

令和3年度厚生労働行政推進調査事業費
食品の安全確保推進研究事業

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

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 辻 学

令和4(2022)年3月

令和3年度 総括・分担研究報告書

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

令和3年度研究班構成員氏名

研究代表者

辻 学 (九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 准教授)

研究分担者

石井 祐次 (九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野 准教授)

上松 聖典 (長崎大学病院眼科 講師)

緒方 英紀 (九州大学病脳神経内科 助教)

小野塚大介 (国立循環器病研究センター 疫学研究推進室 室長)

貝沼茂三郎 (富山大学附属病院和漢診療科 特命教授)

香月 進 (福岡県保健環境研究所 所長)

川崎 五郎 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授)

古賀 信幸 (中村学園大学栄養科学部 教授)

申 敏哲 (熊本保健科学大学リハビリテーション学科 教授)

園田 康平 (九州大学大学院医学研究院眼科学分野 教授)

月森 清巳 (福岡市立こども病院 副院長)

辻 博 (北九州若杉病院 西日本総合医学研究所 所長)

津嶋 秀俊 (九州大学病院整形外科 助教)

戸高 尊 (公益財団法人北九州生活科学センター 室長)

友清 淳 (九州大学病院 歯内治療科 講師)

鳥巢 剛弘 (九州大学病態機能内科 講師)

中原 剛士 (九州大学病院皮膚科 講師)

濱田 直樹 (九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 助教)

冬野 洋子 (九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教)

前田 英史 (九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学分野 教授)

室田 浩之 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 教授)

(五十音順)

研究協力者

- 池田 光政 (公益財団法人北九州生活科学センター 理事長)
上原口奈美 (公益財団法人北九州生活科学センター 検査員)
太田 千穂 (中村学園大学栄養科学部 准教授)
梶原 淳睦 (公益財団法人北九州生活科学センター 参事)
加藤 聖子 (九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学 教授)
北岡 隆 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 眼科・視覚科学分野 教授)
小木曾俊孝 (福岡県保健環境研究所計測技術課 主任技師)
佐藤 環 (福岡県保健環境研究所生活化学課 主任技師)
新谷 依子 (福岡県保健環境研究所生活化学課 研究員)
鈴木 邦裕 (九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 助教)
高尾 佳子 (福岡県保健環境研究所企画情報管理課 研究員)
高橋 浩司 (福岡県保健環境研究所企画情報管理課 課長)
千々和勝己 (公益財団法人北九州生活科学センター 常務理事)
飛石 和大 (福岡県保健環境研究所生活化学科 専門研究員)
中村 優子 (九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 看護師)
平川 周作 (福岡県保健環境研究所水質課 研究員)
平川 博仙 (福岡県保健環境研究所生活化学課 専門研究員)
広瀬 勇氣 (公益財団法人北九州生活科学センター 検査員)
古江 増隆 (九州大学 名誉教授)
古谷 貴志 (福岡県保健環境研究所生活化学課 主任技師)
堀 就英 (福岡県保健環境研究所生活化学課 課長)
宮崎 昭行 (医療法人山内診療所 診療所長)
宮脇 崇 (北九州市立大学エネルギー循環化学科 准教授)
村山 直也 (九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教)
諸隈 誠一 (九州大学大学院医学研究院統合基礎看護学 教授)
柳原 豊史 (九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野)
吉富 泉 (諫早総合病院歯科口腔外科 科長)
吉村 恵 (医療法人社団温故会直方中村病院 病院長)

(五十音順)

目 次

I. 令和3年度総括研究報告書

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

II. 令和3年度分担研究報告書

01. 油症検診受診者の血液中 PCDF 等（ダイオキシン類）濃度実態調査…………… 8
研究分担者 香月 進
研究協力者 堀 就英, 平川 博仙, 飛石 和大, 新谷 依子, 佐藤 環,
古谷 貴志, 平川 周作, 小木曾 俊孝, 戸高 尊, 広瀬 勇氣,
宮脇 崇
02. Thermo Scientific DFS Dual Data XL システムによる
油症患者血液中ダイオキシン類分析法の検討 (2) …………… 17
研究分担者 戸高 尊
研究協力者 広瀬 勇氣, 上原口 奈美, 梶原 淳睦, 千々和 勝己, 池田 光政
03. 油症検診データを用いた基礎的解析…………… 24
研究分担者 香月 進
研究協力者 高尾 佳子, 高橋 浩司
04. 油症患者の追跡調査…………… 31
研究分担者 小野塚 大介
研究協力者 中村 優子, 辻 学, 古江 増隆
05. 油症曝露による女性特有の健康影響に関する研究…………… 35
研究分担者 月森 清巳
研究協力者 加藤 聖子, 諸隈 誠一
06. カネミ油症患者の漢方治療に関する実態調査に関する研究…………… 39
研究分担者 貝沼 茂三郎
07. 油症検診における眼病変の追跡調査…………… 42
研究分担者 園田 康平
08. 油症検診受診者における角膜内皮細胞…………… 43
研究分担者 上松 聖典
研究協力者 北岡 隆
09. 長崎県油症地区における口腔乾燥症に関する研究…………… 45
研究分担者 川崎 五郎
研究協力者 吉富 泉

10. 油症における末梢血 CD3 陽性細胞に対する 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の影響…………… 48
研究分担者 辻 博
11. 油症患者における皮膚ガス分析…………… 54
研究分担者 室田 浩之
研究協力者 村山 直也
12. 油症患者の関節症状に関する研究 — キヌレニン経路の関節炎への影響 — ……58
研究分担者 津嶋 秀俊
13. カネミ油症患者における中枢・末梢神経障害の文献的考察と他の中毒性疾患による
神経障害との差異の研究…………… 60
研究分担者 緒方 英紀
14. ダイオキシン類による気道上皮傷害における
肺サーファクタント蛋白に関する検討…………… 62
研究分担者 濱田 直樹
研究協力者 鈴木 邦裕, 柳原 豊史
15. 感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対する β -NMN の効果検討……………67
研究分担者 申 敏哲
研究協力者 吉村 恵
16. Ah リガンドと消化管における腸内細菌の研究……………75
研究分担者 鳥巢 剛弘
17. 低残留性である 2, 4, 6-三塩素置換 PCB 異性体の動物肝ミクロゾームによる代謝……81
研究分担者 古賀 信幸
研究協力者 太田 千穂
18. 皮膚の慢性炎症におけるエンドセリン-1 と AHR の相互作用……………87
研究分担者 中原 剛士
19. 膠原病の皮疹形成機序における AHR の役割に関する研究……………88
研究分担者 冬野 洋子
20. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析：
脳の性分化と生殖腺の発達に対する芳香族炭化水素受容体の寄与…………… 89
研究分担者 石井 祐次
21. ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質 1 (Selenbp1) の腎臓における役割：
脂質代謝の制御とストレス応答との関連性の検討……………102
研究分担者 石井 祐次
22. AhR シグナルの活性化によるヒト歯根膜細胞の
骨芽細胞分化抑制メカニズムの解析……………117
研究分担者 前田 英史

23. AhR シグナルの活性化はヒト歯根膜細胞の MMP 発現に どのような変化を及ぼすか……………	118
研究分担者 友清 淳	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	119
---------------------------------	-----

総括研究報告書

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

研究代表者 辻 学 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 准教授

研究要旨

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

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

【研究成果】**臨床的追跡調査・疫学研究**

（1）油症患者の支援と治療研究の推進

①健康実態調査、一斉検診の実施、検診結果を集積した患者データベースを更新した。令和2年度全国油症検診の受診者の検診結果をデータベースに入力した。
②油症相談支援員制度による死因調査の結果を論文公開した。油症患者の50年間の追跡調査を実施し、死亡リスクを検証した。その結果、男性の油症患者は、女性の油種患者よりも、がんの累積死亡率が有意に高いことが明らかとなった。これとは対照的に、非がんの累積死亡率については、男女間で有意な差はみられなかった。

（2）臨床的追跡調査・疫学研究

①令和2年度の全国油症検診受診者の検診情報の収集と管理を行った。全国油症一斉検診の受診者について血液中のPCDF等（ダイオキシン類）の濃度を継続的に測定した。令和2年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度を測定した認定患者14名と未認定者66名について結果集計を行った。認定患者の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は53 pg/g-fatとなり、2,3,7,8-TeCDD毒性等価係数（WHO-2006）を用いて毒性等量（TEQ）に換算した総ダイオキシン類（Total TEQ）の平均濃度は42 pg TEQ/g-fatであった。一方、未認定者の2,3,4,7,8-PeCDF平均濃度は10 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は18 pg TEQ/g-fatであった。

②PCB異性体の化学特性及びin silico解析によるヒトチトクロームP450（CYP）分子種とPCB異性体のドッキング様式のシミュレーションデータを用い、油症患者におけるPCB異性体の特徴的な蓄積パターンに影響を与える要因を解析した。

③Thermo Fisher Scientific DFS Dual Data XLシステムにProgrammed Temperature Vaporization-Large Volume Injection（PTV-LVI）システムを装備したガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置を用いて、油症患者血液中ダイオキシン類の高感度分析法を再検討した。

④油症女性患者の閉経年齢と血中ダイオキシン類濃度との関連について検討した。油症女性患者における自然閉経の平均年齢は49.9歳で、わが国における女性の平均閉経年齢と変わらなかった。また、閉経年齢と閉経時の推定血中ダイオキシン（PeCDF）濃度との間には有意な相関は認めなかった。

(3) 基礎的研究

- ①油症肺傷害において肺サーファクタントである SP-D が保護的役割を担っていることが考察された。
- ②2,4,6-三塩素置換型 PCB (246 型 PCB) の1つの 2,4,6,3',4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB168)につき、ラット肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を解析した。
- ③皮膚の慢性炎症において重要な働きをするエンドセリン-1 と AHR の相互作用について紫外線照射モデルを用いて検討した。
- ④実験動物を用い、AHR が欠損すると精巣の重量が減量する傾向を明らかとし、その機序を解析した。また、ダイオキシン誘導性蛋白質である Selenbp1 は酸化ストレスを軽減する役割を明らかにした。
- ⑤油症患者と健常者の皮膚ガスを採取、成分解析し、成分比較を試みた。
- ⑥ベンゾピレンで AHR シグナルが活性化すると歯根膜細胞の MMP2、MMP12 が増加することが分かった。
- ⑦メタゲノム法により全消化管の腸内細菌の分布を網羅的に解析し、十二指腸や空腸に AHR を活性化するインドール化合物の代謝に関わる細菌が豊富であることが分かった。
- ⑧油症患者の関節症状に関する研究では、AHR に作用するキヌレイン経路で産生されるキヌレニン酸という物質が関節内の軟骨変性を防ぐ働きがある可能性が示唆された。
- ⑨油症患者の血液細胞を分析したところ、油症患者において CD3 陽性細胞の低下が認められ、CD3 陽性細胞の低下に 2,3,4,7,8-PeCDF の慢性的影響が示唆された。

A. 研究目的

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

(倫理面に対する配慮)

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

B. 研究方法

I. 班長が担当する研究

1. 班長は、九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター(以下、油症センター)センター長を兼任する。
2. 班の総括と研究会議開催
3. 油症検診の実施(各自治体に委託)と検診結果の全国集計
4. 油症相談員・相談支援員制度
健康の問題を含め、様々な不安を抱く患者の相談を行う。また、患者に対して既往歴、症状、生活習慣の聞き取りまたは文書による調査を行う。
5. 死因・次世代調査
ダイオキシンの生体への影響、次世代への影響を検証する。
6. 台湾油症との情報交換
これまでの研究を通じて得た知識を相補的に交換し、互いの患者の健康増進につとめる。また、これからの研究の方向性を議論し、よりよい研究を目指す。
7. 検診体制の見直し
患者の症状の変遷と高齢化にあわせて検

診科目、検診項目を見直す。

8. 臨床試験の実施

油症患者の様々な症状を軽減するために漢方薬の臨床試験を施行する。

9. 油症対策委員会の開催

患者代表者からなる油症対策委員会を開催し、研究成果の公表および次年度の実態調査票の改正点の検討、医療者向けのパンフレット案の検討を行う。

10. 情報の提供

本研究を通じて得られた知識で、情報公開可能なものについては極力情報公開につとめる。パンフレット、ホームページ、油症ニュース、あるいは書面で公表し、油症対策委員会で患者代表者に説明を行う。

II. 九州大学油症治療研究班と長崎油症研究班が行う調査、治療および研究

1. 検診を実施し、油症患者の皮膚科、眼科、内科、歯科症状について詳細な診察を行い、年次的な推移を検討する。血液検査、尿検査、骨密度検査、神経学的検査を行う。検査結果は他覚的統計手法などを用いて統計学的に解析し、経年変化の傾向について調査する。

2. 油症患者体内に残存する PCB、PCQ やダイオキシン類の生体内動態を把握するために、血中濃度分析を行う。患者の症状、検査結果にいかにか寄与しているかについても分析、検討する。

3. 九州大学大学院医学研究院附属総合コホートセンターが一般住民対象に行う環境調査に協力し、一般対照群と患者の疾患、症状、血液中ダイオキシン類濃度を比較し、ダイオキシン類の慢性影響を明確にする。

4. 油症の継世代に及ぼす影響に関する検討を行うため、コホートの作成に取り掛かる。

5. PCB やダイオキシン類の体内動態を明らかにする。

6. 基礎的研究を行い、PCB やダイオキシン類の慢性毒性の機序の解明およびダイオキシン類の毒性を緩和しうる薬剤の探索を行う。

C. 結果および考察

I. 油症患者の支援と治療研究の推進

1. 油症相談員・相談支援員制度

高齢化や社会的偏見により検診を受診していない患者の健康状態や近況を把握し、様々な相談を受けるために、2002年に患者の集中する福岡県、長崎県、広島県で油症相談員事業を開始した。2016年には、相談支援員制度を施行した。定期的に研修会を開催し、情報共有に努めている。

2. 情報の提示

パンフレットの更新作成、ホームページ、あるいは直接書面にて研究内容を患者に伝達した。さらに患者への情報提供のために、油症新聞を定期的に発行した。また、これまでの研究内容をひろく知らしめることを目的として、

油症の検診と治療の手引きは、

<http://www.kyudai-derm.org/yusho/index.html> に、

油症の現況と治療の手引きは、

<http://www.kyudai-derm.org/member/index.html> に、

カネミ油症の手引きは、

<http://www.kyudai-derm.org/kanemi/index.html> に、

油症研究 - 30年の歩み - は、

http://www.kyudai-derm.org/yusho_kenkyu/index.html に

油症研究 II 治療と研究の最前線は、

http://www.kyudai-derm.org/yusho_kenkyu/index02.html に、

1年おきに福岡医学雑誌の特集号として発行している油症研究報告集は

http://www.kyudai-derm.org/fukuoka_acta_medica/index.html に

厚生労働省科学研究費補助金による研究結果は

<http://www.kyudai-derm.org/kakenhouku/index.html> にそれぞれ掲載している。

3. 患者の実態把握と情報発信に関する研究

今年度の油症研究班の成果を患者団体に

公表し、意見、要望を伺った。今年度は新型コロナウイルス感染症の拡大を防ぐため、WEB会議・書面会議で行った。

4. 油症対策委員会の開催

厚生労働省、患者代表者からなる油症対策委員会を開催し、研究成果の公表および次年度の実態調査票の改正点の検討を行った。加えて油症次世代の健康状況の調査開始のため、調査計画・方法、呼びかけ文について検討を行なった。

5. 油症患者の死因に関する研究

油症認定患者の生存情報および死亡情報をアップデートし、死亡リスクの再評価を行うことを目的として、油症認定患者を対象とした50年間の追跡調査を実施した。がんと非がんの長期死亡リスクを検証した結果、男性の油症患者は、女性の油種患者よりも、がんの累積死亡率が有意に高いことが明らかとなった。これとは対照的に、非がんの累積死亡率については、男女間で有意な差はみられなかった。

6. 油症2世、3世を対象とした次世代の健康調査

参加同意と健康調査票を回収できた人数は388名（男性168名、女性220名）であった。うち、2世は322名（認定2世は16名）、3世は66名であった。今後は、これらのデータに基づいたコホート作り、健康状態に関する統計学的解析を進める。

7. 油症患者の血液中ダイオキシン類分析におけるガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析装置の検討

ガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析装置による測定は、装置が簡素化され再現性が高いこと、測定時間が短縮されたことが優れていたが、ダイオキシン類各異性体のS/N比が従来方と比較して、相対的に低下しており、更なる条件検討が必要と考えられる。

II. 臨床的追跡調査・疫学研究

1. 油症検診の追跡調査

1) 油症検診データ管理システムの改修
検診票の変更については、これまで生化学検査や免疫学的検査等の検査項目について追加や削除など軽微な変更があり、その都度対応してきた。今回は、歯科検診票が大幅に変更され、また、いくつかの検診票で項目中の選択肢の変更が行われたため、データの管理方法を全体的に見直した。

2) 油症患者血液中のPCDF類実態調査

全国油症一斉検診の受診者について血液中のPCDF等（ダイオキシン類）の濃度を継続的に測定している。2020年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度を測定した認定患者14名と未認定者66名について結果集計を行った。認定患者の2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの平均濃度は53 pg/g-fat となり、2, 3, 7, 8-TeCDD 毒性等価係数（WHO-2006）を用いて毒性等量（TEQ）に換算した総ダイオキシン類（Total TEQ）の平均濃度は42 pg TEQ/g-fat であった。一方、未認定者の2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 平均濃度は10 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は18 pg TEQ/g-fat であった。2020年度に実施した血液中ダイオキシン類の分析精度管理について、データ解析を行った。その結果、当所を含む国内6機関の定量値は概ね一致しており、各機関で血液中ダイオキシン類の定量分析が適切に実施されていることが分かった。

2. 油症患者における眼科的所見

1) 福岡県・長崎県検診における眼科的所見
本年度は新型コロナウイルス感染症の影響で眼科的診察を行うことが難しかった。

3. 油症患者における歯肉色素沈着と残存歯に関する検討

本年度は新型コロナウイルス感染症の影響で歯科診察を行うことが難しかった。

4. 油症における末梢血T細胞に関する検討

血中2, 3, 4, 7, 8-PeCDF濃度とCD3陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に負の相関を認め、血中2, 3, 4, 7, 8-PeCDF濃度が高値の油症患者では、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF濃度が低値の受診者に比較しCD3陽性細胞の総リンパ球に対する比率の低下を認めた。油症によるT細胞への慢性影響が明らかとなった。

5. 油症患者における皮膚ガス分析

油症患者では特徴的にデカナールという物質を検出したが、解析数が少なく、更なる検討が必要である。

6. カネミ油症患者における中枢・末梢神経障害の文献的考察と他の中毒性疾患による神経障害との差異の研究

文献を考察したところ、PCB、PCDF、dioxinによる中毒症状の文献は少ないながらも報告されていることが明らかとなった。近年、末梢神経障害に関連した血清バイオマーカーが普及してきているため、末梢神経障害を有するカネミ油症患者での測定を検討する。

7. 油症曝露による継世代健康影響に関する研究

油症曝露による女性特有の健康影響に関して検討した。今回は、自然閉経の年齢を検討した。油症女性患者における自然閉経の平均年齢は49.9歳で、わが国における女性の平均閉経年齢とほぼ同じであった。また、閉経年齢と閉経時の推定血中PeCDF濃度との間には有意な相関は認めなかった。これらの成績から、油症曝露では閉経年齢に影響を及ぼさないことが示唆された。

III. 基礎的研究

1. ダイオキシン類による気道上皮傷害における肺サーファクタント蛋白に関する検討

ヒトClub細胞株NCI-H441細胞に

Benzo[a]pyrene (BaP)を投与すると、ムチンコア蛋白 (MUC5AC) の遺伝子発現が亢進し、ヒトリコンビナントSP-Dの投与により抑制された。油症肺傷害において肺サーファクタントが保護的役割を担っていることが考察された。

2. 感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するβ-NMNの効果検討

ベンゾピレンを投与したラットにおける神経異常に対するβ-NMNの効果の評価した。β-NMNの投与は抗酸化作用とAHR活性化抑制作用によりベンゾピレン中毒を抑制させることで感覚異常の症状改善に有効である可能性が示唆された。

3. 皮膚の慢性炎症におけるエンドセリン-1とAHRの相互作用

紫外線照射により、皮膚ケラチノサイトからのエンドセリン-1産生は確認されたが、その産生に対するAHRリガンドの影響は見られなかった。

4. 膠原病の皮疹形成機序におけるAHRの役割に関する研究

ダイオキシン類の曝露が膠原病を発症させる可能性について検討した。免疫染色で、SLE患者群の表皮細胞でCYP1A1の低下が確認され、AHR活性化が低下していた。また、NRF2の発現も減少していた。これらのことから、AHRの機能異常は膠原病の皮疹形成に関与している可能性が考えられた。

5. PCB異性体の蓄積パターン、代謝経路について

PCB異性体の化学特性及び*in silico*解析によるヒトチトクロームP450 (CYP) 分子種とPCB異性体のドッキング様式のシミュレーションデータを用い、油症患者におけるPCB異性体の特徴的な蓄積パターンに影響を与える要因を解析した。その結果、PCB異性体のうち分子サイズ・脂溶性が大きいもの、同程度の分子サイズ・脂溶性の異性体でも*meta*-位、*para*-位の塩素原子置換数が多い異性体ほど油症患者で代謝されに

くく、かつ蓄積しやすい傾向にあることが示された。

246型PCBの代謝について比較検討し、水酸化されやすい順番は、PCB168 > PCB155 > PCB182 > PCB154であることが示された。

6.

2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析: 脳の性分化と生殖腺の発達に対する芳香族炭化水素受容体の寄与

AHRが欠損すると精巣重量が低下する傾向を示した。さらにこの機序として、AHRがエピジェネティックな機序を介して、FGFやFGFRの発現を調節していることを明らかにした。

7. ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質1 (Selenbp1)の腎臓における役割: 脂質代謝の制御とストレス応答との関連性の検討

Selenbp1欠損マウスを用いて、Selenbp1の欠損が、他のセレン結合タンパク質の発現に影響するか否かを検討した。Selenbp1欠損は、マウス腎臓のPpar経路を介して脂質代謝を変化させるだけでなく、他のシグナル伝達経路に対してもSelenbp1欠損が影響を及ぼす可能性があることを明らかにした。

8. Ahリガンドと消化管における腸内細菌の研究

ダイオキシン類の毒性に中心的役割を果たすAh受容体のリガンドであるインドール系化合物を産生に関わる腸内細菌叢の分布について検討し、十二指腸や空腸にインドール化合物の代謝に関わる細菌が豊富であることを明らかとした。

9. ヒト歯根膜細胞におけるAhRシグナルの活性化に関する研究

ヒト歯根膜細胞に対して、ベンゾピレンを投与して解析を行なった。ベンゾピレンは、歯根膜細胞のコラーゲンを分解するMMP2

/MMP13の発現を増加させる可能性が示唆された。

またマイクロアレイを用いた解析では、ベンゾピレンを投与した歯根膜細胞では、MGPやLaminin等の骨芽細胞関連細胞外基質遺伝子が減少し、骨芽細胞分化抑制に関与する可能性が示唆された。

10. 油症患者の関節症状に関する研究 — キヌレニン経路の関節炎への影響 —

油症患者の関節症状に関する研究では、キヌレニン経路で産生されるキヌレニン酸という物質が関節内の軟骨変性を防ぐ働きがある可能性が示唆された。

D. 結論

環境汚染物質であるダイオキシン類が環境、生物に与える影響は国内外で検証されている。油症は住民が高濃度のPCB/ダイオキシン類を経口摂取した世界的にも稀な事件である。生体内で代謝されにくく、生体内に長期間残存するダイオキシン類がヒトに及ぼす慢性影響を検証した疫学研究は油症研究の他にない。油症班では、血液中にごく微量に存在するダイオキシン類各異性体濃度を精確かつ再現性をもって分析している。この油症研究により、患者のみならず、人類にとって有益な知見が得られると期待される。特に、今年度からは、油症2世・3世における健康調査を開始し、ダイオキシン類の世代に渡る慢性影響についての研究に着手した。このダイオキシン類による継世代の健康状況の解析を行う研究は、人類のダイオキシン類の影響を解明するために非常に重要な研究結果となりうる可能性が高い。

基礎的研究においては、ダイオキシン類の受容体であるAHRの働きに着目し、培養細胞・動物実験を用いた実験を継続して行っている。最近では、九州大学病院油症ダイオキシンセンターの研究業績に基づき、AHRの働きを調節して疾患を治療するというコンセプトに基づいた新しい薬剤(治療用AHR調節薬: Therapeutic

AHR-Modulating Agent, TAMA) が開発された。現在、Tapinarof という化合物を含む外用薬が、炎症性皮膚疾患の治療薬として臨床試験が行われている。Tapinarof は油症の皮膚症状を改善する可能性があり、基礎研究を行なっていく方針である。

E. 健康危険情報

なし。

F. 謝辞

本研究を行うにあたり、研究分担者・協力者の先生方に厚く御礼を申し上げます。

分担研究報告書

油症検診受診者の血液中 PCDF 等（ダイオキシン類）濃度実態調査

研究分担者	香月 進	福岡県保健環境研究所	所長
研究協力者	堀 就英	福岡県保健環境研究所	生活化学課 課長
	平川 博仙	福岡県保健環境研究所	生活化学課 専門研究員
	飛石 和大	福岡県保健環境研究所	生活化学課 専門研究員
	新谷 依子	福岡県保健環境研究所	生活化学課 研究員
	佐藤 環	福岡県保健環境研究所	生活化学課 主任技師
	古谷 貴志	福岡県保健環境研究所	生活化学課 主任技師
	平川 周作	福岡県保健環境研究所	水質課 研究員
	小木曾 俊孝	福岡県保健環境研究所	計測技術課 主任技師
	戸高 尊	公益財団法人北九州生活科学センター	室長
	広瀬 勇氣	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員
	宮脇 崇	北九州市立大学エネルギー循環化学科	准教授

研究要旨

全国油症一斉検診の受診者について血液中の PCDF 等（ダイオキシン類）の濃度を継続的に測定している。2020 年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度を測定した認定患者 14 名と未認定者 66 名について結果集計を行った。認定患者の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の平均濃度は 53 pg/g-fat となり、2, 3, 7, 8-TeCDD 毒性等価係数（WHO-2006）を用いて毒性等量（TEQ）に換算した総ダイオキシン類（Total TEQ）の平均濃度は 42 pg TEQ/g-fat であった。一方、未認定者の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 平均濃度は 10 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 18 pg TEQ/g-fat であった。2020 年度に実施した血液中ダイオキシン類の分析精度管理について、データ解析を行った。その結果、当所を含む国内 6 機関の定量値は概ね一致しており、各機関で血液中ダイオキシン類の定量分析が適切に実施されていることが分かった。

PCB 異性体の化学特性及び *in silico* 解析によるヒトチトクローム P450（CYP）分子種と PCB 異性体のドッキング様式のシミュレーションデータを用い、油症患者における PCB 異性体の特徴的な蓄積パターンに影響を与える要因を解析した。その結果、PCB 異性体のうち分子サイズ・脂溶性が大きいもの、同程度の分子サイズ・脂溶性の異性体でも *meta*-位、*para*-位の塩素原子置換数が多い異性体ほど油症患者で代謝されにくく、かつ蓄積しやすい傾向にあることが示された。また、油症患者において代謝または蓄積されやすい PCB 異性体の判別に関与する因子として、CYP1A1 による *meta*-位、CYP2A6 による *meta*-位、CYP1A1 による *ortho*-位を標的とした代謝能の差が抽出された。

現在、2021 年度に行われた全国油症一斉検診の受診 93 名について血液中ダイオキシン類濃度測定を行っている。

A. 研究目的

2004年に血液中2,3,4,7,8-PeCDF値が新たな油症診断基準に加えられた。また2012年12月には油症診断基準追補(同居家族の条件追補)が加わり、2020年度現在の認定患者数は2,358名である。

全国油症治療研究班では、油症認定患者の治療と追跡、ならびに未認定者の患者診定に資することを目的として、毎年全国で油症一斉検診を行っている。本分担研究では、福岡県保健環境研究所で開発したダイオキシン類分析法を用いて、油症一斉検診受診者のうち、2001年度は福岡県の受診者中の希望者、2002～2006年度の5年間は全国の受診者における希望者、2007年度からは未認定者と油症認定患者のうち初回及び過去3年以内に測定歴の無い認定患者の血液中ダイオキシン類濃度を測定してきた。測定結果は患者認定における指標値として用いられ、患者の血液中ダイオキシン類濃度の解明、血液中濃度の経年推移や体外排泄速度の解析等に活用されている。

本年度は以下の3項目について検討した。

(1) 2020年度全国油症一斉検診の受診者のうち血液中ダイオキシン類濃度の測定を行った80名について結果集計を行った。2013年度から検診が始まった同居認定者の血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度を検診認定者及び未認定者と比較し、現状の把握を行った。

(2) 国内で血液中ダイオキシン類・PCB測定を行っている分析機関に共通の血液試料を配布し、各機関の定量結果を統計手法で比較する精度管理を行った。

(3) PCB異性体の化学特性及び*in silico*解析によるヒトチトクロームP450(CYP)分子種とPCB異性体のドッキング様式のシ

ミュレーションデータを用いて、統計学的手法により油症患者におけるPCB異性体の特徴的な蓄積パターンに影響を与える要因を解析した。

B. 研究方法

1. 血液中ダイオキシン類の測定

血液中ダイオキシン類の測定は、2001年度に開発した高感度分析法に準じて行った。油症一斉検診で要求される条件(分析期間、処理件数、分析感度)に対応するために、必要に応じて抽出法や機器分析法に改良を加えて現在に至っている。定量結果の信頼性を確保するため、血液試料22件につきブランク試験1件、内部精度管理試料としてヒト血清1件を加えた計24件を「1バッチ」として前処理を実施し、試験操作が適切に実施されているか確認した。

2020年度の油症一斉検診受診者のうち、初回及び過去3年以内に血液中ダイオキシン類測定歴が無い認定患者14名及び未認定者66名から得られた血液を対象に測定を実施した。血液はヘパリン入り真空採血管に採取され、測定まで4℃以下で冷蔵保存された。

ダイオキシン類各異性体濃度の2,3,7,8-TCDD毒性等量(TEQ)への換算には、2005年にWHOが策定した毒性等価係数(WHO-2006)を用いた。各受診者の区分(認定または未認定)は2020年の検診受診時のものを用いた。

2. 血液中ダイオキシン類濃度分析の精度管理

国内の分析機関(5か所)に2種類の血液試料を配付し、ダイオキシン類(毒性等価係数が設定されている29異性体)の測定

を依頼した。分析は各機関で通常行っている試験法に従って実施された。各機関からの報告値は全血重量及び脂肪重量あたりのダイオキシン類異性体別濃度及び毒性等量 (TEQ) とした。TEQ の算出には TEF (WHO-2006) を用いた。

各機関の報告値に福岡県保健環境研究所の測定値を加えた6機関分のデータを集計して解析した。定量下限未満の異性体濃度は定量下限の1/2値に置き換え、全血重量及び脂肪重量あたりの測定結果を集計した。各分析機関の比較にはCV値およびZスコアを用いた。

3. PCB 異性体の化学特性及び PCB-CYP ドッキング様式シミュレーションデータの統計解析

ヒトの血液中から検出される69種のPCB異性体について、オクタノール水分配係数、分子量、塩素置換数、*ortho*-、*meta*-、*para*-位の炭素原子における塩素原子未置換数、隣接する炭素原子に塩素原子が置換していない組み合わせの位置と数を各PCB異性体の化学特性として主成分分析を実施した。第1、第2主成分の主成分得点から散布図を作成し、油症患者と一般人のPCB異性体濃度から算出した Yusho/Control ratio [Log₂ Yusho patients (each congeners/CB153) / Controls (each congeners/CB153)] の値に基づいて分類した。

これまでに愛媛大学沿岸環境科学研究センター共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」との共同研究により、69種のPCB異性体と7種の薬物代謝酵素CYP分子種のドッキング様式のシミュレーションによる *in silico* 解析を実施してき

た。CYPの活性中心にあるヘム鉄と基質の代謝標的部位の距離が代謝に関わる重要な因子であることから、5Åを閾値としてPCBの骨格構造における *ortho*-位、*meta*-位、*para*-位ごとに整理し、Yusho/Control ratio で示される油症患者において代謝または蓄積されやすいPCB異性体の判別に関与する因子をロジスティック回帰分析により解析した。

(倫理面への配慮)

血液中ダイオキシン類の測定は、本人の同意が得られた者のみを対象とした。研究成果の発表に際しては統計的に処理された結果のみを使い、個人を特定できるような情報は存在しない。また、本研究は「福岡県保健環境研究所疫学研究倫理審査委員会要綱」に基づき、審査を受け承認されたものである(許可番号R第3-7及び-8号、2021年12月3日承認)。

C. 研究結果・考察

1. ダイオキシン類分析の信頼性確保

1-1. 内部精度管理

各測定バッチ(24件)のブランク試験結果の取扱いは、厚労省が策定した「血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」に準じて行った。全測定を通じて定量精度に著しい影響を与えるような操作ブランクの出現は認められなかった。

血液試料と並行分析したヒト血清試料についてダイオキシン類異性体の定量値を各バッチ間で比較したところ、CV値は約10%で再現性は良好であった。

1-2. 外部精度管理

6機関(A~F)の血液中ダイオキシン類濃度の測定結果(全血重量あたり)を表1

に示した。血液中の各同族体 PCDDs、PCDFs、non-ortho PCBs、mono-ortho PCBs 及び Total TEQ の平均値は Sample 1 がそれぞれ 0.0074、0.014、0.0076、0.0010 及び 0.030 pg-TEQ/g-wet、Sample 2 が 0.0092、0.040、0.0080、0.0013 及び 0.059 pg-TEQ/g-wet であり、Sample 1 及び 2 の Total TEQ の CV 値はそれぞれ 18% 及び 11% であった。結果として各分析機関の測定値は概ね一致しており、ダイオキシン類の抽出と測定は良好に実施されていたと考えられた。

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

2. 2020 年度油症一斉検診受診者の血液中ダイオキシン類濃度

2020 年度の血液中ダイオキシン類測定対象者は 80 名 (内訳：認定患者 14 名及び未認定者 66 名) であり、2019 年度の 228 名に比べて 148 名減少した。これは新型コロナウイルス感染症拡大の影響により、全国で健診の規模が縮小されたことが主たる原因である。また、2007 年度以降、ダイオキシン類測定対象者は初回受診者と過去 3 年以内に測定歴の無い認定患者としており、4 年周期で測定件数が多くなる傾向がある。2020 年度はそのピークの翌々年に当たっていたこと、未認定者の受診者減少には 2012 年 12 月に油症診断基準に同居家族条項が追加され、一部の未認定者が同居家族条件による認定を受けたことが要因として含ま

れる。

表 3 に 2020 年度の油症一斉検診の油症認定患者及び未認定者の血液中ダイオキシン類濃度の分析結果、ならびに 2004 年度に福岡県内で実施した一般住民の血液中ダイオキシン類濃度を示した。

認定患者全体 (14 名) の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の平均濃度は 53 pg/g-fat となり、2, 3, 7, 8-TeCDD 毒性等価係数 (WHO-2006) を用いて毒性等量 (TEQ) に換算した総ダイオキシン類 (Total TEQ) の平均濃度は 42 pg TEQ/g-fat であった。このうち検診認定者 (10 名) の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の平均濃度は 68 pg/g-fat となり、Total TEQ の平均濃度は 50 pg TEQ/g-fat であった。一方、同居認定者 (4 名) の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の平均濃度は 15 pg/g-fat であり、Total TEQ の平均濃度は 22 pg TEQ/g-fat であった。未認定者 66 名の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の平均濃度は 10 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 18 pg TEQ/g-fat であった。

2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の平均濃度を対照群の一般住民と比較すると、認定患者の平均濃度は一般住民に対してそれぞれ 3.1 倍高く、未認定者は一般住民とほぼ同等の濃度であった。

表 4 に 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度の度数分布を示した。同居認定者と未認定者は検診認定者と比べて低濃度域に分布し、油症診断基準で「高い濃度」に区分される 50 pg/g-fat を超えた受診者は認められなかった。

3. 油症患者における PCB 異性体の特徴的な蓄積パターンに影響を与える要因の解析

PCB 異性体の化学特性について実施した主成分分析の結果を図 2 に示す。第 1 主成

分及び第2主成分の主成分得点とYusho/Control ratioに基づく各PCB異性体の分類を対比した結果、分子サイズ・脂溶性が大きい異性体、また、同程度の分子サイズ・脂溶性の異性体でも*meta*-位、*para*-位の塩素原子置換数が多い異性体ほど油症患者で代謝されにくく蓄積しやすい傾向にあることが示された。

また、Yusho/Control ratioに基づいて油症患者において代謝または蓄積されやすいPCB異性体として分類し、その判別に関与する因子を解析した結果、CYP1A1による*meta*-位（オッズ比4.1、 $p < 0.05$ ）、CYP2A6による*meta*-位（オッズ比3.9、 $p < 0.05$ ）、CYP1A1による*ortho*-位（オッズ比0.12、 $p < 0.05$ ）を標的とした代謝能の差が抽出された。

D. 結論

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

2020年度の血液中ダイオキシン類濃度測定対象は、油症認定患者14名と未認定者66名であった。検診認定者における2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は68 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は50 pg TEQ/g-fatであった。同居認定者における2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は15 pg/g-fatであり、Total TEQの平均濃度は22 pg TEQ/g-fatであった。未認定者の2,3,4,7,8-PeCDF平均濃度は10 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は18 pg TEQ/g-fat

であった。同居認定者及び未認定者の血液中ダイオキシン類濃度は一般人と同等のレベルであり、油症診断基準で「高い濃度」に該当する受診者は認められなかった。2001年度から19年間継続している血液中ダイオキシン類濃度測定の実績数は5937件となった。2020年度の測定結果はすでに油症診断データベースへ追加登録されており、臨床症状との関連性解析などに今後活用される。

油症患者におけるPCB異性体の特徴的な蓄積パターンに影響を与える要因を解析した結果、PCB異性体の分子サイズ・脂溶性や*meta*-位、*para*-位の塩素原子置換数が影響していることが示唆された。また、PCB-CYPドッキング様式のシミュレーションデータを用いた判別分析により、油症患者におけるPCB蓄積パターンにはCYP1A1・CYP2A6が関与し、特に*meta*-位を標的とした代謝能が影響していると推測された。

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato T, Kogiso T, Kamiharaguchi N, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Kajiwara J, Katsuki S, Furue M, Tsuji G. Polychlorinated Quaterphenyl Concentrations in the Blood and Their Patterns in Subjects Examined for a Possible Diagnosis of Yusho from FY 2009 to 2019. *Fukuoka Acta Medica*, 2021. 112(2). 90-98.
- 2) 新谷依子、堀就英、飛石和大、平川博仙、佐藤環、安武大輔、戸高尊、梶原淳睦、香

月進、辻 学、古江増隆. 血液中ダイオキシン類および PCB 濃度測定のカロスチェック (2016~2019 年度). 福岡医学雑誌、2021. 112(2). 99-109.

2. 学会発表

- 1) Hori T, Hirakawa H, Tobiishi T, Shintani Y, Sato T, Todaka T, Hirose Y, Hirose Y, Kajiwara J, Katsuki S, Tsuji G. Concentrations of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran in the Blood of Yusho Patients Half a Century After the Incident. 41st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Tianjin, China, 2021 November.
- 2) 新谷依子、堀就英、平川博仙、飛石和大、古谷貴志、香月進、辻学. 血液中ダイオキ

シン類分析のカロスチェック (2020 年度). 第 29 回環境化学討論会 (豊中市・Web ハイブリッド)、2021 年 6 月 1-3 日.

- 3) 平川周作、宮脇崇、堀就英、香月進、平野将司、岩田久人、辻学. 油症患者における PCB 異性体の特徴的蓄積パターンに影響を与える要因の解析. 第 29 回環境化学討論会 (豊中市・Web ハイブリッド)、2021 年 6 月 1-3 日.

