17) Edinger JD, Means MK and Krystal AD : Does physiological hyperarousal enhance error rates among insomnia sufferers? *Sleep.* 36 : 1179-1186, 2013.
- 18) Vgontzas AN, Bixler EO, Lin HM, Prolo P, Mastorakos G, Vela-Bueno A, Kales A and Chrousos GP : Chronic insomnia is associated with nyctohemeral activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis : clinical implications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 86 : 3787-3794, 2001.
- 19) Stepanski E, Zorick F, Roehrs T, Young D and Roth T : Daytime alertness in patients with chronic insomnia compared with asymptomatic control subjects. *Sleep.* 11 : 54-60, 1988.
- 20) Jaeger C and Tischkau SA : Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in Circadian Clock Disruption and Metabolic Dysfunction. *Environmental health insights.* 10 : 133-141, 2016.
- 21) Takahashi JS : Molecular components of the circadian clock in mammals. *Diabetes, obesity &*

- metabolism. 17 Suppl 1 : 6-11, 2015.
- 22) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K and Iida T : Improvement in dioxin analysis of human blood and their concentrations in blood of Yusho patients. *Journal of Dermatological Science Supplement*. 1 : S21-S28, 2005.
- 23) Akahane M, Matsumoto S, Kanagawa Y, Mitoma C, Uchi H, Yoshimura T, Furue M and Imamura T : Long-Term Health Effects of PCBs and Related Compounds : A Comparative Analysis of Patients Suffering from Yusho and the General Population. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 74 : 203-217, 2018.
- 24) Salamanca M, Chandia C and Hernandez A : Impact of forest fires on the concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofurans in coastal waters of central Chile. *The Science of the total environment*. 573 : 1397-1405, 2016.
- 25) Organtini KL, Myers AL, Jobst KJ, Reiner EJ, Ross B, Ladak A, Mullin L, Stevens D and Dorman FL : Quantitative Analysis of Mixed Halogen Dioxins and Furans in Fire Debris Utilizing Atmospheric Pressure Ionization Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*. 87 : 10368-10377, 2015.
- (Received for publication February 27, 2019)

油症における末梢血リンパ球亜集団に関する検討

¹⁾北九州若杉病院 西日本総合医学研究所

²⁾北九州若杉病院内科

辻 博¹⁾, 松村 潔²⁾

Lymphocyte Subpopulations in Patients with Yusho

Hiroshi TSUJI¹⁾ and Kiyoshi MATSUMURA²⁾

¹⁾*Nishinohon Research Institute of Medical Science, Kitakyushu Wakasugi Hospital*

²⁾*Department of Internal Medicine, Kitakyushu Wakasugi Hospital*

Abstract

To investigate chronic immune effects of polychlorinated biphenyls (PCBs), total lymphocyte population and lymphocyte subpopulations in peripheral blood were studied in 216 subjects in 2018. A significant relationship between the concentration of PCB in blood and the percentage of CD3 positive T lymphocyte was observed. However, there was no correlation between the concentration of blood PCB and the density of total lymphocyte population, or the percentage of CD20 positive B lymphocyte. The percentages of T lymphocyte expressing CD3 were significantly decreased in 167 Yusho patients compared with those in 25 control subjects. We conclude that the percentage of T lymphocytes decrease in patients with Yusho, and it may be associated with PCB levels in the blood.

Key words : Yusho, Lymphocyte subpopulation, PCB

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が、その機構の詳細は未だ不明である³⁾。油症発生以来50年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、油症患者では現在においても未だに血中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⁾。油症における免疫機能影響については、1996年度福岡県油症一斉検診において血中PCB濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認め油症患者における免疫機能の障害が推測された¹⁰⁾。そして、1997年度の福岡県油症一斉検診において免疫グロブリンIgA、IgG、IgMのいずれか1分画以上の上昇を40.0%に、自己抗体では

Correspondence author: Hiroshi TSUJI
Nishinohon Research Institute of Medical Science, Kitakyushu Wakasugi Hospital, Tanaka 275, Sasaguri, Kasuya-gun, Fukuoka 811-2416, Japan
Tel : + 81-92-947-0511 Fax : + 81-92-947-1552
E-mail : htsuji@kitakyu-hp.or.jp

抗核抗体を45.6%と高率に認め、油症において液性免疫の障害を高頻度に認めることが報告されている¹¹⁾。

今回、2018年度福岡県油症一斉検診において末梢血リンパ球亜集団を測定し、油症における細胞性免疫に対する慢性的影響について検討した。

対象および方法

2018年度福岡県油症一斉検診において15歳以上の受診者218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、末梢血リンパ球亜集団の測定に同意が得られた216例を対象とした。

検診の内容は自覚症状、既往歴、家族歴、理学的所見、検尿、赤血球沈降速度、末梢血液検査、血液生化学検査、胸部レントゲン検査および心電図などよりなり、採血は午前中の空腹時に行った。白血球数およびリンパ球比率はフローサイトメトリー法(XE-2100, シスメックス社)により測定した。リンパ球亜集団の測定は抗ヒトマウスモノクローナル抗体を用いフローサイトメトリー法により、T細胞を示すCD3陽性細胞をCD3(Leu-4) FITC(日本ベクトン・ディッキンソン(株))を用いて、B細胞を示すCD20陽性細胞をB1-FITC(ベックマン・コールター(株))を用いてBD FACSCanto IIフローサイトメーター(BD Biosciences)により測定した。リンパ球亜集団は、総リンパ球に対する比率および絶対密度で表した。

PCBの測定は福岡県保健環境研究所、福岡市保健環境研究所、北九州市環境科学研究所および北九州生活科学センターで行った。血中PCB濃度は2018年度福岡県油症一斉検診において測定し

た216例の測定値を用いてリンパ球およびリンパ球亜集団との関連について検討した。

結果は平均±標準偏差(mean ± S.D.)で表し、平均値の比較についてはt検定を用いた。

結 果

2018年度福岡県油症一斉検診を受診し、末梢血リンパ球亜集団の測定に同意が得られた15歳以上の受診者216例の内訳は女性122例、男性94例で、平均年齢は64.1 ± 13.5(15~91)歳であり、油症患者167例、油症患者(同居家族)24例、未認定患者25例であった。血中PCB濃度と年齢の間に有意の正の相関($r=0.569$, $P < 0.001$)を認めた。

2018年度福岡県油症一斉検診の受診者216例について血中PCB濃度と末梢血リンパ球、リンパ球亜集団との相関について検討した(Table 1)。血中PCB濃度と末梢血リンパ球数の間に相関を認めなかった。末梢血リンパ球亜集団の総リンパ球に対する比率については血中PCB濃度とCD3陽性細胞の間に弱いながらも有意の負の相関($r = -0.173$, $P < 0.05$)を認めたが、血中PCB濃度とCD3陽性細胞数の間に相関をみなかった。血中PCB濃度とCD20陽性細胞の比率あるいはCD20陽性細胞数の間に相関をみなかった。

油症患者167例について未認定患者25例を対照者として、両群間の末梢血リンパ球、CD3陽性細胞およびCD20陽性細胞について検討した(Table 2)。対照者の平均血中PCB濃度は 0.38 ± 0.28 ppb、油症患者の平均血中PCB濃度は 1.05 ± 0.91 ppbであった。末梢血リンパ球数は

Table 1 Correlation coefficients between PCB concentration in blood and total lymphocyte population, or lymphocyte subpopulations

		r
Total lymphocyte	(/ μ l)	- 0.035
CD3 positive cell	(%)	- 0.173*
	(/ μ l)	- 0.095
CD20 positive cell	(%)	- 0.079
	(/ μ l)	- 0.090

* $P < 0.05$.

Table 2 Total lymphocyte population and lymphocyte subpopulations in patients with Yusho and in controls

No.		Controls 25	Yusho 167
Total lymphocyte	(/ μ l)	1,855 \pm 502	1,775 \pm 519
CD3 positive cell	(%)	71.3 \pm 9.0	66.7 \pm 9.7*
	(/ μ l)	1,311 \pm 320	1,186 \pm 398
CD20 positive cell	(%)	10.5 \pm 4.1	10.1 \pm 4.8
	(/ μ l)	201 \pm 105	181 \pm 109

*P < 0.05 vs. Controls.

対照者 1,855 \pm 502/ μ l に対し油症患者 1,775 \pm 519/ μ l と差をみなかった。CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率は対照者 71.3 \pm 9.0% に比べ油症患者では 66.7 \pm 9.7% と有意の低下を認めた (P < 0.05)。CD3 陽性細胞数は対照者 1,311 \pm 320/ μ l に対し油症患者では 1,186 \pm 398/ μ l と低下傾向を認めたが、差をみなかった。CD20 陽性細胞の比率は対照者 10.5 \pm 4.1% に対し油症患者では 10.1 \pm 4.8% と差をみなかった。CD20 陽性細胞数は対照者 201 \pm 105/ μ l に対し油症患者では 181 \pm 109/ μ l と低下傾向を認めたが、差をみなかった。

考 察

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

度福岡県油症一斉検診において、血中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) 濃度と免疫グロブリン IgA およびリウマチ因子との間に正の相関を、抗核抗体を血中 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ高濃度群に高頻度に認めた。油症における免疫グロブリン IgA およびリウマチ因子の上昇、抗核抗体の出現に 2,3,4,7,8-PeCDF が関与している可能性が考えられ、液性免疫に対する 2,3,4,7,8-PeCDF の慢性的影響が示唆された¹²⁾。そして、油症におけるリンパ球亜集団への影響については 2008 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者 156 例について末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中 PCB 濃度および血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度との関連について報告されている。血中 PCB 濃度と末梢血リンパ球, helper/inducer T 細胞を示す CD4 陽性細胞, suppressor/cytotoxic T 細胞を示す CD8 陽性細胞および B 細胞を示す CD20 陽性細胞の間に相関はみられなかったが、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と末梢血リンパ球数, CD4 陽性細胞の間に相関が認められ油症患者の末梢血リンパ球, CD4 陽性細胞の増加に 2,3,4,7,8-PeCDF の関与が示唆された。また、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者において低値の患者に比べ末梢血リンパ球, CD4 陽性細胞の増加を認めた¹³⁾。

今回の検討では 2018 年度福岡県油症一斉検診の受診者 216 例について血中 PCB 濃度と末梢血リンパ球亜集団の関連について検討し、血中 PCB 濃度と末梢血リンパ球, B 細胞を示す CD20 陽性細胞の間に相関をみなかったが、T 細胞を示す CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に