H. 知的所有権取得

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1 共通血液試料中のダイオキシン類測定結果（全血重量あたり、pg/g-wet）

		分析機関						平均値	CV%
		A	B	C	D	E	F		
Sample 1	PCDDs TEQ	0.0052	0.0087	0.012	0.0049	0.0090	0.0044	0.0074	43
	PCDFs TEQ	0.011	0.015	0.016	0.014	0.014	0.014	0.014	11
	non-ortho PCBs TEQ	0.0057	0.0089	0.0093	0.0070	0.0074	0.0073	0.0076	17
	mono-ortho PCBs TEQ	0.0011	0.00091	0.00093	0.0010	0.0011	0.0013	0.0010	14
	Total dioxins TEQ	0.023	0.034	0.038	0.027	0.031	0.027	0.030	18
Sample 2	PCDDs TEQ	0.0056	0.010	0.015	0.0086	0.0078	0.0074	0.0092	37
	PCDFs TEQ	0.041	0.046	0.043	0.037	0.037	0.037	0.040	9.0
	non-ortho PCBs TEQ	0.0087	0.0078	0.0091	0.0069	0.0079	0.0075	0.0080	10
	mono-ortho PCBs TEQ	0.0015	0.0012	0.0012	0.0013	0.0014	0.0013	0.0013	8.6
	Total dioxins TEQ	0.057	0.065	0.069	0.054	0.055	0.054	0.059	11

表2 共通血液試料中のダイオキシン類測定結果（脂肪重量あたり、pg/g-fat）

		分析機関						平均値	CV%
		A	B	C	D	E	F		
Sample 1	脂肪濃度 (%)	0.43	0.35	0.31	0.31	0.41	0.32	0.35	15
	PCDDs TEQ	1.2	2.5	4.1	1.6	2.2	1.5	2.2	48
	PCDFs TEQ	2.6	4.4	5.1	4.5	3.4	4.4	4.1	22
	non-ortho PCBs TEQ	1.3	2.6	3.0	2.3	1.8	2.3	2.2	27
	mono-ortho PCBs TEQ	0.27	0.26	0.30	0.31	0.26	0.40	0.30	18
	Total dioxins TEQ	5.4	9.7	13	8.7	7.5	8.5	8.7	27
Sample 2	脂肪濃度 (%)	0.50	0.41	0.33	0.34	0.49	0.27	0.39	22
	PCDDs TEQ	1.1	2.4	4.6	2.6	1.6	2.6	2.5	48
	PCDFs TEQ	8.5	11	13	11	7.8	14	11	22
	non-ortho PCBs TEQ	1.7	1.9	2.7	2.1	1.6	2.8	2.1	23
	mono-ortho PCBs TEQ	0.31	0.30	0.37	0.38	0.28	0.49	0.35	21
	Total dioxins TEQ	12	16	21	16	11	20	16	24

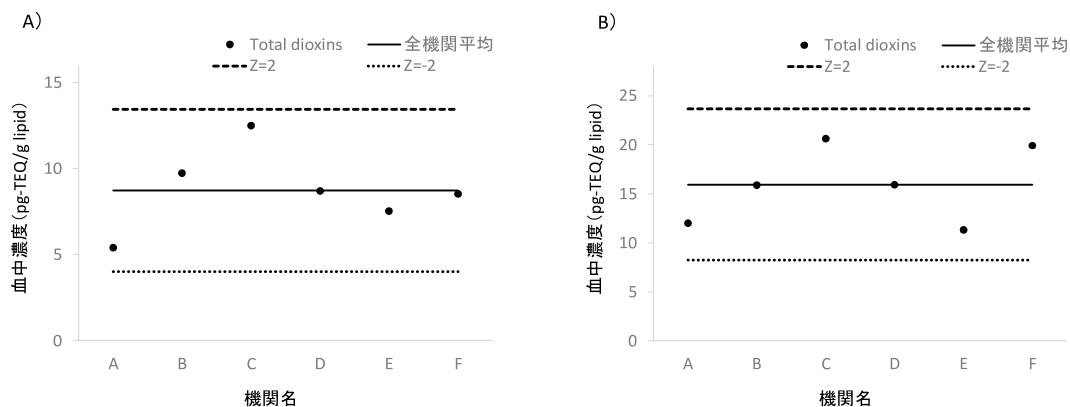


図1 機関別血液中ダイオキシン類濃度の \bar{X} 管理図 (A: Sample 1、B: Sample 2)

表3 2020年度血液中ダイオキシン類濃度調査結果(単位: pg/g-fat)

Congeners	2020年度検診結果								一般住民 (2004年, N=127)			
	認定患者(N=14)				未認定者(N=66)				Mean	SD	Min	Max
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
2,3,7,8-TCDD	1.5	0.91	ND	3.3	1.1	0.82	ND	4.4	1.9	0.84	ND	4.3
1,2,3,7,8-PeCDD	7.1	3.8	3.0	14	3.9	3.0	ND	16	9.0	3.4	3.2	20
1,2,3,4,7,8-HxCDD	3.6	2.9	ND	10	2.2	1.6	ND	8.3	3.6	1.9	ND	13
1,2,3,6,7,8-HxCDD	37	28	12	97	12	7.6	2.7	51	28	11	7.3	70
1,2,3,7,8,9-HxCDD	5.3	4.3	ND	19	3.8	3.2	ND	18	4.5	2.8	ND	16
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	47	34	14	150	40	27	11	180	78	55	18	470
OCDD	620	520	150	2200	410	310	100	2200	1200	640	180	7600
Total PCDDs	720	580	180	2500	480	350	120	2500	1300	1000	210	8200
2,3,7,8-TCDF	1.9	1.5	ND	5.0	1.0	0.93	ND	4.8	1.0	0.72	ND	4.5
1,2,3,7,8-PeCDF	0.74	0.52	ND	2.3	0.7	0.58	ND	3.3	0.67	0.55	ND	4.6
2,3,4,7,8-PeCDF	53	62	5.2	190	10	8.6	1.2	39	17	7.7	6.0	63
1,2,3,4,7,8-HxCDF	8.9	13	ND	47	2.6	3.5	ND	28	5.0	2.7	ND	20
1,2,3,6,7,8-HxCDF	5.9	5.5	ND	22	2.7	3.6	ND	28	5.7	2.6	ND	16
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.3	0.71	ND	3.2	1.0	0.33	ND	3.7	1.2	0.8	ND	5.2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND				ND				ND			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.4	0.7	ND	2.8	2.2	6.4	ND	53.3	2.2	2.1	ND	14
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND				ND				ND			
OCDF	ND				ND				2.1	1.4	ND	18
Total PCDFs	77	81	14	270	25	20	10	159	37	14	15	86
3,4,4',5'-TCB(81)	ND				5.3	2.0	ND	20	5.6	2.3	ND	24
3,3',4,4'-TCB(77)	5.4	1.5	ND	11	5.6	2.6	ND	21	8.4	4.8	ND	31
3,3',4,4',5'-PenCB(126)	65	38	14	160	52	67	ND	460	110	80	17	520
3,3',4,4',5,5'-HxCB(169)	130	100	41	390	56	56	ND	290	64	27	16	190
Total Non-ortho PCBs	210	110	70	460	120	120	20	790	190	110	59	740
Total	1000	620	310	2700	619	454	150	3000	1600	1000	290	8500
PCDDs-TEQ	14	8.0	5.2	30	7.4	5.2	1.6	31	16	5.9	5.1	35
PCDFs-TEQ	18	20	2.1	64	4.0	3.2	0.84	18	6.6	2.5	2.3	14
Non-ortho PCBs-TEQ	11	5.2	2.8	19	6.9	8.1	0.65	54	13	8.6	2.6	58
Total TEQ	42	30	12	100	18	15	3.2	91	37	16	12	100

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

濃度範囲		検診認定者	同居認定者	未認定者
以上	未満			
150 ~	200	2	-	-
100 ~	150	1	-	-
90 ~	100	-	-	-
80 ~	90	-	-	-
70 ~	80	-	-	-
60 ~	70	1	-	-
50 ~	60	-	-	-
40 ~	50	1	-	-
30 ~	40	-	1	3
20 ~	30	-	-	4
10 ~	20	4	2	19
0 ~	10	1	1	40
人数計		10	4	66

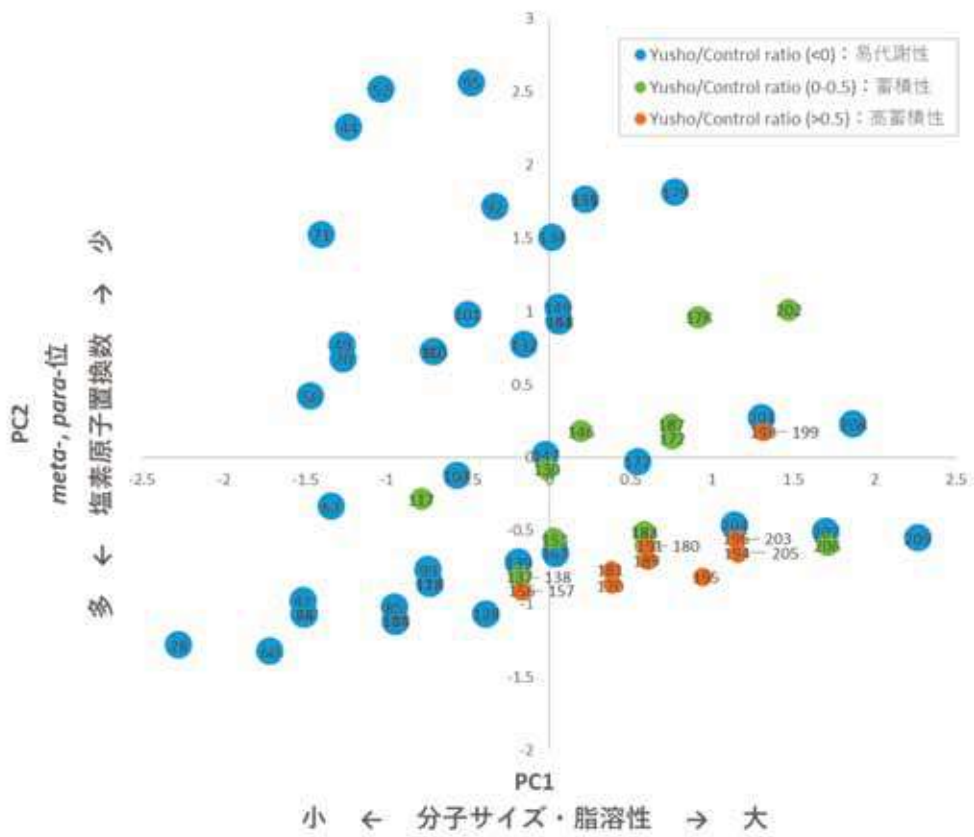


図2 PCB異性体の化学特性を用いた主成分分析とYusho/Control ratioに基づく分類

分担研究報告書

Thermo Scientific DFS Dual Data XL システムによる油症患者血液中ダイオキシン類
分析法の検討 (2)

研究分担者	戸高 尊	公益財団法人北九州生活科学センター	室長
研究協力者	広瀬勇氣	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員
	上原口奈美	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員
	梶原淳睦	公益財団法人北九州生活科学センター	参事
	千々和勝己	公益財団法人北九州生活科学センター	常務理事
	池田光政	公益財団法人北九州生活科学センター	理事長

研究要旨 Thermo Fisher Scientific DFS Dual Data XL システムに Programmed Temperature Vaporization-Large Volume Injection (PTV-LVI) システムを装備したガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置を用いて、油症患者血液中ダイオキシン類の高感度分析法を再検討した。今回、従来法の原理を踏襲した大量注入法の開発を試みたが、ダイオキシン類各異性体の S/N 比が、従来法と比較して相対的に低下していた。今後、PTV-LVI システムの設定条件の最適化を行い、新しい分析法を確立した上で、従来法との妥当性評価を行う。

A. 研究目的

油症患者の血液中ダイオキシン類濃度の分析は、胃袋型インサートを備えた LVI-S200 (AiSTI Science 社) と Solvent Cut Large Volume Injection システム (Trajan 社) を連結した大量注入装置を装備したガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置 (AutoSpec Premier, Waters 社) を用いて行ってきた¹⁾²⁾。昨年度、Thermo Fisher Scientific DFS Dual Data XL システムに Programmed Temperature Vaporization Large Volume Injection (PTV-LVI) システムを装備したガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置を用いて、血液中ダイオキシン類の高感度分析法を検討した。PTV-LVI 方式による大量注入法は、注入口初期温度を試料溶媒の沸点より低く設定し、液体状態で、インサート内で濃縮を行う。さらに、注入口温度の上昇に伴い、分析目的物質をカ

ラムに導入し、測定する方法である(図 1)。この注入法を用いると、試料を 200 μ l 注入することが可能ですが、インサート内での試料濃縮が不十分の場合、残った試料溶媒がカラムに導入され、測定に支障を及ぼす。また、濃縮し過ぎると分析目的物質に悪影響を及ぼし、測定感度が低下するので、測定条件の設定が非常に困難でした。従来法のように、インサート内での濃縮が不十分でも、注入した試料中の溶媒がほとんどプレカラムにより系外に排出され、分析目的成分のみが分析カラムにより分離・分析される方法が効果的であると考えられる。

今回、Dual Data XL モジュール装置に Micro Chanel Device Wafer (MCDW) を組み合わせ、ソルベントカットバルブとして代用することで、装置を簡素化した。さらに、従来法のように、細かい圧力設定を廃止し、高精度・高感度な分析を行える新しい大量注入法について検討を行った。

B. 研究方法

PTV-LVI 装置 (PTV-BKF、Thermo Fisher Scientific) を装備した高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置 (DFS、Thermo Fisher Scientific) を使用した。DFS 装置に付属してある Dual Data XL モジュール装置に、Micro Chanel Device Wafer (MCDW、Thermo Fisher Scientific) を組み合わせて、ソルベントカットバルブとして代用した。カラムは Agilent Technologies 社製で、プレカラムはフューズドシリカチューブ (0.15mm × 10m) および分析カラムは VF-5ms (5% フェニルメチルカラム, 0.15mm × 30m, 膜厚 0.15 μm) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究の結果においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C. 研究結果・考察

油症患者の血液中ダイオキシン類濃度の分析は、胃袋型インサートを備えた LVI-S200 (AiSTI Science 社) と Solvent Cut Large Volume Injection システム (Trajan 社) を連結した大量注入装置を装備したガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置 (AutoSpec Premier, Waters 社) を用いて行ってきた。本法は、注入口初期温度を試料溶媒の沸点より低く設定し、100 μl の試料注入後、液体状態でインサートの胃袋形状部分に保持させた後、インサート内で 20 μl まで濃縮を行う (図 2)。さらに、注入口温度の上昇に伴い、分析目的物質をプレカラムに導入し、カラム恒温槽の昇温が開始される。試料はプレカラムで分析目的物質と溶媒に分離され、溶媒のみをパージラインから排出させた後、分析目的物質は液化炭酸ガスが噴霧されたコールドトラップ部にトラップされる。その後、カラム恒温槽を設定の温度まで下温させ、コールドトラ

ップを解除する。直ちに、恒温槽の昇温を開始し、分析目的物質を分析カラムへ導入し、ダイオキシン類異性体の分離・分析が行われる (図 3)。このシステムは、試料注入後、分析目的物質のみ分析カラムに導入されるので、通常よりも内径の細かい分析用キャピラリーカラムを用いることで可能です。その結果、各異性体の良好な分離が得られるばかりでなく、ピークの半値幅が狭くなり、ピーク強度が相対的に向上する。さらに、試料中に含まれる不揮発性化合物や高沸点化合物類等のマトリックスもプレカラムにより系外に排出させ、分析カラムに導入しないので、クロマトグラムのベースラインを昨年検討した方法と比較した場合、ノイズレベルの差が顕著であった。ダイオキシン類標準液 (0.25pg) を注入後に得られた各クロマトグラムから算出したダイオキシン類各異性体の S/N 比を比較した結果、昨年検討した方法の値は、従来法の約 1/5 であった。

今回、従来法の原理を踏まえた上で高感度分析法の検討を行った。その方法に関して、注入された試料 (100 μl) はインサート内で 20 μl 以下まで濃縮され、注入後 3.0 分以内に溶媒はプレカラムにより分離され、系外に排出される。分析目的成分のプレカラムからの溶出が終了した時点でソルベントカットバルブを開くと同時に、恒温槽の昇温を開始し、分析目的成分を分析カラムへ導入する方法です (図 4)。ダイオキシン類標準液を用いて算出した S/N 比を従来法の値と比較した。その結果、今回検討した方法は、従来法より相対的にピーク強度が 1/2 程度低く、S/N 比に関しても約 1/2 であった。しかしながら、従来法よりも操作を簡略化したことで、分析時間も 40 分程度となり、測定時間が 20 分短縮可能となった。

D. 結論

今回、従来法の原理を踏襲した新しい大量注入法の検討を行った。検討した方法

は従来使用していた方法と比較して、コールドトラップ部を省いたことにより液化炭酸ガスを使用しないこと;装置が簡素化され再現性が高いこと;測定時間が短縮されたことが優れていたが、ダイオキシン類各異性体の S/N 比が相対的に低下していた。今後、この問題を解決するために、PTV-LVI システムの設定条件、試料の濃縮条件、溶媒カットの時間および分析目的成分の追いつき時間に関して最適化を行い、従来法よりも高感度・高精度な分析法の開発を目指す。

一昨年度、油症患者血液中ダイオキシン類濃度の測定に用いるガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置を更新した。今年度も新型コロナウイルス感染症の影響により、海外から検討に必要なパーツ類が十分に供給されないため、新しい装置の調整が遅れ、血液中ダイオキシン類濃度を高感度および高精度に分析できる方法を検討する時間が十分得られなかった。来年度も今年度のテーマを継続し、新しい分析法を完全に確立した上で、従来法との妥当性評価を行う。

Newly Large-Volume Injection System for Dioxin Determinations in Blood of Yusho Patients. Fukuoka Acta Medica 2013; 104(4): 110-116.

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

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

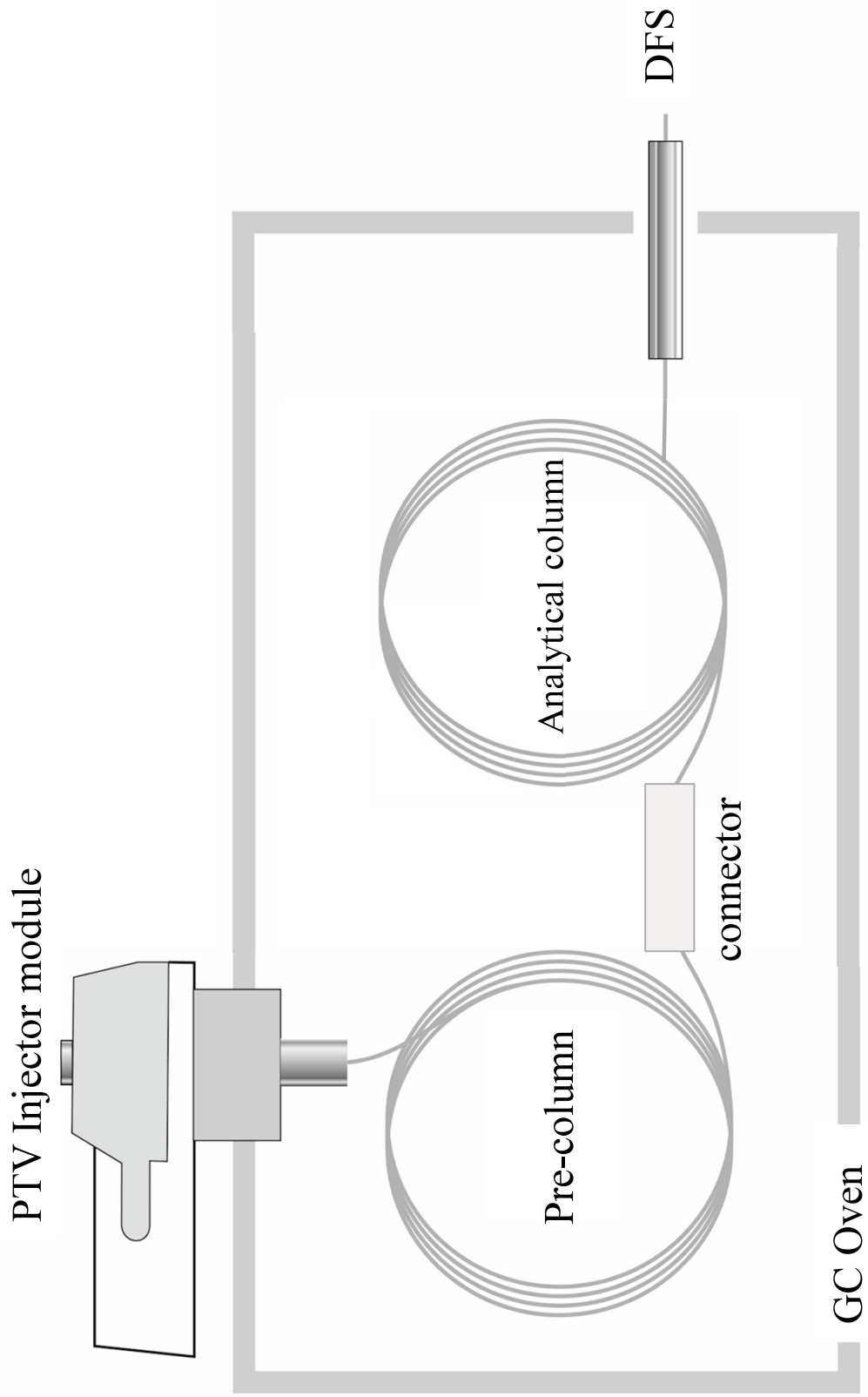


図 1 昨年検討した大量注入法の概要

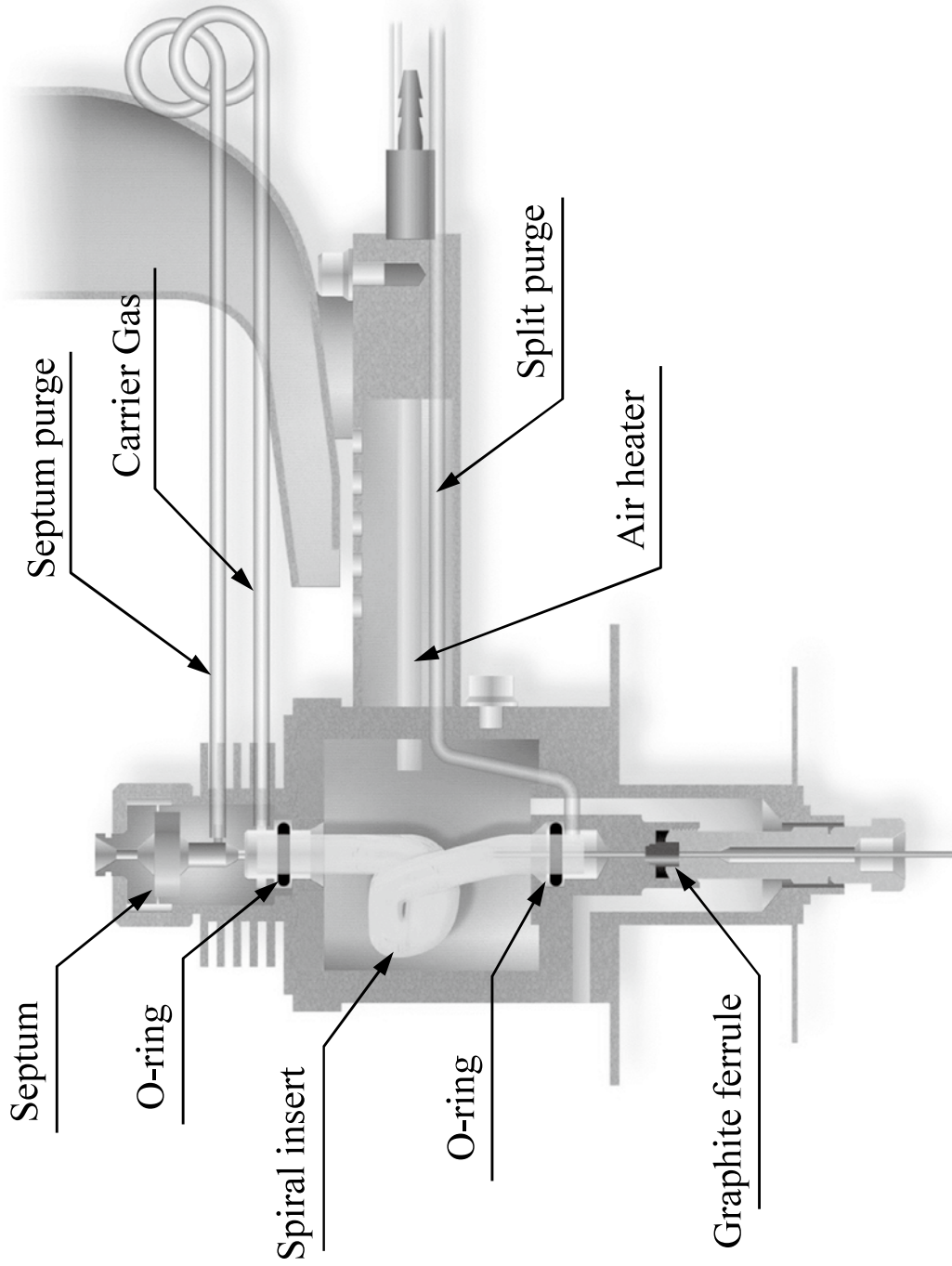


図2 LaviStoma システムの概要

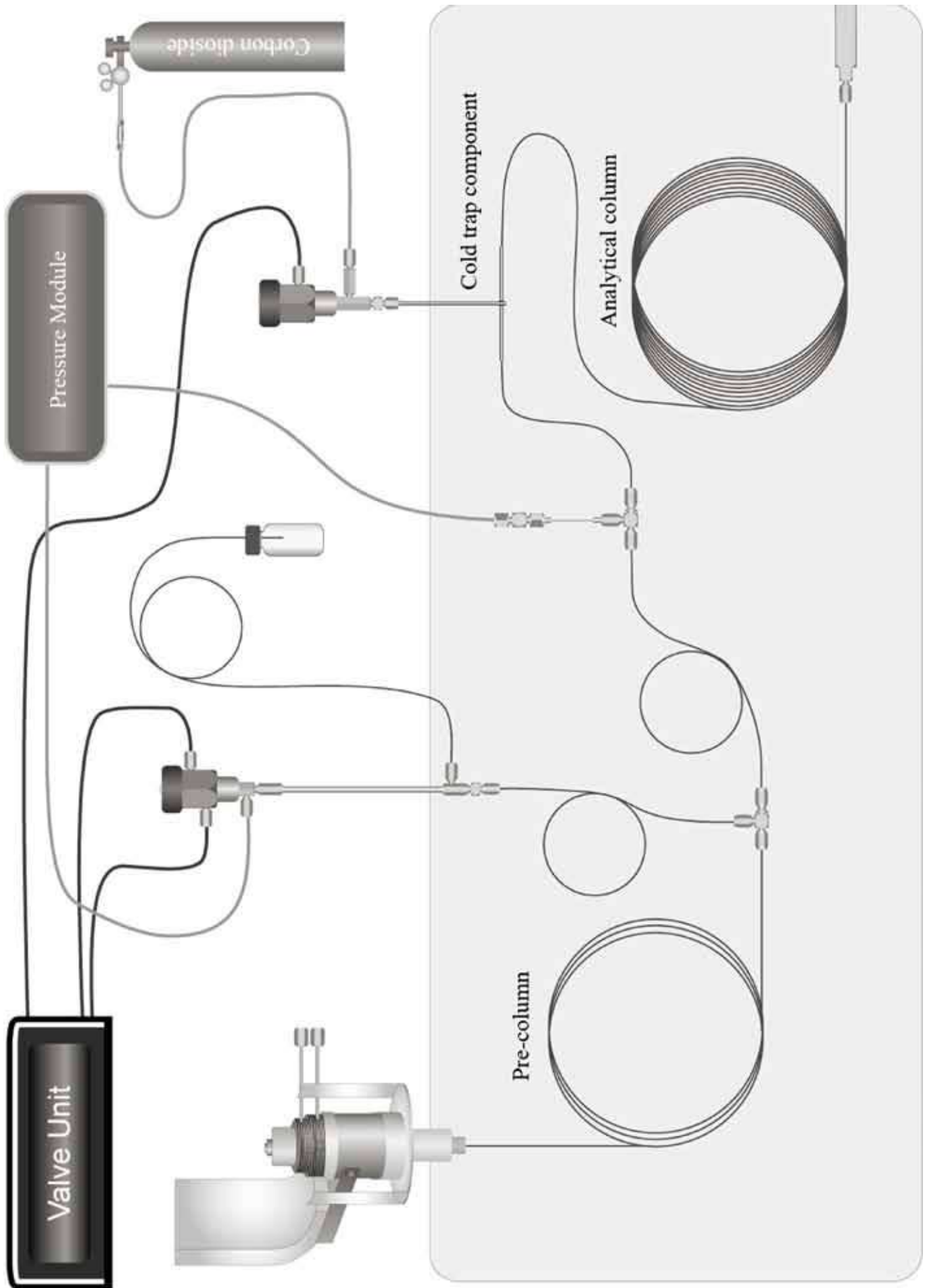


図3 大量注入法（従来法）の概要

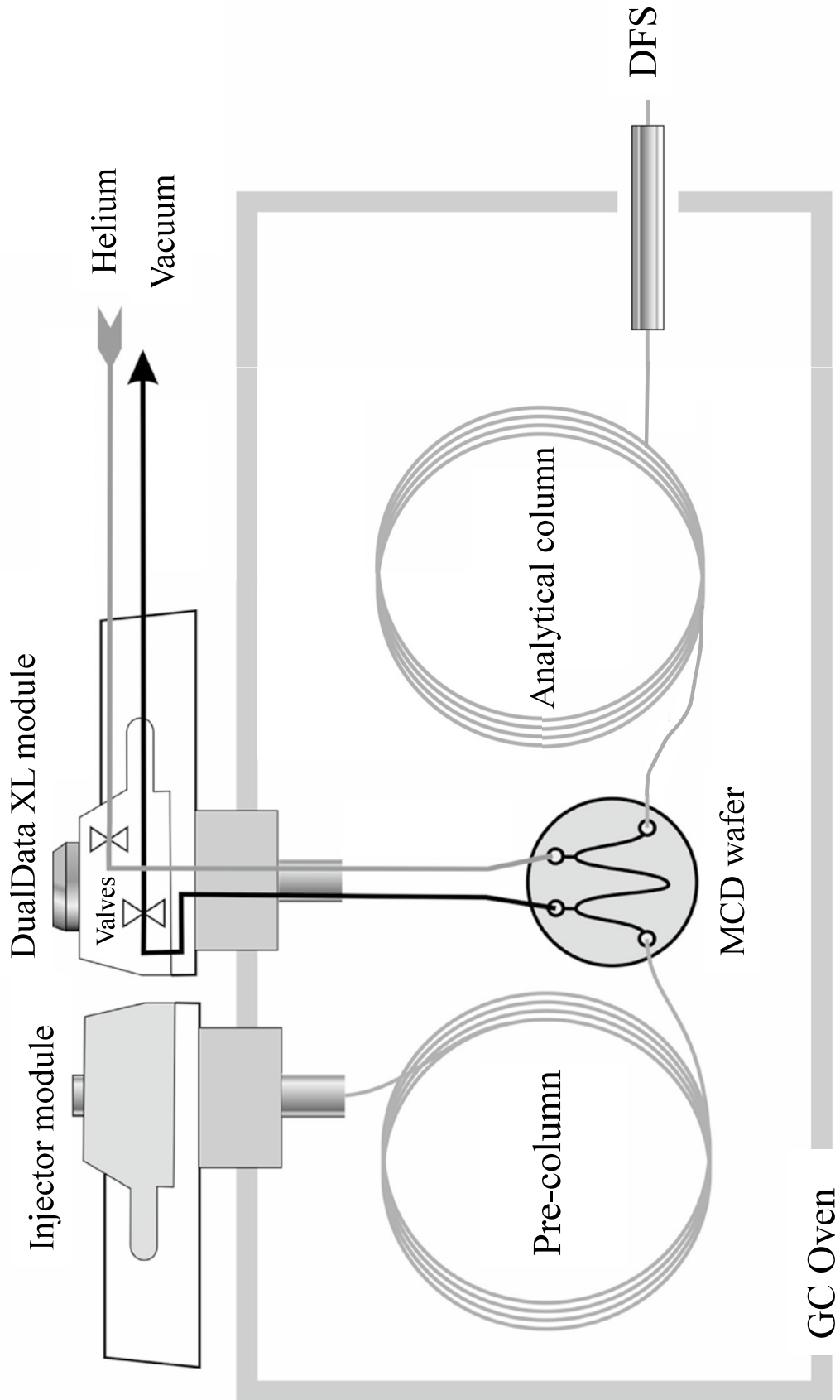


図4 検討中の大量注入法の概要

分担研究報告書

油症検診データを用いた基礎的解析

研究分担者 香月 進 福岡県保健環境研究所 所長
研究協力者 高尾 佳子 福岡県保健環境研究所 企画情報管理課 研究員
高橋 浩司 福岡県保健環境研究所 企画情報管理課 課長

研究要旨 2020年度及び2021年度の全国油症一斉検診は、新型コロナウイルス感染拡大防止のため、対象者や検診項目を減らし規模や時間を縮小して実施された。2020年度の受診者数は102人で、例年の2割弱だった。

A. 研究目的

カネミ油症事件発生から50年以上が経過した現在も全国油症一斉検診が行われている。患者の健康管理のため、また、健康への影響を明らかにするため、検診情報の収集及び管理を行う。

B. 研究方法

1. 検診情報の収集及び管理

1986年以降の検診情報を収集・整理し、一元管理している。全国11追跡調査班(関東以北班、千葉県班、愛知県班、大阪府班、島根県班、広島県班、山口県班、高知県班、福岡県班、長崎県班、鹿児島県班)において、例年7月から11月にかけて検診(内科検診、小児科検診、皮膚科検診、眼科検診、歯科検診、血液特殊検査、尿検査、血液学的検査、生化学的検査、免疫学的検査、内分泌学的検査、骨密度測定)が実施される。この検診票の写しを、追跡調査班の協力を得て収集し、電子化する。その後、記入内容を点検し、疑義照会により修正を行い、データを確定する。確定したデータは検診情報を一元的に管理しているシステムへ追加登録する。

検診受診者の情報は、受診者区分(認定、同居家族認定、未認定)や氏名、住所等、検診を受診した後に変更になるものがある。これら変更情報は、油症事務局、油症

ダイオキシン研究診療センター及び追跡調査班から提供があるため、適宜更新を行う。

2. 検診情報の提供

検診に携わる関係者が受診者の過去の検診情報を参照できるように、検診情報を収録し情報参照画面や検索機能を加えた油症検診データベースを追跡調査班へ送付する。また、研究班長の指示のもと研究者へデータ提供を行う。

3. 検診票変更に伴う対応

検診票の見直しが行われ、項目の追加や削除、項目中の選択肢の変更等、多くの変更が加えられた。この変更に伴うデータの管理や提供への影響と対応策について検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は「福岡県保健環境研究所疫学研究倫理審査委員会要綱」に基づき、審査を受け承認されたものである(受付番号第30-7平成30年9月21日承認)。

C. 研究結果

1. 検診情報の収集・整理

2020年度及び2021年度の検診は、新型コロナウイルス感染拡大防止を念頭に、対

象者及び検診項目を減らし、規模を縮小し時間を短縮して行われた。

2020年度検診の集計結果を表に示す。集計の所見区分は表1、受診者の内訳は表2、各検診の有所見率は表3～6に示す。2020年度の検診受診者は102人だった。

2021年度検診は7月から10月に行われ、検診票の写しの集約は2月、電子化は3月に実施する。その後、記入内容の点検を行い、疑義照会后、次年度5月にデータ確定の予定である。

2. 検診情報の提供

2020年度検診までの情報を収録した油症検診データベースを、各追跡調査班に希望を確認し送付した。また、研究班長の指示のもと、研究者が指定する条件に従いデータを抽出し匿名化を行い提供した。

3. 検診票変更に伴う対応

検診票の項目の追加、削除及び項目中の選択肢の変更に伴い記入方法に変更が生じたため、検診票記入要領を改訂し各追跡調査班へ送付した。

今回の変更に伴い、データを一元的に管理する際、追加登録や時系列での解析時に問題が生じることが確認された。このため、過去から蓄積しているデータと齟齬なく管理できるよう、検診情報を一元的に管理するシステムの改修を行った。

追跡調査班へ提供する油症検診データベースについても改修が必要となったが、利用状況と改修費用を勘案し、改修は行わないこととした。このため、代替案として一部情報に絞ってデータを抽出し表形式での提供を提案した。対応の可否を検討してもらうため、今年度の検診時に新様式データの提供を行った。

D. 考察

例年600人ほどが検診を受診するが、2020年度及び2021年度は対象者を絞って

行われたため、受診者は例年より大幅に減少した。また、検診内容は、血液中のダイオキシン類やPCB、PCQの濃度の測定を優先して行われた。追跡調査班によって実施状況は異なり、採血のみ行った班や検診自体行わなかった班等様々だった。

検診票の変更については、これまで生化学検査や免疫学的検査等の検査項目について追加や削除など軽微な変更があり、その都度対応してきた。今回は、歯科検診票が大幅に変更され、また、いくつかの検診票で項目中の選択肢の変更が行われたため、データの管理方法を全体的に見直した。変更後の検診票を用いた2021年度の検診データは、次年度5月に追加登録を行うため、その際に十分に点検を行う予定である。

油症検診データベースの送付廃止と代替案の提案については、複数の追跡調査班から油症検診データベースでの提供を希望するとの意見を受けた。検診現場での利用について詳細に状況を聞き取り、今後対応策を検討していきたい。

E. 結論

2020年度及び2021年度の検診は、新型コロナウイルス感染拡大防止のため、対象者等を限定して実施された。このため、2020年度の受診者数は102人と例年に比べ大幅に少なく、例年の2割弱だった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 所見区分

検診票	項目	所見有
内科検診	自覚症状	＋、＃
	他覚所見	正常、純、－以外
皮膚科	問診	有
	他覚所見 ^{*1}	＋、＃、卄
眼科	主訴	＋、＃、卄
	他覚所見	＋、＃、卄
歯科	主訴	有
	口腔所見	有
	色素沈着所見 ^{*2}	＋、＃、卄

*1 いずれかの部位に所見が認められれば、所見有とした。

*2 上歯肉、下歯肉を歯肉、右頬粘膜と左頬粘膜を頬粘膜、
上嘴唇粘膜と下嘴唇粘膜を口唇粘膜とした。

表2 2020年度検診受診者内訳

受診者区分及 び年齢階級	総数		男性		女性	
	n	%	n	%	n	%
総数	102	100.0	47	100.0	55	100.0
0 - 29 歳	6	5.9	3	6.4	3	5.5
30 - 39 歳	8	7.8	3	6.4	5	9.1
40 - 49 歳	10	9.8	6	12.8	4	7.3
50 - 59 歳	15	14.7	8	17.0	7	12.7
60 - 69 歳	33	32.4	15	31.9	18	32.7
70 - 79 歳	18	17.6	8	17.0	10	18.2
80 歳以上	12	11.8	4	8.5	8	14.5
認定	36	100.0	15	100.0	21	100.0
0 - 29 歳	0	0.0	0	0.0	0	0.0
30 - 39 歳	0	0.0	0	0.0	0	0.0
40 - 49 歳	0	0.0	0	0.0	0	0.0
50 - 59 歳	4	11.1	2	13.3	2	9.5
60 - 69 歳	20	55.6	10	66.7	10	47.6
70 - 79 歳	8	22.2	2	13.3	6	28.6
80 歳以上	4	11.1	1	6.7	3	14.3
未認定	66	100.0	32	100.0	34	100.0
0 - 29 歳	6	9.1	3	9.4	3	8.8
30 - 39 歳	8	12.1	3	9.4	5	14.7
40 - 49 歳	10	15.2	6	18.8	4	11.8
50 - 59 歳	11	16.7	6	18.8	5	14.7
60 - 69 歳	13	19.7	5	15.6	8	23.5
70 - 79 歳	10	15.2	6	18.8	4	11.8
80 歳以上	8	12.1	3	9.4	5	14.7