負の相関が認められた。T細胞を示すCD3陽性細胞の比率の低下にPCBの関与が示唆された。そして、油症患者では対照者に比べT細胞を示すCD3陽性細胞の比率の低下が認められた。油症患者167例について未認定患者25例を対照者としてCD3陽性細胞およびCD20陽性細胞を比較し、B細胞を示すCD20陽性細胞の比率および絶対密度は油症患者および対照者の間に差をみなかったが、CD3陽性細胞の総リンパ球に対する比率は対照者に比べ油症患者において低下を認めた。CD3陽性細胞の絶対密度は対照者に比べ油症患者において低下傾向を認めた。油症患者におけるT細胞を示すCD3陽性細胞の低下にPCBの慢性的影響が考えられる。

油症発生50年後の2018年度福岡県油症一斉検診受診者におけるリンパ球亜集団の検討において、油症患者ではT細胞を示すCD3陽性細胞の比率の低下を認め、血中PCB濃度とCD3陽性細胞の比率の間に弱いながらも負の相関を認めることより油症患者におけるT細胞の比率の低下にPCBの関与が示唆された。油症におけるリンパ球亜集団に対する慢性的影響の機序は不明であるが、油症の原因物質として毒性影響が大きいと考えられるPCDFの影響についての検討が必要と思われる。

総 括

2018年度福岡県油症一斉検診受診者216例について末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中PCB濃度との関連について検討した。血中PCB濃度と末梢血リンパ球、B細胞を示すCD20陽性細胞の間に相関をみなかったが、T細胞を示すCD3陽性細胞の比率との間に負の相関を認めた。油症患者では対照者に比べT細胞を示すCD3陽性細胞の比率の低下が認められ、油症患者におけるT細胞の比率の低下にPCBの関与が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Masuda Y and Yoshimura H : Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance : A Review. *Amer J Ind Med* 5 : 31-44, 1984.
- 2) Oishi S, Morita M, Fukuda H : Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43 : 13-22, 1978.
- 3) Gonzalez FJ, Liu SY, Yano M : Regulation of cytochrome P450 genes : molecular mechanism. *Pharmacogenetics* 3 : 51-57, 1993.
- 4) 飯田隆男, 芥野岑男, 高田智, 中村周三, 高橋克巳, 増田義人 : ヒトの血液中におけるポリ塩化ビフェニルおよびポリ塩化クアテルフェニルについて. *福岡医誌* 72 : 185-191, 1981.
- 5) 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一 : 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニル異性体. *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) 辻博, 佐藤薫, 下野淳哉, 東晃一, 橋口衛, 藤島正敏 : 油症患者における甲状腺機能 : 油症発生28年後の検討. *福岡医誌* 88 : 231-235, 1997.
- 11) 辻博, 平橋高明, 緒方久修, 藤島正敏 : 油症患者における免疫機能の検討. *福岡医誌* 90 : 147-149, 1999.
- 12) 辻博 : 油症患者における免疫機能の検討. 平成19年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業「熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究」平成19年度総括・分担研究報告書 (主任研究者: 古江増隆) pp. 37-39, 2008.
- 13) 辻博 : 油症における末梢血リンパ球亜集団の検討. *福岡医誌* 100 : 131-135, 2009.

(Received for publication March 22, 2019)

Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Induced by Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Human Keratinocytes and Sebocytes : A Possible Mechanism of Acneiform Eruption

Gaku TSUJI¹⁾²⁾, Masaki TAKEMURA²⁾, Akiko HASHIMOTO-HACHIYA²⁾,
Masutaka FURUE^{1)~3)} and Takeshi NAKAHARA¹⁾³⁾

¹⁾Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan

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

³⁾Division of Skin Surface Sensing, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka, Japan

Abstract

Although epidermal growth factor receptor inhibitors (EGFRIs) are effective in treating advanced carcinomas, they frequently cause acneiform eruption, which could be related to sebaceous gland activity ; however, the mechanism remains largely unknown. Based on the facts that 1) activation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) regulates follicular and epidermal keratinocyte differentiation and sebaceous gland activity, 2) EGFR signaling compensates for AHR signaling by sharing p300, and 3) sebum production is increased during EGFRi treatment, we hypothesized that EGFRi-induced activation of AHR may be involved in the development of acneiform eruption.

To demonstrate this, we administered clinically utilized EGFRIs, namely gefitinib and anti-EGFR antibody (Ab), to normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) and human sebocyte cell line SEB-1, and examined whether gefitinib and anti-EGFR Ab induced AHR activation. Gefitinib treatment induced up-regulation of CYP1A1 mRNA in NHEKs and SEB-1 cells, which was further enhanced by 6-formylindolo (3,2-b) carbazole (FICZ), an endogenous AHR ligand. Although anti-EGFR antibody treatment alone did not induce up-regulation of CYP1A1 mRNA in NHEKs and SEB-1 cells, it enhanced FICZ-induced up-regulation of CYP1A1 mRNA. In the SEB-1 cells, sebum production was increased by gefitinib treatment, and further enhanced by FICZ. Moreover, knockdown of AHR expression, using siRNA transfection of AHR, inhibited sebum production by gefitinib treatment, thereby indicating that EGFRi-induced AHR activation is involved in the increase of sebum production.

To extend our in-vitro observation, we orally administered gefitinib to C57BL/6 mice and applied FICZ on their abdomen. Gefitinib treatment induced up-regulation of CYP1A1 mRNA in the epidermis, which was enhanced by topical application of FICZ. These data together suggest that AHR activation in keratinocytes and sebocytes, with subsequent sebum production induced by EGFRIs, may play an important role in the development of acneiform eruption.

Keywords : AHR, EGFR inhibitor, acneiform eruption

Introduction

Although epidermal growth factor receptor

inhibitors (EGFRIs) are effective in treating advanced carcinomas, EGFRIs often cause adverse effects on the skin, most commonly

Abbreviation :

AHR : Aryl hydrocarbon receptor

EGF : Epidermal growth factor

EGFR : Epidermal growth factor receptor

FICZ : 6-formylindolo (3, 2-b) carbazole

Corresponding author : Gaku TSUJI

E-mail : gaku@dermatol.med.kyushu-u.ac.jp

acneiform eruption, a papulopustular reaction on the skin¹⁾; it requires therapeutic intervention in approximately one third of the patients²⁾.

Although the skin rash usually resolves after interrupting the EGFR treatment, the condition affects both optimal efficacy of the treatment and quality of life negatively. In addition, the severe skin rash may lead to dose-modification or treatment discontinuation, thereby resulting in reduced clinical benefits from the EGFR treatment. Importantly, several retrospective studies on the relationship between EGFR treatment and adverse skin reactions have revealed the appearance and severity of EGFR treatment-related skin rash to be positively correlated with tumor response to EGFR and subsequently good prognosis^{3)~5)}.

These observations together support the consensus that acneiform eruption should be treated while continuing EGFR treatment, in order to derive the maximal clinical benefit from EGFR treatment against advanced carcinomas.

Several studies on the pathomechanism of acneiform eruption, caused by EGFR treatment, have shown EGFR inhibition to modify chemokine and inflammatory cytokine production⁶⁾, anti-bacterial peptide production⁷⁾, and follicular and epidermal keratinocyte differentiation⁸⁾, thereby contributing to the development of acneiform eruption.

Since EGFR signaling has been shown to compensate for aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by sharing p300⁹⁾ (a transcriptional factor), we hypothesized that the inhibition of EGFR by EGFR treatment would cause acneiform eruption via activation of AHR. To the best of our knowledge, there are only a few studies that have investigated the role of AHR in the development of EGFR treatment-induced acneiform eruption.

AHR, a ligand-activated transcription factor, is preferentially expressed in the epidermis, and regulates keratinocyte differentiation¹⁰⁾. Although dioxins such as TCDD were identified as

the ligands of AHR, recent studies have revealed FICZ, a photo-product derived from tryptophan, as an endogenous ligand¹¹⁾. The ligand-activated AHR induces its nuclear translocation from the cytoplasm, thereby leading to the up-regulation of its target genes such as CYP1A1 in normal human keratinocytes (NHEKs)¹²⁾.

AHR activation is reportedly crucial for the development of chloracne, a specific acneiform eruption observed in patients with TCDD-poisoning. TCDD induces the up-regulation of SLPI, SPPR2D, and EPGN via AHR activation, leading to acanthosis and hyperkeratosis of the infundibular keratinocytes¹³⁾. Therefore, we examined whether AHR activation, induced by EGFR treatment in NHEKs, is involved in the development of acneiform eruption.

Our clinical research has revealed that sebum production is increased, since the initiation of EGFR treatment¹⁴⁾, thereby suggesting stimulation of sebaceous gland activity by EGFR inhibition; however, the precise mechanism remains largely unknown.

We also examined how the activation of AHR, induced by EGFR treatment, could modify sebum production by sebaceous glands, using immortalized human sebocyte cell line SEB-1.

In the current study, we administrated clinically utilized EGFRIs, namely gefitinib and anti-EGFR antibody (Ab), to NHEKs and SEB-1 cells and examined whether they induced AHR activation. To extend our in-vitro observation, we also attempted to utilize an in-vivo model. We orally administered gefitinib to C57BL/6 mice and examined whether it could enhance the AHR activation induced by topical application of FICZ.

Results

To examine whether EGFR treatment activates AHR signaling, we evaluated mRNA expression of CYP1A1, a representative AHR downstream gene, in gefitinib- or anti-EGFR Ab-treated NHEKs and SEB-1 cells. Gefitinib treatment induced up-regulation of CYP1A1 mRNA in

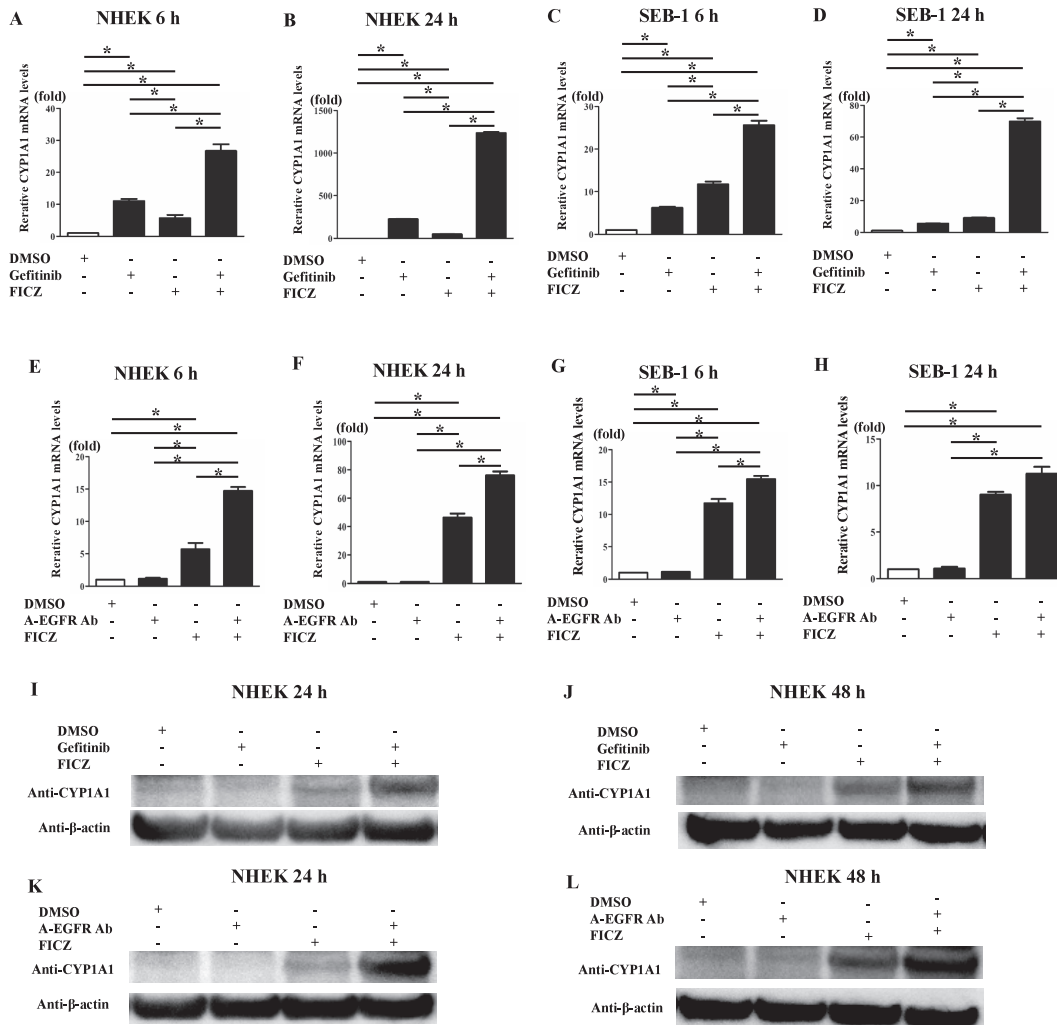


Fig 1. Either gefitinib or anti-EGFR Ab treatment enhanced the up-regulation of CYP1A1, induced by FICZ treatment, in NHEKs and SEB-1 cells.

(A–H) NHEKs and SEB-1 cells were treated with FICZ (100 nM) in presence or absence of either gefitinib (1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or anti-EGFR Ab (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for indicated time periods. CYP1A1 mRNA expression was analyzed by qRT-PCR. Data are expressed as mean \pm S. E. M. ; n = 3 for each group. Statistical differences between the expression of control and treated NHEKs are presented ; * $P < 0.05$. (I, J, K, and L) CYP1A1 protein expression was analyzed with an anti-CYP1A1 antibody using western blotting. The data are representative of experiments repeated thrice with similar results.

NHEKs (Fig. 1A and 1B) and SEB-1 cells (Fig. 1C and 1D). Anti-EGFR Ab treatment alone did not induce up-regulation of CYP1A1 mRNA in either NHEKs (Fig. 1E and 1F) or SEB-1 cells (Fig. 1G and 1H) ; however, they enhanced FICZ treatment-induced up-regulation of CYP1A1 mRNA (Fig. 1A–H). From western blot analysis, we observed up-regulation of CYP1A1 protein in NHEKs (Fig. 1I, 1J, 1K, and 1L), but not in SEB-1 cells (data not shown).

Our previous clinical research on acneiform

eruption, during EGFR treatment, had shown sebum production of the skin to be subsequently enhanced after the initiation of EGFR treatment¹⁴. Therefore, we hypothesized that AHR activation, induced by EGFR treatment, is involved in the increase of sebum production. To test this, we examined whether EGFR treatment increased sebum production, which was enhanced by FICZ treatment in SEB-1 cells. Sebum production in the cytoplasm of SEB-1 cells was evaluated using BODIPY staining. Gefitinib treat-

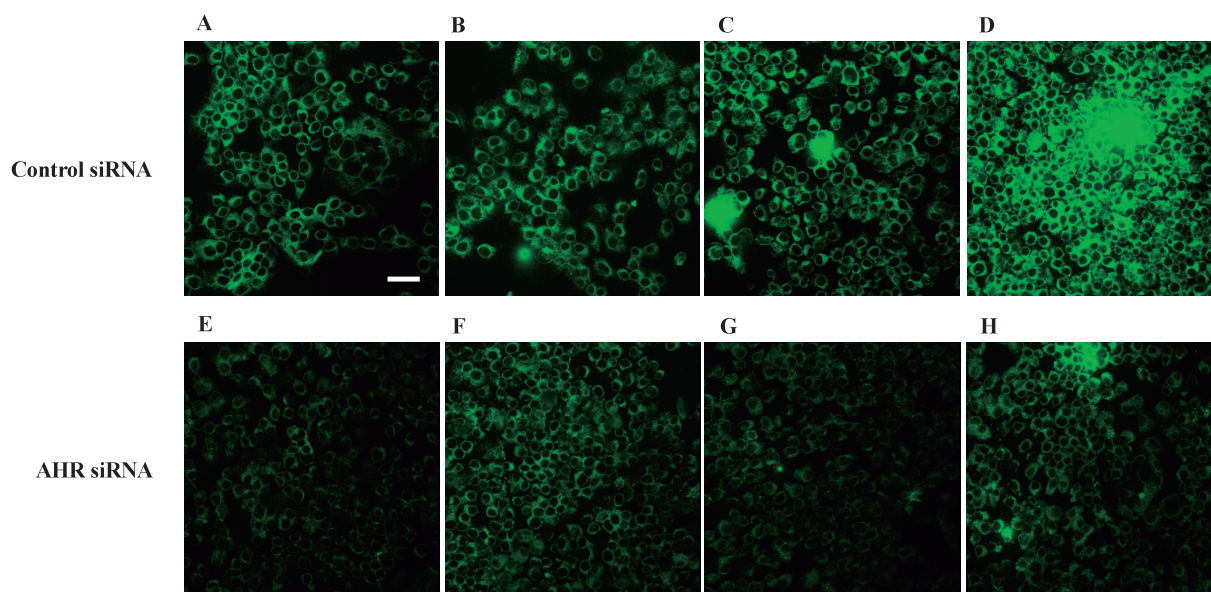


Fig 2. Gefitinib treatment enhanced the sebum production induced by FICZ treatment in SEB-1 cells, which was dependent on AHR.

(A–H) Either control siRNA- or AHR siRNA-transfected SEB-1 cells were treated with FICZ (100 nM) in presence of gefitinib (1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. Sebum production was evaluated by BODIPY staining (Green). (A and E) control ; (B and F) Gefitinib ; (C and G) FICZ ; (D and H) Gefitinib plus FICZ. Data are representative of experiments repeated thrice with similar results. The scale bar (in A) is 25 μm .

ment increased sebum production, which was further enhanced by FICZ treatment (Fig. 2C and 2D). To determine whether the increase of sebum production is dependent on AHR, we knocked down the expression of AHR (siRNA AHR) using siRNA transfection. Knockdown of AHR inhibited the sebum production induced by gefitinib-plus-FICZ treatment (Fig. 2H), thus indicating that EGFR1 treatment increased sebum production via AHR activation in SEB-1 cells. Knockdown of AHR was previously confirmed by qRT-PCR analysis¹²⁾.

To examine whether EGFR1 treatment induces AHR activation in vivo, we administered gefitinib to C57BL/6 mice and applied FICZ topically on the abdomen, as described in a previous report¹⁵⁾. qRT-PCR analysis of the abdomen skin revealed the induced up-regulation of CYP1A1 mRNA levels by topical application of FICZ, which was enhanced by gefitinib treatment (Fig. 3), implying a possibility that gefitinib enhances AHR activation in vivo.

Discussion

In the current study, we have shown for the first time that EGFR1 treatment induces AHR activation in human keratinocytes and sebocytes. Our results suggest that the EGFR1 treatment-induced AHR activation in NHEKs may lead to follicular and epidermal keratinocyte differentiation, contributing to the development of acneiform eruption. Considering the fact that FICZ is a photo-product generated from tryptophan¹⁶⁾, ultra violet irradiation such as sunlight-exposure might possibly worsen the acneiform eruption caused by EGFR1 ; hence, proper protection from sun light may be useful during the treatment of acneiform eruption.

Our clinical research on sebum production in EGFR1 treatment-induced acneiform eruption has shown EGFR1 treatment to increase sebum production¹⁴⁾, which is consistent with the finding of EGFR1 inducing sebum production in SEB-1 cells. In addition, FICZ treatment enhanced EGFR1-induced sebum production, suggesting

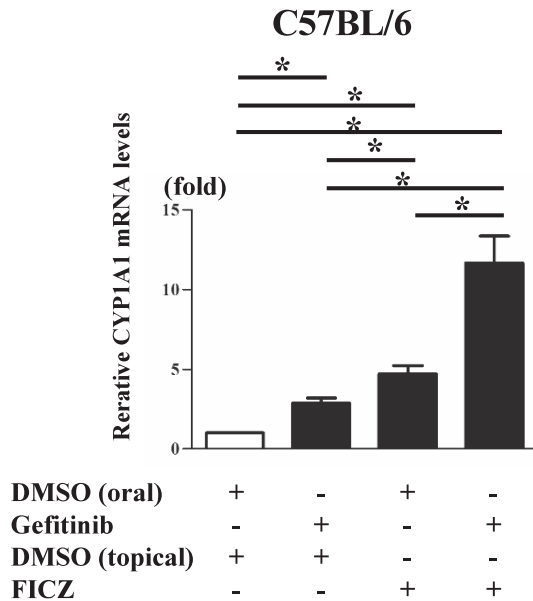


Fig. 3 Gefitinib treatment enhanced the up-regulation of CYP1A1 mRNA in the epidermis induced by topical application of FICZ in vivo.