表3 2020年度内科検診の有所見率

	全体		男性		女性	
認定						
自覚症状						
全身倦怠感	55.6%	(20/36)	46.7%	(7/15)	61.9%	(13/21)
頭重・頭痛	38.9%	(14/36)	33.3%	(5/15)	42.9%	(9/21)
咳嗽	38.9%	(14/36)	33.3%	(5/15)	42.9%	(9/21)
喀痰	38.9%	(14/36)	33.3%	(5/15)	42.9%	(9/21)
腹痛	33.3%	(12/36)	20.0%	(3/15)	42.9%	(9/21)
下痢	33.3%	(12/36)	33.3%	(5/15)	33.3%	(7/21)
便秘	41.7%	(15/36)	13.3%	(2/15)	61.9%	(13/21)
しびれ感	44.4%	(16/36)	33.3%	(5/15)	52.4%	(11/21)
関節痛	62.9%	(22/35)	46.7%	(7/15)	75.0%	(15/20)
月経異常	0.0%	(0/13)	.	.	0.0%	(0/13)
他覚所見						
栄養	2.8%	(1/36)	0.0%	(0/15)	4.8%	(1/21)
心音	0.0%	(0/36)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/21)
呼吸音	2.8%	(1/36)	0.0%	(0/15)	4.8%	(1/21)
肝腫	0.0%	(0/36)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/21)
脾腫	0.0%	(0/36)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/21)
浮腫	5.6%	(2/36)	6.7%	(1/15)	4.8%	(1/21)
リンパ節腫大	0.0%	(0/36)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/21)
四肢けん反射	5.6%	(2/36)	0.0%	(0/15)	9.5%	(2/21)
感覚障害	5.6%	(2/36)	0.0%	(0/15)	9.5%	(2/21)
胸部レ線	8.3%	(3/36)	6.7%	(1/15)	9.5%	(2/21)
心電図	16.7%	(6/36)	20.0%	(3/15)	14.3%	(3/21)
肝・胆・脾エコー	-	-	-	-	-	-
未認定						
自覚症状						
全身倦怠感	71.4%	(40/56)	66.7%	(18/27)	75.9%	(22/29)
頭重・頭痛	58.9%	(33/56)	55.6%	(15/27)	62.1%	(18/29)
咳嗽	37.5%	(21/56)	44.4%	(12/27)	31.0%	(9/29)
喀痰	39.3%	(22/56)	44.4%	(12/27)	34.5%	(10/29)
腹痛	32.1%	(18/56)	29.6%	(8/27)	34.5%	(10/29)
下痢	37.5%	(21/56)	40.7%	(11/27)	34.5%	(10/29)
便秘	33.9%	(19/56)	22.2%	(6/27)	44.8%	(13/29)
しびれ感	56.4%	(31/55)	59.3%	(16/27)	53.6%	(15/28)
関節痛	66.1%	(37/56)	63.0%	(17/27)	69.0%	(20/29)
月経異常	20.8%	(5/24)	.	.	20.8%	(5/24)
他覚所見						
栄養	7.1%	(1/14)	0.0%	(0/7)	14.3%	(1/7)
心音	7.1%	(1/14)	0.0%	(0/7)	14.3%	(1/7)
呼吸音	0.0%	(0/14)	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)
肝腫	0.0%	(0/14)	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)
脾腫	0.0%	(0/14)	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)
浮腫	14.3%	(2/14)	0.0%	(0/7)	28.6%	(2/7)
リンパ節腫大	0.0%	(0/14)	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)
四肢けん反射	0.0%	(0/14)	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)
感覚障害	0.0%	(0/14)	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)
胸部レ線	22.2%	(2/9)	20.0%	(1/5)	25.0%	(1/4)
心電図	11.1%	(1/9)	0.0%	(0/5)	25.0%	(1/4)
肝・胆・脾エコー	-	-	-	-	-	-

表4 2020年度皮膚科検診の有所見率

	全体		男性		女性	
認定						
問診						
最近の 化膿傾向	13.9%	(5/36)	13.3%	(2/15)	14.3%	(3/21)
最近の粉りゆう 再発傾向	11.1%	(4/36)	13.3%	(2/15)	9.5%	(2/21)
かつての ざ瘡様皮疹	38.9%	(14/36)	40.0%	(6/15)	38.1%	(8/21)
かつての 色素沈着	36.1%	(13/36)	46.7%	(7/15)	28.6%	(6/21)
他覚所見						
黒色面皰	13.9%	(5/36)	6.7%	(1/15)	19.0%	(4/21)
ざ瘡様皮疹	13.9%	(5/36)	6.7%	(1/15)	19.0%	(4/21)
瘢痕化	25.0%	(9/36)	40.0%	(6/15)	14.3%	(3/21)
色素沈着	30.6%	(11/36)	40.0%	(6/15)	23.8%	(5/21)
爪変形	0.0%	(0/36)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/21)
未認定						
問診						
最近の 化膿傾向	10.0%	(1/10)	0.0%	(0/5)	20.0%	(1/5)
最近の粉りゆう 再発傾向	0.0%	(0/10)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/5)
かつての ざ瘡様皮疹	20.0%	(2/10)	0.0%	(0/5)	40.0%	(2/5)
かつての 色素沈着	0.0%	(0/10)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/5)
他覚所見						
黒色面皰	10.0%	(1/10)	0.0%	(0/5)	20.0%	(1/5)
ざ瘡様皮疹	0.0%	(0/10)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/5)
瘢痕化	0.0%	(0/10)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/5)
色素沈着	0.0%	(0/10)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/5)
爪変形	0.0%	(0/10)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/5)

表5 2020年度眼科検診の有所見率

	全体		男性		女性	
認定						
主訴						
眼脂過多	0.0%	(0/35)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/20)
他覚所見						
眼瞼浮腫	0.0%	(0/35)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/20)
眼瞼結膜色素沈着	0.0%	(0/35)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/20)
瞼板腺嚢胞形成	0.0%	(0/35)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/20)
瞼板腺チーズ様分泌物圧出	0.0%	(0/35)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/20)
未認定						
主訴						
眼脂過多	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/4)
他覚所見						
眼瞼浮腫	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/4)
眼瞼結膜色素沈着	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/4)
瞼板腺嚢胞形成	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/4)
瞼板腺チーズ様分泌物圧出	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/5)	0.0%	(0/4)

表6 2020年度歯科検診の有所見率

	全体		男性		女性	
認定						
主訴	26.9%	(7/26)	36.4%	(4/11)	20.0%	(3/15)
口腔所見						
歯肉炎	38.5%	(10/26)	27.3%	(3/11)	46.7%	(7/15)
辺縁性歯周炎	42.3%	(11/26)	45.5%	(5/11)	40.0%	(6/15)
歯牙萌出異常	3.8%	(1/26)	0.0%	(0/11)	6.7%	(1/15)
歯牙着色	11.5%	(3/26)	18.2%	(2/11)	6.7%	(1/15)
歯牙形成不全	0.0%	(0/26)	0.0%	(0/11)	0.0%	(0/15)
咬合異常	7.7%	(2/26)	9.1%	(1/11)	6.7%	(1/15)
その他	0.0%	(0/26)	0.0%	(0/11)	0.0%	(0/15)
色素沈着所見						
歯肉	19.2%	(5/26)	9.1%	(1/11)	26.7%	(4/15)
頬粘膜	3.8%	(1/26)	9.1%	(1/11)	0.0%	(0/15)
口蓋粘膜	0.0%	(0/26)	0.0%	(0/11)	0.0%	(0/15)
口唇粘膜	0.0%	(0/26)	0.0%	(0/11)	0.0%	(0/15)
未認定						
主訴	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/5)
口腔所見						
歯肉炎	33.3%	(3/9)	50.0%	(2/4)	20.0%	(1/5)
辺縁性歯周炎	11.1%	(1/9)	0.0%	(0/4)	20.0%	(1/5)
歯牙萌出異常	11.1%	(1/9)	0.0%	(0/4)	20.0%	(1/5)
歯牙着色	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/5)
歯牙形成不全	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/5)
咬合異常	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/5)
その他	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/5)
色素沈着所見						
歯肉	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/5)
頬粘膜	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/5)
口蓋粘膜	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/5)
口唇粘膜	0.0%	(0/9)	0.0%	(0/4)	0.0%	(0/5)

分担研究報告書

油症患者の追跡調査

研究分担者 小野塚 大介 京都府立医科大学 医学・医療情報管理学講座 講師
 研究協力者 中村 優子 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 看護師
 辻 学 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 准教授
 古江 増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 名誉教授

研究要旨 油症患者を対象に50年間の追跡調査を実施し、がんと非がんの長期死亡リスクを検証した。その結果、がんの50年間累積死亡率は、男性では16.8% (95% CI: 14.5-19.5)、女性では8.8% (95% CI: 7.0-10.9)であった。また、非がんの50年間累積死亡率は、男性では31.5% (95% CI: 28.9-34.3)、女性では30.8% (95% CI: 28.4-33.3)であった。

A. 研究目的

我々はこれまで、油症患者を対象とした追跡調査を実施してきた。40年間の追跡調査の結果、男性の油症患者では全がん、肺がん、肝がんの死亡リスクが一般人より高いことを明らかにした(Onozuka et al., Am J Epidemiol, 2009)。また、追跡期間を50年間に延長して死亡リスクを再評価した結果、男性の油症患者では全がんと肺がんの死亡率が高いこと、女性の油症患者では、肝がんの死亡率が高いことを明らかにした。(Onozuka et al., Environ Health, 2020)。しかし、がんと診断された油症患者全員ががんによって死亡するとは限らず、がん以外の死因によって死亡する影響を考慮した競合リスクについて検討した研究はこれまでに報告されていない。

そこで本研究は、油症患者における50年間の追跡調査をもとに競合リスク解析を行い、がんと非がんの長期的な累積死亡率を明らかにすることを目的として実施した。

B. 研究方法

50年間の追跡調査の対象者1,664名について、行政機関、油症センター、油症相

談員等の関係者から引き続き情報収集を行い、生存情報のアップデートを行った。また、死亡者における死因の特定については、油症患者の名簿記録と人口動態調査(基幹統計調査)の死亡票との照合を行った。なお、当該死亡票の使用については、厚生労働省政策統括官付参事官付審査解析室に申請を行い、承認を得た(厚生労働省発政統0309第3号・令和2年3月9日、厚生労働省発政統1209第2号・令和2年12月9日)。

油症患者におけるがんと非がんの累積死亡率については、Royston-Parmar flexible parametric 生存モデルによって解析した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1968年から2017年までの油症患者における基本情報をTable 1に示す。がんで死亡した油症患者は198名(男性132名、女

性 66 名)、非がんで死亡した油症患者は 445 名(男性 228 名、女性 217 名)であった。観察人年は、63,566 人年(男性 31,559 人年、女性 32,007 人年)であり、追跡期間の中央値は 43.7 年(男性 42.9 年、女性 44.6 年)であった。生存油症患者の平均年齢は 66.3 歳(男性 64.9 歳、女性 67.6 歳)であった。

Table 2 と Figure 1 に、油症患者における追跡期間中のがんと非がんの累積死亡率を示す。がんの 50 年間累積死亡率は、男性では 16.8% (95% CI: 14.5-19.5)、女性では 8.8% (95% CI: 7.0-10.9) であった。また、非がんの 50 年間累積死亡率は、男性では 31.5% (95% CI: 28.9-34.3)、女性では 30.8% (95% CI: 28.4-33.3) であった。

D. 考察

油症患者を対象に 50 年間のがんの累積死亡率を解析した結果、男性の油症患者は、女性の油種患者よりも、がんの累積死亡率が有意に高いことが明らかとなった。これとは対照的に、非がんの累積死亡率については、男女間で有意な差はみられなかった。油症事件発生後 50 年が経過した時点において、PCB やダイオキシン類による発がんによる累積死亡リスクは、男性の油症患者において高い傾向を維持していることが示唆された。

E. 結論

本研究は、油症患者を対象とした 50 年間の追跡調査により、がんと非がんの累積死亡率をはじめ推定したものである。その結果、男性の油症患者は、女性の油種患者よりも、がんの累積死亡率が有意に高いことが明らかとなった。

本研究の結果は、油症患者に対して、がんの予後、サバイバーシップ、疾病管理における意志決定のためにより正確な情報を提供する上で有用であると考えられる。

(謝辞)

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1
Demographic characteristics of Yusho patients between 1968 and 2017.

	Males (n = 860)		Females (n = 804)	
	No.	(%)	No.	(%)
Age in 1968				
<20	345	(40.1)	305	(37.9)
20–29	94	(10.9)	99	(12.3)
30–39	126	(14.7)	136	(16.9)
40–49	140	(16.3)	130	(16.2)
50–59	82	(9.5)	68	(8.5)
60–69	49	(5.7)	43	(5.3)
70–79	20	(2.3)	21	(2.6)
≥80	4	(0.5)	2	(0.2)
Vital status of 31 December 2017				
Alive	500	(58.1)	521	(64.8)
Dead	360	(41.9)	283	(35.2)
Cancer	132	(15.3)	66	(8.2)
Noncancer	228	(26.5)	217	(27.0)
Person-years of follow-up	31,559		32,007	

Table 2
Cumulative incidence function and risk difference with 95% confidence interval (CI) in Yusho patients.

	Cumulative incidence, % (95% CI)				Risk Difference, %pt (95% CI)	
	Male		Female			
Cancer						
1 year	0.4	(0.2–0.9)	0.2	(0.1–0.3)	0.3	(0.1–0.5)
5 year	1.3	(0.9–1.9)	0.5	(0.3–0.8)	0.8	(0.4–1.1)
10 year	2.5	(1.8–3.4)	1.0	(0.7–1.5)	1.4	(0.8–2.0)
20 year	5.4	(4.3–6.7)	2.4	(1.8–3.3)	3.0	(1.9–4.1)
30 year	8.9	(7.4–10.6)	4.2	(3.3–5.4)	4.6	(2.9–6.3)
40 year	12.8	(11.0–15.0)	6.4	(5.1–8.1)	6.4	(4.0–8.8)
50 year	16.8	(14.5–19.5)	8.8	(7.0–10.9)	8.0	(4.9–11.2)
Noncancer						
1 year	0.3	(0.2–0.7)	0.2	(0.1–0.5)	0.1	(0.0–0.2)
5 year	2.1	(1.6–2.8)	1.5	(1.1–2.0)	0.6	(0.3–1.0)
10 year	4.8	(4.1–5.8)	3.7	(3.0–4.4)	1.2	(0.5–1.8)
20 year	10.3	(9.2–11.7)	8.5	(7.5–9.7)	1.8	(0.6–3.1)
30 year	15.6	(14.1–17.3)	13.6	(12.3–15.1)	2.0	(0.2–3.8)
40 year	22.2	(20.3–24.3)	20.4	(18.7–22.3)	1.8	(–0.7 to 4.3)
50 year	31.5	(28.9–34.3)	30.8	(28.4–33.3)	0.7	(–2.6 to 4.0)

Abbreviation: CI, confidence interval; %pt, percentage point.

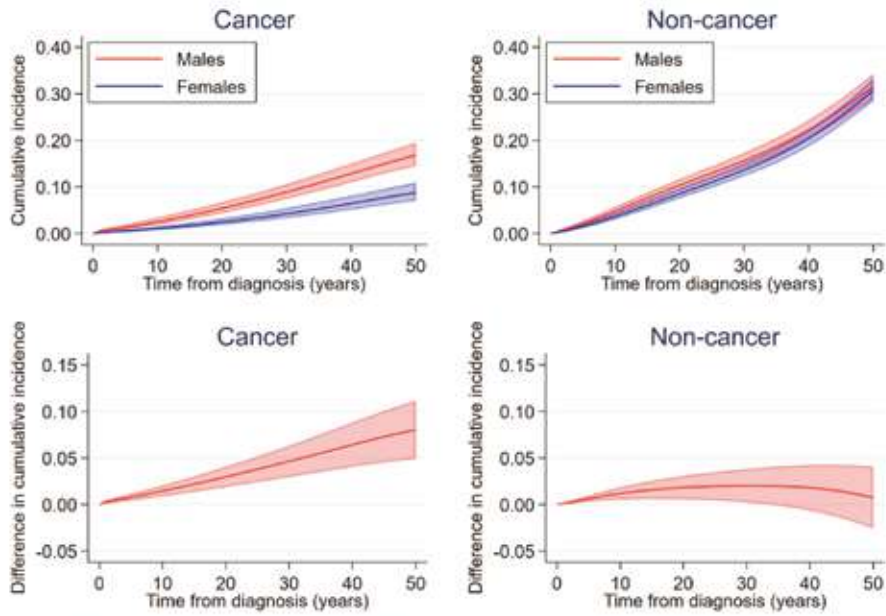


Fig. 1. Adjusted cumulative incidence function of cancer (left top panel) and other causes of death (right top panel) for males and females, and risk difference due to sex (men-women) for cancer (left bottom panel) and other causes of death (right bottom panel) over time elapsed in the 50 years following registration of Yusho patients.

分担研究報告書

油症曝露による女性特有の健康影響に関する研究

研究分担者 月森 清巳 福岡市立こども病院 副院長 周産期センター長
 研究協力者 加藤 聖子 九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学 教授
 研究協力者 諸隈 誠一 九州大学大学院医学研究院広域生涯看護学 教授

研究要旨 油症女性患者の閉経年齢と血中ダイオキシン類濃度との関連について検討した。油症発生後に自然閉経となった油症女性患者 63 例を対象とした。油症女性患者における自然閉経の平均年齢は 49.9 歳で、わが国における女性の平均閉経年齢と変わらなかった。また、閉経年齢と閉経時の推定血中ダイオキシン (PeCDF)濃度との間には有意な相関は認めなかった。

A. 研究目的

ヒトにおけるダイオキシン類曝露と閉経年齢との関連については、ダイオキシン類曝露では、閉経年齢が早くなるという報告¹⁾や、健常人と変わらない^{2,3)}、といった報告もみられ、まだ一定の見解が得られていない。

本研究では、油症女性患者における閉経年齢と血中ダイオキシン類濃度との関連を観察することによって、油症曝露による女性特有の健康影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象：

カネミ油症発生後に自然閉経となった油症女性患者 63 例を対象とした。

2. 方法：

油症検診で得られたデータより対象者の年齢、身長、体重、BMI、油症曝露時年齢、閉経年齢、血中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzo furan (PeCDF) 濃度および閉経から血液検体採取までの期間を得た。

また、閉経時の推定血中 PeCDF 濃度を、検査時血中濃度×2[閉経から血液検体採

取までの期間(年)/PeCDF の半減期(7.7年)]の式を用いて推定した⁴⁾。

これらで得られた結果をもとに、閉経年齢と閉経時の推定血中 PeCDF 濃度との関連について回帰分析を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究については、福岡市立こども病院倫理委員会(承認番号 112) および九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会(承認番号 29-326)の承認を得た後、実施した。

C. 研究結果

1. 油症女性患者の臨床像：

検査時の年齢は、68.8±7.9歳(平均値±標準偏差)であった(範囲 50-85歳)。また検査時のBMIは、22.5±3.8(平均値±標準偏差)であった(範囲 17.1-32.4)。油症曝露時の年齢は、30.8±7.9歳(平均値±標準偏差)であった(範囲 12-47歳)。閉経時の推定血中 PeCDF 濃度は 312.4±324.0 pg-TEQ/g lipid であった(範囲 5.3-1641.5 pg-TEQ/g lipid)。

2. 閉経年齢：

油症女性患者の自然閉経年齢は、49.9±4.1歳(平均値 ± 標準偏差)であった(範囲38-63歳)。油症女性患者63例のなかで、40歳未満で自然閉経となった早発閉経は、1例(1.6%)であった。

3. 閉経年齢と血中 PeCDF 濃度との関連：

油症女性患者の閉経年齢と閉経時の推定血中 PeCDF 濃度との関連について単回帰分析で解析すると、有意な相関はなかった(標準回帰係数 -0.2338, P=0.065)(図1)。また、閉経年齢に影響する因子として、年齢、BMI、閉経時の推定血中 PeCDF 濃度について重回帰分析で解析すると、閉経時の推定血中 PeCDF 濃度は有意な相関はなかった(標準偏回帰係数 -0.2325、p=0.085)。

D. 考察

ヒトにおけるダイオキシン類曝露と閉経との関連については、イタリア・Sevesoで発生した2,3,7,8-Tetrachlorobenzo-p-dioxin (TCDD)曝露における検討³⁾では、TCDD曝露では閉経年齢が早くなること、一方、Michiganで発生したpolybrominated biphenyls (PBBs)曝露および台湾で発生した油症(Yucheng)における検討^{1,2)}では、閉経年齢は健常人と変わらないと報告されている。このように、ダイオキシン類曝露が閉経に及ぼす影響については、まだ一定の見解が得られていない。

これまでの油症女性患者における閉経年齢に関する検討では、油症女性患者の平均閉経年齢は、0-19歳時曝露群で47.7歳、20-29歳時曝露群で49.6歳、30-39歳時曝露群で50.3歳と、日本人女性の平均閉経年齢の49.5歳と変わらないことが報告されている⁵⁾。今回の検討では、油症女性患者における自然閉経の平均年齢は49.9歳で、わが国における女性の平均閉経年齢とほぼ同じであった。また、閉経年齢と閉経

時の推定血中 PeCDF 濃度との間には有意な相関は認めなかった。これらの成績から、油症曝露では閉経年齢に影響を及ぼさないことが示唆された。

E. 結論

油症女性患者における自然閉経の平均年齢は、日本人女性の平均閉経年齢と変わらず、また閉経年齢と閉経時の推定血中 PeCDF 濃度との間には有意な相関は認めなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 参考文献

- 1) Eskenazi B, et al. Serum dioxin concentrations and age at menopause. *Environ Health Perspect.* 113:858-862, 2005.
- 2) Blanck HM, et al. Time to menopause in relation to PBBs, PCBs, and smoking. *Maturitas.* 49:97-106,2004.
- 3) Yu ML, et al. Menstruation and reproduction in women with polychlorinated biphenyl (PCB) poisoning: long-term follow-up interviews of the women from the Taiwan Yucheng cohort. *Int J Epidemiol.* 29:672-677,2000.
- 4) Tsukimori K, et al. Long-Term Effects of

Polychlorinated Biphenyls and Dioxins on Pregnancy Outcomes in Women Affected by the Yusho Incident. Environ Health Persp 116:626-630, 2008.

- 5) 月森清巳. 油症患者における婦人科疾患の研究. 平成20年度分担研究報告書. pp111-113, 平成21年3月.

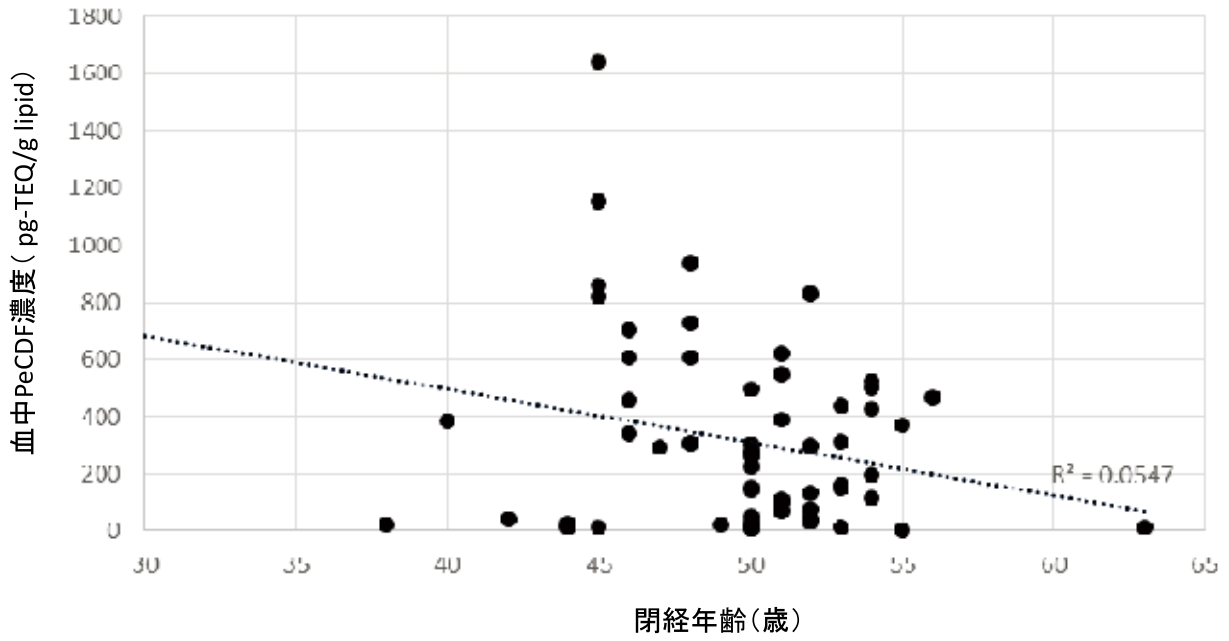


図1 油症女性における閉経年齢と閉経時の推定血中 PeCDF 濃度との関連

分担研究報告書

カネミ油症患者の漢方治療に関する実態調査に関する研究

研究分担者 貝沼 茂三郎 富山大学附属病院和漢診療科 特命教授

研究要旨 今年度はカネミ油症患者健康実態調査結果からカネミ油症患者に対する漢方薬の服薬状況について検証した。平成27年度と令和2年度のカネミ油症患者健康実態調査を比較すると平成27年度では128/1443名(8.9%)、令和2年度では180/1362名(13.2%)がそれぞれ漢方薬を内服していた。また令和2年度において漢方薬内服群は非内服群と比較して有意に年齢が高く、女性が多かった($P<0.0001$)。それぞれの年度で処方されている漢方薬は多い順に平成27年度は葛根湯、芍薬甘草湯、大建中湯、桂枝茯苓丸であり、令和2年度は芍薬甘草湯、桂枝茯苓丸、大建中湯、葛根湯の順であった。以上の結果より平成27年度と比較して令和2年度で全体として漢方内服患者が増加しており、特に高齢女性が服用していることがわかった。また処方としては特に桂枝茯苓丸の内服患者が増加していることが明らかになった。

A. 研究目的

これまでカネミ油症患者に対する漢方薬の服薬状況についてのまとまった報告はない。今回、我々は平成25年度から毎年実施されているカネミ油症患者健康実態調査結果からカネミ油症患者に対する漢方薬の服薬状況について検証する。

B. 研究方法

平成27年度と令和2年度のカネミ油症患者健康実態調査において内服薬ならびにサプリメント欄に記載されている漢方薬を抽出し、漢方薬の内服者数ならびに内服薬の変化について検証した。なお統計解析には統計解析ソフト JMPpro16 を用い、2群間の比較にはt検定を用いた。結果の有意水準は両側5%未満とした。

(倫理面への配慮)

本研究の結果においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C. 研究結果

平成27年度においては128/1443名(8.9%)、令和2年では180/1362名

(13.2%)がそれぞれ漢方薬を内服していた。そのうち、医師から処方されていた人数は全体の処方人数からするとそれぞれ107/951名(11.3%)、171/967名(17.7%)であった。また令和2年度に関して漢方薬内服群(男性52名、女性128名 平均年齢71.8歳)と非内服群(男595例、女587例 平均年齢66.7歳)を比較すると、漢方薬内服群において有意に年齢が高く、女性が多かった(いずれも $P<0.0001$)。

次に平成27年度では処方された漢方薬は多い順に葛根湯、芍薬甘草湯、大建中湯、桂枝茯苓丸であった(表1)。また23名が薬局で漢方薬を購入していたが、その中では芍薬甘草湯が最も多く、6名だった。一方、令和2年度では処方された漢方薬は多い順に芍薬甘草湯、桂枝茯苓丸、大建中湯、葛根湯であった(表2)。また10名が薬局で漢方薬を購入していたが、その中では葛根湯が最も多く、5名だった。また服用している漢方薬の種類を比較すると平成27年度が50種類であったのに対し、令和2年度は75種類であった。

D. 考察

平成27年度と令和2年度を比較すると全体として漢方薬を内服している患者が増加していた。その内訳を見ると葛根湯に関しては“かぜに葛根湯”と言われるように、疾患特異性は低いと考えられる。しかし芍薬甘草湯に関しては一般的にはこむら返りに頻用されるが、今回も同様の目的で使用されているのではないかと推測する。すなわち漢方医学的には血虚（末梢まで十分な栄養が行きわたらない状態）の患者が多いのかもしれない。

また2回の実態調査とも大建中湯の内服者が多かった。大建中湯は漢方医学的には腹部の冷えによるさまざまな消化器症状（便秘や下痢）に用いられる代表的な方剤である。また応用としては術後の腸閉塞予防としても広く用いられているが、令和2年度における併用薬の詳細から12名（66.7%）では便秘に対して用いられていると推測された。

さらに今回の検証で特記すべき点としては令和2年度では桂枝茯苓丸の内服患者が増加していたことである。これについては三苦らが平成28年度にカネミ油症患者に対する桂枝茯苓丸の臨床研究を行い、全身倦怠感、皮膚症状や呼吸器症状の一部が改善し、生活の質も向上したことを報告した¹⁾。その結果から桂枝茯苓丸が油症患者の症状軽減の治療薬の一つになり得ると期待され、内服患者が増加していたのではないかと考えられた。これはカネミ油症患者自身ならびに治療する側からもカネミ油症患者のさまざまな症状に対してエビデンスがある漢方薬への高い期待の裏付けなのかもしれない。

また今回の検証から平成27年度と比較して令和2年度において服用している漢方薬の種類が増加や、令和2年度において漢方薬内服群の方が非内服群よりも有意に高齢であったことから、カネミ油症患者の高齢化に伴う種々の症状に対して漢方

薬が有用である可能性が考えられた。

今後は油症患者がどのような症状に対して漢方薬を服用しているのか、またその効果も含めてさらに研究を深めていきたい。

E. 結論

平成27年度と比較して令和2年度で全体として漢方内服患者が増加しており、特に高齢女性が服用していることがわかった。また処方としては特に桂枝茯苓丸の内服患者が増加していることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kainuma M, Mitoma C, Tsuji G, Onozuka D, Nakaguchi T, et al. The Association between Objective Tongue Color and the Static Blood Findings of Yusho Patients. *Asian Journal of Complementary and Alternative Medicine*, Vol 9(3), 89-97:2021.

2. 学会発表

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

参考文献

- 1) Mitoma C, Uchi H, Tsukimori K, Todaka T, Kajiwara J, et al (2018) Current state of yusho and prospects for therapeutic strategies. *Environ Sci Pollut Res Int*;25. 16472-80.

表1 平成27年度主な漢方薬内服者数
(医師処方分)

処方名	人数
葛根湯	12
芍薬甘草湯	11
大建中湯	8
桂枝茯苓丸	6

表2 令和2年度主な漢方薬内服者数
(医師処方分)

処方名	人数
芍薬甘草湯	28
桂枝茯苓丸	19
大建中湯	18
葛根湯	17

分担研究報告書

油症検診における眼病変の追跡調査

研究分担者 園田 康平 九州大学医学研究院眼科学分野 教授

研究要旨 令和3年度油症患者の眼症状を調査した。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

令和3年度の油症検診にて、九州大学病院眼科外来あるいは福岡県の油症一斉検診時に油症患者を診察し、眼所見および症状を把握する。

(倫理面への配慮)

本研究の解析結果においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C. 研究結果

新型コロナウイルス感染の拡大を懸念し、今年度は検診を行っていないが、昨年度までの患者データおよび臨床所見を解析し、文献的考察を行った。

D. 考察

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

E. 結論

昨年度までの経過では受診者の高齢化が進み、臨床所見は少なくなっているが今後も経過観察が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

油症検診受診者における角膜内皮細胞

研究分担者 上松 聖典 長崎大学病院眼科 病院准教授

研究協力者 北岡 隆 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 眼科・視覚科学分野 教授

研究要旨：角膜内皮細胞の減少は水疱性角膜症の原因となる。動物実験において、外的要因により障害された角膜内皮細胞の形態変化が観察された。同様の変化があれば、ダイオキシン類による角膜内皮細胞への毒性があることが推測できる可能性がある。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

長崎県油症検診の3地区すなわち、玉之浦、奈留、長崎地区において2020年度油症検診の眼科部門を受診し、細隙灯による前眼部観察およびスペキュラーマイクロスコープによる角膜内皮細胞密度の測定が可能であった油症認定患者を対象とし、角膜内皮細胞密度とCB、PCQ、PeCDF濃度の関連を調査する。

また、動物実験では摘出したウサギ

角膜を様々な条件で保存し、角膜内皮細胞の形態変化を観察する。

(倫理面への配慮)

本研究のデータ解析においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C. 研究結果

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

外的要因による角膜内皮細胞の形態変化を動物実験で調査したところ、摘出角膜を低温保存すると、角膜内皮細胞は2週目まで正常であったが、3週目以降、変性細胞がデスメ膜に隣接して現れ始め、内皮細胞が完全に失われた領域も出現した。

D. 考察

結膜色素沈着やマイボーム腺に変化を認める油症患者では、ダイオキシン類が角膜の正常形態・代謝維持に影響している可能性がある。油症患者に、動物実験における内皮細胞形態と同様の変化がみられれば、ダイオキシン類が前房に

移行し、内皮細胞障害を与えていることが推測できる可能性がある。

E. 結論

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

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

分担研究報告書

長崎県油症地区における口腔乾燥症に関する研究

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

研究要旨 平成28年度から30年度の長崎県油症地区で行った歯科検診結果をもとに、口腔乾燥症患者と口腔カンジダ発現、口腔細菌数およびその他の歯科的因子との関連について検討を行った。口腔乾燥症の発現率に関しては認定者および未認定者の間に有意差はみられなかった。口腔乾燥症の患者には口腔カンジダ陽性が多く、可撤性義歯装着者にも多い傾向があったが、口腔細菌数や色素沈着とは関連性がなかった。

A. 研究目的

口腔乾燥症はストレス社会や超高齢化社会を背景に年々増加傾向にあり、医療だけでなく介護の現場でも重要視すべき病態の一つである。油症患者においては、口腔症状として以前より様々なものが報告されているが、口腔乾燥症についても報告がなされている。

これまで、平成28年度から30年度において口腔カンジダの検出および口腔細菌数について検討を行い報告してきた。今回は平成28年度から30年度における歯科検診結果を基に、口腔乾燥症の訴えのあった患者に注目して、口腔カンジダ発現、口腔細菌数および歯科的因子との関連についてレトロスペクティブに検討することを目的とした。

B. 研究方法

平成28年度から30年度の、長崎県油症検診（五島玉之浦地区、奈留地区および長崎地区）において歯科検診を行い、口腔乾燥症の訴えがあった人を対象とした。平成28、29年度において行った舌背におけるカンジダの有無、平成29、30年度に行った口腔内細菌数のデータ、および平成28年から30年度の歯科検診結果から得られた義歯や歯科的疾患の有無などとの関連について検討した。口腔カンジダの検出についてはカンジダディテクター（亀水化学工業）を、口腔内細菌数の測定には微生物定量装置口腔内細菌カウンター（パ

ナソニック）をそれぞれ用いて検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の解析結果においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

C. 研究結果

長崎県油症地区における歯科検診受診者のうち、口腔乾燥感を訴えた者は平成28年度が21名、平成29年度が17名、平成30年度が13名であった。各年度とも口腔乾燥感の訴えと認定および未認定の間との有意差はみられなかった。カンジダ発現に関しては、平成28年度が12名、平成29年度が8名で、各年度において口腔乾燥を訴える者の半数以上にカンジダ発現がみられていた。

舌背部で行った口腔細菌数測定結果に関しては、口腔乾燥症の訴えがある者については、平成29年度が 7.5×10^6 で、30年度が 18.5×10^6 であった。一方、口腔乾燥の訴えのない者の数値は平成29年度が 8.8×10^6 で、平成30年度が 21.2×10^6 であった。口腔乾燥の訴えの有無と口腔細菌数との間に有意差は認められなかった。

義歯との関係については、口腔乾燥を訴えた者のうち可撤義歯を装着していた者は28年度が13名、29年度が9名、30年度が7名で、半数以上が義歯装着者であった。口腔乾燥症を訴えた者のうち、口腔粘膜色素沈着の

発現者は年度ごとに、28年度が6名、29年度が6名および30年度が5名であった。

D. 考察

口腔乾燥症は口腔の乾燥が主症状で、広義には、客観的な唾液分泌量は保たれているものの口腔乾燥を訴えるもので、dry mouthあるいはxerostomiaと呼ばれ、狭義には実際に唾液分泌低下を認めるもので唾液分泌低下症と呼ばれる。原因は多岐にわたっており、唾液腺自体の器質的変化に基づく腺因性のもの、自律神経障害などの神経性のもの、抗コリン薬の作用などによる薬剤性のもの、糖尿病などの代謝疾患によるもの、に分類される。口腔乾燥症の客観的評価として以前からガムテストやサクソテストなど唾液分泌量の検査が行われてきたが、平成30年度診療報酬改定により口腔水分計（ムーカス：ライフ社）が口腔機能低下症を診断する診断機器の一つとして保険診療機器となり、広く臨床の場で使用できるようになった。われわれも以前、長崎県油症地区においてムーカスを用いた口腔乾燥に関する研究を行ったが、いわゆる dry mouth とムーカスによる測定値が必ずしも相関しない症例も少なからずみられた。そこで今回は広義の口腔乾燥症に対して検討を行った。

油症患者においては、様々な歯科的症状のうち口腔乾燥を訴える患者も比較的多いとされている。その原因は明らかではないが、動物実験においては、PCBの唾液腺（特に耳下腺）への影響が報告されている。耳下腺は漿液腺で、そこから出される唾液の量は全唾液腺の分泌量の45%を占めている。動物実験では顎下腺の影響も少なからず認められたことから、PCBの唾液腺への影響が唾液分泌量に影響している可能性があり、それらのことから実際の油症患者の口腔乾燥症も唾液腺の影響と何らかの関連性がある可能性が示唆されている。今回の結果では、認定未認定患者間での口腔乾燥症の訴えに差はなかった。今後は血中PCB等の濃度との関連性や、口腔乾燥症

に関する詳しいアンケート調査を行うなどの精査が必要と思われる。

一般に口腔乾燥症に付随する症状としては、味覚障害、口腔内の疼痛、嚥下障害、構音障害などがあるが、口腔乾燥により唾液の有する洗浄作用や抗菌作用の減少から口腔カンジダが起こることも知られている。

口腔カンジダ症は口腔内常在菌であるカンジダ菌により起こされる日和見感染症で、高齢者に多く、口腔乾燥以外にも、義歯の使用、抗菌薬やステロイド薬の使用、糖尿病、悪性腫瘍などがリスク因子となる。口腔カンジダの病型は、主として偽膜性、紅斑性、肥厚性の3病型であるが、時に舌痛症患者の一部にみられるような不顕性カンジダも認められる。今回対象とした患者では、舌苔のような白苔が明らかに認められる者と理学的所見のない者をランダムに調べた結果ではあるが、ある程度口腔乾燥症と口腔カンジダには相関があるものと考えられた。

口腔カンジダがみられる症例では口腔清掃状態もやや不良である傾向があると考えられたため平成29年度、30年度では細菌カウンターを用いた口腔細菌数について検討した。今回それらの検査結果を基に口腔乾燥症との関係をみたが特に口腔乾燥症と口腔細菌数の間には特に有意な関係性は認められなかった。一般に口腔乾燥症の患者は高齢者や基礎疾患を有する患者に多く認められる傾向にある。口腔衛生状態を口腔細菌数が反映しているか否かは議論のあるところではあるが、高齢かつ有病者で口腔ケアが不良の患者の場合には口腔乾燥症と細菌数には何らかの関係性がある可能性も否定できない。また、義歯装着者に口腔乾燥症が多い傾向もあり、義歯の種類や清掃状態などとの関連についても今後の検討が必要である。さらに、今回は歯科的所見という限られた因子間での検討結果であったが、局所所見だけでなく患者の背景にある基礎疾患等を含めた検討が必要であると思われる。

E. 結論

口腔乾燥症と口腔カンジダの発現には相関性がみられた。また、義歯装着者においては口腔カンジダが多い傾向がみられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

油症における末梢血 CD3 陽性細胞に対する 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の影響

研究分担者 辻 博 北九州若杉病院西日本総合医学研究所 所長

研究要旨 2018 年度福岡県油症一斉検診受診者 215 例について末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度との関連について検討した。油症患者では対照者に比較し T 細胞を示す CD3 陽性細胞の比率および絶対数の低下を認めたが、B 細胞を示す CD20 陽性細胞の比率あるいは絶対数は油症患者と対照者の間に差をみなかった。血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に負の相関を認め、血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度が高値の油症患者では 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度が低値の受診者に比較し CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の低下を認めた。油症患者において CD3 陽性細胞の低下が認められ、CD3 陽性細胞の低下に 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の慢性的影響が示唆される。

A. 研究目的

1968 年 4 月頃よりポリ塩化ビフェニル (PCB) 混入ライスオイル摂取により北部九州を中心に発生した油症では、原因油の分析から油症の原因物質としてポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) の毒性影響が大きいと考えられる¹⁾²⁾。PCDF は、狭義のダイオキシンであるポリ塩化ジベンゾ-パラジオキシン (PCDD) およびコプラナー-PCB とともにダイオキシン類と総称され、これらの物質の毒性は細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体 (Ah 受容体) を介すると考えられているが、その機構の詳細は未だ不明である³⁾。油症発生以来 50 年が経過し種々の症状は軽快しているが、重症例においては体内の PCB 濃度が今なお高く血中 PCB の組成には未だに特徴的なパターンが認められ、慢性中毒に移行していると推定される⁴⁾⁵⁾⁶⁾。2001 年度より福岡県油症一斉検診においてダイオキシン類の測定が開始され、油症患者では未だに血中 PCDF 濃度が高値であり、PCDF の体内残留が推測される⁷⁾。

近年、PCB、ダイオキシン類が内分泌攪乱物質として正常なホルモン作用を攪乱し、生殖機能の阻害、悪性腫瘍の発生、免

疫機能の低下等を引き起こす可能性が指摘されている⁸⁾⁹⁾。油症における免疫機能影響については、1996 年度福岡県油症一斉検診において血中 PCB 濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認め油症患者における免疫機能の障害が推測された¹⁰⁾。そして、1997 年度の福岡県油症一斉検診において免疫グロブリン IgA、IgG、IgM のいずれか 1 分画以上の上昇を 40.0%に、自己抗体では抗核抗体を 45.6%と高率に認め、油症において液性免疫の障害を高頻度に認めることが報告されている¹¹⁾。

今回我々は、2018 年度福岡県油症一斉検診において細胞性免疫機能検査として末梢血リンパ球亜集団の T 細胞を示す CD3 陽性細胞および B 細胞を示す CD20 陽性細胞を測定し、油症における細胞性免疫に対する 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) の慢性的影響について検討した。

B. 研究方法

2018 年度福岡県油症一斉検診における 15 歳以上の受診者 218 例中、細胞性免疫検査にアンケートにて同意が得られ、血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度の研究目的の使用

に同意が得られた 215 例を対象者とした。

白血球数、末梢血液像は半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法により多項目自動血球分析装置 XE-2100 (シスメックス(株))にて測定した。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)にて測定した。リンパ球亜集団は、総リンパ球に対する比率および絶対数で表した。

2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の測定は福岡県保健環境研究所で行なった。血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 2018 年度福岡県油症一斉検診に最も近い時期に測定した 2015 年度 27 例、2016 年度 25 例、2017 年度 63 例、2018 年度 100 例の計 215 例の測定値を用いて CD3 陽性細胞および CD20 陽性細胞との関連について検討した。

結果は平均±標準偏差 (mean±S. D.) で表し、平均値の比較については t 検定で行なった。

C. 研究結果

2018 年度福岡県油症一斉検診における 15 歳以上の受診者で細胞性免疫検査および血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度の研究目的の使用に同意が得られた 215 例の内訳は女性 122 例、男性 93 例で、平均年齢は 64.2 ± 13.5 (15-91) 歳であり、油症患者 165 例、油症患者 (同居家族) 24 例、未認定患者 17 例、観察者 1 例、初回受診者 8 例であった。血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と年齢の間に有意の正の相関 ($r=0.3985$, $P<0.001$) を認めた。

2018 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者 165 例について未認定患者 17 例を対照者として、両群間の CD3 陽性細胞

および CD20 陽性細胞について検討を行なった (表 1)。油症患者の平均血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 90.25 ± 154.99 pg/g lipids、対照者の平均血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 5.96 ± 3.86 pg/g lipids であった。CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率は対照者 $73.6 \pm 6.8\%$ に対し油症患者では $66.6 \pm 9.7\%$ と有意の低下を認めた ($P<0.005$)。CD3 陽性細胞絶対数は対照者 $1,326.2 \pm 232.0/\mu\text{l}$ に対し油症患者では $1,178.8 \pm 392.7/\mu\text{l}$ と有意の低下を認めた ($P<0.05$)。CD20 陽性細胞の比率は対照者 $11.0 \pm 4.3\%$ に対し油症患者では $10.1 \pm 4.8\%$ と差をみなかった。CD20 陽性細胞絶対数は対照者 $205.5 \pm 101.5/\mu\text{l}$ に対し油症患者では $179.7 \pm 107.8/\mu\text{l}$ と差をみなかった。

2018 年度福岡県油症一斉検診の受診者 215 例について血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と末梢血リンパ球亜集団の関連について検討した (表 2)。血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に有意の負の相関 ($r=-0.1816$, $P<0.01$) を認めた。血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と CD3 陽性細胞絶対数の間に相関をみなかった。血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と CD20 陽性細胞の比率あるいは CD20 陽性細胞絶対数の間に相関をみなかった。

2018 年度福岡県油症一斉検診受診した 215 例について血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度 50 pg/g lipids 未満の 152 例を 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 低濃度群、血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度 50 pg/g lipids 以上の油症患者 63 例を 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 高濃度群として、CD3 陽性細胞および CD20 陽性細胞について検討した (表 3)。2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 低濃度群の平均血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 15.63 ± 11.16 pg/g lipids、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 高濃度群の平均血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 206.85 ± 202.41 pg/g lipids であった。CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率は 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 低濃度群

68.6±9.5%に対し2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群 64.8±9.9%と有意の低下を認めた ($P < 0.01$)。CD3 陽性細胞絶対数は2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群 1,243.3 ± 413.4/μl に対し高濃度群では1,194.4 ± 424.3/μl と低下傾向を認めたが、差をみなかった。CD20 陽性細胞の総リンパ球に対する比率あるいは絶対数は2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群と高濃度群の間に差をみなかった。

D. 考察

油症における免疫機能への影響については血中 PCB 濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認めることが報告されている。油症発症28年後の1996年の甲状腺機能検査において、甲状腺ホルモンは血中 PCB 濃度 3.0 ppb 以上の PCB 高濃度群と 3.0 ppb 未満の PCB 低濃度群の間に差がみられなかったが、抗サイログロブリン抗体を高濃度群の41例中8例(19.5%)と低濃度群の40例中1例(2.5%)に比べ高頻度に認めた¹⁰⁾。そして、1997年度福岡県油症一斉検診において免疫機能検査として免疫グロブリンおよび自己抗体を測定し、油症患者において免疫グロブリン IgA、IgG、IgM のいずれか1分画以上の上昇を40.0%に、自己抗体についてはリウマチ因子を8.9%に、抗核抗体を45.6%と高率に認め、液性免疫を中心とする免疫機能に対する慢性的影響が示唆された¹¹⁾。さらに、2007年度福岡県油症一斉検診において、血中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と免疫グロブリン IgA およびリウマチ因子との間に正の相関を、抗核抗体を血中2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ高濃度群に高頻度に認め、油症における免疫グロブリン IgA およびリウマチ因子の上昇、抗核抗体の出現に2,3,4,7,8-PeCDF が関与している可能性が考えられ、液性免疫に対する2,3,4,7,8-PeCDF の慢性的影響が示唆された¹²⁾。

今回の油症における細胞性免疫の検討では、2018年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者について未認定患者を対照者としてT細胞を示すCD3陽性細胞およびB細胞を示すCD20陽性細胞を検討した。CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率および絶対数は対照に比較し油症において低下を認めたが、CD20 陽性細胞の比率および絶対数は対照者および油症患者に差をみなかった。そして、2018年度福岡県油症一斉検診受診者の血中2,3,4,7,8-PeCDF 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2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と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を認めた。さらに、血中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者では、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が低値の受診者に比較しCD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の低下を認めた。油症患者におけるT細胞の低下に2,3,4,7,8-PeCDF の慢性的影響が示唆される。

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¹³⁾。血中 PCB 濃度と末梢血リンパ球、helper/inducer T 細胞を示すCD4 陽性細胞、suppressor/cytotoxic T 細胞を示すCD8 陽性細胞の間に相関はみられなかったが、血中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と末梢血リンパ球数、CD4 陽性細胞の間に相関が認められ油症患者の末梢血リンパ球、CD4 陽性細胞の増加に2,3,4,7,8-PeCDF の関与が示唆された。また、血中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者において低値の患者に比べ末梢血リンパ球、helper/inducer T 細胞を示すCD4 陽性細胞の増加を認めた。今回の検討では油症においてT細胞を示すCD3陽性細胞の低下を認め、2,3,4,7,8-PeCDF の慢性

的影響が示唆された。そして、血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度が高値の油症患者において helper/inducer T細胞は増加し、helper/inducer T細胞および suppressor/cytotoxic T細胞等より構成される T細胞は減少する可能性が考えられる。

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いてリンパ球亜集団を検討し、油症患者において対照者に比べ T細胞を示す CD3 陽性細胞の低下を認めた。そして、血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と CD3 陽性細胞の比率の間に負の相関を認め、血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度が高値の油症患者では、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度が低値の受診者に比較し CD3 陽性細胞の低下を認めた。油症における 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の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、油症患者における CD3 陽性細胞の低下に 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の関与が示唆される。

E. 結論

油症発生50年後の2018年度福岡県油症一斉検診受診者 215 例のリンパ球亜集団を検討し油症患者において T細胞を示す CD3 陽性細胞の低下を認めた。血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に負の相関を認め、血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度が高値の油症患者では、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度が低値の受診者に比較し CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の低下を認めた。油症患者において T細胞の低下が認められ、T細胞の低下に 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の慢性的影響が示唆された。

F. 参考文献

1. Masuda Y, Yoshimura H : Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance : A Review. *Amer J Ind Med* 5 : 31-44, 1984.
2. Oishi S, Morita M, Fukuda H : Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43 : 13-22, 1978.
3. Gonzalez FJ, Liu SY, Yano M : Regulation of cytochrome P450 genes : molecular mechanism. *Pharmacogenetics* 3 : 51-57, 1993.
4. 飯田隆男, 芥野岑男, 高田智, 中村周三, 高橋克巳, 増田義人 : ヒトの血液中におけるポリ塩化ビフェニルおよびポリ塩化クアテルフェニルについて. *福岡医誌* 72 : 185-191, 1981.
5. 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一 : 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニル異性体. *福岡医誌* 76 : 150-152, 1985.
6. 増田義人, 原口浩一, 古野純典 : 油症患者における PCB 異性体の 30 年にわたる特異な残留. *福岡医誌* 94 : 136-143, 2003.
7. 飯田隆男, 戸高尊, 平川博仙, 飛石和大, 松枝隆彦, 堀就英, 中川礼子, 古江増隆 : 油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査 (2001年). *福岡医誌* 94 : 126-135, 2003.
8. Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP and Becker JL : Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21 : 433-441, 1993.
9. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S : Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor.

Nature 423 : 545-550, 2003.

10. 辻 博, 佐藤薫, 下野淳哉, 東晃一, 橋口衛, 藤島正敏: 油症患者における甲状腺機能: 油症発生28年後の検討. 福岡医誌 88 : 231-235, 1997.
11. 辻 博, 平橋高明, 緒方久修, 藤島正敏: 油症患者における免疫機能の検討. 福岡医誌 90 : 147-149, 1999.
12. 辻 博: 油症患者における免疫機能の検討. 熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究 平成19年度総括・分担研究報告書 37-39, 2008.
13. 辻 博: 油症における末梢血リンパ球亜集団の検討. 福岡医誌 100:131-135, 2009.

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 油症患者および対照者におけるリンパ球亜集団

		Controls	Yusho
No.		17	165
CD3 陽性細胞	(%)	73.6±6.8	66.6±9.7*
	(/μl)	1,326.2±232.0	1,178.8±392.7 [†]
CD20 陽性細胞	(%)	11.0±4.3	10.1±4.8
	(/μl)	205.5±101.5	179.7±107.8

*P<0.005 vs. Controls, [†]P<0.05 vs. Controls.

表2 血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度とリンパ球亜集団の関連

		r
CD3 陽性細胞	(%)	-0.1816*
	(/μl)	-0.0178
CD20 陽性細胞	(%)	-0.0163
	(/μl)	-0.0182

*P<0.01.

表3 血中 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群および高濃度群におけるリンパ球亜集団

		2,3,4,7,8-PeCDF 濃度	
		< 50 pg/g lipids	≥ 50 pg/g lipids
No.		152	63
CD3 陽性細胞	(%)	68.6±9.5	64.8±9.9*
	(/μl)	1,243.3±413.4	1,194.4±424.3
CD20 陽性細胞	(%)	10.5±4.6	9.5±4.8
	(/μl)	194.0±110.3	176.1±117.9

*P<0.01 vs. blood 2,3,4,7,8-PeCDF concentration <50 pg/g lipids.

分担研究報告書

油症患者における皮膚ガス分析

研究分担者 室田 浩之 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 教授
研究協力者 村山 直也 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教

研究要旨

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

近年、皮膚ガスの研究が注目されている。皮膚ガスとは、体表面から発せられる揮発性の化学物質であり、①炭水化物、②タンパク質や脂質の代謝生成物、③細菌の分解産物、④吸入・経口摂取された外因性化学物質、⑤皮膚表面における反応生成物などからなる混合ガスである。本研究では油症患者と健常者の皮膚ガスを採取、成分解析し、双方間での成分比較を試みた。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

①対象:油症認定患者3名と対照群として、健常人ボランティア3名での検討を行った。

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

本研究は長崎大学病院、五島中央病院の倫理審査委員会から承認され、すべての被

験者にインフォームドコンセントを行い、文書による同意を得た上で実施された。

C. 研究結果

被験者の年齢、性別を表1に示す。油症患者は男性2名、女性1名で平均年齢は76.3歳、健常者は男性2名、女性1名で平均年齢は66.0歳であった。

測定結果を図1～3に示す。油症患者と健常者を比較し、差異が見られたものにデカナールがあった。デカナールは油症患者3名全てで検出し、健常者では検出されなかった。油症患者、健常者共通して2-エチル-1-ヘキサノールとトルエンを検出した。健常者全てで検出されたものにリモネンがあり、油症患者では1名のみで検出された。

D. 考察

油症患者特徴的にデカナールを検出した。デカナールは柑橘類など果実の香りやソバ

の香りの要素である。グレープフルーツやレモンガラスの精油に含まれ、果実の香料や香水に使用される。

2-エチル-1-ヘキサノールは、揮発性有機化学物質であり、シックハウス症候群の原因となる空気汚染物質として知られている^{3,4}。

2-エチル-1-ヘキサノールは、プラスチック等の可塑剤や床タイルの接着剤などにも広く用いられているフタル酸エステル由来の分解物であることから、屋内環境中に含まれていると考えられる⁵。また、ペットボトルのマイクロプラスチック由来とする報告もある³。

リモネンはミカン、レモンなどの柑橘類の果皮、香水、整髪料、制汗スプレー等の香料や医薬品の成分の一部に含まれる。これらの製品は、日常的に用いられることが多く、皮膚からの吸収や揮発した成分を口から吸い込み、皮膚からガスとして放出されていた可能性があると考えられる⁵。明らかな男女差はなかった。

今回のパイロット研究の限界は、ダイオキシンの測定は規制の内容と倫理配慮の双方を鑑み、実施できていないこと、また皮膚ガス採取を油症患者3名は五島市で、健常者は長崎市で行ったため、採取環境の影響は否定できないことであった。

E. 結論

皮膚ガスの成分は、油症患者と健常者で異なる物質が検出された。今回の検討では被験者の年齢や生活環境、検査時の環境等の影響が大いにあると推定された。

呼吸時や経口摂取で生体内に取り込まれ、皮膚ガスとして放出される物質を検出できることから油症患者特異的な物質の検出への応用が期待できる。ダイオキシン類の直接的な測定は規制上困難であったが、測定条件や測定対象を精査し追加の検討を行うことで油症の病態解明の一助とな

ることを期待する。

謝辞

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

参考文献

1. 古江増隆、油症における塩素ご瘡と色素沈着の発症機序とその対策 aryl hydrocarbon receptor の役割:福岡医学雑誌 111 巻 3 号 124-136; 2020
2. 関根嘉香、木村桂大、梅澤和夫、【生体ガス活用の最前線】皮膚ガス測定は何に役立つか?: におい・かおり環境学会誌 48 巻 6 号 410-417; 2017
3. 津田孝雄、小松史哉、鈴木健志、伊藤宏、佐々木陽典、瓜田純久、皮膚ガスの疾病へのアプローチ 皮膚ガス 2-エチルヘキサノールの由来と透析中における変動: 安定同位体と生体ガス: 医学応用 12 巻 1 号 45-54; 2020
4. 上島通浩、柴田英治、酒井潔、大野浩之、石原伸哉、山田哲也、竹内康浩、那須民江、2-エチル-1-ヘキサノールによる室内空気汚染 室内濃度, 発生源, 自覚症状について; 日本公衛誌第 52 巻 第 12 号 1021-1031; 2005
5. 久永真央、津田孝雄、大桑哲男、伊藤宏、GC/MS によるヒト皮膚ガス中の環境由来揮発性有機化合物の測定; BUNSEKI KAGAKU Vol. 61, No. 1, pp. 57-61(2012) 57; 2012

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1
被験者一覧

	年齢	性別	
油症1	74	男	
油症2	78	男	平均年齢
油症3	77	女	76.3
	年齢	性別	
健常1	83	男	
健常2	52	男	平均年齢
健常3	63	女	66.0

図1
2-エチル-1-ヘキサノールは油症患者3名と、健常者3名全員から検出した。

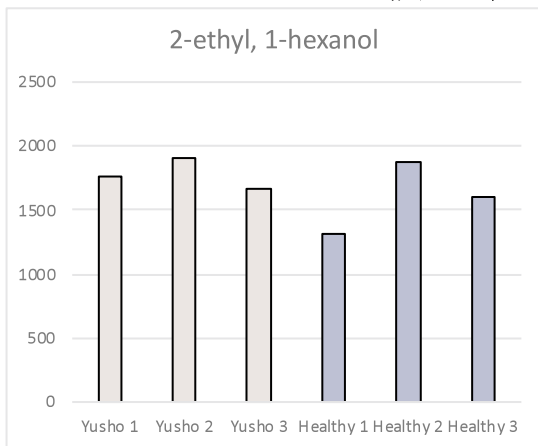


図2
デカナールは油症患者のみで検出した。(N.D. not detected)

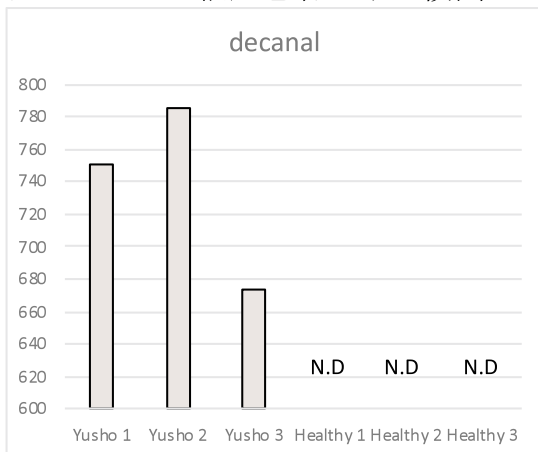
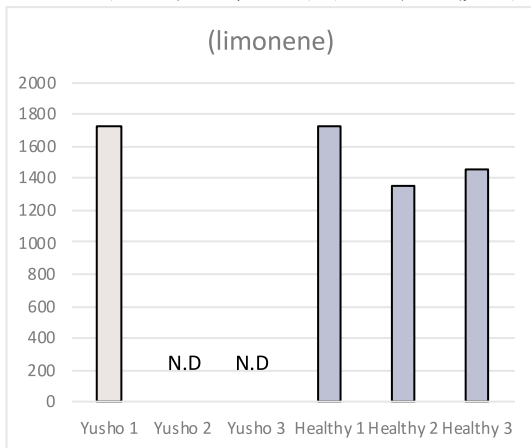


図3

油症患者1名と、健常者3名で検出した。(N.D. not detected)



分担研究報告書

油症患者の関節症状に関する研究
—キヌレニン経路の関節炎への影響—

研究分担者 津嶋 秀俊 九州大学病院 整形外科 助教

研究要旨 油症患者が、発症初期より骨・関節症状を有することは報告されている。診断基準の参考所見より関節痛は含まれてはいないが、油症発症より50年が経過した現在においても、多くの油症患者が、骨・関節症状を訴えており、その病態を理解し、解決していくことが必要である。関節炎メカニズムの一つとしてキヌレニン経路に注目している。

A.研究目的

ダイオキシン類が運動器機能へ影響を及ぼすことは知られており、特に関節腫脹、関節痛は発症初期より発生する。2005年の油症認定患者を対象に施行されたアンケート調査においては、72.5%の患者が何らかの関節痛を有していた。ダイオキシン類レベルと、関節痛特に膝関節痛との間には正の関連があると報告されている。ダイオキシン類の作用は aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介して調節されている。ダイオキシン類を含む ligand が AhR に結合すると、核内に移行し、種々の因子が転写、産生されることになる。関節の腫脹や疼痛を惹起するのは滑膜の炎症であることが多いが、この関節内滑膜においても AhR が発現していることは知られている。AhR の ligand の一つにキヌレニン(KYN)がある。食事によって摂取された必須アミノ酸であるトリプトファン(Trp)の99%はKYNに代謝される。この代謝経路はキヌレニン経路(Kynurenine Pathway: KP)とよばれ、Trp から KYN への代謝は、律速段階酵素であるインドレアミン 2,3-デオキシゲナーゼ (IDO) によって行われる。そして、IDO

は IFN- γ 、LPS や炎症性サイトカインによって活性化されることが知られている。変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) や関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA) では IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 、IFN- γ 、IL-6 など炎症促進性サイトカインが上昇し、関節内において IDO の活性化、つまり KP が活性化されていると推測される。しかし、OA や RA における KYN、KP の役割についてはまだ明らかでない。

OA や RA など関節炎において、AhR の endogenous ligand である KYN、および KYN 経路、その代謝産物の役割を明らかにすることを通して、油症の関節症状の病態の理解を深めることが、この研究の目的である。前回の報告より、KYN では軟骨基質である Acan の発現が減少し、基質分解酵素である MMP13 の発現が上昇していたことより、KYN は関節内において変性をもたらすと考えられた。今回は、KP 代謝産物の一つであるキヌレニン酸 (KYNA) に着目した。

B.研究計画・方法

まず、変形性膝関節症患者（OA）の軟骨細胞を細胞培養した。これに、LPS 刺激を行うことによって、KP が変化するかを調べた。同様に OA 滑膜細胞も培養し刺激を行った。軟骨細胞の合成因子(aggrecan など)や軟骨変性因子(MMP3、MMP13、ADAMTS4 など)の遺伝子発現変化に関して PCR を用いて調べた。

C.研究結果

ヒト OA 軟骨培養細胞に対し LPS10ng/ml 24 時間刺激すると、KP 律速酵素である IDO 1 mRNA の発現は約 50 倍を呈していた。また LPS 刺激によって、炎症促進性サイトカイン IL-6、分解酵素 MMP13、ADAMTS4 の発現が亢進していることを確認できた。LPS に KYNA0.1mA を加えて刺激すると、LPS によって上昇した IL-6、MMP13、ADAMTS4 の発現が抑制されていた。OA 滑膜細胞にても同様のことを行ったが、軟骨細胞と同様の結果は得られなかった。

D.考察

LPS によって、OA 軟骨細胞や滑膜細胞にて IDO は著明に発現上昇し、キヌレニン経路が亢進していることが考えられた。一方で、KP 代謝産物の一つである KYNA は、特に軟骨細胞において、LPS によって上昇した catabolic な因子を抑制する作用を有していることが示唆された。キヌレニン経路内の代謝産物によって、関節における作用が異なることが示唆された。

キヌレニン経路について、さらに詳細な検討を行い、関節炎の病態解明につなげたい。

E.結論

キヌレニン経路が OA 関節内に過剰に増加することは、軟骨変性など負の影響を及ぼす可能性がある。一方で、KP 内の代謝産物 KYNA は軟骨保護作用があることが示唆された。

F.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

カネミ油症患者における中枢・末梢神経障害の文献的考察と他の中毒性疾患による神経障害との差異の研究

研究分担者 緒方 英紀 九州大学病院 脳神経内科 助教

研究要旨 文献検索を行いPCB(polychlorinated biphenyl)、PCDF(polychlorinated dibenzofuran)、dioxinに関連する末梢神経障害についての報告を見出した。報告数は決して多くはないが、病態解明に向けた研究が続けられており、それらを理解し、次なる研究に結びつけることが重要であると考えられた。

A. 研究目的

カネミ油症患者では四肢異常感覚を多く認め、発症後長期間経過した後でも症状が残存していることが多い。当科で以前に行った36年以上経過した油症患者における神経症候の調査でも¹、頭痛、四肢異常感覚や痺れ感のような自覚的神経症状の頻度を油症患者と年齢一致の対照群で比較したところ、神経症状は、認定・非認定にかかわらず、油症患者群で有意に高頻度だった。他覚的神経症状として、腱反射低下および四肢の他覚的感覚障害は、感覚障害が公的認定の油症患者群において有意に高頻度だった(男性、 $p=0.014$; 女性、 $p=0.001$)。今年度の研究では、最新の研究によるカネミ油症患者での末梢神経障害の特徴を抽出するため

PCB(polychlorinated biphenyl)、PCDF(polychlorinated dibenzofuran)およびdioxinに関連する末梢神経障害を文献的に検索した。

B. 研究方法

PubmedにてPCB、PCDF、dioxin、neuropathyをキーワードとして検索を実施した。2010年以降の研究で末梢神経障害に関しての要点を検証した。

(倫理面への配慮)

個人情報とは原則的に検証の倫理対象としていないが、個人のプライバシーが侵害

されないように配慮した。

C. 研究結果

PCB、PCDF、dioxinをキーワードとした末梢神経障害(neuropathyで検索)に関する2010年以降の文献は、PCDFでは抽出できなかったが、dioxin、PCBではそれぞれ5件と2件抽出された。そのうち、実際にPCB、PCDF、dioxinに関連のある原著論文は2報であった^{2,3}。

1) 発達期における

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)の毒性はaryl hydrocarbon receptor(AhR)によって調整される。

Theresaらは、胎児の有毛細胞の発達に最も重症とされる時期(胎生12日目)に妊娠した雌マウスにTCDDを経口投与したところ、ダイオキシンに高親和性のAhRを有するマウスでは出生1.5か月後において、聴神経障害を来すことを見出した²。

2) PCBを含む残留性有機汚染物質は2型糖尿病の発生リスクを上昇させるとされる。Schwarzらは低濃度の残留性有機汚染物質への曝露より糖尿病性運動感覚ニューロパチーの発症頻度が上昇するかを調査したが、最終的にいずれの残留性有機汚染物質も糖尿病性運動感覚ニューロパチーの発症リスクではないと結論付けられた³。

D. 考察

PCB、PCDF、dioxin、neuropathy をキーワードとした文献は少ないながらも報告されていることが明らかとなった。近年、末梢神経障害に関連した血清バイオマーカーが普及してきているため、末梢神経障害を有するカネミ油症患者での測定を検討する。

E. 結論

文献検索により PCB、PCDF と dioxin に関連する末梢神経障害の報告を見出した。決して報告数は多くはないが、病態解明に向けた研究が続けられており、それらを理解し、次なる研究に結びつけることが重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし

1. 古谷 博和 , 大八木 保政 , 山田 猛 , 三好 甫 , 藤井 直樹吉良 潤一. 36年以上経過した油症患者における神経症候. 福岡医学雑誌 2005;96(5):152- 156.
2. Safe TM, Luebke AE. Prenatal low dosage dioxin (TCDD) exposure impairs cochlear function resulting in auditory neuropathy. Hear. Res. 2016;331:7- 12.

3. Schwarz M, Wolf K, Schneider A, et al. Association of persistent organic pollutants with sensorimotor neuropathy in participants with and without diabetes or prediabetes: Results from the population-based KORA FF4 study. Int. J. Hyg. Environ. Health 2021;235:113752.

分担研究報告書

ダイオキシン類による気道上皮傷害における 肺サーファクタント蛋白に関する検討

研究分担者 濱田 直樹 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 助教
研究協力者 鈴木 邦裕 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 助教
柳原 豊史 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野

研究要旨 ヒト Club 細胞株 NCI-H441 細胞に対して Benzo[a]pyrene (BaP) を投与すると、ムチンコア蛋白 (MUC5AC) の遺伝子発現が亢進し、ヒトリコンビナント SP-D の投与により抑制された。油症肺傷害において SP-D が保護的役割を担っていることが考察された。

A. 研究目的

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

っている。今回、我々は、ダイオキシン類による気道上皮傷害 (Club 細胞傷害) におよび杯細胞への分化に対する肺サーファクタント蛋白 (SP-D) に役割に着目して in vitro での研究を行った。

B. 研究方法

Club 細胞株: H441 細胞を Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 培地 (10% ウシ胎児血清、1% ストレプトマイシン/ペニシリン) を用いて、24well プレート (観察用) および、6well プレート (RT-PCR 用) に培養した。DMSO で溶解した BaP の濃度を 0~50nM に設定し、細胞傷害誘導の試適濃度を決定した。次にこの実験系を用いて、AhR の蛍光免疫染色をおこない、細胞内の AhR の局在性を確認した。更に、CYP1A1 の遺伝子発現を RT-PCR で解析した。次に、BaP により誘導される NCI-H441 細胞の傷害に対するヒトリコンビナント SP-D の抑制効果を RT-PCR による解析を行った。

C. 研究結果

前回の実験同様、H441 細胞を 24well プレートに培養し、BaP を投与 24 時間後に、Aneexin V-PI による染色を行

い、アポトーシスを確認し、BaP の試適濃度を 10mM に設定した。抗 AhR 抗体 (F ITC) を用い蛍光免疫染色を用いて観察したところ、溶媒 (DMSO) 投与群では、細胞質中に AhR の局在が確認されたが、BaP 刺激により AhR が核内に移行することが確認された (図 1)。次に、RT-PCR により、CYP1A1 の発現を確認したところ、BaP 刺激により NHI-H441 細胞で CYP1A1 の遺伝子発現が上昇を確認した (図 2)。更に、ROS の産生を CellROX® Oxidative Stress Reagent にて観察したところ、溶媒 (DMSO) 刺激で ROS の産生は確認されなかったが、BaP 刺激により ROS の産生が確認された。(図 3)

次に、以前の報告同様⁸⁾リコンビナント SP-D を同時投与による効果について検討した。NCI-H441 細胞に BaP10mM を投与すると、MUC5AC の遺伝子発現の亢進を認めた。リコンビナント SP-D を同時投与すると、MUC5AC の遺伝子発現の抑制を確認した。(図 4)

D. 考察

我々は以前の報告で、BaP の投与により、NHI-H441 細胞の apoptosis の誘導を確認した⁸⁾。Club 細胞株に BaP を投与したところ、AhR の核内移行 (図 1) および CYP1A1 の遺伝子発現の増強 (図 2) を認め、更には ROS の産生 (図 3) を確認した。即ち、細胞傷害の一部を担うと思われる、AhR-CYP1A1-ROS 経路が *in vitro* でも確認された。このように、BaP による Club 細胞傷害が、油症による呼吸器障害の病態解明に重要だが、その一方で、我々の作成した油症マウスモデルにおいても、BaP 投与により、マウスの気管支に杯細胞が増加する現象を認めている。杯細胞の産生する分泌型ムチンコア蛋白に、MUC5AC (Mucin 5 subtype AC) が知られている。MUC5AC は、主に杯細胞に発現しており、多くの呼吸器疾

患に関与していると考えられており、喘息や COPD での過剰発現が報告されている。今回我々は、MUC5AC に着目し、解析を行ったところ、BaP を投与すると、Club 細胞株の MUC5AC の遺伝子発現が亢進した。更にリコンビナント SP-D でこの遺伝子発現が抑制されることが確認された。SP-D は Club 細胞株の goblet cell differentiation を抑制する可能性が考えられた。また、我々は以前にリコンビナント SP-D は BaP による Club 細胞株の apoptosis 抑制作用をもつことを報告したが、その事象との関連性は不明である。今後、AhR-CYP1A1-ROS による細胞傷害の経路およびそれ以外の経路にも着目し実験を進めていく予定である。具体的には、ドメイン欠損した SP-D を強制発現させた Club 細胞の cell line を用いた実験系などを用い、SP-D-Collectin receptor の経路などにも解析を進めていく方針である。

E. 結論

SP-D は BaP 刺激による club 細胞株の goblet cell differentiation を抑制する。

F. 研究発表

第 57 回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会

令和 4 年 (2022 年) 1 月 15 日

ヒト Club 細胞株 (NCI-H441 細胞) を用いた多環芳香族炭化水素に対する Surfactant protein D (SP-D) の保護作用の検討 秦 兼太郎, 鈴木 邦裕, 柳原 豊史, 濱田 直樹

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

1) 中西洋一、他、(1985). 油症における

呼吸器系ならびに免疫系の障害一経過ならびに発症機序について. 福岡医誌. 1985;76:196-203

2) Podgehard N, et al. Interleukin-8 Induction by the environmental Contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. Toxicol Lett. 2008;177(2):130-7

3) Wong PS, et al. Aryl hydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010;42(2):210-7.

4) N' Diaye M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. J Biol Chem. 2006;281(29): 19906-15.

5) Nishikiori et al. Distinct compartmentalization of SP-A and SP-D in the vasculature and lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. BMC Pulmonary Medicine 2014, 14:196

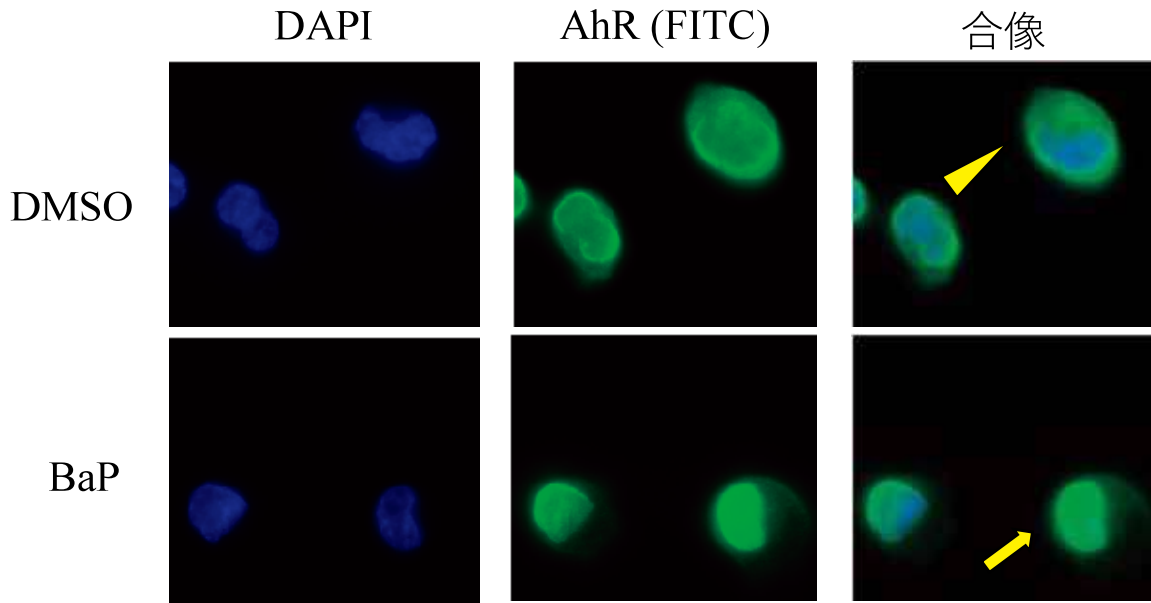
6) 中西洋一、他、(2014). 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究「油症患者における血中 Surfactant protein に関する検討」、平成 25 年度 分担者報告書

7) Knudsen L et al. Truncated recombinant human SP-D attenuates emphysema and type II cell changes in SP-D deficient mice. Respir Res 8: 70

8) 中西洋一、他、(2018). 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究「ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルにおける肺サーファクタント蛋

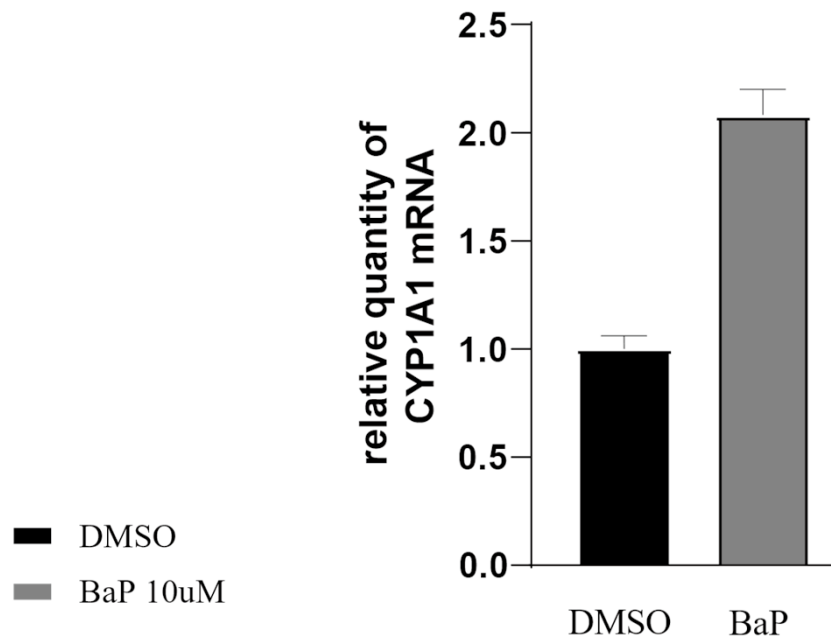
白に関する検討」、平成 30 年度 分担者 報告書

図1. AhR 蛍光免疫染色



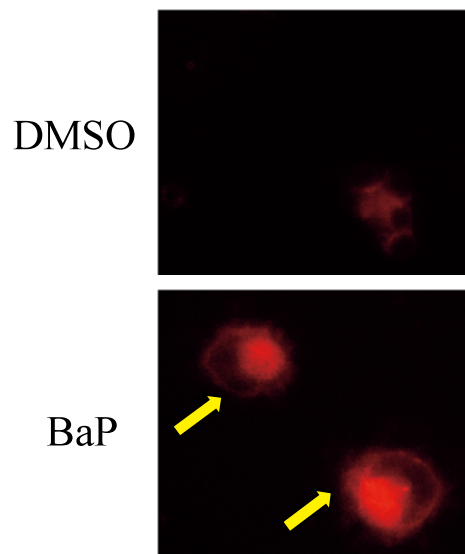
NHI-H441細胞（Club細胞株）で溶媒(DMSO)刺激では細胞質内にAhRの発現が確認された。（△）
BaP 刺激によりAhR 核内移行が確認された。（↑）

図2. Club細胞株でのCYP1A1のPT-PCR



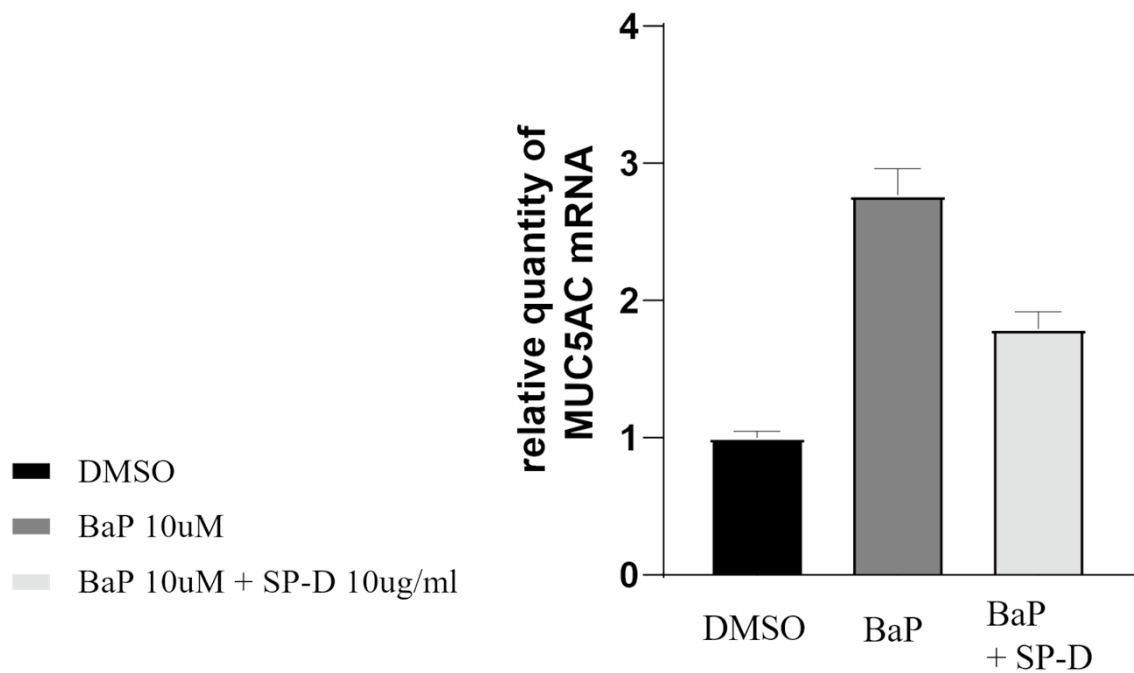
BaP 刺激によりNHI-H441細胞（Club細胞株）でCYP1A1 の遺伝子発現が上昇した。