Gefitinib (50 mg/kg) was administered to C57BL/6 mice by oral gavage (200 μ l per mouse). On day 0, the abdomen of each mouse was shaved and DMSO or gefitinib was administered. On day 1, 1 μ M of FICZ, dissolved in DMSO, was applied to the abdomen topically (20 μ l/mouse); 6 h later, the abdomen skin was collected to analyze mRNA levels, using qRT-PCR. The epidermis was separated from the dermis and mRNA was extracted from the epidermis. Data are expressed as mean \pm S. E. M. ; n = 5 for each group. Statistical differences between the expression in control and treated-groups are presented ; * P < 0.05.

that AHR activation by FICZ is one of the triggers toward the development of acneiform eruption. These data suggest that antagonists against AHR, such as CH223191, may be promising agents in the treatment of EGFR1-induced acneiform eruption in SEB-1 cells. The mechanism by which AHR activation increases sebum production is not yet clear. Considering the facts that PPAR- γ expression is a key determinant of sebum production in sebaceous glands¹⁷, EGFR1 treatment up-regulates PPAR- γ expression¹⁸, and TCDD treatment increases adipocyte differentiation along with PPAR- γ up-regulation¹⁹, there is a possibility that up-regulation of PPAR- γ via AHR activation may mediate EGFR1 treatment-induced sebum production ; however, further studies would be required to reveal the vital relationship between AHR and PPAR- γ in sebum production.

Finally, in-vivo study using gefitinib showed that gefitinib treatment enhances FICZ-induced up-regulation of CYP1A1 mRNA, thereby suggesting a possibility that EGFR1 treatment activates the AHR-Nrf2 axis in the epidermis in vivo. Taken together, we have demonstrated that activation of AHR, induced by EGFR1 treatment, in human keratinocytes and sebocytes, may partially explain the mechanism by which EGFR1 treatment results in acneiform eruption.

Materials & Methods

Reagents and antibodies

Gefitinib from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) and FICZ from Enzo Life Sciences (Exeter, United Kingdom) were dissolved in DMSO (St. Louis, MO) and stored at -30°C until further use. Anti-EGFR-Ab was purchased from Merck Millipore (Darmstadt, Germany).

Anti-human CYP1A1 mouse monoclonal IgG antibody (ab79819) from Abcam (Cambridge, UK) and anti-human β -actin mouse monoclonal IgG antibody (#3700) from Cell Signaling Technology (Danvers, MA) were utilized in western blot analysis.

Cell culture and treatments

NHEKs, obtained from Clonetics-BioWhittaker (San Diego, CA), were grown in culture dishes at 37°C in 5% CO_2 . They were cultured in serum-free KC growth medium (Lonza, Walkersville, MD) supplemented with bovine pituitary extract, recombinant epidermal growth factor, insulin, hydrocortisone, transferrin, and epinephrine. Culture medium was replaced every 2 days.

SEB-1 cells, kindly gifted by Dr. Diane Thiboutot²⁰, were grown to confluence in all experiments and cultured in Dulbecco's Modified

Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 5.5 mM glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)/Ham's F-12 (Sigma-Aldrich) in 3 : 1 ratio, 2.5% fetal bovine serum (Japan Bioserum Co. Ltd., Hiroshima, Japan), 1.8×10^{-4} M adenine (Sigma-Aldrich), 0.4 μ g/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 10 ng/ml ; insulin (Sigma-Aldrich), 3 ng/ml epidermal growth factor (PeproTech, Rocky Hill, NJ), and 1.2×10^{-10} M cholera toxin (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan).

NHEKs or SEB-1 cells (1×10^5) were seeded in 24-well culture plates, allowed to attach for 24 h, and subsequently treated with or without DMSO, gefitinib, anti-EGFR-Ab, and FICZ.

Confocal laser scanning microscopy of sebum production using BODIPY staining

SEB-1 cells (2.5×10^5), cultured on 35-mm dish, were treated with or without DMSO, gefitinib, anti-EGFR-Ab, and FICZ for 24 h, and washed in phosphate-buffered saline. Sebum staining using BODIPY (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan) was performed according to the manufacturer's protocol (Adipocyte Fluorescent Staining Kit). All samples were analyzed using a D-Eclipse laser scanning confocal microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

Quantitative reverse transcription (qRT)-PCR analysis

Total RNA was extracted using the RNeasy[®] Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Reverse transcription was performed using PrimeScript[™] RT reagent kit (TaKaRa Bio, Otsu, Japan). qRT-PCR was performed on a CFX Connect[™] Real-time System (Bio-Rad, Hercules, CA) using SYBR[®] Premix Ex Taq (TaKaRa Bio). Amplification was initiated at 95°C for 30 s, followed by 40 cycles of qRT-PCR at 95°C for 5 s and 60°C for 20 s. mRNA expression was measured in triplicate and normalized to that of β -actin. Primer sequences from TaKaRa Bio and SABiosciences (Frederick, MD) are shown below :

β -actin :

Forward 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGA-3' ;
Reverse 5'-GAGTACTTGCCTCAGGAGGA-3'
The sequence of the CYP1A1 primers (PPH 01271E) was not opened.

Western blotting

Cells were incubated in lysis buffer for 5 min (Complete lysis M ; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Protein concentration of the lysate was measured using a BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL). Equal amounts of protein (20 μ g) were dissolved in NuPage LDS sample buffer (Invitrogen) in presence of 10% sample reducing agent (Invitrogen). The lysates were boiled at 70°C for 10 min and then loaded and run on NuPage 4 % ~12% Bis-Tris gels (Invitrogen) at 200 V for 60 min. The proteins were then transferred on to polyvinylidene difluoride membranes (Invitrogen) and blocked in Western-Breeze Blocker/Diluent (Invitrogen). The membranes were then probed with anti-CYP1A1 and anti- β -actin antibody overnight at 4°C. Anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated IgG antibody (Cell signaling) was used as a secondary antibody. Visualization of protein bands was accomplished using SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) by ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad).

Transfection of siRNAs against AHR

siRNAs against AHR (AHR siRNA, s1200), as well as those with a scrambled sequence that would not lead to specific degradation of any cellular message (control siRNA), were purchased from Ambion (Austin, TX). NHEKs or SEB-1 cells, cultured in 24-well plates, were incubated for 48 h in 0.5 ml of culture medium, along with 5 nM siRNA and 3 μ l of HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen).

Animal experiment procedure

C57BL/6 mice were obtained from the Kyushu University Institute's Animal Production Program (Fukuoka, Japan), housed in a clean facility,

and bred and used in accordance with institutional guidelines. A total of 10 mg of gefitinib was first dissolved in 160 μ l of DMSO and diluted with 1440 μ l of sterile olive oil. Gefitinib was administered to mice by means of oral gavage (200 μ l/mouse). On day 0, the abdomen of each mouse was shaved and DMSO or gefitinib was administered to the mice. On day 1, 1 μ M of FICZ, dissolved in DMSO, was topically applied on the abdomen (20 μ l/mouse). 6h later, skin sample was collected to analyze mRNA levels using qRT-PCR.

The skin was floated with dermal side down and incubated with 3.8% ammonium thiocyanate for 30 min. The epidermis was separated from the dermis and mRNA extraction from the epidermis was performed immediately after, using TRIzol (Invitrogen), according to the manufacture's protocol.

Statistical analysis

Unpaired Student's t-test or one-way analysis of variance was used to analyze the results. A *p*-value of <0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. All data are presented as mean \pm S. E. M. ; n = 3 for three independent experiments.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare (Japan).

References

- 1) Pérez-Soler R : Rash as a surrogate marker for efficacy of epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer. *Clin. Lung Cancer.* 8 : S7-S14, 2006.
- 2) Pérez-Soler R and Van Cutsem E : Clinical research of EGFR inhibitors and related dermatologic toxicities. *Oncology.* 21 : 10-16, 2007.
- 3) Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J and Mayer RJ : Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J. Clin. Oncol.* 22 : 1201-1208, 2004.
- 4) Hecht JR, Patnaik A, Berlin J, Venook A, Malik I, Tchekmedyian S, Navale L, Amado RG and Meropol NJ : Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 10 : 980-988, 2007.
- 5) Van Cutsem E, Siena S, Humblet Y, Canon JL, Maurel J, Bajetta E, Neyns B, Kotasek D, Santoro A, Scheithauer W, Spadafora S, Amado RG, Hogan N and Peeters M : An open-label, single arm study assessing safety and efficacy of panitumumab in patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy. *Ann. Oncol.* 19 : 92-98, 2008.
- 6) Mascia F, Lam G, Keith C, Garber C, Steinberg SM, Kohn E and Yuspa SH : Genetic ablation of epidermal EGFR reveals the dynamic origin of adverse effects of anti-EGFR therapy. *Sci. Transl. Med.* 5 : 199ra110, 2013.
- 7) Lichtenberger BM, Gerber PA, Holcman M, Bühren BA, Amberg N, Smolle V, Schrupf H, Boelke E, Ansari P, Mackenzie C, Wollenberg A, Kislak A, Fischer JW, Röck K, Harder J, Schröder JM, Homey B and Sibilio M : Epidermal EGFR controls cutaneous host defense and prevents inflammation. *Sci. Transl. Med.* 21 : 199ra111, 2013.
- 8) Van Doorn R, Kirtschig G, Scheffer E, Stoof TJ and Giaccone G : Follicular and epidermal alterations in patients treated with ZD1839 (Iressa), an inhibitor of the epidermal growth factor receptor. *Br. J. Dermatol.* 147 : 598-601, 2002.
- 9) Sutter CH, Yin H, Li Y, Mammen JS, Bodreddigari S, Stevens G, Cole JA and Sutter TR : EGF receptor signaling blocks aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription and cell differentiation in human epidermal keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106 : 4266-4271, 2009.
- 10) Furue M, Tsuji G, Mitoma C, Nakahara T, Chiba T, Morino-Koga S and Uchi H : Gene regulation of filaggrin and other skin barrier proteins via aryl hydrocarbon receptor. *J. Dermatol. Sci.* 80 : 83-88, 2015.
- 11) Oberg M, Bergander L, Håkansson H, Rannug U and Rannug A : Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo [3,2-b] carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor

- activity. *Toxicol. Sci.* 85 : 935–943, 2005.
- 12) 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.
 - 13) Schäfer M, Willrodt AH, Kurinna S, Link AS, Farwanah H, Geusau A, Gruber F, Sorg O, Huebner AJ, Roop DR, Sandhoff K, Saurat JH, Tschachler E, Schneider MR, Langbein L, Bloch W, Beer HD and Werner S : Activation of Nrf2 in keratinocytes causes chloracne (MADISH)-like skin disease in mice. *EMBO Mol. Med.* 6 : 442–457, 2014.
 - 14) Nakahara T, Moroi Y, Takayama K, Itoh E, Kido-Nakahara M, Nakanishi Y and Furue M : Changes in sebum levels and the development of acneiform rash in patients with non-small cell lung cancer after treatment with EGFR inhibitors. *Onco. Targets Ther.* 28 : 259–263, 2015.
 - 15) Wincent E, Bengtsson J, Mohammadi Bardbori A, Alsberg T, Luecke S, Rannug U and Rannug A : Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109 : 4479–4484, 2012.
 - 16) Wei YD, Helleberg H, Rannug U and Rannug A : Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo [3,2-b] carbazole. *Chem. Biol. Interact.* 110 : 39–55, 1998.
 - 17) Dozsa A, Dezso B, Toth BI, Bacsi A, Poliska S, Camera E, Picardo M, Zouboulis CC, Biró T, Schmitz G, Liebisch G, Rühl R, Remenyik E and Nagy L : PPAR γ -mediated and arachidonic acid-dependent signaling is involved in differentiation and lipid production of human sebocytes. *J. Invest. Dermatol.* 134 : 910–920, 2014.
 - 18) Mansure JJ, Nassim R, Chevalier S, Szymanski K, Rocha J, Aldousari S and Kassouf W : A novel mechanism of PPAR gamma induction via EGFR signaling constitutes rational for combination therapy in bladder cancer. *PLoS One.* 8 : e55997, 2013.
 - 19) Arsenescu V, Arsenescu RI, King V, Swanson H and Cassis LA : Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ. Health Perspect.* 116 : 761–768, 2008.
 - 20) Thiboutot D, Jabara S, McAllister JM, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z and Clawson G : Human skin is a steroidogenic tissue : steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J. Invest. Dermatol.* 120 : 905–914, 2003.

(Received for publication March 27, 2019)

(和文抄録)

上皮成長因子受容体阻害薬によって生じる芳香族炭化水素受容体の活性化について：ざ瘡様発疹症の発症機序の可能性

¹⁾九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター

²⁾九州大学大学院医学研究院皮膚科学

³⁾九州大学大学院医学研究院体表感知学講座

辻 学¹⁾²⁾，竹村 正規²⁾，八谷 顕子²⁾，古江 増隆^{1)~3)}，中原 剛士¹⁾³⁾

上皮成長因子受容体阻害薬は進行期の癌に対して有効であるが、しばしば、副作用としてざ瘡様発疹症を生じる。これには脂腺の活動性が増加することが関連することが示唆されているが、その機序はほとんど知られていない。我々は、1) 芳香族炭化水素受容体が毛包上皮細胞や表皮細胞の細胞分化を制御し、脂腺の活動性も制御すること、2) 上皮成長因子受容体シグナルと芳香族炭化水素受容体シグナルは p300 タンパクを共有しており、お互いに競合しあうこと、3) 上皮成長因子受容体阻害薬の投与を開始すると皮脂の分泌が増加すること、という事実に基づき、上皮成長因子受容体阻害薬によって芳香族炭化水素受容体の活性化されることが、ざ瘡様発疹症の発症に関与しているのではないかという仮説を立てた。

この仮説を証明するために、正常ヒト表皮細胞とヒト脂腺細胞の cell line である SEB-1 細胞に対して、上皮成長因子受容体阻害薬（ゲフィチニブ、抗上皮成長因子受容体抗体）を投与し、芳香族炭化水素受容体が活性化されるかを検討した。ゲフィチニブ、抗上皮成長因子受容体抗体の投与は、CYP1A1 の発現の増加を誘導し、この現象は芳香族炭化水素受容体に対する内因性リガンドである FICZ を投与するとさらに増強した。また、SEB-1 細胞にゲフィチニブを投与したところ、皮脂の分泌が増加し、FICZ を投与するとさらに皮脂の分泌は増加した。さらに、芳香族炭化水素受容体の発現を siRNA によって低下させた状態では、ゲフィチニブを投与しても皮脂の分泌は増加しなかった。

さらに、in vivo でも同様の結果が得られるか確かめるため、C57BL/6 マウスに対してゲフィチニブを経口投与し、同時に腹部に FICZ を外用した。腹部の皮膚を回収し、CYP1A1 の発現について解析したところ、ゲフィチニブを投与すると、CYP1A1 の発現の増加が誘導され、FICZ を外用するとさらに CYP1A1 の発現の増加が増強された。

以上から、上皮成長因子受容体阻害薬によって生じる芳香族炭化水素受容体の活性化は、ざ瘡様発疹症の発症において重要な役割をしている可能性が示唆された。

キーワード：芳香族炭化水素受容体，上皮成長因子受容体阻害薬，ざ瘡様発疹症

2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin の ダイオキシン毒性に対する拮抗作用

九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

武田 知起, 人見 将也, 山田 英之, 石井 祐次

The effect of 2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin on Dioxin Toxicity

Tomoki TAKEDA, Masaya HITOMI, Hideyuki YAMADA and Yuji ISHII

Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University

Abstract

Maternal exposure to dioxin produces a number of developmental toxicity, such as growth retardation and defects in sexual dimorphic behaviors in offspring. Our previous studies have found that the toxic effects induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), a highly toxic congener of dioxins, are due to a reduction in the pituitary expression of growth hormone (GH) and luteinizing hormone (LH) during the fetal period, via activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). In this study, we examined whether 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD), the analog of TCDD in which chlorine atoms are replaced with fluorine atoms, can antagonize dioxin toxicity. In T47D cells, TCDD (0.5 nM) dramatically increased the activity and expression of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), a representative gene induced by AHR activation. However, TFDD co-treatment suppressed the induction in a dose-dependent manner. Its median effective dose (ED₅₀) was estimated as 45.9 nM. In contrast, although exposing 1 μg/kg TCDD to pregnant rats attenuated the expression of LHβ and GH mRNA and induced the expression of CYP1A1 mRNA in the male fetal pituitary, daily oral administration of TFDD (1 mg/kg/day) to the TCDD-exposed dams did not have any suppressive effects. These results suggest that maternal treatment with TFDD, even at 1,000 times the dose of TCDD, cannot block dioxin-produced developmental toxicity in fetuses.

Key words: dioxin, fetus, pituitary, 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD), Ah-receptor (AHR)

はじめに

ダイオキシンは、妊娠期母体への比較的低用量の曝露によって、出生児に成長遅延や性特異的行動障害などの様々な発育障害を惹起する¹⁾。カネミ油症の被害者追跡調査や出生コホート研究から、ダイオキシンがヒトこどもの発達に及ぼす影響が懸念されており²⁾³⁾、早期の治療・予防法の確立が求められている。

一般に、ダイオキシン毒性には、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) が重要な役割を演じることが明らかにされている^{4)~6)}。すなわち、AHRはダイオキシンとの結合により核内に移行し、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 への結合を介して、これらの発現を変動させる。変動遺伝子は数百種類も存在し^{7)~9)}、これらが複合的に毒性に寄与すると考えられている。当研究室では最近、AHRを標的としたダイオキ

Corresponding author : Yuji ISHII
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan
Tel : + 81-92-642-6586 E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

シン拮抗剤の創製を目指し、強毒性ダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (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) を合成した¹⁰⁾。さらに、思春期ラットに高用量の TFDD を経口投与しても、ダイオキシン様の急性毒性を示さないことを確認した¹⁰⁾。そこで本研究では、TFDD がダイオキシンによる毒性作用に対して拮抗できるか否かを細胞および動物レベルで検討することを目的とした。当研究室ではこれまでに、妊娠ラットへの TCDD 曝露が胎児脳下垂体において成長ホルモン (growth hormone ; GH) ならびに黄体形成ホルモン (luteinizing hormone ; LH) の合成を低下させることで出生後に低体重や交尾行動障害を引き起こすことを見出している^{11)~13)}。そこで、生体内における TFDD の拮抗作用の検討には、上記の胎児のホルモンレベルの低下を指標とした。

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ものを使用した¹⁰⁾。Corn oil は、味の素株式会社の市販品を使用した。抗ラット CYP1A1 抗体は当研究室において合成されたもの、および抗 β -actin 抗体は Biovision 社の市販品を購入して使用した。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°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。

2. 細胞培養

ヒト乳がん細胞株である T47D 細胞は、48 穴プレートに播種し、Dulbecco's modified eagle medium (10% 牛胎児血清含有) 中にて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。プレート底面への細胞の接着を確認したのち、TCDD (0.5 nM、0.5% DMSO にて溶解) を添加した培地に置換して培養を継続した。TCDD 処理 1 時間後、TFDD (10⁻⁴ nM~10⁴ nM、0.5% DMSO に溶解) を培地中に添加してさらに 23 時間培養を続けたのち、細胞を回収した。なお、対照群は 0.5% DMSO の

みを処理して同様に培養した。培養後の細胞は、50 mM Tris-HCl にて懸濁し、以下の実験に供した。

3. CYP1A1 活性測定

T47D 細胞における CYP1A1 活性は、既報¹⁴⁾ に従い、7-ethoxyresorufin の O-脱アルキル化反応により生じる resorufin の蛍光強度を測定することにより算出した (励起光 : 544 nm ; 測定光 : 590 nm)。細胞溶解液のタンパク質濃度は、Lowry 法¹⁵⁾ にて定量した。反応に用いたタンパク質量および反応時間は、あらかじめ条件検討によって決定し、50 μ g および 2 時間とした。

4. CYP1A1 タンパク質発現

T47D 細胞溶解液中の CYP1A1 の発現量は、イムノブロット法によって解析した¹²⁾。また、loading control として β -actin のタンパク質を同時に検出した。電気泳動に用いた細胞溶解液のタンパク質量は、5 μ g/lane とした。

5. 動物実験

本研究における動物実験は、九州大学動物実験委員会による実験計画の承認を受けた上で実施した。Wistar 系ラットは、九動株式会社より購入した。雌雄のラットを一晩交配し、翌朝膈内に精子が確認された場合、その日を妊娠 (gestational day ; GD) 0 日目とした。GD15 に、TCDD (1 μ g/kg/2 mL Corn oil) を単回経口投与した。対照群には、Corn oil のみを投与した。GD16 から GD19 の母体に対して、一日一回 TFDD (1 mg/kg/day/2 mL Corn oil) あるいは Corn oil を経口投与したのち、GD20 の雄胎児より脳下垂体を採取した。