図3. Measurement of total ROS



NHI-H441細胞（Club細胞株）で溶媒(DMSO)刺激ではROSの産生は確認されなかった。BaP 刺激によりROSが確認された。（↑）

図4. Club細胞株でのMUC5ACのPT-PCR



BaP 刺激によりNHI-H441細胞（Club細胞株）で MUC 5 AC の遺伝子発現が上昇した。rhSP-D は BaP 刺激による MUC5AC 発現を抑制した。

分担研究報告書

感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対する β -NMNの効果検討

研究分担者 申 敏哲 熊本保健科学大学、リハビリテーション学科 教授
 研究協力者 吉村 恵 療法人社団温故会 直方中村病院 病院長

研究要旨 β -Nicotinamide mononucleotide (β -NMN) はビタミン B2 関連物質であり、ミトコンドリアに作用して Adenosine triphosphate (ATP) 産生量の増加、ニューロンの axon や dendrite の発育促進や神経損傷からの回復促進、神経保護作用、血液脳関門 (blood-brain barrier、BBB) を通過しての脳組織の保護作用等がすでに確認されている。本研究ではダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを用いてベンゾピレン中毒ラットに対する β -NMN の効果を、Wistar 系雄性ラットを使用し、コーンオイル投与後蒸留水投与群 (Corn+DW)、ベンゾピレン単回投与後蒸留水投与 (Ben+DW) 群、ベンゾピレン投与後 100mg/kg β -NMN 投与 (Ben+ β -NMN) 群に分け、感覚刺激による定量的閾値評価法、酸化ストレス・抗酸化力測定法、Western blot 法を用いて検討した。その結果、 β -NMN の投与はベンゾピレン投与群に対し、感覚閾値上昇の抑制、酸化ストレス度の改善傾向、cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1) の発現増加の抑制、myelin basic protein (MBP) の発現低下抑制傾向、myelin-associated glycoprotein (MAG) の発現低下の抑制を示した。本研究の結果から、 β -NMN の投与は抗酸化作用と AHR 活性化抑制作用によりベンゾピレン中毒を抑制させることで感覚異常の症状改善に有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

カネミ油症事件発生からおおよそ 50 年の時間が経過した現在までも頭痛や倦怠感、痤瘡様皮疹などの後遺症が報告されている¹⁾。特に、末梢の感覚鈍麻やしびれ感、などの末梢神経障害が多く、多くの患者で報告されているが、その発生機序や治療方法については未だ不明な部分が多い²⁻⁴⁾。近年私たちはこれらの神経症状の発生機序や治療方法について、ダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを用いて動物実験を行い、ベンゾピレンの毒性が触・圧覚を伝える A β 線維に作用し、感覚異常等を発生させた可能性を確認した。また、その症状は抗酸化作用と AHR 活性化の阻害作用をもつケイヒの投与により改善される可能性を報告した⁵⁾。

β -Nicotinamide mononucleotide (β -NMN) は Vitamin B2 関連物質であり、ミ

トコンドリアに作用して Adenosine triphosphate (ATP) 産生量を亢進し、生命を延長する効果があると報告された。最近の in vitro と in vivo 研究では、ATP 産生量の増加作用だけではなく、ニューロンの axon や dendrite の発育促進や神経損傷からの回復促進、神経保護作用、血液脳関門 (blood-brain barrier、BBB) を通過しての脳組織の保護作用まで確認されている⁶⁻⁸⁾。これらの報告から β -NMN はダイオキシン類似化合物の複合中毒で起こる感覚鈍麻やしびれ感などの末梢神経障害等の症状改善に影響を与える可能性が考えられる。従って、本研究では、2 週間以上のベンゾピレン投与によるベンゾピレン暴露ラットにおける β -NMN の効果を感じ覚刺激による定量的閾値評価、酸化ストレス・抗酸化力の測定、Western blot 法を用いて検討することを目的とした。

B. 研究方法

5週齢のWistar系雄性ラット(SLC株、静岡)を用いて、Corn-oil 2週間連続投与後蒸留水投与群(Corn+DW)、ベンゾピレン 2週間連続投与後蒸留水投与群(Ben+DW)、ベンゾピレン 2週間連続投与後 β -NMN投与群(Ben+ β -NMN)に分けた。Corn-oil投与群ではCorn-oilを、ベンゾピレン投与群では30mg/kgベンゾピレンを経口投与器でそれぞれのラットに2週間、一回500 μ lずつ胃に直接に投与した。2週間のベンゾピレン投与後からCorn-oil投与群とベンゾピレン投与群には蒸留水、 β -NMN投与群には30mg/kg、100mg/kgの β -NMNを、それぞれ経口投与器を用いて500 μ lずつ、4週間胃に直接投与した。時間的経過による感覚の変化は小動物用電気刺激装置(STG2000バイオリサーチセンター)を用いて電気刺激による感覚閾値を測定した。測定に際しては、ラットを拘束装置に入れて一定時間放置し、ラットが環境に慣れた頃合いをみて開始した。周波数5Hz、250Hz、2000Hzの正弦波電機刺激を覚醒下のラット右後肢足底部に与え、刺激を与えてからラットの逃避反応が観察された時点までの時間を計測し、p-clampソフトウェア(Axon Instrument社製)で、刺激時間から刺激強度(μ A)を換算した。最終日の行動実験実施後、直ちに3種混合麻酔薬を用いてラットを麻酔し、心臓から採血後、左右の坐骨神経と脊椎標本を採集し、 -80°C に凍結した。血液試料は遠心分離し、取り出した血清を用いて、72時間以内に酸化ストレスと抗酸化力の測定を行った。測定機器はフリーラジカル解析装置FREE CARRIO DUO(WISMERLL社)を用いた。凍結した坐骨神経と脊椎標本は解凍後、T-PER Tissue Protein Extraction Reagent(Thermo Fisher Scientific)を用いてタンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液はcytochrome P450 (P450) 1A1(CYP1A1, Santa Cruz Biotechnology)、

myelin basic protein (MBP, Cosmo Bio)、myelin-associated glycoprotein (MAG, Cosmo Bio)、 β -Actin(Cell Signaling Technology)の抗体を用いてタンパク質自動分析装置、WES (Protein simple)により分離し分析を実施した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育および実験に関しては、熊本保健科学大学動物倫理委員会の許可(登録番号、動18-10)を得て行った。全身麻酔下でラットの心臓から採血を行い、その後過量の3種混合麻酔薬を腹腔内に追加投与して死に至らしめるため痛みなどの侵襲は殆ど無い。

C. 研究結果

1. 体重の変化

ベンゾピレンの摂取が体重の変化に及ぼす影響を検討した。図1はベンゾピレン投与前を0日とした1週間ごとの体重の推移を示す。Corn-oil + 蒸留水投与群(Corn+DW)、30 mg/kgベンゾピレン + 蒸留水投与群(Ben+DW)、30 mg/kgベンゾピレン + β -NMN投与群(Ben+ β -NMN)共に最終測定時には200g程度の体重増加を示し、有意な体重の変化はみられなかった(図1)。

2. 感覚閾値の経時的变化

ベンゾピレンの経口投与後、電気刺激による感覚閾値の経時的变化を小動物用電気刺激装置で測定した。その結果、5Hz、250Hzの電気刺激周波数による感覚閾値の測定では、各群若干の閾値の変化がみられたが、有意差は認められなかった(図2A、B)。2000Hzの電気刺激周波数による感覚閾値変化においては、Corn+DW群に対し、Ben+DW群で感覚閾値の有意な上昇がみられた。しかし、Ben+ β -NMN群では、その感覚閾値上昇の抑制がみられた(図2C)。

3. CYP1A1、MBP、MAG タンパク質の変化に及ぼす影響

ベンゾピレン経口投与ラットに対する β -NMNの作用メカニズムを調べる為に取り出した坐骨神経からCYP1A1(図3A)、MBP(図3B)、とMAG(図3C)タンパク質の変化を測定した。AHRの標的遺伝子であるCYP1A1に関しては、Ben+DW群において、Corn+DW群に比べ、CYP1A1タンパク質の有意な発現増加がみられたが、Ben+ β -NMN群においては、その発現増加の抑制傾向がみられたが有意差はなかった。MBPタンパク質においては、各群若干の変化はみられたが、有意差はなかった。MAGタンパク質においては、Ben+DW群でCorn+DW群より発現の低下がみられたがBen+ β -NMN群においてはその低下の抑制がみられた。

4. ベンゾピレン、 β -NMN投与が酸化ストレスと抗酸化力に及ぼす影響

ベンゾピレン投与と β -NMNの投与が酸化ストレスに及ぼす影響について検討するために、血清を用いて酸化ストレスと抗酸化力を測定した。図4は酸化ストレス(図4A)と抗酸化力(図4B)、酸化ストレス度(図4C)の結果を示す。酸化ストレスに関しては、Corn+DW群に対し、Ben+DW群で酸化ストレスの有意な増加がみられ、Ben+ β -NMN投与群ではその酸化ストレス増加の抑制傾向がみられたが、有意差は認められなかった(図4A)。抗酸化力に関しては、Corn+DW群に対し、Ben+DW群で抗酸化力の抑制傾向がみられたが、有意差は認められなかった。しかし、Ben+ β -NMN投与群については、ベンゾピレンによる抗酸化力抑制が改善する傾向にあったものの、有意差はなかった。これらの結果から酸化ストレス度を計算した結果が図4Cである。BAP/d-ROMs \leq 12.5の場合を酸化ストレス状態とみなす。酸化ストレス度では、Ben+DW群に対し、Ben+ β -NMN投与群で酸化ストレス状態の改善傾向が見られたも

の、有意差は認められなかった。

D. 考察

本研究ではダイオキシン類似化合物中毒による末梢神経障害症状を呈したラットへの β -NMN投与が及ぼす影響について検討した。その結果ベンゾピレンの投与による体重への影響は若干の変化はみられたが、有意差はなかった。感覚閾値の経時的変化では、ベンゾピレン投与群では2000Hz電気刺激で感覚閾値の上昇が認められ、ベンゾピレン+ β -NMN投与群で感覚閾値上昇抑制がみられた。

ダイオキシン類は、化学的化合物の一種で、難分解性の環境汚染物質(POPs)である。ヒトへの暴露の90%以上は、食物、主として肉類、乳製品、魚介類を通じてであり、毒性が強く、生殖や成長面の問題を引き起こす可能性があり、免疫システムやホルモン、神経に障害をもたらす、発がん性もある⁹⁾。カネミ油症事件は食用油にポリ塩化ビフェニル(PCB)などのダイオキシン類が製造過程で混入し、その食用油を摂取した人々やその胎児に障害などが発生した、西日本一帯における食中毒事件である。カネミ油症事件は発生から50年が過ぎた現在までも顔面などへの色素沈着や塩素挫瘡(クロロアクネ)など肌の異常、頭痛、手足のしびれ、肝機能障害など様々な後遺症で苦しんでいる患者さんは少なくない。特に、一部の患者では自律神経失調症、末梢の感覚鈍麻やしびれ感等の末梢神経障害および中枢経障害等が報告されている⁴⁾。

近年、我々はカネミ油症の末梢のしびれ感と神経線維の関係についてダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを用いた動物実験を行った。その結果、ベンゾピレン投与がA β 神経線維の伝導速度の低下に影響を与える可能性を確認した。A β 線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感と関係が有ると報告されてい

る¹⁰⁾。A β 神経線維は、2000Hz の電気刺激によって選択的に刺激することが出来ると植田ら¹¹⁾は報告しており、これらの結果から、本研究における 2000Hz の電気刺激による閾値の上昇はベンゾピレンの毒性による A β 線維の異常で発生した感覚異常である可能性が考えられる。また、末梢神経の障害による感覚異常では、感覚神経の伝導速度の遅延を認めることが多いとの報告がある¹²⁻¹⁴⁾。これらの結果から、ベンゾピレンの毒性による A β 線維の異常で 2000Hz の電気刺激による閾値の上昇が発生した可能性が考えられる。また、伝導速度が遅延した要因として脱髄が考えられる。脱髄は中の軸索は保たれ、髄鞘には障害が生じる現象である。脱髄性病変による感覚障害の電気生理学的検討では、感覚神経の伝導速度遅延が報告されており、脱髄疾患は四肢のしびれなど様々な神経症状が出る原因不明の難病で、神経を覆っているミエリンが消失し(脱ミエリン化)、神経信号がうまく伝達できなくなるために起こるとされている^{14,15)}。本研究では伝導速度の遅延と脱ミエリンの関係を検討するために MBP タンパク質と MAG タンパク質の発現を比較した結果、ベンゾピレン投与群で MAG タンパク質の有意な発現低下と MBP タンパク質の低下傾向がみられた。これらの結果から、ベンゾピレン投与群における感覚閾値の上昇はベンゾピレンの毒性により脱髄が起こることで、神経の伝導速度が低下し、感覚閾値が上昇した可能性が考えられる。

本研究の結果、 β -NMN の投与はベンゾピレン投与群に対し、感覚閾値上昇の抑制、酸化ストレス度の改善傾向、CYP1A1 の発現増加の抑制、MAG の発現低下を抑制させた。ダイオキシン類の毒性は、AHR を介して起こることと、様々な生薬が AHR 活性を抑制することが報告されている¹⁶⁾。近年、ケイヒの主成分であるシンナムアルデヒドが AHR の標的遺伝子である CYP1A1 タン

パク質の発現を阻害するとともに、抗酸化ストレス作用も持つことが報告されている¹⁶⁾。本研究ではベンゾピレン投与ラットに β -NMN を投与した結果ケイヒと同様の結果が得られた。最近の研究では、NMN の投与がニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (NAMPT) ノックアウトマウスの運動機能障害の改善と寿命も延長させることが明らかになり、ニューロンの NAMPT がミトコンドリアの生体エネルギー、運動機能、生存に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。NAMPT は、ビスファチンまたはプレ B 細胞コロニー増強因子としても知られ、哺乳類におけるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) サルベージ合成の酵素である⁶⁾。NAMPT-NAD 軸はエネルギー生産において重要な役割を果たし、SIRT、ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) および CD38 に接続する。それによってさまざまなストレスに対する強力な内因性防御システムを構成することが報告されている⁶⁻⁷⁾。Vitamin B2 誘導体である β -NMN は、これまでの in vitro と in vivo 実験で、ミトコンドリアに作用し ATP 産生量の増加、ニューロンの axon や dendrite の発育促進、神経損傷からの回復促進、神経保護作用、血液脳関門 (blood-brain barrier、BBB) を通過しての脳組織の保護作用、生命の延長などが確認されている⁶⁻⁸⁾。近年、多くの神経変性疾患はミトコンドリアの異常と関連していることが報告されている¹⁷⁾。また、ミトコンドリアが生理学および病理学的条件下で軸索の変性および再生において重要な役割を果たすことが確認されている。特にミトコンドリアの機能障害は、軸索変性の初期段階で発生し、酸化ストレス、エネルギー不足、ミトコンドリアダイナミクスの不均衡、ミトコンドリア輸送の欠陥、およびマイトファジー調節不全を伴う¹⁸⁾。ミトコンドリア輸送の強化、活性酸素種 (ROS) のクリアランス

および生体エネルギーを改善することで、軸索再生に大きく影響を与えることが報告されている¹⁸⁾。これらの報告から、ベンゾピレンの投与はその毒性によりミトコンドリアの機能不全が起こることで軸索の変性による神経伝導速度の低下が起こる可能性が考えられ、 β -NMNの投与はベンゾピレンの毒性によって引き起こされるミトコンドリアの機能不全を抑制することによって得られる、本来の神経保護作用の維持、また機能不全となったミトコンドリアに作用し回復させることで axon や dendrite の神経損傷からの回復を促進させ感覚異常の症状を改善させた可能性が示唆される。

E. 結論

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

引用文献

- 1) Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxin, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disruptors what we have learned from Yusho disease. *Environ Res*, 86(1):2-11, 2001.
- 2) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司 : 油症患者における神経学的所見. *福岡医誌*, 60 : 462-463, 1969.
- 3) 岩下宏, 志田堅四郎, 増田義人 : 慢性油症患者における頭痛, 四肢異常感と血中 PCB. *福岡医誌*, 68 : 139-144, 1977.
- 4) 古谷博和, 大八木保政, 山田猛, 他 : 36 年以上経過した油症患者における神経症候. *福岡医誌*, 96: 152-156, 2005.
- 5) 申 敏哲, 行平 崇, 小牧龍二, 他: 感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討. *福岡医誌*, 112(2) : 155-163, 2021.
- 6) Yoshino J, Baur JA, and Imai SI : NAD⁺ intermediates: The biology and therapeutic potential of NMN and NR. *Cell Metab*, 27(3): 513- 528, 2018.
- 7) Kiss T, Nyúl-Tóth Á, Balasubramanian P : Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation promotes neurovascular rejuvenation in aged mice: transcriptional footprint of SIRT1 activation, mitochondrial protection, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects. *Geroscience*, 42(2):527-546, 2020.
- 8) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司 : 油症患者における神経学的所見. *福岡医誌*, 60 : 462-463, 1969.
- 9) 公益社団法人日本 WHO 協会: ダイオキシンとその人体への影響. https://japan-who.or.jp/factsheets/factsheets_type/dioxins-and-their-effects-on-human-health/ (2021 年 10 月 14 日)
- 10) 申 敏哲, 吉村 恵 : ベンゾピレンの末梢神経および脊髄感覚系シナプス伝達に及ぼす作用に関する研究検討. *福岡医誌*, 108 (3) : 27-34, 2017.
- 11) 植田 弘師, 松本 みさき : ニューロメーターを用いた新しい知覚線維選択的侵害受容評価法. *日本薬理学雑誌*, 131: 367-371, 2008.
- 12) Michalek JE, Akhtar FZ, Arezzo JC, et al : Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation

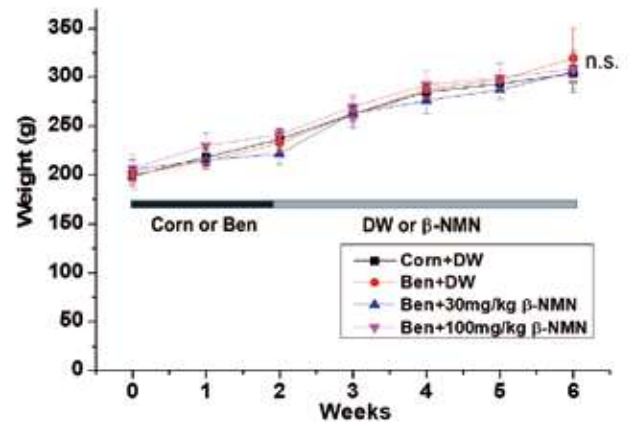
- Ranch Hand. Neurotoxicol, 22(4): 479-490, 2001.
- 13) Thömke F, Jung D, Besser R, et al : Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans. Acta Neurol Scand, 106(3): 155-158, 2002.
 - 14) 三井 良之, 楠 進 : 末梢神経の障害. 日本内科学会雑誌, 97(8):1771-1777, 2008.
 - 15) 荒記俊一, 村田勝敬 : 鉛による末梢神経障害の診断. 産業医学, 26(1):3-8, 1984.
 - 16) Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, et al: Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. J Dermatol Sci, 85(1): 36-43, 2017.
 - 17) Mandal A, Drerup CM: Axonal Transport and Mitochondrial Function in Neurons. Front Cell Neurosci, 9:13:373, 2019.
 - 18) Wang B, Huang M, Shang D, et al: Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration. Front Aging Neurosci, 13:650038, 2021.

の効果検討. 第72回西日本生理学会.
2021年11月5日.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

図1. ベンゾピレン、β-NMN 投与による体重の変化

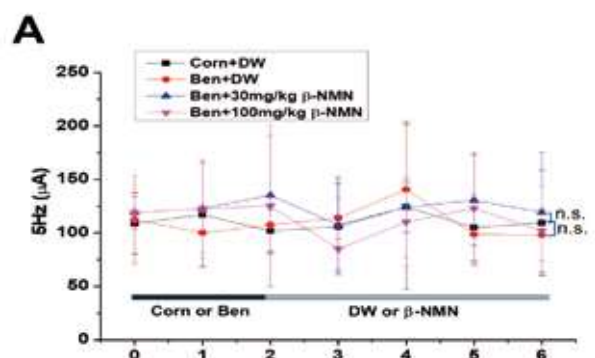


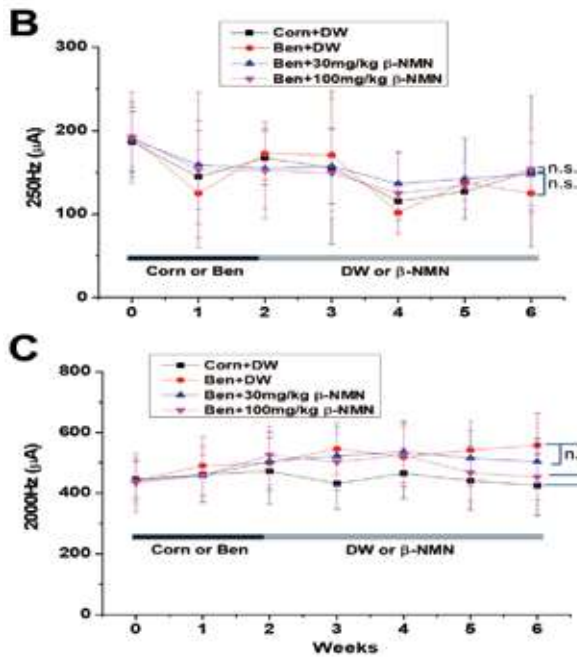
Corn, Corn-oil; DW, 蒸留水; Ben, 30mg/kg ベンゾピレン; β-NMN, β-Nicotinamide mononucleotide; n.s., no significant; Mean±S.D.; n=6

F. 研究発表

1. 論文発表
 1. **申敏哲**, 行平崇, 小牧龍二, 福永貴之, 田中哲子, 土井 篤, 吉村 恵. 感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討. 福岡医誌 112(2): 155-163, 2021.
2. 学会発表
 - ① **申敏哲**, 行平 崇, 小牧 龍二, 田中 哲子, 福永 貴之, 亀山 広喜, 坂本 亜里沙, 吉村 恵. 感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するβ-NMN

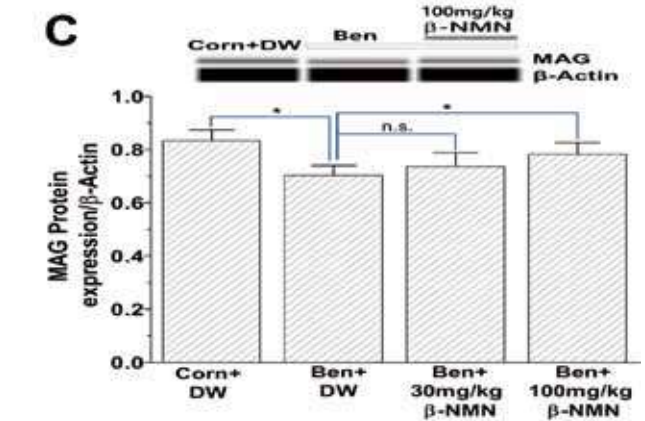
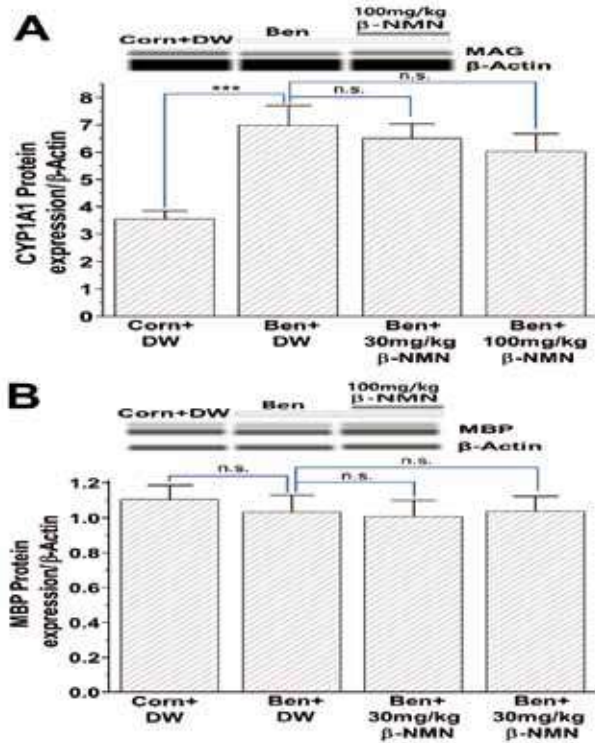
図2. ベンゾピレン、β-NMN 投与による感覚閾値の経時的変化





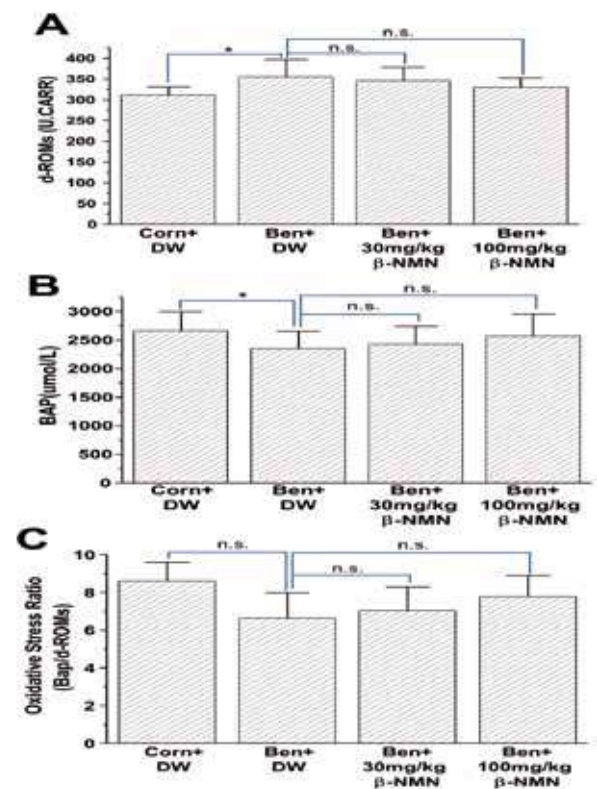
(A), 5Hz ; (B), 250Hz ; (C), 2000Hz ; Corn, Corn-oil ; DW, 蒸留水 ; Ben, 30mg/kg ベンゾピレン ; β -NMN, β -Nicotinamide mononucleotide ; *, $P < 0.05$; n.s., no significant ; Mean \pm S.D. ; n=6

図 3. ベンゾピレン、 β -NMN 投与による CYP1A1、MAG タンパク質の変化



(A), CYP1A1 タンパク質の変化 ; (B), MBP タンパク質の変化. ; (C), MAG タンパク質の変化. Corn, Corn-oil ; DW, 蒸留水 ; Ben, 30mg/kg ベンゾピレン ; β -NMN, β -Nicotinamide mononucleotide ; CYP1A1, cytochrome P450 (P450) 1A1 ; MBP, myelin basic protein. ; MAG, myelin-associated glycoprotein. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; n.s., no significant ; Mean \pm S.E. ; n = 6

図 4. ベンゾピレン、 β -NMN 投与による 酸化ストレス、抗酸化力の変化



(A), d-ROMs (酸化ストレス); (B), BAP (抗酸化力); (C), 酸化ストレス度; Corn, Corn-oil; DW, 蒸留水; Ben, 30mg/kg ベンゾピレン; β -NMN, β -Nicotinamide mononucleotide; n.s., no significant; Mean \pm S.E.; n=6

分担研究報告書

Ah リガンドと消化管における腸内細菌の研究

研究分担者 鳥巢 剛弘 九州大学病態機能内科 講師

研究要旨 油症のメカニズムとして、ダイオキシン類が Ah 受容体を介した過剰な活性酸素を生じることが一因と考えられている。生理的な Ah 受容体のリガンドとして腸内細菌叢で産生されるインドール化合物が知られているが、小腸の細菌叢は採取が困難で、腸内細菌の分布は不明であった。今回バルーンアシスト内視鏡を用い、小腸を含む全消化管と便の検体を採取し、メタゲノム法により全消化管の腸内細菌の分布を網羅的に明らかとした。十二指腸や空腸にインドール化合物の代謝に関わる細菌が豊富であった。今後、ダイオキシン類による過剰な Ah 受容体刺激と生理的リガンドによる機能の差の解明が期待される。

A. 研究目的

ダイオキシン類による中毒である油症が発生し約 50 年が経過し、病態の分子機構も部分的に明らかになった。ダイオキシン類は生体内に取り込まれたのち芳香族炭化水素受容体 Ah 受容体に結合する。Ah 受容体はリガンドと結合すると ARNT と 2 量体を形成し Ah 受容体が細胞質から核内へ移行することにより CYP1A2 や CYP1B1 などを含む様々な転写産物が作られる。CYP1A2 や CYP1B1 はリガンドを分解するが、ダイオキシン類はその他の自然界の物質と比べ分解を受けにくく、強固に結合する。その結果 Ah 受容体シグナルが強くなることにより大量の活性酸素が作られるより毒性が発揮されると考えられている(1)。

ダイオキシン類による中毒である油症に関連する消化器症状として腹痛や下痢などが一般住民と比較して高頻度であるこ

とが知られている。油症患者では約半数、また長期経過した後においても約 3 分の 1 の患者に消化器症状が持続すると報告されている。(2)。Ah 受容体は消化管を含む様々な臓器に広く存在することから、消化管においても活性酸素が亢進し症状が出現すると考えられている。Ah 受容体は元来生体に存在し、生理的な役割も担っている。腸内細菌から産生されるインドール系化合物は最も重要な生理的なリガンドとして知られている。また、小腸の細菌叢の採取は困難であったが、近年バルーンアシスト小腸内視鏡など小腸検査方法のモダリティの進歩により可能となってきた(3)。そこで今回、小腸内視鏡を用い消化管の粘膜関連細菌叢を網羅的に探索することにより生理的な Ah 受容体のリガンドの産生について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

当科において小腸内視鏡を施行した39人の被験者のうち消化管の外科切除歴がある人、炎症性腸疾患、3か月以内の抗生物質や整腸薬内服の内服歴のない29人を対象とした。胃、十二指腸、空腸、回腸、終末回腸、直腸、便検体の合計133検体の細菌叢を粘膜擦過法により採取した。16S rRNA 遺伝子領域をPCRにて増幅し、IlluminaMiseq[®]にてシーケンスを行った。バイオインフォマティクスの解析はQIIME およびPICRUStにて行い細菌組成の同定と細菌叢の予測メタゲノム解析を行った(4)。

C. 研究結果

消化管の各部位の粘膜関連の細菌叢の組成は胃、十二指腸、上部空腸は類似していたが、回腸は上部消化管から下部消化管の広い組成を有し、下部消化管の終末回腸と直腸は類似していた。便はやや異なっていた(Fig. 1)。属レベルの解析でVeillonella 属、Streptococcus 属が上部消化管で多く、回腸からEscherichia 属、回腸末端からBacteroides 属が増加し、便ではEscheria は少なく、Clostridium が増加することが特徴的であった(Fig. 2)。AhRのリガンドを産生することが知られているLactobacillus 属は比較的少ないものの十二指腸などの上部消化管で多かった(Fig. 2)。AhRリガンドを含むインドールの産生に関わる細菌については機能解析を行ったところ十二指腸や空腸に豊富であった(Fig. 3)。

D. 考察

これまで採取が困難であった小腸の腸内細菌も含め解析を行った。生理的なAh受容体のリガンドとして重要なインドール系化合物の産生に関わる細菌叢は十二指腸や空腸に豊富に存在することを明らかにした。また従来腸内細菌の研究で用いられている便検体は腸管内とやや異なることが示された。必須アミノ酸の一つであるトリプトファンは腸内細菌叢によりインドール系化合物に代謝され、Ah受容体シグナルを活性化する。それに伴いIL22やIL17の遺伝子発現を亢進させ腸管免疫や腸管バリアーに影響を及ぼす(5)。また高トリプトファン食はインドール系化合物の合成に関わる腸内細菌叢が増加し、腸内細菌の中ではLactobacillus reuteri が最も関与が示唆されている(6)。過去の多くの腸内細菌叢の検討が便でされている現状であるが、今回の検討ではLactobacillus reuteri や機能解析によるインドール化合物代謝は十二指腸など上部消化管に豊富であることが部位別に細菌叢を検索することで明らかにすることができた。タンパク質は十二指腸～空腸で消化吸収されるのでこの結果は妥当である。同様に油症におけるダイオキシン類の吸収も生理的なAh受容体リガンドと同様に十二指腸から空腸で吸収され全身に影響した可能性も推測される。今後生理的なAh受容体リガンドと油症における過剰なAh受容体刺激により共通点と相違点を明らかにすることでより病態理解が進むことが期待される。

E. 結論

ダイオキシン類の毒性に中心的役割を果たす Ah 受容体のリガンドであるインドール系化合物を産生に関わる腸内細菌叢の分布について示した。

参考文献

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

(2)Akahane M, Matsumoto S, Kanagawa Y, Mitoma C, Uchi H, Yoshimura T, Furue M, Imamura T. Long-Term Health Effects of PCBs and Related Compounds: A Comparative Analysis of Patients Suffering from Yusho and the General Population. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2018 Feb;74(2):203-217.

(3)Nakamura M, Yano T, Esaki M, Oka S, Mitsui K, Hirai F, Kawasaki K, Fujishiro M, Torisu T, Tanaka S, Iwakiri K, Kishi M, Matsumoto T, Yamamoto H. Novel ultrathin double-balloon endoscopy for the diagnosis of small-bowel diseases: a multicenter nonrandomized study. *Endoscopy.* 2021 Aug;53(8):802-814.

(4)Hirano A, Umeno J, Okamoto Y, Shibata H, Ogura Y, Moriyama T, Torisu T, Fujioka S, Fuyuno Y, Kawarabayasi Y, Matsumoto T, Kitazono T, Esaki M. Comparison of the microbial community

structure between inflamed and non-inflamed sites in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2018; 33 (9) 1590-1597

(5)Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, Carvalho A, Puccetti P, Romani L. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity.* 39, 372–385 (2013).

(6)Lamas B, Hernandez-Galan L, Galipeau HJ, Constante M, Clarizio A, Jury J, Breyner NM, Caminero A, Rueda G, Hayes CL, McCarville JL, Bermudez Brito M, Planchais J, Rolhion N, Murray JA, Langella P, Loonen LMP, Wells JM, Bercik P, Sokol H, Verdu EF. Aryl hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is decreased in celiac disease leading to intestinal inflammation *Sci Transl Med.* 2020 Oct 21;12(566).

消化管の各部位における β 多様性

Fig.1

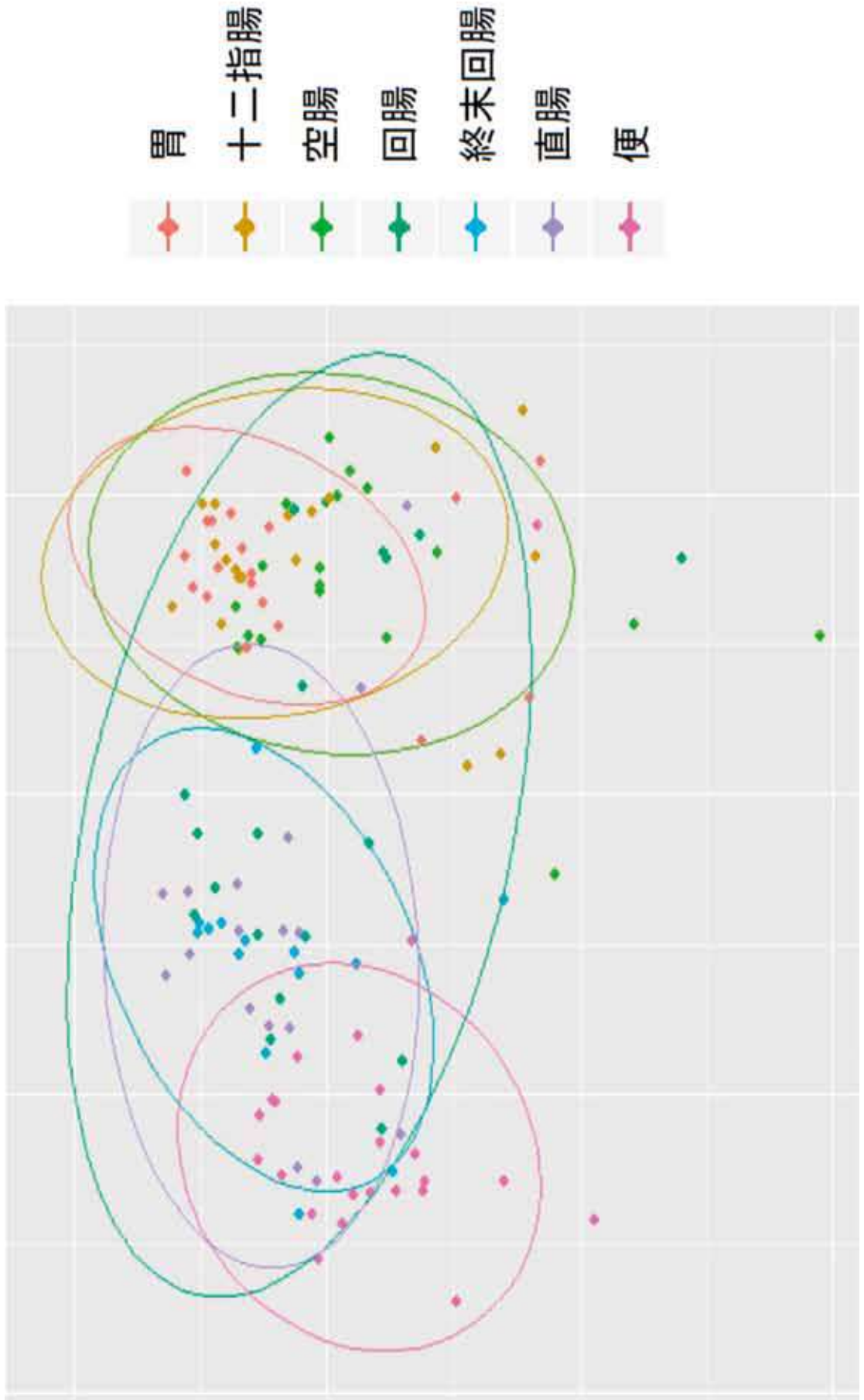


Fig.2 Genusレベルにおける各部位の細菌組成

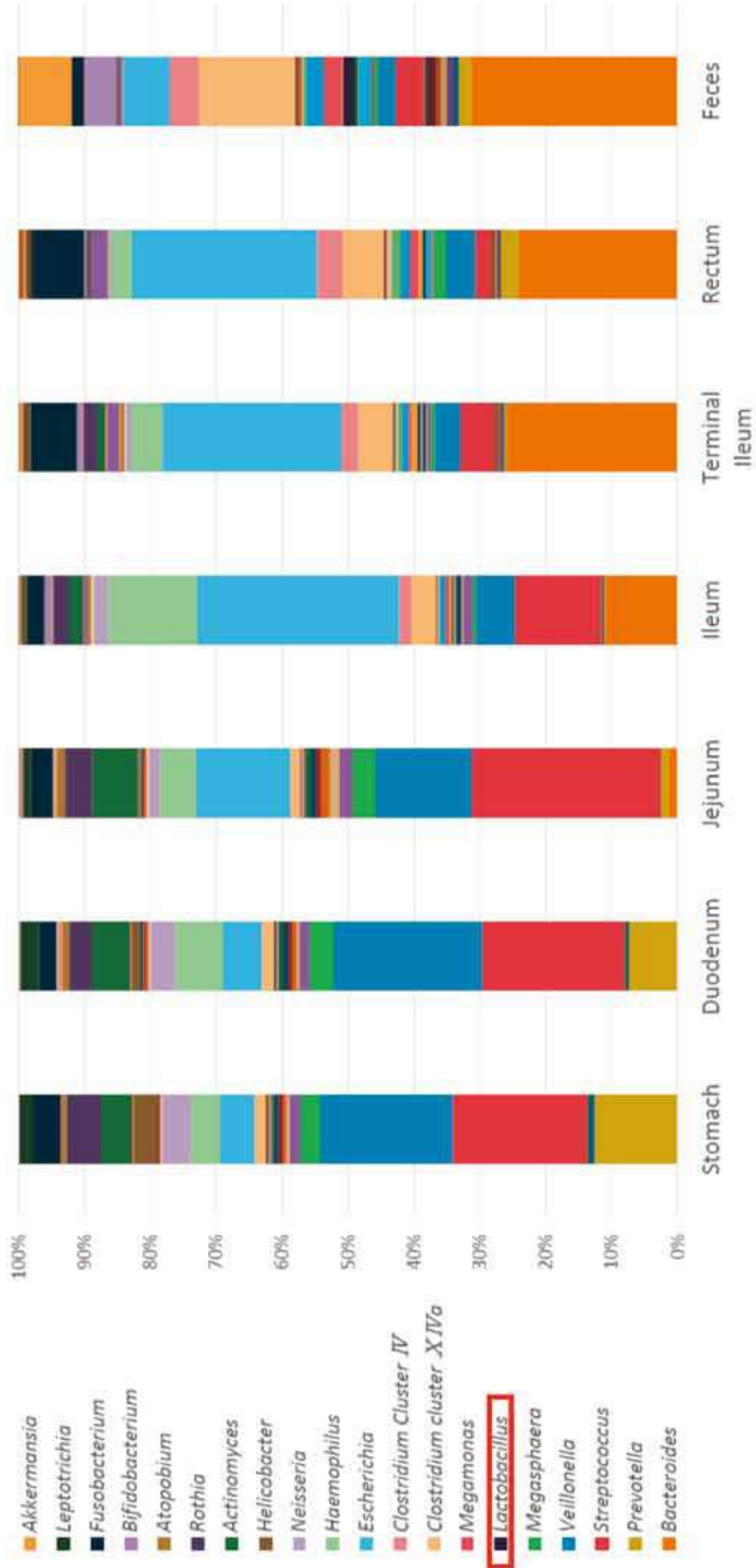
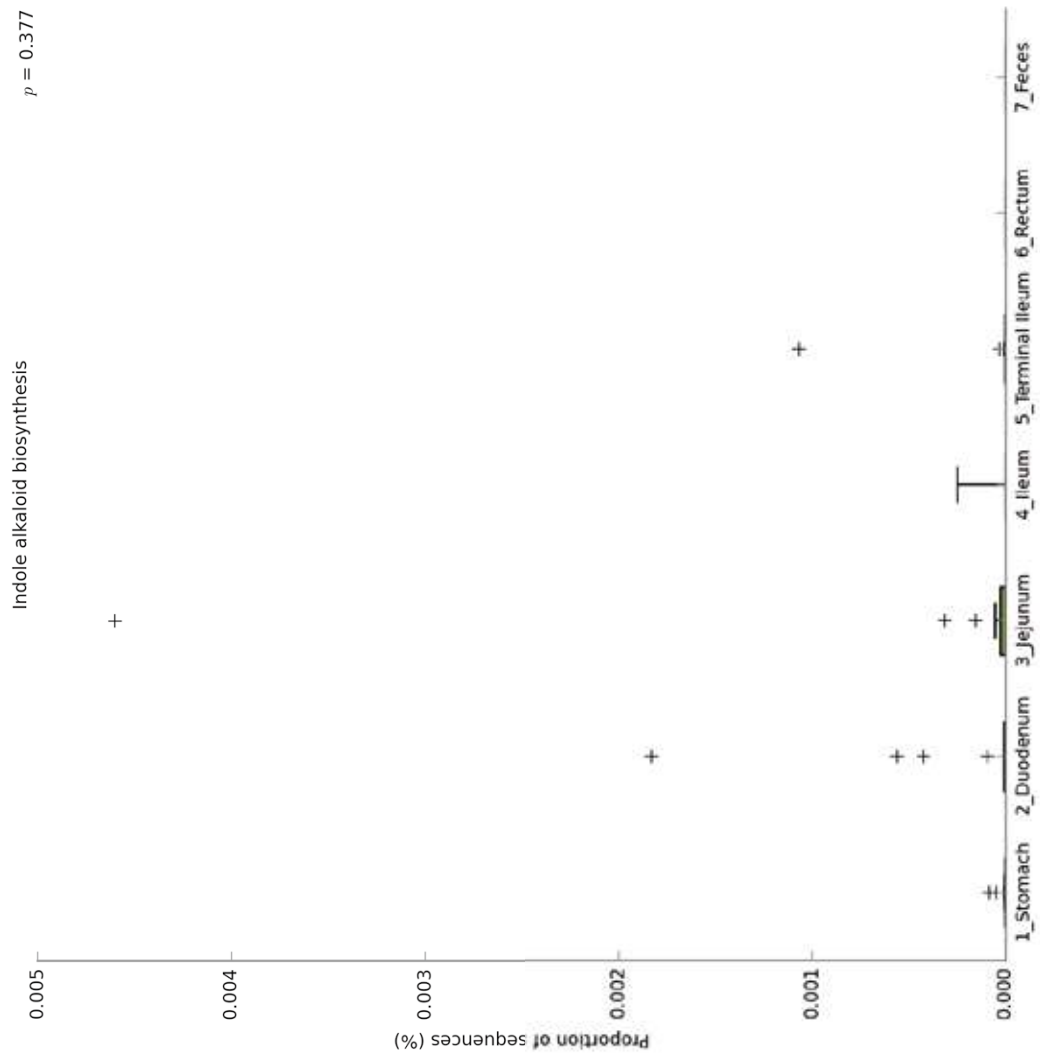


Fig.3 インドール化合物代謝に関わる細菌の消化管各部位における割合



分担研究報告書

低残留性である2,4,6-三塩素置換PCB異性体の動物肝マイクロゾームによる代謝

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

本年度は、低残留性 PCB である 2,4,6-三塩素置換型 PCB (246 型 PCB) の 1 つの 2,4,6,3',4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB168)につき、ラット肝マイクロゾーム(Ms)による代謝を調べた。肝 Ms は、未処理、phenobarbital (PB)前処理および 3-methylcholanthrene (MC)前処理ラット肝より調製した。37°Cで 60 分間反応したところ、未処理 Ms および MC 前処理 Ms では、代謝物は全く生成されなかった。一方、PB 前処理 Ms でのみ、代謝物が 1 種類(以下 M1 とする)生成された。PCB168 の検量線を用いて M1 を定量したところ、その生成活性は 9.58 nmol/hr/mg protein であった。次に、GC-MS で M1 (メチル誘導体)の分子量を調べた結果、388 であり、PCB168 より 30 大きいことが明らかになった。この結果から、M1 は一水酸化(OH)体であることが示唆された。さらに、予想代謝物として 3-MeO-PCB168 を別途合成し、GC-MS において M1 (メチル誘導体)と比較したところ、分子量および保持時間が完全に一致した。以上の結果から、①PCB168 は、2,4,6-三塩素置換ベンゼン側の *meta* 位 (3 位) が主に水酸化されること、②M1 の生成には PB 誘導性の CYP2B1 が強く関与すること、③3-あるいは 3'-OH 体の生成され易さを他の 246 型 PCB と比較すると、PCB168 > PCB155 > PCB182 > PCB154 であることが明らかになった。

A. 研究目的

PCB類は一般に高残留性であるといわれるが、ヒト組織中で高濃度残留しているものは、共通して2,4,5-三塩素置換あるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有している(以下、245型および2345型と略する)。Todakaらは、油症患者および健常者のいずれでも、特に、2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (hexaCB) (PCB153)、2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (heptaCB) (PCB180)および2,2',3,4,4',5'-hexaCB (PCB138)が多いこと、さらに、これらは油症患者で健常者の1.6～2.2倍多いこと、を報告した。

一方、PCB182、PCB188、PCB155、等の246型PCBはヒト組織からほとんど検出されていない。当研究室ではこれまでに、2345型でかつ246型でもあるPCB182の代謝を、ラットおよびモルモット肝マイクロゾーム(Ms)を用いて調べ、その結果、いずれの動物肝Msも代謝物M1 (3'-OH体)を生成すること、さらに、

phenobarbital (PB)前処理ラットでは、他のheptaCB (PCB180、PCB183、PCB187)に比べ、10～50倍もの高い活性でM1を生成することも明らかにした。さらに、246型のPCB188についても検討し、その結果、PCB182と同様に比較的容易にM1 (3'-OH体)へと代謝されることを明らかにした。

これらの結果は、低残留性のPCBは塩素数が6～7個と多くても、塩素置換位置が2,4,5位から2,4,6位に変わっただけで、非常に代謝され易くなることを示唆している。本研究では、この点をさらに確かめるため、246型PCBの1つである2,3',4,4',5',6-六塩素化ビフェニル(PCB168)のラット肝Msによる代謝を調べた。

B. 研究方法

① PCB168 合成 : 3,4,5-trichloroaniline および 1,3,5-trichlorobenzene を、tetrachloroethylene に溶解し、isopentyl nitrite を添加後、

110℃で24時間反応させた。反応液をchloroformで抽出後、アルミナカラムおよびシリカゲルカラムにかけ、最終的に分取用HPLCで精製した。HPLCの分析条件は以下の通りである。収量は60mgで純度は99.5%(GC-ECDによる)であった。分析機器、高速液体クロマトグラフLC-10AT(島津製)；カラム、Inertsil ODS-HLカラム(10×250mm i.d.、5µm、GL Sciences製)；移動相、acetonitrile；流速、4mL/min；検出波長、254nm。② 予想代謝物 3-MeO-PCB168の合成：3,4,5-trichloroaniline および 2,4,6-trichloroanisole を合成原料とし、以下、PCB168合成と同様に行った。③ ラット肝 Ms の調製：Wistar 系雄性ラット(体重約220g)を各群4匹ずつ合計16匹用いた。ラット肝 Ms は、未処理群、PB前処理群(80mg/kg体重×3日間)および3-methylcholanthrene (MC)前処理群(20mg/kg体重×3日間)のラットから、常法により調製した。④ 肝 Ms による PCB168 代謝：40µM PCB168をNADPH生成系(0.33mM NADP、5mM glucose-6-phosphate、glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.0 unit)、6mM MgCl₂、ラット肝 Ms (1mg protein)および100mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)とともに合計1.0mLとして、37℃で60分間インキュベート後、反応液に chloroform-methanol (2:1) 1mLとn-hexane 3mLを加えボルテックスで振とう抽出した。抽出は2回行い、有機層を合わせて濃縮後、diazomethane でメチル化し、GC-ECDで代謝物の定量を行った。GC-ECDの測定条件は以下の通りである。分析機器、GC-ECD(Agilent製)；カラム、DB-1フューズドキャピラリーカラム(30m×0.25mm i.d.、0.25µm フィルム厚、J&W Scientific製)；キャリアーガス、高純度 N₂ (6.5 mL/min)；カラム温度、210℃；注入口温度、270℃；検出器温度、350℃。また、一部を分子量測定のためGC-MSに付した。GC-MSの測定条件は次の通りである。分析機器、GCMS-QP2010(島津製)；カラム、DB-1 フューズドキャピラリーカラ

ム(30m×0.25mm i.d.、0.25µm フィルム厚、J&W Scientific製)；キャリアーガス、He (1 mL/min)；カラム温度、70℃ (1.5min) - 20℃/min - 230℃ (0.5min) - 4℃/min - 280℃ (5min)；注入口温度、250℃；検出器温度、230℃。(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

ラット肝Msにより生成された代謝物の化学構造：PCB168を、NADPH存在下、好氣的にラット肝Msとともに、37℃、60分間反応した。Fig. 1にGC-ECDにおけるクロマトグラムを示した。PB前処理Msでは、PCB168(保持時間6.07min)に続き、1つの代謝物ピーク(以下M1とした)が保持時間9.86minに検出された。しかしながら、未処理およびMC前処理MsではM1は全く生成されなかった。

次に、PB前処理ラット肝 Ms により生成された M1(メチル化体)の分子量をGC-MSにより測定した。Fig. 2にその結果を示す。M1(メチル化体)は、分子量388を有しており、PCB168の分子量より30大きいことから、一水酸化体(メチル化体)であることが明らかになった。

さらに、M1のGC-MSにおける分析結果を、別途合成した予想代謝物3-MeO-PCB168と比較した(Table 1)。その結果、M1(メチル化体)は、分子量およびGCにおける保持時間が、別途合成した3-MeO-PCB168と、完全に一致した。これらの結果から、M1は3-OH体であると推定された。なお、今回は、GC-MS機器へのM1の注入量が少なかったためか、ノイズが多く、正確なフラグメント([M⁺-15]および[M⁺-43])が得られず、比較するには至らなかった。

ラット肝 Ms の PCB168 代謝活性：PCB168の検量線を用いて、M1の定量を試みた。その結果、Table 2に示すように、PB前処理 Ms の M1 生成活性は、9.58 nmol/hr/mg protein であ

った。この値は、これまでに報告した 246 型 PCB のうち、最も高く、PCB168 > PCB155 > PCB182 > PCB154 の順となった。

D. 考察

今回、ラット肝 Ms を用いて PCB168 代謝を調べたところ、PCB168 は PB 前処理 Ms により、容易に代謝され、1 種類の一水酸化体 M1 に変換されることが明らかになった。また、M1 は、合成標品との比較により、3-OH-PCB168 であることが判明した。これらの結果から、PCB168 代謝には、PB 前処理により顕著に誘導されるラット CYP2B1 が関与すること、また、この CYP は 246 型 PCB ではいずれも *meta* (3, 3', 5 あるいは 5') 位に対し、より強い水酸化活性を有していることが示唆された。しかしながら、246 型 PCB における *meta* 位水酸化活性をみると、PCB154 を 1 とした場合、2~17 倍の差異がある。現在のところ、このような差異が何によるのかは説明できないが、化学構造から考察すると、PCB 骨格の 4 位から 4' 位までを軸として塩素が対照に置換されている場合、CYP2B1 にとってより良い基質になるのかもしれない。

E. 結論

PCB168は、PB誘導性のラットCYP2B1により、1種類の一水酸化体（3-OH体）へと代謝されること、また、これまでに報告した246型PCBのうち、最も水酸化されやすいことが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 太田千穂, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村 治, 古賀信幸, 2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル(PCB155)のラット, モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム, およびヒトチト

クロム P450 による代謝. 福岡医誌 **112**, 127-135 (2021).

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

2. 学会発表

- 1) 太田千穂, 加藤善久, 原口浩一, 藤井由希子, 木村 治, 遠藤哲也, 古賀信幸, 2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル(PCB155)のヒト肝ミクロゾームおよびチトクロム P450 分子種による代謝. 日本薬学会第 141 回年会 (広島), 令和 3 年 3 月 25 -28 日. (新型コロナウイルスのため中止)
- 2) 太田千穂, 出口昌代, 木村 治, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 古賀信幸, Quercetin pentamethylether (QPM)の 5-脱メチル化体の *in vitro* 代謝. 第 75 回日本栄養・食糧学会大会 (東京), 講演要旨集, p. 27. 令和 3 年 7 月 3, 4 日. (オンライン開催)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

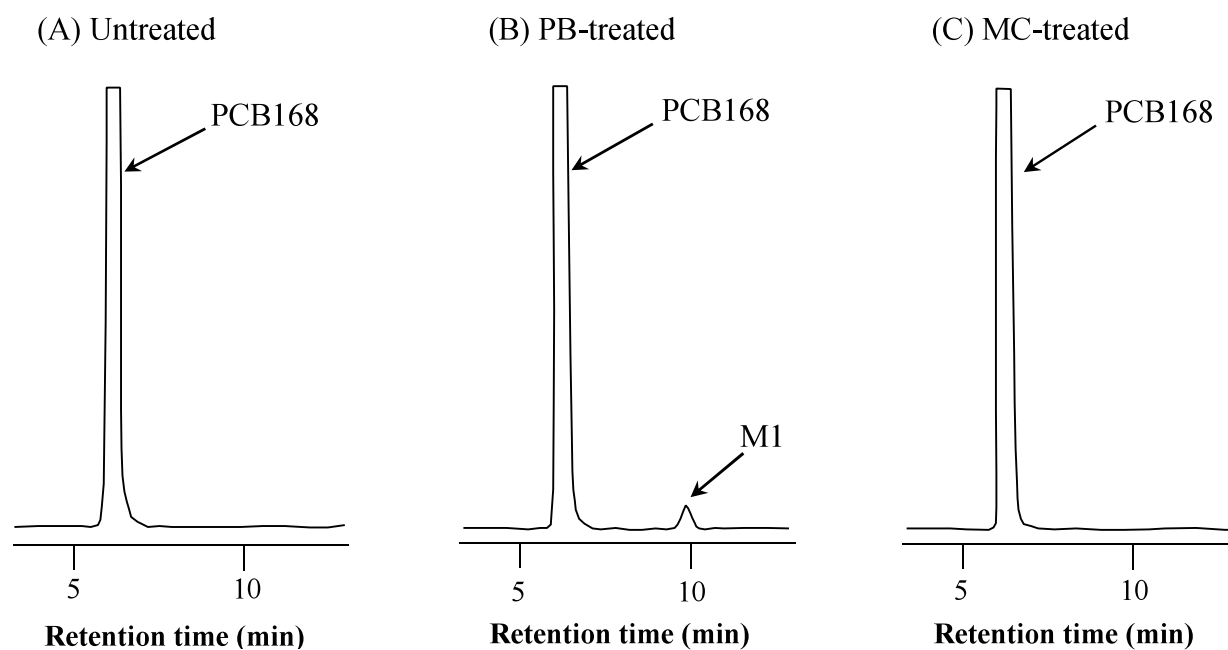
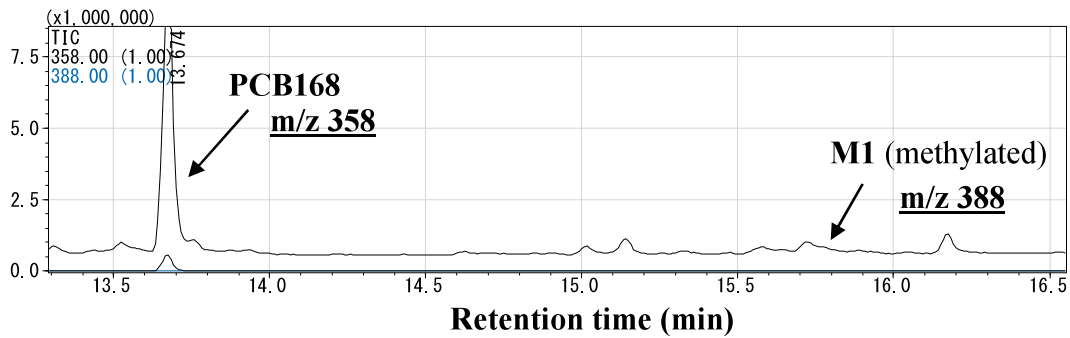


Fig. 1 GC-ECD chromatograms of PCB168 and its metabolite M1 (the methylated derivative) formed by liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated rats

(A) Mass chromatogram



(B) Mass spectrum of the methylated M1

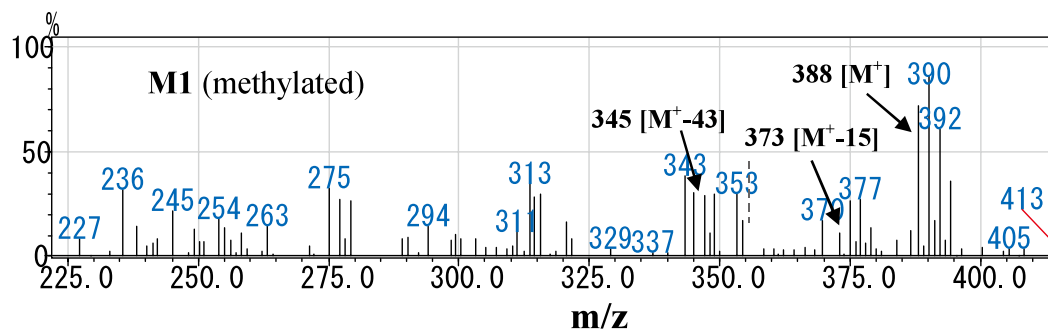


Fig. 2 GC-MS analysis of PCB168 and the methylated derivative of its metabolite M1 formed by liver microsomes of PB-treated rats

Table 1 Mass spectral data and retention times of PCB168 and the methylated derivative of its metabolite M1

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min) in GC-MS
		[M ⁺]	[M ⁺ -15]	[M ⁺ -35]	[M ⁺ -43]	[M ⁺ -50]	[M ⁺ -70]	
PCB168	358	100	-	5	-	-	74	13.73
M1	388	100	-	-	-	-	-	15.78
3-MeO-PCB168	388	100	51	-	30	-	-	15.78

-, not detected.

Table 2 Comparison of metabolic pattern of PCB168 and other 246-type PCB congeners in liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated rats

PCB	Metabolite	M1 formed (nmol/hr/mg protein)		
		Untreated	PB-treated	MC-treated
PCB168	M1 (3-OH)	N.D.	9.58 ± 2.24	N.D.
PCB155	M1 (3-OH)	N.D.	4.66 ± 0.20	N.D.
PCB154	M1 (3'-OH)	N.D.	0.56 ± 0.14	N.D.
PCB182	M1 (3'-OH)	B.D.	1.37 ± 0.16	N.D.

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

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

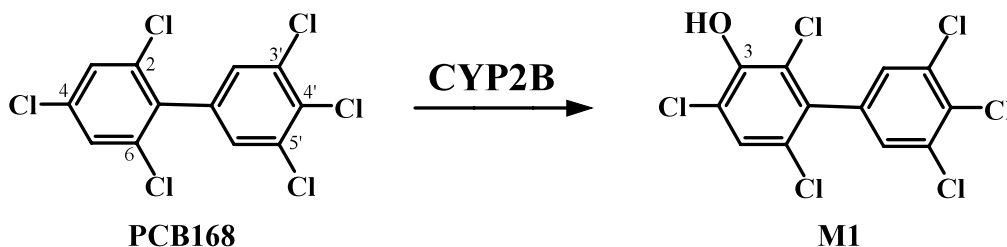
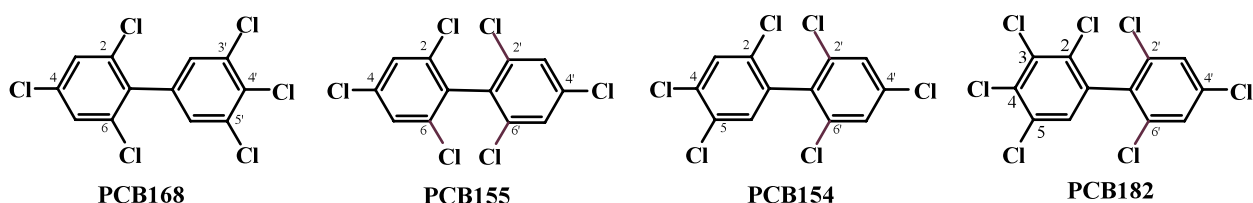


Fig. 3 Postulated metabolic pathways of PCB168 in rat liver

分担研究報告書

皮膚の慢性炎症におけるエンドセリン-1 と AHR の相互作用

研究分担者 中原 剛士 九州大学病院皮膚科 講師

研究要旨 紫外線照射により、皮膚ケラチノサイトからのエンドセリン-1 産生は確認されたが、その産生に対する AHR リガンドの影響は見られなかった。

A. 研究目的

我々は以前、様々な皮膚の慢性炎症において皮膚でのエンドセリン-1 (ET-1) 発現が上昇することを明らかにした。また、表皮細胞からの ET-1 産生は、皮膚の色素沈着を引き起こすことも知られている。そこで本研究では、様々な AHR アゴニストによる刺激が皮膚の色素沈着における ET-1 の作用にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒトケラチノサイト (NHEK) に紫外線 UV (40mJ/cm²) を照射し、RT-qPCR にて ET-1 の mRNA 発現量を確認した。同時に、様々な AHR リガンド (FICZ (100nM)・B[a]P (1μM)・Glyteer (10⁻⁵%)・tapinarof (500nM)) をそれぞれ添加、24 時間刺激を行い、同様に RT-qPCR にて ET-1 の mRNA 発現量への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

該当せず

C. 研究結果

UV 照射した NHEK における ET-1 の mRNA 発現量は増加した。しかし、様々な AHR リガンド刺激は、UV 照射による NHEK からの ET-1 産生に明らかな影響を与えることはなかった。

D. 考察

今回は皮膚の炎症に伴う色素沈着への AHR リガンドの影響を、紫外線による表皮細胞からの ET-1 産生増加を指標として評価した。し

かし、明らかな AHR リガンドの影響は見られなかった。そこで今後は、メラノサイトからのメラニン産生への ET-1 の効果に対する様々な AHR リガンドの影響を検討することで、皮膚の炎症に伴う色素沈着への AHR リガンドの影響を別の側面から評価する必要があると考えられた。

E. 結論

紫外線照射により、皮膚ケラチノサイトからの ET-1 産生は確認されたが、その産生に対する AHR リガンドの影響は明らかではない。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

膠原病の皮疹形成機序における AHR の役割に関する研究

研究分担者 冬野洋子 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教

研究要旨

膠原病の皮疹形成機序に、AHR が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

膠原病の皮疹形成機序については、未解明な点が多い。AHR、NRF2 経路や EGFR 経路には一部相互作用があることが既知であり、膠原病の皮疹形成における、AHR と、NRF2、EGFR 経路の関わりと、抗酸化物質が治療薬となる可能性について、検討する。

B. 研究方法

SLE の皮膚生検の病理組織を免疫染色し、CYP1A1、NRF2、HO1、pEGFR の免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いた実験は後ろ向きの観察研究として、九州大学の倫理審査委員会にて承認されている。遺伝子組み換え実験については、研究の進展により、必要になれば、文部科学省のガイドライン、九州大学遺伝子組換え実験指針に則り、遺伝子組換え実験審査委員会の承認を得た後に、適切に施行する。臨床研究ならびに遺伝子組み換え実験を行うための講習等を受講済みであり、学内委員会での研究実施の承認を得ている。

C. 研究結果

免疫染色で、SLE 患者群の表皮細胞で CYP1A1 の低下が確認され、AHR 活性化が低下していた。また、NRF2 の発現も減少していた。

D. 考察

膠原病の皮疹の病態形成に、AHR-NRF2 経路のクロストークが関与している可能性がある。

E. 結論

AHR の活性化による膠原病皮疹への影響について、さらなる検討が必要である。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析： 脳の性分化と生殖腺の発達に対する芳香族炭化水素受容体の寄与

研究分担者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野 准教授

研究要旨

妊娠ラットへの 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) の低用量曝露は、出生児に性未成熟を惹起する。我々はこれまでに、本障害が出生前後の性ホルモン合成抑制に起因することを突き止めてきた。さらに最近、芳香族炭化水素受容体 (AHR) 欠損ラットを用いた解析から、上位制御因子の黄体形成ホルモン (LH) の調節に AHR が関与する事実も突き止めつつある TCDD による出生児の性未成熟の機構解析を目指して、AHR 欠損ラットで検討を行った。その結果、AHR には、脳の性分化が起こる周産期及び思春期における重要な働きがあることが強く示唆された。そこで、さらに、ダイオキシンによる出生児性未成熟の機構における AHR の役割を明らかにするため、ダイオキシン暴露しない AHR 欠損ラットを調べ、脳の雄優位の性的二型核の体積が AHR 欠損雄児において有意に小さいことが分かった。次いで、思春期の血中 testosterone 低下の機構を調べるために、精巣における testosterone 合成酵素と testosterone 代謝酵素の発現レベルを調べた。合成酵素に関しては、有意な変動はなかったものの、cytochrome P450 17 (CYP17) に減少傾向があった。これは、testosterone の低下と同じ方向性のものである。一方、代謝酵素では、検討したいずれの酵素にも AHR 欠損による著しい発現変動は認められなかった。そこで、精巣重量に着目したところ、AHR 欠損ラットにおいて、思春期の精巣サイズが小さい可能性が浮上した。精巣のサイズに関係する遺伝子について、線維芽細胞成長因子 fibroblast growth factor (FGF) および FGF 受容体 (FGFR) の発現レベルが有意に増加していることが明らかになった。これらのことから、AHR は FGF および FGFR を直接あるいは間接的に調節している可能性がある。このように、AHR の脳性分化と性腺成熟における重要性が示されつつある。そこで、R3 年度は精巣のサイズに影響を及ぼす機構をさらに検証した。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) への抑制が示唆された。また、FGF の働きに必要な因子として、glypican および syndecan について検討したところ、glypican の一部の分子種に有意な抑制が観察された。AHR 欠損による FGF および FGFR の誘導は精巣重量低下に対する代償的な応答であると考えられた。先行研究において、思春期である 8 週齢で、AHR 欠損ラットの精巣重量の減少が明らかとなり、その代償的応答として、精巣の成長に関与する線維芽細胞成長因子 FGF (fibroblast growth factor) 及びその受容体である FGFR (FGF receptor) の発現が増加することが強く示唆された。しかしながら、精巣重量は有意に減少していることから、FGF の機能に重要な HSPG (heparan sulfate proteoglycan) の一種である、Gpc (glypican) および Sdc (syndecan) の mRNA 発現量を解析した。その結果、AHR 欠損によって Gpc4 の発現量が有意に減少し、Sdc4 で減少傾向が見られ、その他の HSPG には AHR による影響はほとんど見られなかった。また、HS (heparan sulfate) の発現や作用には、硫酸転移酵素やグルクロン酸転移酵素が重要である。HS6ST (Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase) による 6-O-硫酸化は FGF、FGFR、HSPG シグナル伝達複合体の形成に不可欠であ

り、Ogt (*O*-Glucuronosyl transferase) は HS 鎖の合成に必要である。この Ogt および HS6ST の mRNA レベルの解析を行った結果、AHR 欠損による影響はほとんど見られなかった。HDAC (histone deacetylase) はヒストンの脱アセチル化を触媒する酵素である。ヒストンの脱アセチル化は、遺伝子の転写を抑制する方向に働く。精巣での HDAC の mRNA 発現量を解析した。その結果、AHR 欠損によって HDAC2 および HDAC5 において、発現量が有意に低下することが明らかになった。また、その他の HDAC においても減少傾向を示した。思春期である 8 週齢では、FGF の増加にもかかわらず、精巣重量が低下していることは、HSPG 低下による FGF の機能不全であることが考えられ、これらの制御に AHR が重要であることが示唆された。また、精巣でのエピジェネティックな影響として、HDAC が FGF や FGFR の発現を制御していることが示唆された。

A. 研究目的

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

芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AHR) は、細胞質に存在するリガンド活性化型の転写因子である。リガンドと結合することで活性化され核内に移行する。核内に移行した AHR は、AHR nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成し、xenobiotic responsive

element (XRE) に結合して、標的遺伝子の転写制御を行う (7)。AHR は全身の組織に発現し、この転写制御を介して、薬物代謝経路及び毒性発現経路を仲介する。

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

当研究室では、AHR 欠損 (KO) ラットを作成し、ダイオキシンによる肝毒性発現における AHR の関与について研究を行っている (14)。また、同ラットを用いて、ダイオキシン非投与条件下においても、AHR 欠損による影響が解析されている。その中で、成熟期における精巣の機能低下や形態学的異常、さらに交尾行動における

異常が確認された(平成27年度分担研究報告)。また、胎児期において、脳下垂体ホルモンであるLHβおよび、性ステロイド合成の律速過程の中心的役割を担うStAR(steroidogenic acute-regulatory protein)のmRNA発現がAHR欠損により、胎生20日(gestational day 20, GD20)において低下することが確認されたことから(15)、AHRには胎児期の性ステロイド合成を介して性成熟および生殖機能に重要な役割があることが示唆された。これまでの当研究室の研究結果から、AHR欠損ラットでは上述のように雄の生殖機能の低下が顕著であることが示唆されている。しかし、その機構には未だ不明な点が多く残されている。平成30年度および令和元年度の検討により、WTとAHRヘテロ欠損雄胎児間でAHRのLHβのXRE配列への結合能に有意な差は見られなかった。一方、GD18において脳下垂体のLH産生細胞への分化に関与する因子、GATA2, Pitx1およびProp1の発現の有意な低下を認めた。AHRは胎児期の脳下垂体に作用しLH産生細胞への分化に重要な役割を示す可能性が浮上した。また、令和2年度、AHR欠損がPND28において脳の雄優位の性的二型核(sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, SDN-POA)の体積を有意に低下させることも示唆された。思春期の生殖腺の発達への寄与と作用機構の解明を目指し、testosterone低下の機構について検証する中で、精巣重量の低下を見出した。

線維芽細胞成長因子 fibroblast growth factor (FGF) は、発生、細胞増殖、代謝調節、創傷治癒および修復など、複数の生物学的機能を有していることが報告されている(16)。FGFは精巣での発現が確認されており(16)、FGFはその受容体であるFGF受容体(FGFR)に作用して効果を発揮する(17)。このため、FGF及びFGFRの発現へのAHR-KOの影響を調べた。その結果、精巣に発現するFGF1, FGF2,

FGFR1及びFGFR3すべてにおいてAHR-KOラットで有意に増加することが明らかになった。これらのことから、精巣重量の低下への代償的応答として、精巣の成長に関与するFGF及びFGFRの発現が増加することが強く示唆された。

そこで、本年度は、FGFの機能に重要なHSPG(heparan sulfate proteoglycan)とその関連遺伝子の発現を解析した。また、FGFの調節に重要なHDAC(histone deacetylase)についても検討した。

B. 研究方法

1. 動物実験

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

1-1. 児のAHR遺伝子型間での比較

雌雄のAHR-Hetラットを一晩交配し、翌朝膈内に精子が確認された場合、その日を妊娠0日目とした。出生後の成熟に対する影響を調べるため、母ラットを自然に出産させたのち、生後21目において離乳させた。遺伝子型を判別したのち、継続飼育を行い、8週齢にて実験に供した。精巣を摘出し、遺伝子解析を行った。

2. リアルタイム RT-PCR 法

組織よりtotal RNAを抽出したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser(タカラバイオ社)を用いてcDNAを合成した(18)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix(Life Technologies社)を用いて目的タンパク質のmRNA発現変動を解析した。解析は、ターゲットmRNAのthreshold cycle(Ct)値をβ-actin mRNAのCt値で補正した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第12条第4号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認のもとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。動物実験承認番号：A30-106及びA20-060。遺伝子組換え実験は、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」第10条第2項の規定に基づき、委員会の承認を得て行った（承認番号：26-4及び1-9）。

C. 研究結果

先行研究において、思春期である8週齢で、AHR欠損ラットの精巣重量の減少が明らかとなり（Fig. 1）、その代償的応答として、精巣の成長に関与するFGF及びその受容体であるFGFRの発現が増加することが強く示唆された（Fig. 2）。しかしながら、精巣重量は有意に減少していることから、FGFの機能に重要なHSPG (heparan sulfate proteoglycan) の一種である、Gpc (glypican) および Sdc (syndecan) の mRNA 発現量を解析した。その結果、AHR欠損によって Gpc4 の発現量が有意に減少し、Sdc4 で減少傾向が見られ、その他のHSPGにはAHRによる影響はほとんど見られなかった（Fig. 3）。

また、HS (heparan sulfate) の発現や作用には、硫酸転移酵素やグルクロン酸転移酵素が重要である。HS6ST (Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase) による6-O-硫酸化はFGF、FGFR、HSPGシグナル伝達複合体の形成に不可欠であり（19-22）、Ogt (O-Glucuronosyl transferase) はHS鎖の合成に必要である（23）。このOgtおよびHS6STのmRNAレベルの解析を行った結果、AHR欠損による影響はほとんど見られなかった（Fig. 4）。

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) は線溶系に重要なタンパクとして知られており、*in vitro* において、Sdcノックダウンにより、PAI-1のタンパク発現がアッ

プレギュレートされることが分かっている（24）。そのため、PAI-1のmRNAレベルの解析を行った。その結果、AHR欠損で減少傾向を示した（Fig. 5）。

HDAC (histone deacetylase) はヒストンの脱アセチル化を触媒する酵素である。ヒストンの脱アセチル化は、遺伝子の転写を抑制する方向に働く。先行研究において、HDACの発現が、TCDD依存的に胎児脳下垂体において誘導されることを見い出しており（25）、HDACはAHRによって制御されている。そこで、精巣でのHDACのmRNA発現量を解析した。その結果、AHR欠損によってHDAC2およびHDAC5において、発現量が有意に低下することが明らかになった（Fig. 6）。また、その他のHDACにおいても減少傾向を示した。

D. 考察

本研究では、AHRの性成熟への寄与を遺伝子レベルで検討した。令和2年度の検討により、8週齢でAHR欠損による精巣重量の低下、およびその成長に関わる因子であるFGFの発現増加が明らかとなった。FGFはその受容体FGFRに結合することで作用を発揮する。しかしFGFは分解されやすいため、HSPGによる相互作用が作用発現に必要であると考えられている。HSPGは糖タンパク質であり、コアタンパク質に1つまたは複数の共有結合したHS鎖を含んでいる（26）。FGFがFGF、FGFR、HSPG三元複合体の形態でFGFRと結合すると、FGFRの二量体化を形成し（27-29）、細胞内領域のチロシン残基がリン酸化され、シグナル伝達複合体が形成される。その後、RAS/MAPキナーゼ経路、PI3キナーゼ/AKT経路、PLC γ 経路などのシグナル経路が多数誘導され、特異的な細胞応答を引き起こすことが知られている（27, 28, 30-32）。そこで、精巣における、HSPGの一種であるGpc

(glypican) および Sdc (syndecan) の mRNA 発現量を解析した。その結果、AHR 欠損によって Gpc4 の発現量が有意に減少し、Sdc4 で減少傾向が見られた。その他の HSPG には AHR による影響はほとんど見られなかった。

また、HS 鎖の合成には グルクロン酸転移酵素が関わっており、HS 鎖は硫酸転移酵素によって硫酸化されている。硫酸化はヘパラン硫酸鎖上不均一になされ、種々の程度に修飾され複雑な硫酸化パターンを持った HS 鎖が形成される。この特定の硫酸化パターンが HS の生物学的活性に重要であることが報告されている (23)。この Ogt および HS6ST の mRNA レベルの解析を行った結果、AHR 欠損による影響はほとんど見られなかった。

PG (Proteoglycan) の硫酸転移酵素反応は、活性化されたヌクレオチド硫酸塩である PAPS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate) を普遍的な硫酸塩供与体として利用する (29)。この PAPS は PAPSS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthetase) により生合成される (33)。AHR 欠損で、HS6ST の mRNA 発現レベルに変動は見られなかったが、PAPS の変動による PG への硫酸転移が十分に行われていないことが考えられる。そのため、PAPS の合成酵素である PAPSS の変動を調べてみる必要がある。

次に、ヒストンを脱アセチル化することで、遺伝子発現を抑制する HDAC の mRNA について検討した。その結果、HDAC2 および HDAC5 の発現量が有意に低下し、その他の HDAC においても減少傾向を示した。従って、精巣においても、AHR が HDAC を介して遺伝子の発現調節を行っている可能性が示唆された。このことから、FGF および FGFR の発現増加が AHR による転写制御によるものかどうかを検討するため、思春期における野生型ラットと AHR 欠損ラットの精巣を用

いたクロマチン免疫沈降法により、FGF および FGFR 遺伝子の XRE への AHR 結合能の解析を行う必要がある。

また、性ステロイド合成に着目した検討も行いたい。思春期に分泌の増える男性ホルモンである testosterone は、精巣の発達、精子形成やその維持に關与する (34-35)。先行研究で、8 週齢の AHR 欠損ラットで精子数と testosterone の低下が明らかとなった。令和2年度の検討では、思春期の生殖腺の発達への寄与と作用機構の解明を目指し、testosterone の合成および代謝酵素の mRNA 発現の解析を行った。その結果、合成酵素である CYP17 の mRNA レベルに減少傾向が見られたものの、その他の合成および代謝に關与する酵素に AHR による影響はさほど見られなかった。Testosterone の前駆体には DHEA (dehydroepiandrosterone) や androstenedione などが知られており、それらは主に副腎で生成される (36)。また、DHEA や androstenedione は、8 週齢の AHR 欠損ラットで減少傾向を示した CYP17 の代謝産物であるため、AHR 欠損によりこれらの量が減少したために、相対的に testosterone の合成が減少した可能性が考えられる。そのことから、testosterone 合成の中間生成物である DHEA や androstenedione の血中濃度の解析が望まれる。

E. 結論

AHR の欠損は、思春期 8 週齢の精巣重量を低下させた。これが testosterone 低下、精子数の減少と關係する可能性がある。思春期である 8 週齢では、FGF の増加にもかかわらず、精巣重量が低下していることは、HSPG 低下による FGF の機能不全であることが考えられ、これらの制御に AHR が重要であることが示唆された。また、精巣でのエピジェネティックな影響として、HDAC が FGF や FGFR の発現を

制御していることが示唆された。AHRは、TCDDにより活性化され、その次世代毒性に関与するが、そのような影響が現れるのは、AHRが構成的条件下に、性成熟において重要な役割を担っているためだと考えられる。当研究室の先行研究で観察された影響は、ダイオキシンが、AHRの働きを攪乱させることを示唆しているのであろう。

F. 研究発表

1. フォーラム2021:衛生薬学・環境トキシコロジー (千葉、2021年9月10日-11日、オンライン)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

- 1) Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. *Crit Rev Toxicol*, **23**: 283-335 (1993).
- 2) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y, Yamada H. *Endocrinology*, **147**: 927-936 (2006).
- 3) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T, Yamada H. *J Pharmacol Exp Ther*, **329**: 1091-1099 (2009).
- 4) Hattori Y, Takeda T, Taura J, Ishii Y, Yamada H. *Endocrine*, **47**: 572-580 (2014).
- 5) Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Yamada H. *Toxicol Appl Pharmacol*, **281**: 48-57 (2014).
- 6) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
- 7) Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. *Biochim Biophys Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
- 8) Latchney SE, Hein AM, O'Banion MK, DiCicco-Bloom E, Opanashuk LA. *J Neurochem*, **125**: 430-445 (2013).
- 9) Harrill JA, Hukkanen RR, Lawson M, Martin G, Gilger B, Soldatow V, Lecluyse EL, Budinsky RA, Rowlands JC, Thomas RS. *Toxicol Appl Pharmacol*, **272**: 503-518 (2013)
- 10) Ikuta T, Kurosumi M, Yatsuoka T, Nishimura Y. *Exp Cell Res*, **343**: 126-134 (2016).
- 11) Baba T, Shima Y, Owaki A, Mimura J, Oshima M, Fujii-Kuriyama Y, Morohashi K. *Sex Dev*, **2**: 1-11 (2008)
- 12) Barnett KR, Tomic D, Gupta RK, Miller KP, Meachum S, Paulose T, Flaws JA. *Biol Reprod*, **76**: 1062-1070 (2007).
- 13) Baba T, Mimura J, Nakamura N, Harada N, Yamamoto M, Morohashi K, Fujii-Kuriyama Y. *Mol Cell Biol*, **25**: 10040-10051 (2005).
- 14) Takeda T, Komiya Y, Koga T, Ishida T, Ishii Y, Kikuta Y, Nakaya M, Kurose H, Yokomizo T, Shimizu T, Uchi H, Furue M, Yamada H. *J Biol Chem*, **292**: 10586-10599 (2017).
- 15) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H, Ishii Y. *Biochem Pharmacol*, **154**: 213-221 (2018).
- 16) Vera J M Nies, Gencer Sancar, Weilin Liu, Tim van Zutphen, Dicky Struik, Ruth T Yu, Annette R Atkins, Ronald M Evans, Johan W Jonker, Michael Robert Downes, Fibroblast Growth Factor Signaling in Metabolic Regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **6**: 193 (2015)
- 17) Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J, Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**: 139-49 (2005)
- 18) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D,

- Wariishi H, Yamada H. *J Toxicol Sci*, **35**: 365-373 (2010).
- 19) Ferreras C, Rushton G, Cole CL, Babur M, Telfer BA, Kuppevelt TH, Gardiner JM, Williams KJ, Jayson GC, Avizienyte E. *J Biol Chem*, **287**: 36132-36146 (2012).
- 20) Turnbull JE, Fernig DG, Ke Y, Wilkinson MC, Gallagher JT. Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *J Biol Chem*, **267**: 10337-10341 (1992).
- 21) Guimond S, Maccarana M, Olwin BB, Lindahl U, Rapraeger AC. Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4. *J Biol Chem*, **268**: 23906-23914 (1993).
- 22) Pye DA, Vives RR, Turnbull JE, Hyde P, Gallagher JT. Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J Biol Chem*, **273**: 22936-22942 (1998).
- 23) Lindahl U, Gullberg MK, Kjellen L. Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem*, **273**: 24979-24982 (1998).
- 24) Schneider C, Kässens N, Greve B, Hassan H, Schüring AN, Starzinski-Powitz A, Kiesel L, Seidler DG, Götte M. Fertil Steril. *Fertil Steril*, **99**: 871-881 (2013).
- 25) Takeda, T, Fujii, M, Taura, J, Ishii, Y, Yamada, H. *J Biol Chem*, **287**: 18440-18450 (2012).
- 26) Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**: a004952 (2011).
- 27) Groth C, Lardelli M. *Int. J. Dev. Biol.*, **46**: 393-400 (2002).
- 28) Bottcher RT, Niehrs C. *Endocr Rev*, **26**: 63-77 (2005).
- 29) Dick G, Akslen-Hoel LK, Grondahl F, Kjos I, Maccarana M, Prydz K. *Glycobiology*, **25**: 30-41 (2015).
- 30) Ornitz DM, Itoh N. *Rev Dev Biol*, **4**: 215-266 (2015).
- 31) Turner N, Grose R. *Nat Rev Cancer*, **10**: 116-129 (2010).
- 32) Harmer NJ, Ilag LL, Mulloy B, Pellegrini L, Robinson CV, Blundell TL. *J Mol Biol*, **339**: 821-834 (2004).
- 33) Schroder E, Gebel Lena, Eremeev AA, Morgner J, Grum D, Knauer SK, Bayer P, Mueller JW. *PLoS One*, **7**: e29559 (2012).
- 34) Wdowiak A, Raczkiewicz D, Stasiak M, Bojar I. *Neuro Endocrinol. Lett*, **35**: 73-79 (2014).
- 35) Handelsman DJ, Spaliviero JA, Simpson JM, Allan CM, Singh J. *Endocrinology*, **140**: 3938-3946 (1999).
- 36) Rege J, Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kennedy MR, Layman LC, Honma S, Sasano H, Rainey WE. *J Clin Endocrinol Metab*, **98**: 1182-1188 (2013).