6. リアルタイム RT-PCR 法

RNeasy kit (QIAGEN 社) にて胎児脳下垂体より total RNA を抽出したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した¹⁶⁾。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Thermo-Fisher Scientific 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。ターゲット mRNA の相対的発現量は、それぞれの遺伝子の threshold cycle

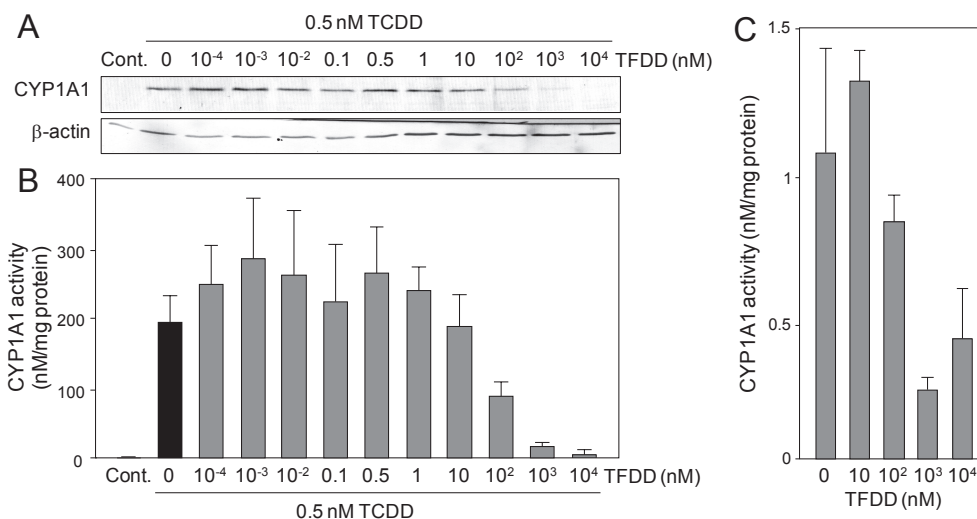


Fig. 1 Effect of TFDD on the TCDD-produced induction of the expression (A) and activity (B) of CYP1A1 protein and the constitutive activity of CYP1A1 (C) in T47D cells. (A) The level of CYP1A1 protein was determined by immunoblotting. (B and C) The CYP1A1 activity was analyzed by an ethoxyresorufin-*O*-deethylase assay. Bars are the means \pm S.E.M. of 4 cultures.

(Ct) 値を β -actin mRNA の Ct 値で補正したのち、control に対する割合として解析した。

結 果

TFDD が細胞レベルでダイオキシン依存的な AHR 活性化に対して拮抗作用を示すか否かを検討するため、代表的な AHR 標的遺伝子である CYP1A1 のタンパク質発現ならびに酵素活性を指標として検討を行った。検討の結果、T47D 細胞への 0.5 nM の TCDD 処理による CYP1A1 タンパク質発現ならびに酵素活性の誘導は、TFDD 併用によって 100 nM 以上では用量依存的に抑制される傾向が観察された (Fig. 1A and B)。本検討により、TCDD 依存的な CYP1A1 活性誘導に対する TFDD の 50% 阻害濃度は、 45.9 ± 3.1 nM と算出された。一方、TFDD 単独処理では CYP1A1 の基礎的活性に影響は与えなかった (Fig. 1C)。

妊娠期の TCDD 曝露による胎児のホルモン水準の低下に対する TFDD の効果を検証した。その結果、GD15 の妊娠ラットへの TCDD 単回経口投与によって雄胎児脳下垂体の GH ならびに LH β mRNA 発現は低下ないし低下傾向を示したが、これらに対して TFDD 併用による抑制効果は観察されなかった (Fig. 2)。さらに、TFDD の併用は TCDD 依存的な CYP1A1 mRNA 発現誘

導に対しても影響を示さなかった (Fig. 2)。加えて、本検討では TCDD 曝露が生存胎児数を有意に減少させることを確認したが、TFDD の併用はこれに対しても影響しなかった (Table 1)。なお、TCDD および TFDD は、胎児体重、胎盤重量ならびに性比には有意な影響を与えなかった (Table 1)。

考 察

本研究では第一に、AHR を発現しダイオキシン応答性を示す細胞株である T47D 細胞を用いて、TFDD のダイオキシンに対する拮抗作用を検討した。その結果、TFDD は処理濃度依存的に TCDD 依存的な CYP1A1 レベルの誘導を抑制することが明らかになった。さらに、その 50% 効果量は 45.9 nM であり、TCDD のおよそ 90 倍高用量を要することが確認された。TFDD は、マウス腹腔内への投与によって 24 時間後に肝臓中レベルが投与量の 1~2% 程度にまで減少するが¹⁷⁾、TCDD は投与量の 10% 程度が肝臓に貯留する¹⁸⁾。これらの知見を踏まえ、本研究では妊娠母体への TCDD 投与量の 1,000 倍高用量の TFDD を一日一回反復経口投与し、TCDD の次世代毒性に対する拮抗作用を検討した。その結果、本研究で用いた投与条件下においては、胎児の GH/LH β mRNA 発現低下ならびに CYP1A1 mRNA 発現

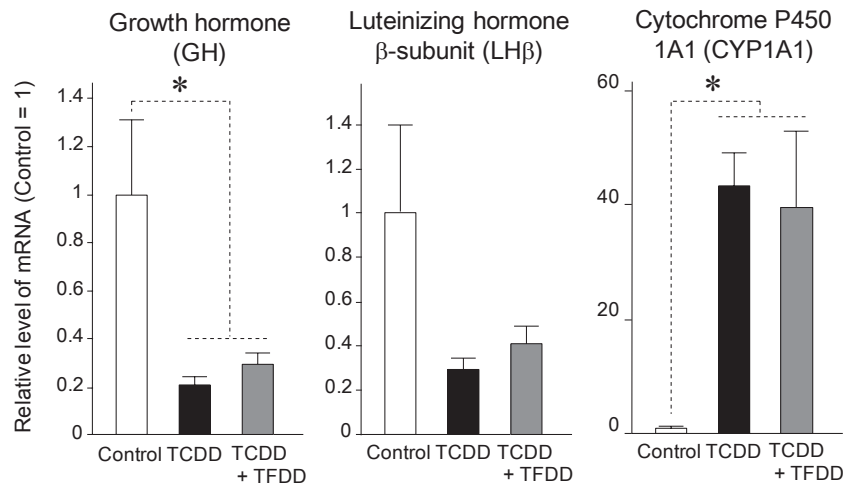


Fig. 2 Effect of maternal exposure to TCDD and TFDD on the pituitary expression of mRNAs coding for GH, LH β , and CYP1A1 in male fetuses at gestational day (GD) 20. Pregnant rats at GD15 were orally treated with 1 μ g/kg TCDD or corn oil and treated with TFDD (1 mg/kg/day) during GD16 and GD19. Bars are the means \pm S.E.M. of 3 pooled fetal pituitaries, which were removed from different dams. Significant difference between the pair indicated : * $p < 0.05$.

Table 1 Effects of maternal exposure to TCDD and TFDD on the litter size, sex ratio, and body and placental weight of fetuses.

Treatment	Sex	Litter Size	Sex ratio (% male)	Body weight (g)	Placental weight (mg)	% of BW
Control		13.7 \pm 0.9	48.6 \pm 7.0			
	Male	6.7 \pm 1.2		3.83 \pm 0.11	488 \pm 3	12.8 \pm 0.3
	Female	7.0 \pm 1.0		3.62 \pm 0.14	453 \pm 2	12.6 \pm 0.4
TCDD		11.3 \pm 1.2*	52.8 \pm 7.4			
	Male	6.0 \pm 1.2		3.74 \pm 0.10	510 \pm 18	13.7 \pm 0.7
	Female	5.3 \pm 1.2		3.45 \pm 0.07	487 \pm 58	14.1 \pm 1.6
TCDD + TFDD		11.7 \pm 1.3*	57.6 \pm 4.2			
	Male	6.7 \pm 1.2		3.75 \pm 0.22	528 \pm 15	14.2 \pm 0.5
	Female	5.0 \pm 0.3		3.57 \pm 0.14	471 \pm 44	13.2 \pm 0.8

Each value represents the mean \pm S.E.M. of 3 dams. *Significantly different from the control ($p < 0.05$).

誘導のいずれに対しても TFDD は拮抗することができなかった。胎児脳下垂体は、AHR mRNA 基礎発現が胎児脳組織の中でも比較的高い水準で発現しており、LH β mRNA の発現低下は AHR 依存的に起こる¹⁹⁾。従って、本研究における細胞での検討で 100 倍量の TFDD によって拮抗作用が見られた事実を合わせて考えると、母体に投与された TFDD が、胎児組織中で拮抗作用を示す

レベルに達していないために効果が見られなかった可能性が考えられる。母体に投与された TCDD は、投与量の 0.01~0.1% が胎児に移行することが報告されているが²⁰⁾、TFDD の胎盤透過性および胎児移行性に関する知見は筆者の知る限り存在しない。TFDD は、生体内において比較的代謝されやすいことが報告されており¹⁷⁾²¹⁾、母体における易代謝性によって胎児への移行量が予

想以上に小さかった可能性がある。TFDDの生体内での効果の有無を結論づけるため、胎児組織中のTFDDレベルを正確に定量することが今後必要である。

結 論

TCDD曝露を受けた妊娠ラットに対して、1,000倍量のTFDDを一日一回経口投与しても、TCDD依存的な胎児GH/LH mRNA発現低下に対して拮抗できないことが確認された。

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

- Peterson RE, Theobald HM and Kimmel GL : Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds : cross-species comparisons. *Crit. Rev. Toxicol.* 23 : 283-335, 1993.
- Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Chiba T, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Fukushima K, Wake N and Furue M : Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease. *Environ. Int.* 38 : 79-86, 2012.
- Nishijo M, Tawara K, Nakagawa H, Honda R, Kido T, Nishijo H and Saito S : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 18 : 246-251, 2008.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 : 307-340, 1995.
- 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.
- Whitlock JP Jr : Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 : 103-125, 1999.
- Hitomi M, Takeda T, Yamada H and Ishii Y : The effect of 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin on pubertal rats : an analysis focusing on the dioxin-like acute toxicity. *Fukuoka Acta Med.* 108 : 68-74, 2017.
- Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y and Yamada H : Fetal pituitary gonadotropin as an initial target of dioxin in its impairment of cholesterol transportation and steroidogenesis in rats. *Endocrinology* 147 : 927-936, 2006.
- Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T and Yamada H : Maternal exposure to dioxin disrupts gonadotropin production in fetal rats and imprints defects in sexual behavior. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329 : 1091-1099, 2009.
- Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y and Yamada H : Dioxin-induced fetal growth retardation : the role of a preceding attenuation in the circulating level of glucocorticoid. *Endocrine.* 47 : 572-580, 2014.
- 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.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Yamamoto M, Shimazoe T, Ishii Y, Himeno M and Yamada H : Maternal exposure to dioxin imprints sexual immaturity of the pups through fixing the status of the reduced expression of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Pharmacol.* 85 : 74-82, 2014.
- 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.
- 18) MacKenzie SA, Thomas T, Umbreit TH and Gallo MA : The potentiation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity by tamoxifen in female CD1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 116 : 101-109, 1992.
- 19) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H and Ishii Y : The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. *Biochem. Pharmacol.* 154 : 213-221, 2018.
- 20) Van den Berg M, Heeremans C, Veenhoven E and Olie K : Transfer of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans to fetal and neonatal rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 9 : 635-644, 1987.
- 21) 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.