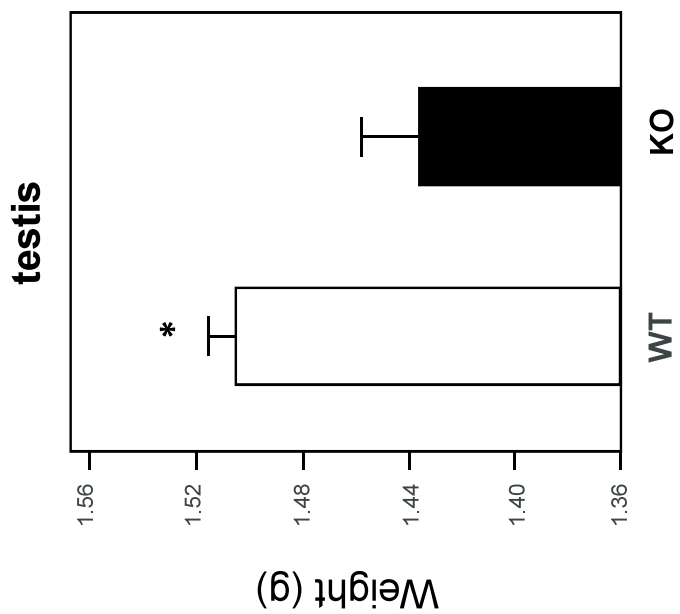


Fig. 1 The comparison of testis weight between the wild-type and AHR-deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 6 rats. Significantly different from the control: * $p < 0.05$. (令和2年度研究報告より引用)

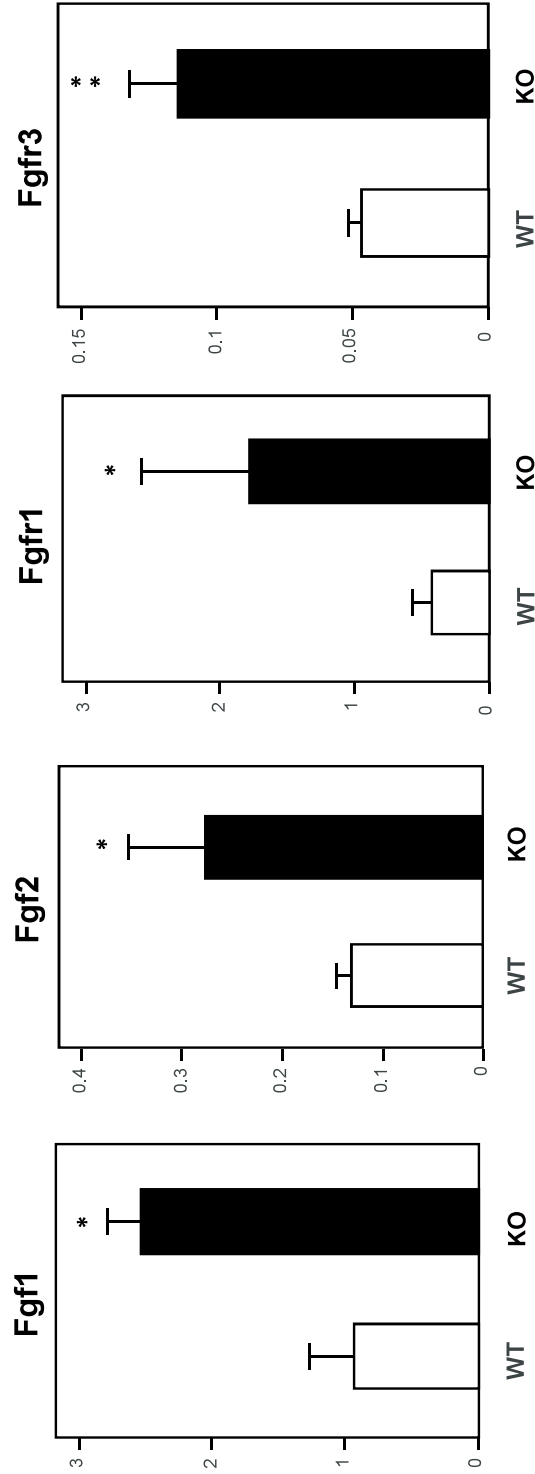


Fig. 2. The testicular expression of fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor mRNA in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means \pm S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Abbreviations used: fgf, fibroblast growth factor; fgfr, fibroblast growth factor receptor (令和2年度研究報告より引用)

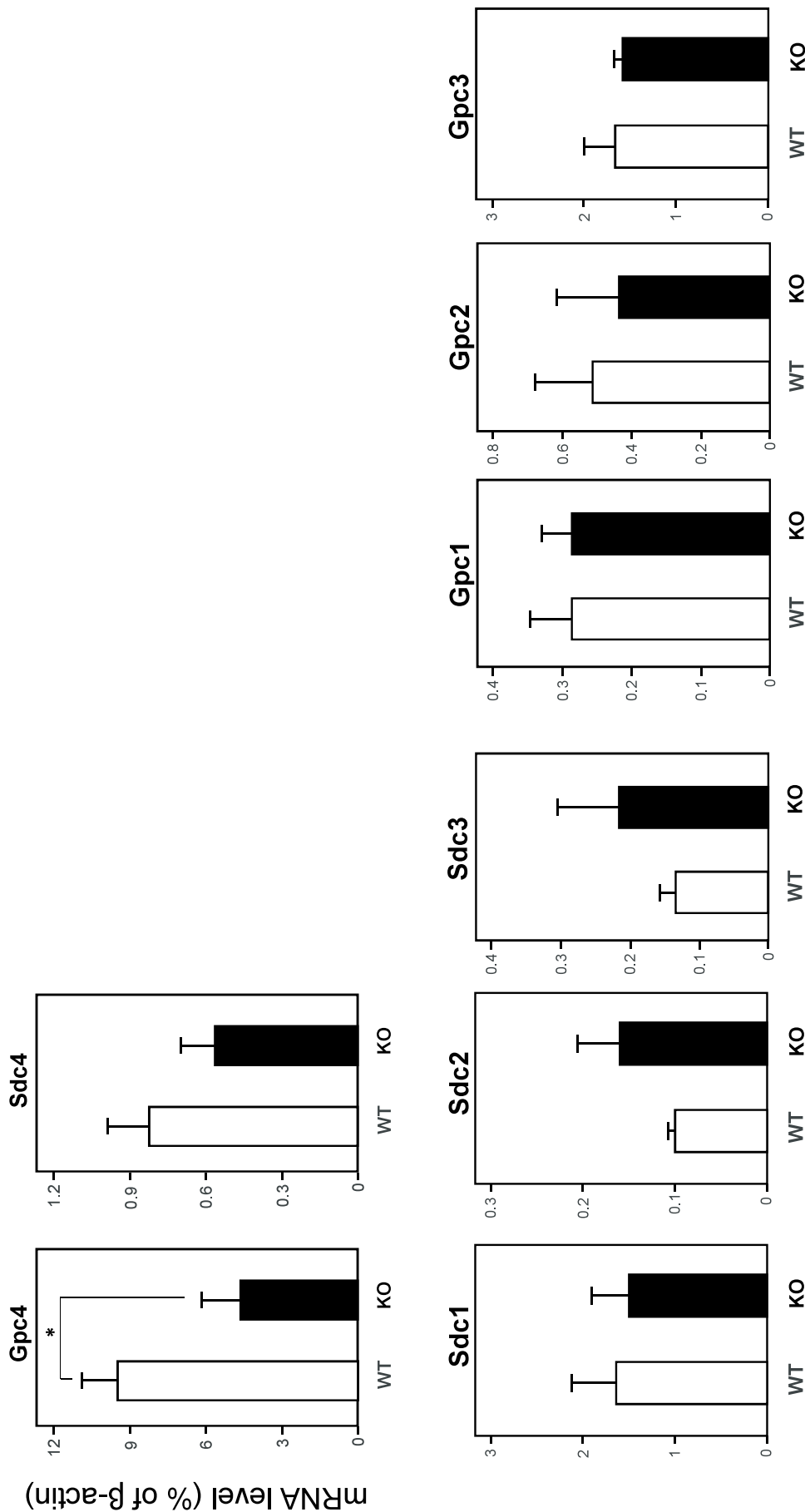


Fig. 3. The testicular expression of glypican and syndecan mRNA in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 5 rats. Significantly different from the control: * $p < 0.05$. Abbreviations used: Gpc, glypican; Sdc, syndecan;

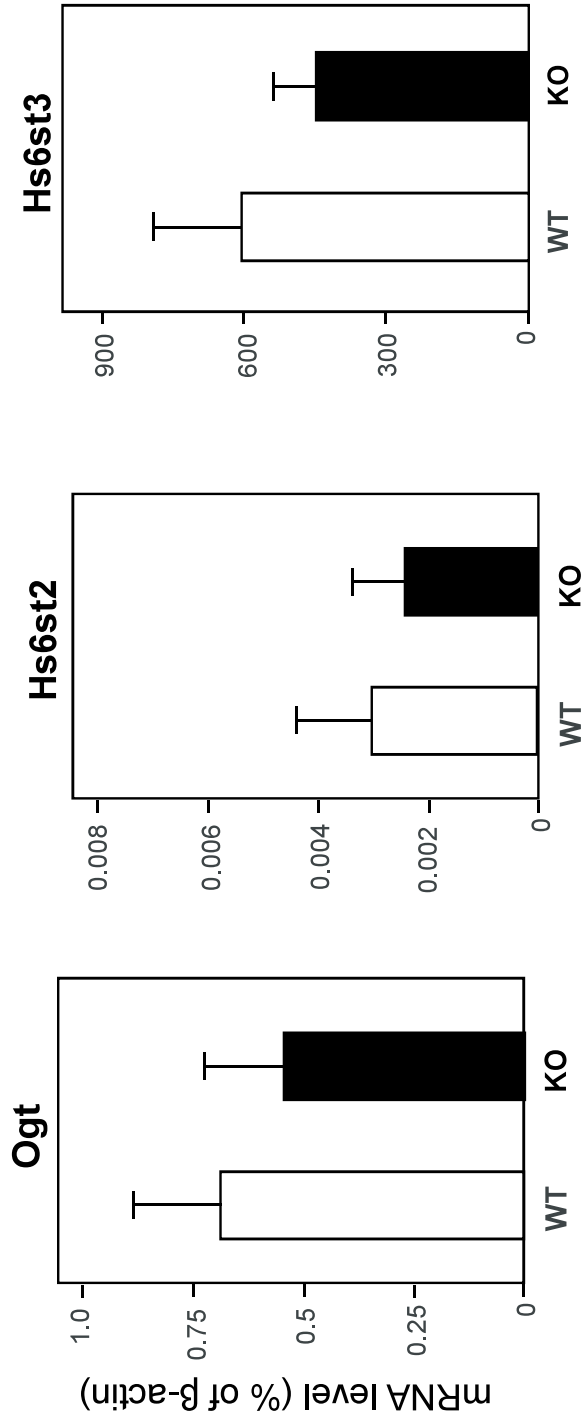


Fig. 4 The testicular expression of *O*-GlcNAc transferase and heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferase mRNA in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means \pm S.E.M. of 5 rats. Abbreviations used: Ogt, *O*-GlcNAc transferase; Hs6st, heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferase.

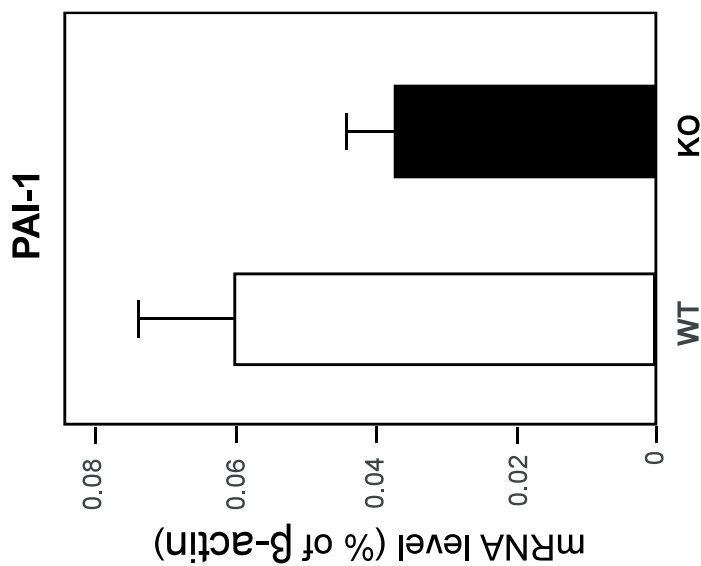


Fig. 5 The testicular expression of plasminogen activator inhibitor-1 mRNA in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means \pm S.E.M. of 5 rats. Abbreviations used: PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1

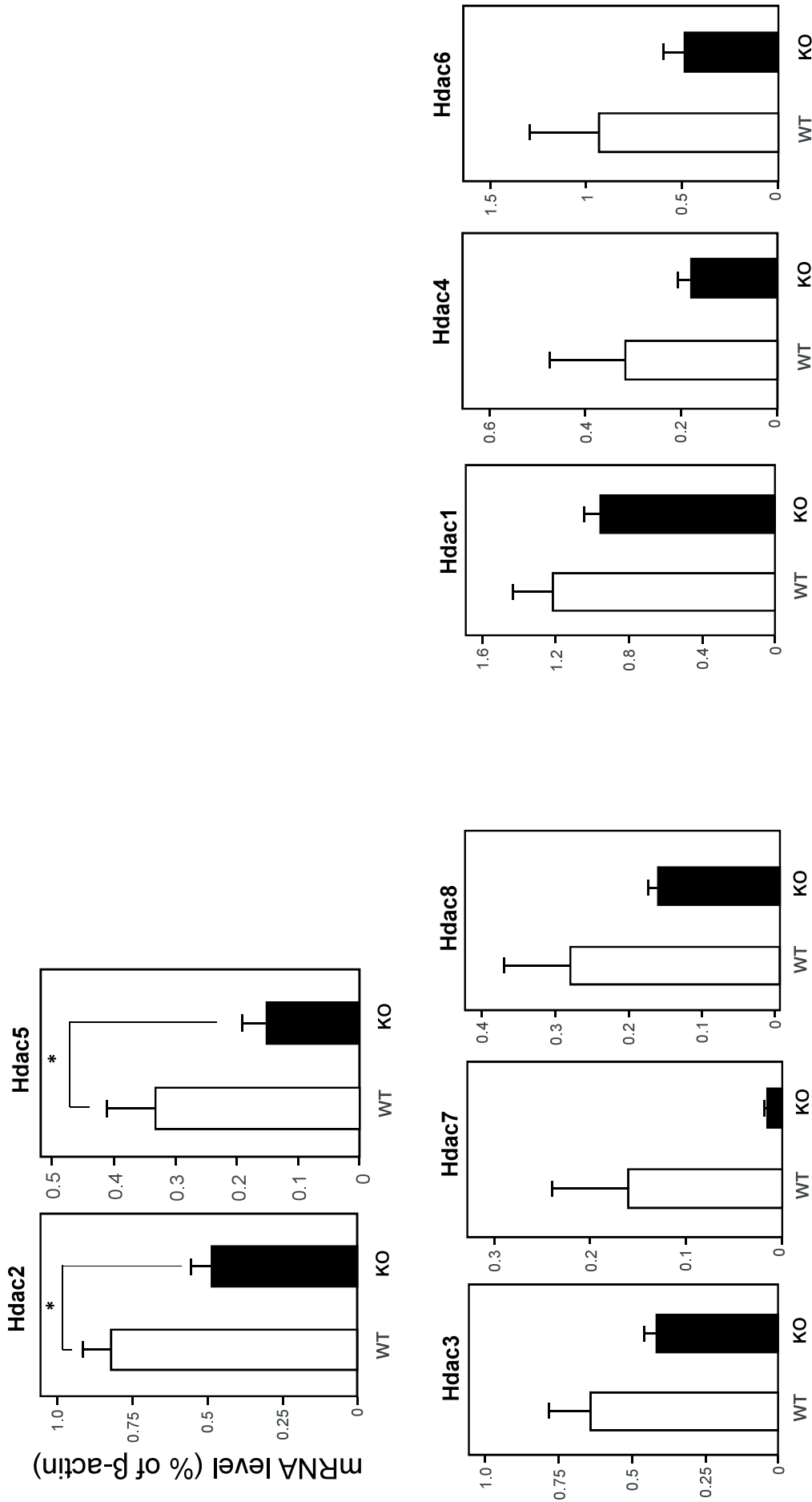


Fig. 6. The testicular expression of histone deacetylase mRNA in AHR deficient rats (8 weeks old).

Each bar represents the means ± S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: * $p < 0.05$.

Abbreviations used: Hdac, histone deacetylase;

分担研究報告書

ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質 1 (Selenbp1)の腎臓における役割：
脂質代謝の制御とストレス応答との関連性の検討

研究分担者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野 准教授

研究要旨

当教室ではこれまでに、ダイオキシンが肝臓のセレン結合性タンパク質 1 (Selenbp1)を誘導することを明らかにしてきた。また、Selenbp1 の遺伝子欠損マウスを作成して、ダイオキシン毒性発現、あるいは毒性軽減への寄与について検討を行って来たが、Selenbp1 と相同性の高いもう一つの分子種 Selenbp2 が発現しているため、その誘導の意義について理解することが難しかった。これまでのところ、Selenbp1 欠損マウスの腎臓では、DNA マイクロアレイ分析で多くの遺伝子発現の変化が観察されており、特に多くの脂質代謝関連因子がリアルタイム RT-PCR で確認されている。Selenbp1-KO マウスの腎臓を用いた検討において、脂質代謝を調節する転写調節因子 peroxisome proliferator-activated receptor- α (Ppar α)および脂質代謝関連遺伝子 acyl-CoA oxidase 3 (Acox3) 遺伝子、cytochrome P450 (Cyp) 4a12a などの転写レベルの低下が検出されている。一方、マイクロアレイ解析では、脂質代謝関連遺伝子の中に発現レベル増加の可能性が示唆されたものもあった。本年度の検討では、prostaglandin (PG)F2 レベルと脂肪細胞の分化に影響を与える NADPH 依存性酵素であるアルドケトレダクターゼファミリー1 メンバーC3 (Akr1c3) の発現が有意に増加することが示唆された。さらに、血小板活性化因子 (PAF) リン脂質の生合成酵素の一つである lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 (Lpcat 2) が、Selenbp1-KO により、有意に増加することが示唆された。また、細胞内の遊離脂肪酸と結合し、その細胞内輸送を担っていると考えられている脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid-binding protein, FABP)Fabp3 と Fabp4 にも転写レベルの増加傾向が認められた。そのほか、胚発生とガンに関連する Wnt シグナル伝達経路 (Wnt signaling pathway) に関与することが知られている糖タンパク質 Dkk2 (Dickkopf homolog 2) の遺伝子の発現は増加傾向が認められた。これらは、前に行ったマイクロアレイの結果を支持した。以前メタボロミクス分析の結果から、変動があった 20-Carboxy-leukotriene B4 および 11-Epi-prostaglandin F2 α などはアラキドン酸代謝物であり、脂質代謝が影響を受け炎症性物質が生成する可能性も示された。そこで、Selenbp1 欠損が腎臓の形態学的特性へ及ぼす影響について検討した。野生型と比較して、Selenbp1 欠損マウス腎臓には炎症などの明らかな病原性はなかった。また、以前の検討結果で、Selenbp1-KO により retinoid-X-receptor- α (Rxr α)発現レベルに影響があったことから、Rxr α とヘテロオリゴマーを形成する Ppar 以外の受容体の発現への影響を調べた。さらに、セレンと Selenbp1 タンパク質の結合特性を考え、Selenbp1 の欠損が、他のセレン結合タンパク質の発現に影響するか否かを検討した。Selenbp1 欠損は、マウス腎臓の Ppar 経路を介して脂質代謝を変化させるだけでなく、他のシグナル伝達経路に対しても Selenbp1 欠損が影響を及ぼす可能性がある。

A. 研究目的

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

当研究室では、ダイオキシン類の一種、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl、および多環芳香族炭化水素、3-methylcholanthrene のラットへの曝露により肝臓における **Selenbp1** タンパク質および mRNA 発現が顕著に誘導することをすでに報告している (5-7)。ダイオキシン類は、免疫抑制、肝障害、発がんプロモーション作用等、生体に対して非常に多彩な毒性を引き起こすが (8)、その大部分の毒性発現に関与すると考えられているのが芳香族炭化水素受容体 (AhR) である (9)。ダイオキシン類は、細胞内においてサイトゾルに局在している AhR に結合することで核内へと移行し、AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成する。この複合体が様々な遺伝子上流に存在するコンセンサス配列、xenobiotic responsive element (XRE) に結合することで、cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) に代表される遺伝子発現を変動させることが知られている (10)。ダイオキシン類により変動する遺伝子は実に数百種類にもものぼるが、どの遺伝子変動がどの毒性発現に重要であるのかなど詳細に関しては未だ十分には明らかになっていない。

当研究室では、これまでにラットにおいて見出されている **Selenbp1** 遺伝子の誘導に注目し、ダイオキシンによる毒性との関連性を検証することを目指して研究を行って来た。マウスにおいては **Selenbp1** とアミノ酸配列で約 97% の相同性を示す **Selenbp2** (アセトアミノフェン結合性タンパク質) が存在することが知られているが、これは異なる遺伝子産物であり臓器分布等も多少異なる (11)。**Selenbp2** は、アセトアミノフェン代謝物との結合を介して肝障害発現に関わると推定されているが (12)、**Selenbp1** 同様に肝臓に多く発現していること、および、その相同性の高さから **Selenbp1** との機能的な関連性も示唆されている。当研究室では、ダイオキシンによる **Selenbp1** の誘導機構を解析するため、ダイオキシン類に対して親和性の異なる AhR を有する二系統のマウス (C57BL/6J マウス: 高親和性 AhR、および DBA/2J マウス: 低親和性 AhR) を用いて比較検討することにより、**Selenbp1** の誘導に対する AhR 依存性が検証されるとともに、**Selenbp1** ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型の解析を行った (13)。これらの結果から、**Selenbp1** には、卵巣におけるガンへの防御的な役割がある可能性が示された。また、**Selenbp1** と **Selenbp2** は、ダイオキシンによる誘導性に差があることが分かったが、**Selenbp1**-KO マウスの肝臓においては、依然として **Selenbp2** が発現しており、**Selenbp1**-KO によるダイオキシン毒性の悪化や軽減作用を見出すことは出来ず、その誘導の意義について理解することが難しかった。

最近、当研究室では、絶食により肝臓及び腎臓において、リアルタイム RT-PCR により検討を行った際に、**Selenbp1** 発現は影響を受けないが、**Selenbp2** 発現が著しく低

下することを見だした。Selenbp2 の発現は腎臓において低いことが報告されているため (14)、当研究室では、ダイオキシン誘導性 Selenbp1 の腎臓における役割を明らかにすることを目的として研究を推進してきた。

平成30年度までの検討により、ダイオキシンにより変動する他の因子を排除して検討するために、ダイオキシン非投与条件下で絶食を行い、野生型の C57BL マウスと Selenbp1 欠損マウスの腎臓を用いたメタボロミクス解析を行った。また、マイクロアレイ解析も行った。さらに、リアルタイム RT-PCR による解析を通じて、脂質代謝関連因子が変動する可能性が示唆された。令和元年度は、個体数を増やして、メタボロミクスの精度を上げるとともに、引き続き Selenbp1 の脂質代謝への影響に着目してさらなる解析を行った。平成30年度及び令和元年度の検討において Selenbp1-KO マウスの腎臓では、脂肪酸の ω および ω -1 水酸化に関与することが知られている cytochrome P450 4a (Cyp4a) サブファミリーのうち、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現が有意に低下することが示唆された。また、ペルオキシゾームでの分岐脂肪酸の不飽和化を触媒する acyl-CoA oxidase3 (Acox3) の発現も有意に低下した。さらに、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor- α (Ppar α) の発現レベルの有意な低下が示唆された。これは、先に行ったマイクロアレイの結果を支持した。一方、Ppar- β (Pparb) および Ppar- γ (Pparg) の発現レベルには影響がなかった。Ppar α とヘテロオリゴマーを形成して遺伝子発現を促進させる retinoid-X-receptor- α (Rxr α) の発現の低下が示唆されている。従って、Ppar α および Rxr α の発現低下を通じた Cyp4a の低下が示唆された。一方、cyclooxygenase 1 (Cox1), Cox2 および3種の lipoxigenase レベルは変動しなかった。

これに符合して、ロイコトリエン類の増加が推定された。また、抗酸化酵素の発現解析を行ったところ、superoxide dismutase 1 (Sod1) および Sod2 の発現が有意に低下していた。また、Sod 活性、過酸化水素生成量が Selenbp1-KO マウス腎臓で低下することを明らかにした。この時、腎臓及び血中のセレン含量については変動がなかった。

一方、マイクロアレイ解析では、脂質代謝関連遺伝子の中に発現レベル増加の可能性が示唆されたものもあったため、本年度は、それらの発現変動を検証した。また、Ppar α とヘテロオリゴマーを形成して遺伝子発現を促進させる Rxr α の発現の低下が示唆されていたため、本研究では、Rxr α とヘテロオリゴマーを形成する、Ppar 以外の受容体の遺伝子発現の調節に変動を及ぼすか否かも検討した。これらの研究を通じて、Selenbp1 は脂肪酸の酸化を促進し、炎症を抑制する役割を果たしていることが示唆されたことから、腎臓組織への形態学的な影響についても検討した。また、Ppar α 以外の他のシグナル伝達経路に対する Selenbp1 欠損の影響についても検討した。最後に、Selenbp1 欠損により、セレン関連のセレノプロテインが影響を受けるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1. 動物実験

Selenbp1-KO マウスは、先行研究において作製したものをを用いた (13)。このマウスにおいては、Selenbp1 遺伝子の第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子カセットと置換することによって KO マウスを作製している。マウスの genotyping は、離乳後のマウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、置換したネオマイシン耐性遺伝子、および Selenbp1 遺伝子を含むプライマーを用いて PCR を行い、アガロース電気泳動によるバンド検出にて行った。解析には、雌雄のホモ KO マウスの交配により

得たホモ KO 雄マウスを用いた。また、日本クレアより、野生型 C57BL/6J を7週齢にて購入し、KO マウスと同一条件で一週間馴化させたのち、20 時間の絶食後に腎臓を摘出し解析に供した。

2. リアルタイム RT-PCR 法

組織より total RNA を抽出したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (15)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、ターゲット mRNA の threshold cycle (Ct) 値を β -actin mRNA の Ct 値で補正した。

3. Hematoxylin Eosin (HE) 染色

摘出した腎臓は paraformaldehyde (4% in 0.1 M PBS) 中で浸け置き、スクロース処理の後、組織を O.C.T. コンパウンドで包埋し、凍結ブロックとした。完成した凍結ブロックは、クライオスタット (Leica CM3050S) を用いて薄切し、組織切片 (切片厚: 18 μ m) を作製した。作製した切片はスライドガラスに貼り付けて、HE 染色を行った。最後に、切片に Entellan[®] New (rapid mounting medium for microscopy) をのせ、光学顕微鏡を用いて形態観察を行った。(倍率: x100)

4. DNA analysis

有意差を特定するために、Bioconductor、マイクロアレイ分析用線形モデル (limma) パッケージ (16)、および野生型と Selenbp1-KO の有意差の基準を使用してデータを処理した。有意水準は $P < 0.05$ に設定した。マイクロアレイデータセットは、Gene Expression Omnibus (GEO) データベースに提出した (アクセッション番号: GSE169517; www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/、NCBI によってパブリックドメインで提供)。P 値 ≤ 0.05 の選

択、注釈および視覚化は、統合ディスカバリー用データベース (DAVID) (DAVID Bioinformatics Resources 6.8; オンライン <http://david.ncifcrf.gov/>) を使用して行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認のもとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。動物実験承認番号: A30-103 及び A20-061。遺伝子組換え実験は、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」第 10 条第 2 項の規定に基づき、委員会の承認を得て行った (承認番号: 1-8)。

C. 研究結果

本研究は、ダイオキシン誘導性 Selenbp1 の生理学的役割を解明することを目的とした。これまでの結果から、Selenbp1 欠損は、マウス腎臓の Ppar 経路を介して脂質代謝を変化させることが示されている。Ppar 経路の中で、腎臓における Cyp4a12a、Cyp4a12b、Acox3 などの酸化酵素の発現低下は、絶食条件下での Selenbp1-KO によって確認された。一方、GO 分析を使用した生物学的機能に基づいた解析において (平成30年度および令和元年度報告書)、脂質代謝関連のいくつかの代表的な遺伝子は、Selenbp1 欠損マウス腎臓において増加の可能性が示唆されていた。それら遺伝子の mRNA 発現レベル変動は未だ検証されていなかった。今年度は、この点に着目した。Selenbp1 欠損により、PGF2 レベルと脂肪細胞の分化に影響を与える NADPH 依存性酵素であるアルドケトレダクターゼファミリー1 メンバーC3 (Akr1c3) の発現が腎臓で有意に増加することが示唆された (Fig. 1)。さらに、血小板活性化因子 (PAF) リン脂質の生合成酵素の一つである lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 (リゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 2: Lpcat2) が、Selenbp1-KO より、有意に増加す

ることが示唆された (Fig. 1)。また、細胞内の遊離脂肪酸と結合し、その細胞内輸送を担っていると考えられている脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid-binding protein, FABP) Fabp3 と Fabp4 の mRNA レベルの増加傾向が認められた (Fig. 2)。そのほか、胚発生とガンに関連する Wnt シグナル伝達経路 (Wnt signaling pathway) に関与することが知られている糖タンパク質 Dkk2 (Dickkopf homolog 2) の遺伝子の発現は増加傾向が認められた。Ptges3l (プロスタグランジン E 合成酵素 3) や Ptgis (プロスタグランジン I 合成酵素) を含む遺伝子の発現レベルにも増加傾向が認められた (Fig. 1)。これらは、以前行ったマイクロアレイの結果を支持した。

上記の結果から、Selenbp1 は脂肪酸の酸化を促進し、炎症を抑制する役割を果たしていることが示唆された。次に、Selenbp1 欠損により腎臓の組織病理学的変化があるかどうかを観察した。HE 染色した腎組織切片の顕微鏡写真 (Fig. 3) は、Wild-type と Selenbp1-KO では類似しており、糸球体との適切な間隔の尿細管を備えたネフロン of 正常な配向を示している。

一方、今までの検討から Ppara とヘテロオリゴマーを形成して遺伝子発現を促進させる Rxra の発現の低下が示唆されていた。Rxra は、Ppar だけでなく、Lxr (Liver X receptor)、Pxr (Pregnane X receptor)、Rar (Retinoic acid receptor)、Car (Constitutive androstane receptor) など多くの核内受容体とヘテロオリゴマーを形成し、転写調節に関与している (17, 18)。本研究では、脂質代謝への影響を中心に検討したが、Selenbp1 が Rxra の発現レベルにも影響するのであれば、これら Ppar 以外の受容体が関わる遺伝子発現の調節にも変動を及ぼす可能性があり、これらについても検討する必要があると考え検討した。結果、Lxr (nuclear receptor subfamily 1 group H: Nr1h2, Nr1h3)、Pxr (nuclear receptor subfamily 1 group I: Nr1i2, Nr1i3)、Rar 遺

伝子の mRNA レベルは有意な変動が見られなかった (Fig. 4)。従って、Rxra のパートナーの中では、Ppara が特異的に Selenbp1-KO により発現低下することが示唆された (令和元年および令和二年度研究報告参照)。

次に、Selenbp1 欠損が、Ppar 経路以外の他のシグナル伝達経路に及ぼす影響についても検討した。以前行った DNA マイクロアレイ解析では、さまざまなシグナル伝達経路に関与する遺伝子や腫瘍の促進または抑制に寄与する遺伝子の発現に Selenbp1 欠損が影響を与える可能性が示唆されていたことから、この点を調べた。Selenbp1 欠損に関連する遺伝子を包括的に調査することは、Selenbp1 の生理的機能を解明することにつながると考えられる。Selenbp1 欠損により変動の大きかった遺伝子の発現に関与する主な経路 (Fig. 5) には、アジポサイトカイン、ユビキチン (Ubi) 結合、p13k-Akt (ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼおよびプロテインキナーゼ B)、哺乳類ラパマイシン標的 (mTOR)、FoxO (フォークヘッドボックスプロテイン O)、cAMP (環状アデノシンーリン酸)、内因性アポトーシス、古典的補体、およびその他のシグナル伝達経路などが推定された。

また、SelenBP1-KO による腎臓でセレノプロテイン発現量を調べた所、今回調べた範囲では、唯一、チオレドキシシン還元酵素 2 (TrxR2) に低下が認められた (Fig. 7)。その他のセレノプロテインでは野生型動物との間に差は認められなかった (Figs. 6, 7)。

D. 考察

本研究では、ダイオキシン誘導性 Selenbp1 の本来の役割を明らかにすることを目的とし、今までの報告内容を参照しつつ、本年度の研究を考察する。マウスの腎臓には、もう一つの分子種 Selenbp2 の発現は低く (14)、当研究室の先行研究で絶食によって腎臓の

mRNA とタンパク質レベルが著しく低下することが示唆されていることから、ダイオキシンを投与しない条件下で 8 週齢の雄 *Selenbp1*-KO マウスと対照の C57BL/6J マウスに 20 時間絶食を行ってから比較検討した。ダイオキシン類の毒性の一つとして、脂質代謝異常が知られていることから (19-21)、ダイオキシンにより著しく誘導される *Selenbp1* が脂質代謝に関連したタンパク質である可能性は十分考えられ、腎臓の *Selenbp1* 欠失に関連する *Pparα* 経路を介した脂質代謝の顕著な変化を示唆していた成果は、その仮説を支持していた。今回の研究では、対照的に、脂質代謝に関連する他の酵素、細胞内の遊離脂肪酸と結合し、その細胞内輸送を担っていると考えられている *Fabp3* と *Fabp4* には転写レベルの増加傾向が認められている。そのほか、胚発生とガンに関連する *Wnt* シグナル伝達経路に関与することが知られている糖タンパク質 *Dkk2* の遺伝子の発現に増加傾向が認められた。そして、*PGF2* レベルと脂肪細胞の分化に影響を与える *Akr1c3* の発現が有意に増加することが示唆された。さらに、PAF 生合成酵素の一つである *Lpcat2* は、野生型マウスと比較して、*Selenbp1*-KO マウスで mRNA 発現が約 2 倍有意に増加することを確認した。近年、脂肪滴 (Lipid droplet, LD) の蓄積は、癌細胞株と腫瘍性組織の数の増加で観察されている (22-25)。脂肪滴に関与する *Lpcat2* は、*PGE2* などの炎症誘発性脂質メディエーターを産生することによって炎症過程に関与している。*Lpcat2* の過剰の発現は炎症反応を増強する。これまでに実施したメタボロミクスの結果にも符合して、プロスタグランジン類の増加が推定された。

令和 2 年度までの研究成果から、アラキドン酸代謝物 *prostaglandin J2* および *11-epi-prostaglandin F2α* などの増加が示唆されており、脂肪酸代謝が影響を受け炎症性物質が生成する可能性も示された。これらのことから、*Selenbp1* が脂肪酸の酸化を促進

し、炎症を抑制する役割を果たしていることが示唆された。さらに、*Selenbp1* 欠損により腎臓の組織病理学的変化があるかどうかを観察した。HE 染色した腎組織切片の顕微鏡写真 (Fig. 3) から、*Wild-type* グループと *Selenbp1*-KO グループは類似し、いずれも糸球体との適切な間隔の尿細管を備えたネフロン の 正常な配向を示すことから、*Selenbp1* の欠損は腎臓に病的な変化を伴わないと推定された。但し、この実験の精度は将来改善される必要がある。

Selenbp1 は、その欠損が致命的な影響を及ぼすことはないものの、少なくとも脂質代謝に関係する可能性が示唆された。欠損により脂肪酸の代謝抑制による代謝スイッチングを生じて炎症性の代謝物を増加させる可能性も示唆された。一方、*Selenbp1* 欠損による変動を受ける遺伝子の調節に関与する主な経路 *Pparα* 以外にも、存在すると推定される。DNA マイクロアレイ解析では、野生型および *Selenbp1*-KO マウスと比較して、発現が変動する 2689 の遺伝子が同定され、そのうち 1464 は増加、1225 が減少した (平成 30 年度報告書)、有意水準 0.05 未満の *p* 値で、*Selenbp1* 欠損症に応答する遺伝子プロファイルの変化を、国立アレルギー感染症研究所 (NIAID) の提供する DAVID を使用してさらに分析した。これらの発現変動を示した遺伝子は、遺伝子オントロジー (GO) 分析 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>、関数注釈チャート) を使用して注釈付けを行った。その結果、アジポサイトカイン、Ubi 結合、*p13k-Akt*、*mTOR*、*FoxO*、*cAMP*、内因性アポトーシス、古典的補体、およびその他のシグナル伝達経路が推定された。今後も関連している経路を調べる必要がある。これら異なるシグナル伝達経路において、さまざまな遺伝子の発現レベルが *Selenbp1* 欠損によって変化した。これらの遺伝子は、細胞増殖、細胞生存、および代謝プロセスに関与している。他グループの以前の研究から、*Selenbp1* が患者の発がんや予後不良に関連する要因であること

が示されている (26-28)。ただし、この基になるメカニズムはよくわかっていない。今後は、他のシグナル伝達経路に対する *Selenbp1* 欠損の影響についても検討が必要であろう。

Selenbp1 とセレンの結合形態は未だ不明である。近年、最大 100 のセレノプロテインが哺乳類のシステムに存在する可能性があるとしており、これまでに約 25 の同定された哺乳類のセレノプロテインが機能的に特徴付けられている (29)。明確な機能を持つこれらのセレノプロテインには、主に glutathione peroxidase ファミリー (サイトゾル GPx1、胃腸 GPx2、血漿 GPx3、リン脂質ヒドロペルオキシド GPx4)、iodothyronine deiodinase (ID1、ID2、ID3)、thioredoxin reductase (TrxR1、TrxR2、TrxR3) が含まれる。すべてオキシドレダクターゼ機能を持ち、生物において重要な役割を果たす (29)。そこで、*Selenbp1* を欠損すると、セレノプロテインが影響を受けるかどうかを検討した。結果、*Selenbp1*-KO により、TrxR2 mRNA レベルが有意的に減少することがわかった (Fig. 7)。TrxR2 は抗酸化酵素として、酸化還元反応を触媒し、thioredoxin を還元し、細胞シグナル伝達に関与することが示されている (29)。これらの情報と、当研究室におけるこれまでの研究成果、令和3年度の成果の情報を総合すると、生理的条件下で *Selenbp1* には、酸化ストレス軽減作用があると推定される。今後は、酸化的ストレスの変動状況についても深く検討を行うことが必要であろう。

E. 結論

以上の結果から、1) *Selenbp1* は、その欠損が致命的な影響を及ぼすことはないものの、少なくとも脂質代謝に関係する可能性が示唆された。*Selenbp1* 欠損により発現変動する遺伝子の調節に関与する経路は、*Pparα* 以外にも存在し、細胞増殖、細胞生存、および代謝プロセスに関与する、異なるシグナル伝達経路が影響を受けると推定された。2) *Selenbp1*-KO より、抗酸化酵素 TrxR2 の

発現レベルが有意に減少した。TrxR2 は酸化還元反応を触媒することから、*Selenbp1*-KO が TrxR2 の制御を通じて細胞のシグナル伝達に関与することが示唆された。これまでの研究の成果を総合すると、生理的条件下で *Selenbp1* には、酸化ストレス軽減作用があると推定される。

F. 研究発表

1. Song Y, Kurose A, Li R, Takeda T, Onomura Y, Koga T, Mutoh J, Ishida T, Tanaka Y, Ishii Y. Ablation of *Selenbp1* Alters Lipid Metabolism via the *Ppara* Pathway in Mouse Kidney. *Int J Mol Sci*, **22**(10): 5334 (2021). doi: 10.3390/ijms22105334.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

- 1) Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG, Medina D. *Carcinogenesis*, **10**: 541-546 (1989).
- 2) Jamba L, Nehru B, Bansal MP. *Mol Cell Biochem*, **177**: 169-175 (1997).
- 3) Pohl NM, Tong C, Fang W, Bi X, Li T, Yang W. *PLoS One*, **4**: e7774 (2009).
- 4) Porat A, Sagiv Y, Elazar Z. *J Biol Chem*, **275**: 14457-14465 (2000).
- 5) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Chemosphere*, **32**: 509-515 (1996).
- 6) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Toxicol Lett*, **87**: 1-9 (1996).
- 7) Ishida T, Ishii Y, Tasaki K, Ariyoshi N, Oguri K. *Fukuoka Acta Medica*, **88**: 135-143 (1997).
- 8) Poland A, Knutson JC. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **26**: 371-399 (1982).