(Received for publication March 15, 2019)

雌マウス肝臓におけるセレン結合性タンパク質 (SelenBP) の 発現と 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 被誘導性： SelenBP1 欠損動物を用いた検討

¹⁾九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

²⁾九州大学大学院薬学研究院 細胞生物薬学分野

³⁾崇城大学薬学部

⁴⁾第一薬科大学

宋 穎霞¹⁾, 藤本 景子²⁾, 黒瀬 厚¹⁾, 石田卓巳³⁾, 古賀貴之⁴⁾, 李 任時¹⁾,
武田知起¹⁾, 武知進士³⁾, 山田英之¹⁾, 田中嘉孝²⁾, 石井祐次¹⁾

Hepatic Expression of Selenium Binding Protein (SelenBP) in Female Mice and Its Inducibility by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : Study with SelenBP1-Knockout Mice

Yingxia SONG¹⁾*, Keiko FUJIMOTO²⁾*, Atsushi KUROSE¹⁾, Takumi ISHIDA³⁾, Takayuki KOGA⁴⁾,
Ren-shi LI¹⁾, Tomoki TAKEDA¹⁾, Shinji TAKECHI³⁾, Hideyuki YAMADA¹⁾,
Yoshitaka TANAKA²⁾ and Yuji ISHII¹⁾

¹⁾Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University

²⁾Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University

³⁾Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University

⁴⁾Daiichi University of Pharmacy

Abstract

Hepatic expression of selenium binding protein (SelenBP) in female mice and its inducibility by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was studied using wild-type (WT) C57BL/6J and SelenBP1-knockout mice. Female WT mice (4 weeks old) received TCDD at the dose of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i. p.). The control group received the vehicle, corn oil. In addition, SelenBP1-KO mice received TCDD at the same dose as the WT. A control group of SelenBP1-KO mice received the vehicle, corn oil. Five days after treatment, livers were removed and homogenized. The level of SelenBP in the liver homogenate was compared between the control and TCDD-treated groups by immunoblotting using anti-human SelenBP1 antibody as the primary antibody. It has been discovered that there are two SelenBP isoforms in mice, SelenBP1 and SelenBP2. The antibody used was expected to recognize both SelenBP1 and SelenBP2 in mice. The level of SelenBP in the livers of female SelenBP1-KO mice was far lower than those in WT mice. In addition, the level of SelenBP in WT mice was induced to approximately 5 times by TCDD treatment while there was no substantial increase in SelenBP level in SelenBP1-KO mice. Therefore, SelenBP1 is constitutively expressed as the predominant SelenBP isoform in the liver of female WT mice whereas the level of SelenBP2 remains low. In addition, the SelenBP2 is barely induced in the liver of female mice by TCDD. These results suggest that the

*Equally contributed to this work.

Corresponding author : Yuji ISHII
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan
Tel : + 81-92-642-6586 E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

induction of hepatic SelenBP at the protein level in female mice by TCDD is mainly due to the induction of SelenBP1.

Key words : SelenBP1, dioxin, selenium, TCDD, knockout mouse

はじめに

ダイオキシン類は、消耗症、免疫抑制、肝障害、発がんプロモーション作用等、多彩な毒性を引き起こすが¹⁾、それらは細胞の可溶性画分に存在する芳香族炭化水素受容体 (AhR) の活性化を通して生起すると考えられている²⁾。活性化した AhR は核内で AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成し、様々な遺伝子上流に存在するコンセンサス配列 [xenobiotic responsive element (XRE)] に結合することでそれらの遺伝子発現を変動させることが知られている³⁾。ダイオキシン類により変動することが報告されている遺伝子は 300 種類以上にもほぼが⁴⁾、どの遺伝子変動が毒性発現に重要であるのかは未だ十分に理解されていない。

当教室では、ダイオキシン類の一種である 3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (PCB126)、および多環芳香族炭化水素の 3-methylcholanthrene (3MC) が雄ラット肝臓のセレン結合性タンパク質 (SelenBP1) mRNA およびタンパク質発現を顕著に誘導することを既に報告している⁵⁾⁻⁷⁾。一方、マウスには相同性の高い 2 種の SelenBP isoform, SelenBP1 および SelenBP2 があると報告されている⁸⁾⁹⁾。当教室では、さらに、マウスを用いた研究により、肝臓 SelenBP1 の誘導には AhR 活性化が関わることを突き止めた¹⁰⁾。前述の通り、ダイオキシンによる毒性発現には、AhR が中心的な役割を果たすと考えられている。従って、SelenBP1 誘導が AhR 活性化を介するという事実は、本誘導がダイオキシン毒性発現に寄与する可能性を示唆する。そこで、SelenBP1 の誘導とダイオキシン毒性との関連性を明らかにすることを目指し、SelenBP1 ノックアウト (KO) マウスを作製した¹⁰⁾。SelenBP1-KO および野性型マウスそれぞれに最強ダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を処理し、急性毒性発現状況を比較することにより、SelenBP1 誘導がダイオキシン毒性に関与するか

否かを検討した。その結果、高用量のダイオキシン曝露により出現する代表的な毒性である体重増加抑制、肝臓肥大、胸腺萎縮、ならびに酸化ストレスの増大に対して、両マウス間で程度に違いが確認されなかった¹⁾。このことから、ダイオキシンによる SelenBP1 誘導は、少なくとも上記の毒性に対して見る限り、それらの発現には関与しないことが示唆された。また、SelenBP1 の誘導がダイオキシン毒性に拮抗するための防御的応答であるなら、SelenBP1 の欠失は毒性増強をもたらさなければならない。しかし、我々の先行研究ではこれも観察されなかったことから、SelenBP1 の誘導はダイオキシン毒性の軽減にも働かないことが示唆された¹⁰⁾。但し、この先行研究の成果をもってしても、SelenBP1 が全ての TCDD 毒性発現/軽減に関与しないと結論づけることはできない。それは、先行研究では、高用量を用いての解析が行われていたことに加え、SelenBP1-KO マウスに発現する SelenBP2 の寄与の可能性も否定できないからである。当研究室の先行研究では、mRNA レベルでの解析を行ったものの、イムノブロットングによる発現変動までは調べておらず、SelenBP1-KO がマウスの SelenBP レベルに及ぼす影響をタンパク質レベルでは評価していない。一方、mRNA レベルでの解析からは、雌マウスには SelenBP2 の発現が低い可能性があり、SelenBP1-KO による影響の評価に適している可能性もある¹⁰⁾。

そこで、本研究では、基礎的なデータの収集を目指し、雌マウスにおける SelenBP の発現をイムノブロットングにより解析した。また、TCDD による誘導性と SelenBP1-KO による影響についても合わせて検討した。

実験方法

1. 実験材料

TCDD は、AccuStandard 社から購入して使用した。Corn oil は、味の素株式会社の市販品を使用した。抗ヒト SelenBP1 抗体は、Santa Cruz

Biotechnology 社, 抗 β -actin 抗体は Sigma-Aldrich 社および Biovision 社, Enhanced chemiluminescence (ECL) 用の Horseradish Peroxidase 標識二次抗体は GE Healthcare 社, ECL 用の基質 Clarity™ Western ECL Substrate は日本バイオラッドの市販品を購入して使用した. その他の試薬は, 実験に適した純度のものを使用した. TCDD は, 100 μ g TCDD/mL acetone 溶液として使用まで -30°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.

2. 動物実験

本研究における動物実験は, 九州大学動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会による実験計画の承認を受けた上で実施した. SelenBP1-KO マウスは, SelenBP1 遺伝子の第 3 エクソンから第 11 エクソンまでをネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) と置換することにより作製したものであり, 遺伝子型の決定は, 既報に従って行った¹⁰⁾. 野生型 C57BL/6J マウスは, 日本クレアより購入した. 4 週齢の野性型および SelenBP1-KO 雌性マウスに TCDD を 100 μ g/kg/5 mL の用量で単回腹腔内投与した. 対照群には, corn oil を投与した. 投与 5 日後に肝臓を摘出し液体窒素中で凍結後, 使用まで -80°C にて保存した¹⁰⁾. これを解凍し, 肝重量の 3 倍容の 1.15% KCl 中でホモジナイズを行い, 使用まで -80°C にて保存した. また, 5 週齢の野性型および SelenBP1-KO 雄性マウスから肝臓を摘出し, 使用まで -80°C にて保存した. 肝重量の 3 倍容の 0.25 M スクロース中でホモジナイズを行い, 9,000xg, 20 分遠心を行って, その上清を S9 として使用まで -80°C にて保存した. ホモジネートおよび S9 のタンパク質濃度は, Lowry 法¹¹⁾ にて定量した.

3. SelenBP タンパク質発現

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

結 果

5 週齢雌マウス肝臓における SelenBP の発現と, TCDD による被誘導性について検討した. ホモジネートをサンプルとして, SelenBP1 抗体反応性バンドを検出した. また, ホモジネートサンプルであるため, 均質性を担保する目的で, β -actin に対する抗体によるイムノブロットングを行い, この抗体へ反応するバンドの強度との比をもって, SelenBP 発現量を評価した. 野生型 C57BL マウスと SelenBP1-KO マウスを未処理動物間で比較すると, SelenBP1-欠損雌マウス肝臓では, 野生型に比べ, 抗ヒト SelenBP 抗体と交差性を示すバンドの強度が著しく低かった (Fig. 1A). また, 野生型雌マウス肝臓の SelenBP のタンパク質レベルは, TCDD により約 5 倍に誘導されたが, SelenBP1-KO 雌マウスでは, タンパク質発現レベルの増加は確認できなかった (Fig. 1B). 一方, 5 週齢雄マウスの肝 S9 を用い, 野生型 C57BL マウスと SelenBP1-KO マウスを未処理動物間で比較すると, SelenBP1-KO 雄マウス肝臓においても, SelenBP は野生型の約 60% 発現していた (Fig. 2). これらタンパク質レベルでの解析から, SelenBP1-KO 雄マウスには, SelenBP2 が高レベルに発現していること, SelenBP1-KO 雌マウスには, SelenBP2 の発現は著しく低いことが明らかになった.

考 察

5 週齢マウス肝臓における SelenBP のタンパク質発現レベルについて検討した. 構成的条件下において, 雄マウス肝臓には, SelenBP2 が SelenBP1 と同程度, あるいはそれより多く発現しており, SelenBP1-KO 雄マウス肝臓においても, SelenBP2 の発現レベルが無視し得ないほど高く, SelenBP の機能を解析するには良いモデルとは言い難いと考えられた. 一方, 構成的条件下において, 雌マウス肝臓の主要な SelenBP は SelenBP1 であり, SelenBP2 の発現レベルは著しく低いと考えられた. また, 雌マウスの SelenBP2 は TCDD による誘導をほとんど受けず, TCDD によるタンパク質レベルでの SelenBP の誘導は主に SelenBP1 の誘導によることが明らかになった. SelenBP2 は, 生体内での局在は SelenBP1 と若干

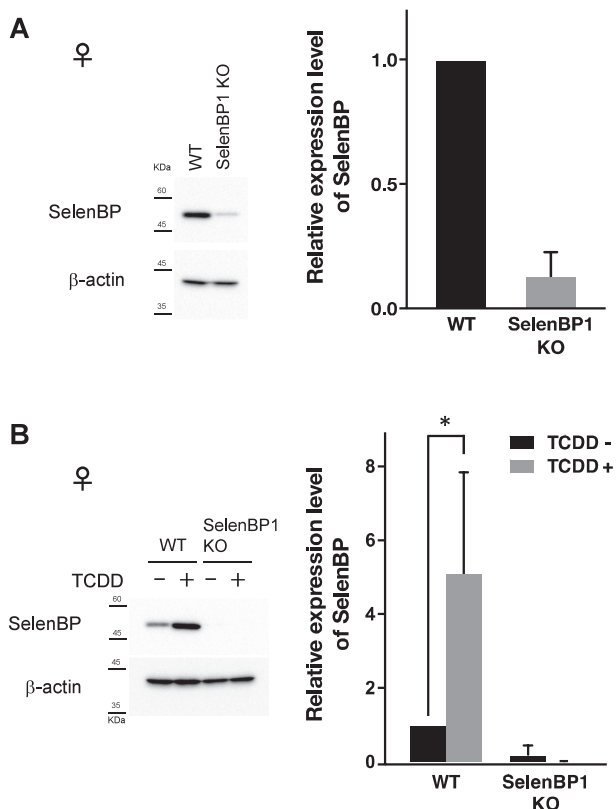


Fig. 1 Comparison of the hepatic expression level of SelenBP between female C57BL and SelenBP1-KO mice and its inducibility by TCDD. (A) The levels of SelenBP protein and β -actin were determined by immunoblotting in 5-week-old female wild-type (WT) C57BL/6J and SelenBP1-KO mice. The levels of SelenBP in the liver homogenate was normalized to that of β -actin. Protein amounts subjected for SelenBP and β -actin were 10 and 15 μ g/lane, respectively. Bars are the means \pm S.E. of 5 mice. One of the representative data is shown. (B) The effect of TCDD treatment on the levels of SelenBP protein and β -actin was determined by immunoblotting. Female WT and SelenBP1-KO mice (4 weeks old) were treated with TCDD (100 μ g/kg, i.p.) and the livers were removed five days after treatment (5 weeks old). The level of SelenBP in the liver homogenate was normalized to that of β -actin. Protein amounts subjected for SelenBP and β -actin were 10 and 15 μ g/lane, respectively. Bars are the means \pm S.E. of 3 mice. Significant difference from the untreated group: * $p < 0.05$. One of the representative data is shown.

異なるものの⁹⁾¹⁰⁾, その相同性の高さから機能的連携が示唆されている. 当研究室の先行研究で mRNA レベルでの影響を雄マウスで調べた結果, ダイオキシンによる応答性に関して, SelenBP1 は高用量においても誘導されるのに対し, SelenBP2 は低用量でこそ誘導傾向があるものの, 高用量では抑制された¹⁰⁾. これらのことから, 両タン

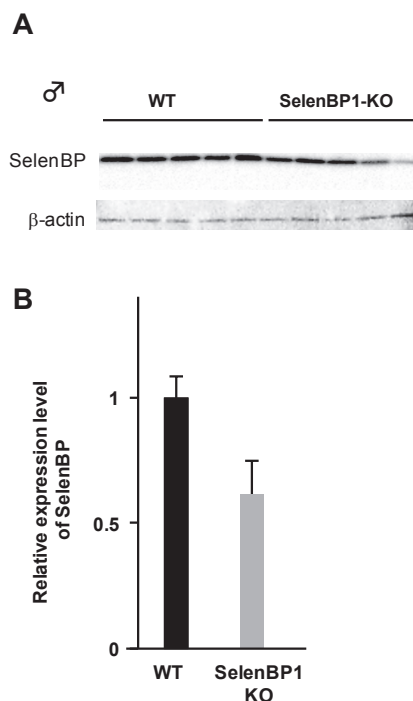


Fig. 2 Comparison of the hepatic expression level of SelenBP between male C57BL and SelenBP1-KO mice. A) immunoblot analyses of the liver S9 fraction of male WT and SelenBP1-KO mice (5 weeks old) with anti-human SelenBP1 and anti- β -actin are shown. B) the level of SelenBP was determined and normalized to that of β -actin. Protein amount subjected was 10 μ g/lane. Bars are the means \pm S.E. of 5 mice.

パク質の関連性については注視すべき点である. このように, ダイオキシンによる SelenBP1 誘導意義に関しては, 異なる毒性指標での解析を行うとともに, SelenBP2 との関係性も考慮して更なる解析を行う必要がある. この点において, 今後, 野生型と SelenBP1-KO 雌マウスの肝臓を用いた比較を行うことは有用であろう. また, 近年, 重金属による腎臓障害の際, 尿中に漏出する SelenBP1 が, 腎障害マーカーとして有用であることも報告されている¹²⁾. 筆者の知る限り, 油症と腎疾患との間に明確な関連を見出した報告はなされていないと考えるが, ダイオキシン受容体である AhR 欠損動物では, 水腎症が引き起こされることが知られている¹³⁾. また, 腎臓においては, SelenBP2 の mRNA 発現レベルが低いと報告されている⁹⁾¹⁰⁾. 今後, SelenBP1-KO マウスの腎

臓を用いた検討も必要であろう。多くのがんのタイプにおいて SelenBP1 の発現が低下しており、これが、がんの臨床成績、生存期間に負の影響を及ぼす可能性があるとして指摘されている¹⁴⁾。ダイオキシンによる SelenBP1 誘導の意義を明らかにするために、SelenBP1 および SelenBP2 の生理的機能の更なる解明が必要である。

結 論

SelenBP1-KO 雄マウス肝臓においては、SelenBP2 の発現レベルが無視し得ないほど高く、SelenBP の機能を解析するには良いモデルとは言えないと考えられた。一方、雌マウス肝臓の主要な SelenBP は SelenBP1 であり、SelenBP2 の発現レベルは著しく低いと考えられた。ダイオキシンの新たな毒性指標を設定し、肝臓の SelenBP1 の機能を評価するのに SelenBP1-KO 雌マウスは有用であると期待される。

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, H27-食品-指定-017 および H30-食品-指定-005)によった。

参 考 文 献

- Poland A and Knutson JC : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26 : 517-554, 1982.
- 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.
- 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.
- Boverhof DR, Burgoon LD, Tashiro C, Sharratt B, Chittim B, Harkema JR, Mendrick DL and Zacharewski R : Comparative toxicogenomic analysis of the hepatotoxic effects of TCDD in Sprague Dawley rats and C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 94 : 398-416, 2006.
- Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N and Oguri K : A coplanar PCB induces a selenium binding protein as a major cytosolic protein in rat liver. *Chemosphere* 32 : 509-515, 1996.
- Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N and Oguri K : Significant induction of a 54-kDa protein in rat liver with homologous alignment to mouse selenium binding protein by a coplanar polychlorinated biphenyl, 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and 3-methylcholanthrene. *Toxicol. Lett.* 87 : 1-9, 1996.
- Ishida T, Tasaki A, Fukuda Y, Ishii Y and Oguri K : Induction of a cytosolic 54 kDa protein in rat liver that is highly homologous to selenium-binding protein. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 6 : 249-255, 1998.
- Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG and Medina D : Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis* 10 : 541-546, 1989.
- Lanfear J, Fleming J, Walker M and Harrison P : Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen-binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14 : 335-340, 1993.
- Tsujimoto S, Ishida T, Takeda T, Ishii Y, Onomura Y, Tsukimori K, Takechi S, Yamaguchi T, Uchi H, Suzuki SO, Yamamoto M, Himeno M, Furue M and Yamada H : Selenium-binding protein 1 : its physiological function, dependence on aryl hydrocarbon receptors, and role in wasting syndrome by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochim. Biophys. Acta* 1830 : 3616-3624, 2013.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- Lee EK, Shin YJ, Park EY, Kim ND, Moon A, Kwack SJ, Son JY, Kacew S, Lee BM, Bae ON and Kim HS : Selenium-binding protein 1 : a sensitive urinary biomarker to detect heavy metal-induced nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* 91 : 1635-1648, 2017.
- Harrill JA, Hukkanen RR, Lawson M, Martin G, Gilger B, Soldatow V, Lecluyse EL, Budinsky RA, Rowlands JC and Thomas RS : Knockout of the aryl hydrocarbon receptor results in distinct hepatic and renal phenotypes in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272 : 503-518, 2013.
- Elhodaky M and Diamond AM : Selenium-Binding Protein 1 in Human Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19 : pii : E3437, 2018.

(Received for publication March 15, 2019)

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、文法上の誤りがなく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)、古江増隆* (皮膚科学)、江藤正俊* (泌尿器科学)、小川佳宏* (病態制御内科学)、和田尚久 (歯・総合歯科学)、森元 聡* (薬・生薬学)、中村誠司 (歯・顎顔面腫瘍制御学)、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.

令和元年6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。