- 9) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
- 10) Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. *Biochim Biophys Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
- 11) Bartolone JB, Sparks K, Cohen SD, Khairallah EA, *Biochem Pharmacol*, **36**: 1193-1196 (1987).
- 12) Pumford NR, Martin BM, Hinson JA, *Biochem Biophys Res Commun*, **182**: 1348-1355 (1992).
- 13) Tsujimoto S, Ishida T, Takeda T, Ishii Y, Onomura Y, Tsukimori K, Takechi S, Yamaguchi T, Uchi H, Suzuki SO, Yamamoto M, Himeno M, Furue M, Yamada H. *Biochim Biophys Acta*, **1830**: 3616-3624 (2013).
- 14) Lanfear J, Fleming J, Walker M, Harrison P. *Carcinogenesis*, **14**: 335-340 (1993).
- 15) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H, Yamada H. *J Toxicol Sci*, **35**: 365-373 (2010).
- 16) Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. *Nucleic Acids Res*, **43**: e47 (2015).
- 17) Chambon P. *FASEB J*, **10**: 940-954 (1996)
- 18) Leid M, Kastner P, Chambon P. *Trends Biochem Sci*, **17**: 427-433 (1992).
- 19) Hatsumura M, Ishida T, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H. *Fukuoka Acta Medica*, **86**: 135-143 (1995).
- 20) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K. *Chem Res Toxicol*, **12**: 1158-1165 (1999).
- 21) Takeda T, Komiya Y, Koga T, Ishida T, Ishii Y, Kikuta Y, Nakaya M, Kurose H, Yokomizo T, Shimizu T, Uchi H, Furue M, Yamada H. *J Biol Chem*, **292**: 10586-10599 (2017).
- 22) Yue S, Li J, Lee SY, Lee HJ, Shao T, Song B, Cheng L, Masterson TA, Liu X, Ratliff TL, Cheng JX. *Cell Metab*, **19**: 393-406 (2014).
- 23) Qiu B, Ackerman D, Sanchez D, Li B, Ochocki JD, Grazioli A, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Keith B, Simon MC. *Cancer Discov*, **5**: 652-667 (2015).
- 24) Qi W, Fitchev PS, Cornwell M, Greeberg J, Cabe M, Weber CR, Roy HK, Crawford SE, Savkovic SD. *J Biol Chem*, **288**: 16274-16281 (2013).
- 25) Bozza PT, Viola JP. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **82**: 243-250 (2010).
- 26) Chen G, Wang H, Miller CT, Thomas DG, Gharib TG, Misek DE, Giordano TJ, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. *J Pathol*, **202**: 321-329 (2004).
- 27) Li T, Yang W, Li M, Byun DS, Tong C, Nasser S, Zhuang M, Arango D, Mariadason JM, Augenlicht LH. *Mol Nutr Food Res*, **52**: 1289-1299 (2008)
- 28) Schott M, de Jel MM, Engelmann JC, Renner P, Geissler EK, Bosserhoff AK, Kuphal S. *Oncotarget*, **9**: 10445-10456 (2018)
- 29) Labunskyy VM, Hatifield D, Gladyshev VN. *Physiol Rev*, **94**: 739-777 (2014)

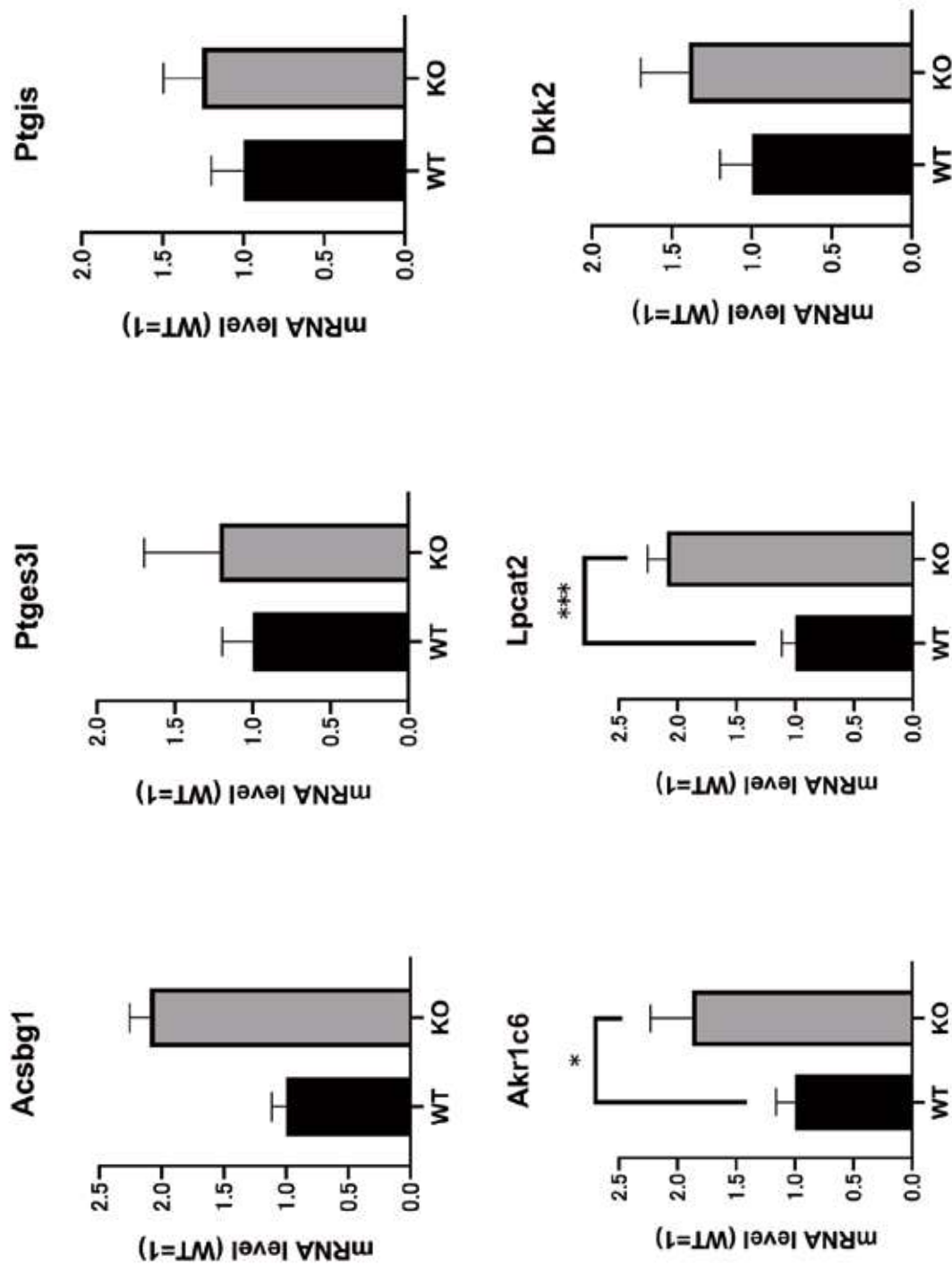


Fig. 1 Effect of Selenbp1 ablation on the renal expression of lipid metabolism-related enzymes (fasting). Abbreviations used: WT, wild-type; KO, Selenbp1-knockout; Acsbg1, acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1; Ptges3l, prostaglandin E synthase 3-like; Ptgis, prostaglandin I2 synthase; Dkk2, dickkopf homolog 2; Akkr1c6, aldo-keto-reductase family 1 member C6; Lpcat2, lysophosphatidylcholine acyltransferase 2. Significantly different from wild-type (WT): * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

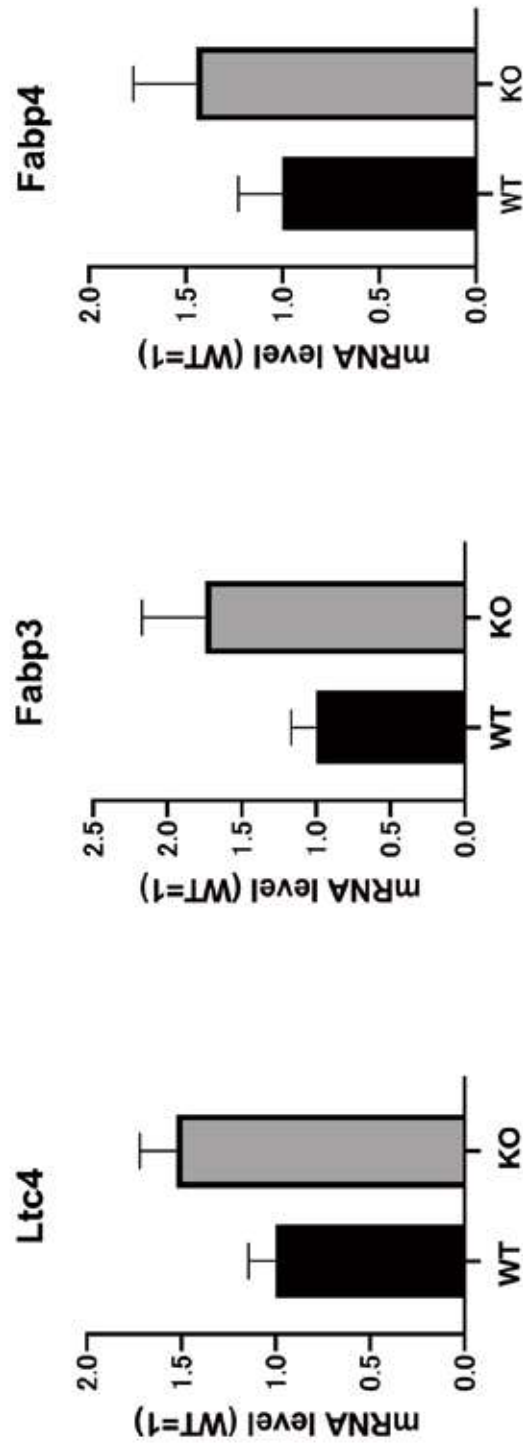


Fig. 2 Effect of Selenbp1 ablation on the renal expression of lipid metabolism-related enzymes (fasting). Abbreviations used: Ltc4, Leukotriene C4; Fabp, fatty acid binding protein

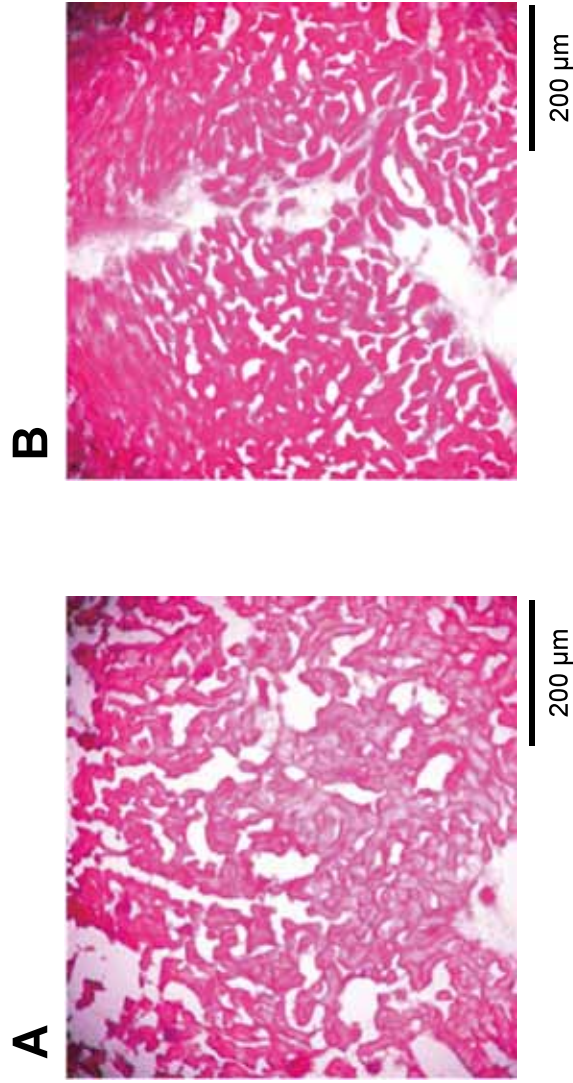


Fig. 3 Hematoxylin-eosin (H-E) staining and no obvious differences in Selenbp1-KO and wild-type mouse. A, kidney of wild-type mouse; B, kidney of Selenbp1-KO mouse (x100). One of the representative data is shown.

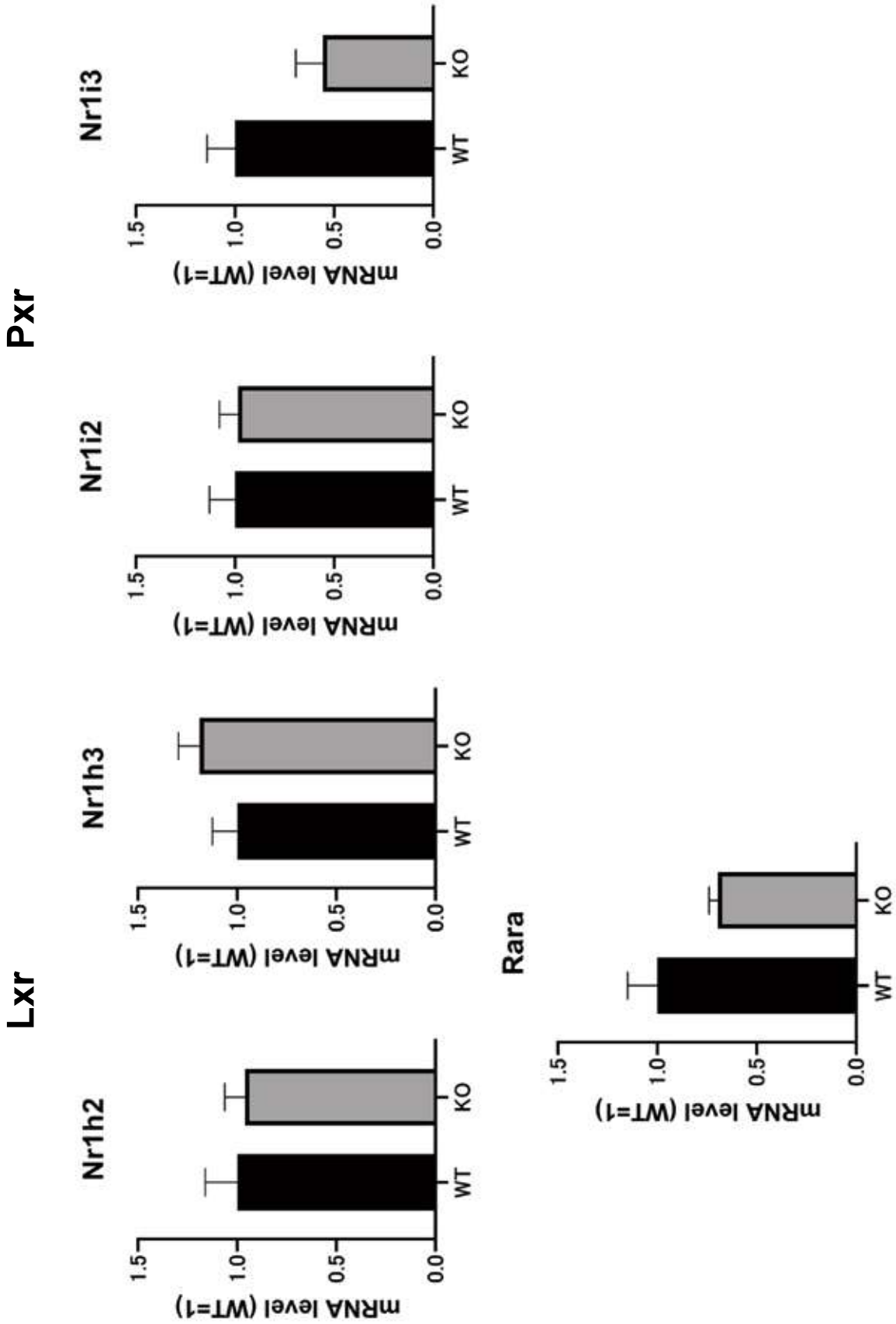


Fig. 4 Effect of Selenbp1 ablation on the renal expression of nuclear receptors (fasting). Liver X receptor (Lxr)(Nr1h2 and Nr1h3), pregnane X receptor (Pxr)(Nr1i2 and Nr1i3) and retinoic acid receptor- α (Rara) were examined. Abbreviations used: Nr1h, nuclear receptor subfamily 1 group H; Nr1i, nuclear receptor subfamily 1 group I.

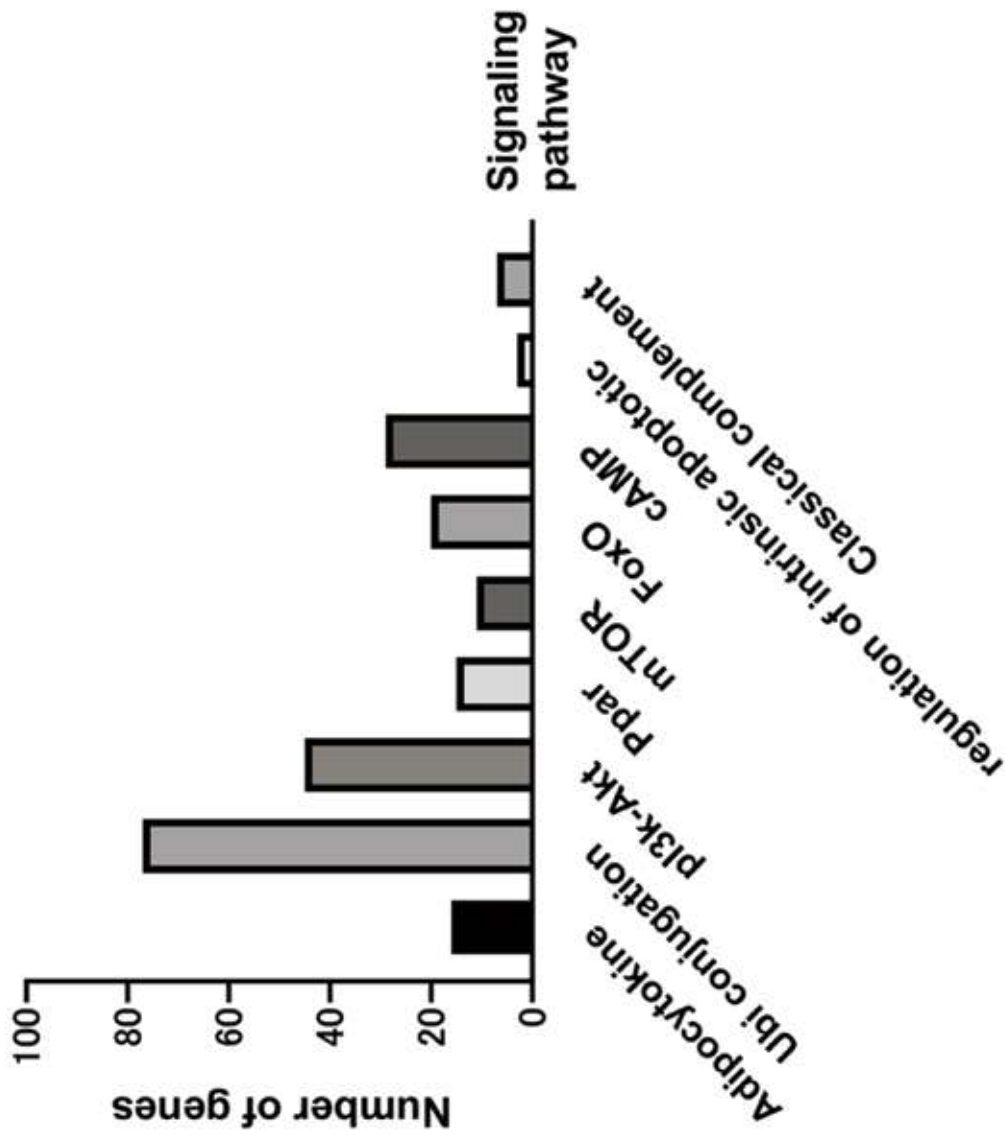


Fig. 5 Number of genes altered by ablation of Selenbp1 and related to different signaling pathways. Different accumulated genes were classified into nine signaling pathway groups by gene ontology (GO) analysis.

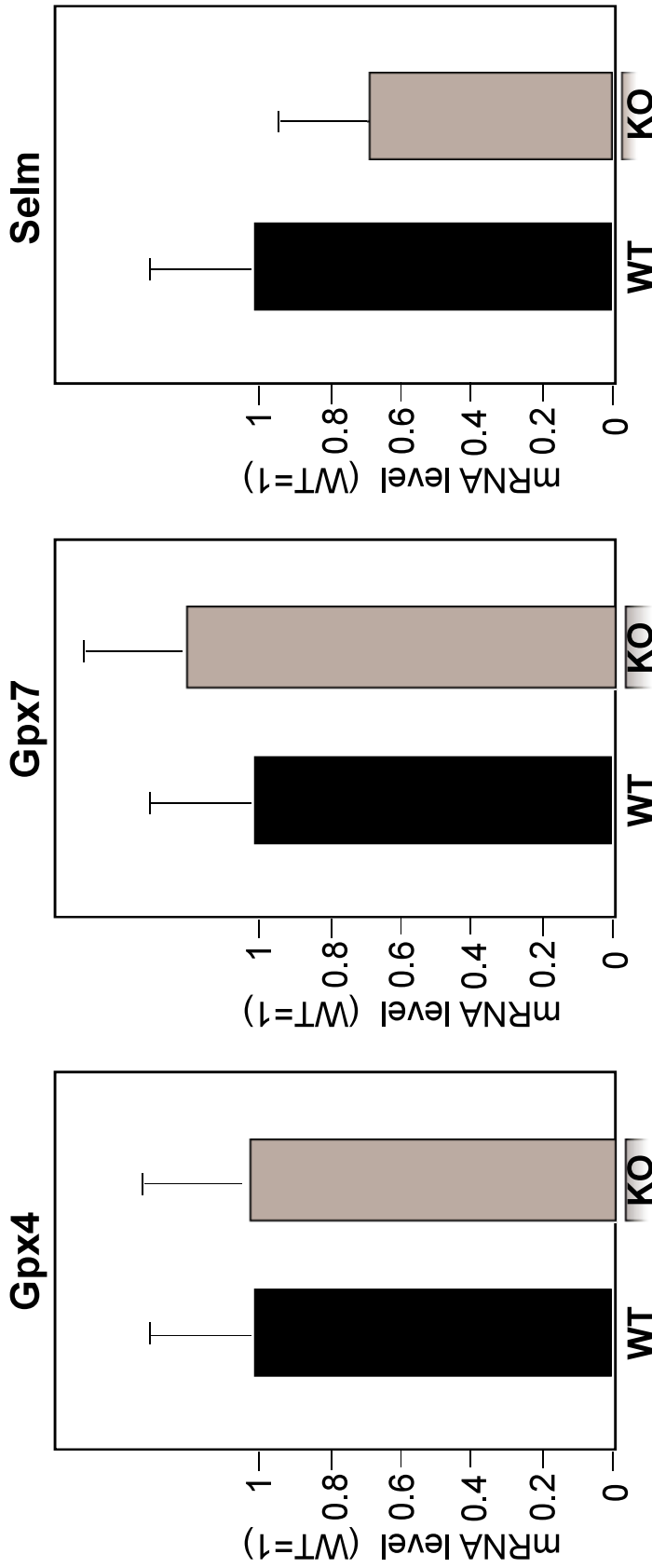


Fig. 6 Effect of Selenbp1 ablation on the renal expression of Selenoproteins mRNA by Quantitative RT-PCR (fasting).

Abbreviations used: Selm, Selenoprotein M; Gpx, glutathione peroxidase

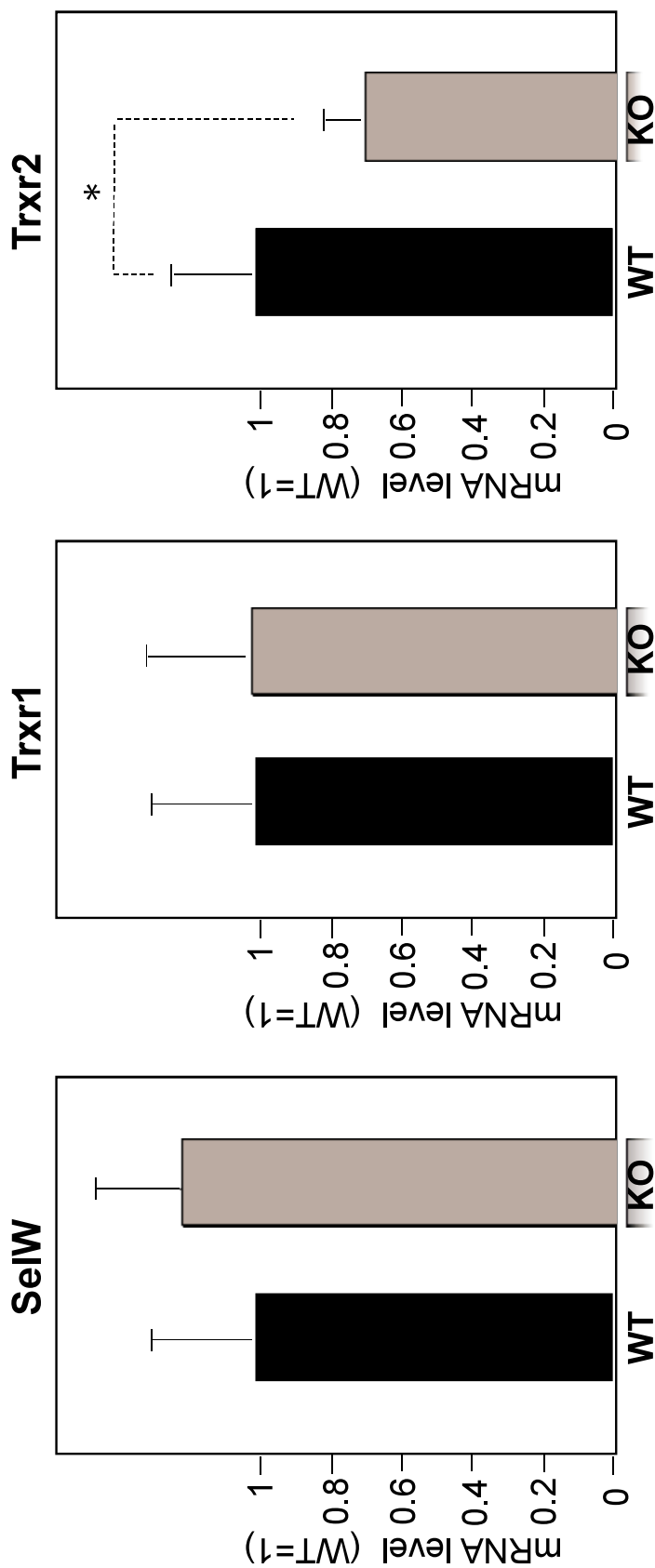


Fig. 7 Effect of Selcnbp1 ablation on the renal expression of Selenoproteins mRNA by Quantitative RT-PCR (fasting).

Abbreviations used: SelW, Selenoprotein W; Trxr, thioredoxin reductase.

分担研究報告書

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

研究分担者 前田 英史 九州大学歯科保存学研究分野教授

研究要旨 ヒト歯根膜細胞における AhR シグナルの活性化は、MGP や Laminin 等の骨芽細胞関連細胞外基質遺伝子の発現量を減少させる。

A. 研究目的

ヒト歯根膜細胞における AhR シグナルの活性化が、骨芽細胞関連遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにする。

B. 研究方法

油症患者における歯槽骨の状態について検証を行う予定であったが、コロナウィルス感染の影響により油症患者検診が行われなかった。そこでヒト歯根膜細胞を、AhR シグナルのアクチベーターである Benzo(a)pyrene (BaP) にて刺激したのち、マイクロアレイ解析にて、その骨芽細胞関連遺伝子発現について検証を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

BaP にて刺激した歯根膜細胞では、非刺激細胞と比較して、MGP や Laminin 等の骨芽細胞関連細胞外基質遺伝子が減少することが明らかとなった。また、これらの中には、これまでの報告で AhR と共発現することが明らかとなっている TNC、BGN、LAMB1 が含まれていた。

D. 考察

ヒト歯根膜細胞では BaP の刺激により、骨芽細胞分化が抑制されることが明らかとなっている。さらに、本研究により、骨芽細胞関連細胞外基質遺伝子の減少が、骨芽細胞分化抑制に関与する可能性が示唆された。

E. 結論

ヒト歯根膜細胞における AhR シグナルの活性化は、多くの骨芽細胞関連細胞外基質遺伝子の発現量を減少させる。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

分担研究報告書

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

研究分担者 友清 淳 九州大学病院歯内治療科講師

研究要旨 AhRシグナルの活性化は、ヒト歯根膜細胞におけるMMP2およびMMP12の発現量を上昇させる。

A. 研究目的

ヒト歯根膜細胞において、AhRシグナルの活性化により変動するMMP遺伝子群を網羅的に解析し、それらの発現解析を行う。

B. 研究方法

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

マイクロアレイ解析の結果、BaP刺激により、多くのMMP遺伝子発現が上昇することが明らかとなった。それらの中には、歯根膜組織で発現の報告のあるMMP2およびMMP12が含まれていた。そこでRT-PCRにて歯根膜細胞におけるこれらの発現について詳細に検討したところ、MMP2はBaP

の濃度に依存して発現量が増加するが、MMP12は濃度が上昇しても大きな変化が生じないことが明らかとなった。

D. 考察

我々はこれまでに、AhRシグナルの活性化が、ヒト歯根膜細胞のMMP1遺伝子発現量を上昇させることを明らかにしていたが、MMP1だけでなく、他のMMP遺伝子発現も同様に上昇する可能性が示唆された。

E. 結論

ヒト歯根膜細胞におけるAhRシグナルの活性化は、MMP1だけでなく、MMP2およびMMP12の発現量も上昇させる。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

Aryl hydrocarbon receptorの活性化がヒト歯根膜細胞のMMP2およびMMP12発現に及ぼす影響. 令和3年度全国油症治療研究会議, 2021.6.25

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働科学研究費の補助を受けたことが明記された書籍・雑誌

書籍：著者氏名，論文タイトル名，書籍全体の編集者名，書籍名，出版社名，出版地，出版年，ページ

【厚生労働科学研究費により刊行】 なし

雑誌：発表者氏名，論文タイトル名，発表誌名，巻号，ページ，出版年，

【厚生労働科学研究費により刊行】

古江 増隆，石井 祐次，月森 清己，辻 学【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 28 集】Aryl. hydrocarbon receptor からみた油症の病態と治療開発 2020、福岡医学雑誌 112(2)：61-89, 2021

佐藤 環，小木曾 俊孝，上原口 奈美，戸高 尊，平川 博仙，堀 就英，梶原 淳睦，香月 進，古江 増隆，辻 学【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 28 集】2009-2019 年度の油症検診における血中のポリ塩化クアテルフェニルの濃度と傾向、福岡医学雑誌 112(2)：90-98, 2021

新谷 依子，堀 就英，飛石 和夫，平川 博仙，佐藤 環，安武 大輔，戸高 尊，梶原 淳睦，香月 進，辻 学，古江 増隆【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 28 集】血液中ダイオキシン類および PCB 濃度測定のカロスチェック (2016-2019 年度)、福岡医学雑誌 112(2)：99-109, 2021

松本 伸哉，赤羽 学，神奈川 芳行，古江 増隆，辻 学，今村 知明【油症と PCB 及びダイオキシン関連化合物に関する研究報告集 第 28 集】油症患者における体脂肪率推定式の作成と半減期の再検証、福岡医学雑誌 112(2)：110-119, 2021

赤羽 学，松本 伸哉，神奈川 芳行，古江 増隆，辻 学，今村 知明【油症と PCB 及びダイオキシン関連化合物に関する研究報告集 第 28 集】油症患者の健康実態に関するアンケート調査自由記載のテキスト分析、福岡医学雑誌 112(2)：120-126, 2021

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

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

西田 恭子, 武田 知起, 山田 英之, 石井祐次, 【油症と PCB 及びダイオキシン関連化合物に関する研究】 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析: ゴナドトロピン放出ホルモン神経への影響. 福岡医学雑誌, 112(2): 148-154 (2021)

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

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

Matsuda-Taniguchi T, Takemura M, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Takai- Yumine A, Furue M, Tsuji G. The Antidiabetic Agent Metformin Inhibits IL-23 Production in Murine Bone-Marrow-Derived Dendritic Cells. J Clin Med. 2021 Nov 29;10(23):5610. doi: 10.3390/jcm10235610. PMID: 34884312; PMCID: PMC8658299.

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

Nakahara T, Kido-Nakahara M, Onozuka D, Sakai S, Hirose T, Take N, Sugiyama A, Harada K, Tsuji G, Kikuchi S, Kohda F. Efficacy of Dupilumab for Atopic Dermatitis According to Clinical Course and Clinical Findings: A Multicentre Retrospective Study. Acta Derm Venereol. 2021 Nov 10;101(11):adv00586. doi: 10.2340/actadv.v101.369. PMID: 34708248.

Nita A, Matsumoto A, Tang R, Shiraishi C, Ichihara K, Saito D, Suyama M, Yasuda T, Tsuji G, Furue M, Katayama B, Ozawa T, Murata T, Dainichi T, Kabashima K, Hatano A, Matsumoto M, Nakayama KI. A ubiquitin-like protein encoded by the "noncoding" RNA TINCR promotes keratinocyte proliferation and wound healing. PLoS Genet. 2021 Aug 5;17(8):e1009686. doi: 10.1371/journal.pgen.1009686. PMID: 34351912; PMCID: PMC8341662.

Miyamoto K, Dissanayake B, Omotezako T, Takemura M, Tsuji G, Furue M. Daily Fluctuation of Facial Pore Area, Roughness and Redness among Young Japanese Women; Beneficial Effects of Galactomyces Ferment Filtrate Containing Antioxidative Skin Care Formula. J Clin Med. 2021 Jun 5;10(11):2502. doi: 10.3390/jcm10112502. PMID: 34198790; PMCID: PMC8200969.

Tsuji G, Takai-Yumine A, Kato T, Furue M. Metalloproteinase 1 downregulation in neurofibromatosis 1: Therapeutic potential of antimalarial hydroxychloroquine and chloroquine. *Cell Death Dis.* 2021 May 19;12(6):513. doi: 10.1038/s41419-021-03802-9. PMID: 34011935; PMCID: PMC8134427.

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

辻学 【アトピー性皮膚炎 Basic & Clinical, Perspective】アトピー性皮膚炎における芳香族炭化水素受容体と Ovo-like 1 遺伝子、*Pharma Medica*39 巻7号 Page33-36, 2021

辻学 新・皮膚科セミナーウム アトピー性皮膚炎の病態 アトピー性皮膚炎の皮膚バリア機能障害における芳香族炭化水素受容体と Ovo-like 1 の役割、*日本皮膚科学会雑誌* 131 巻 8 号 Page1821-1825, 2021

辻学 進化する皮膚科学 機能研究・臨床・評価・製品開発の最前線
第5節 アトピー性皮膚炎における AHR の関与と治療法の開発 Page 287-290、株式会社 N・T・S 2021

Kido-Nakahara M, Yokote G, Yoshida M, Furue M, Nakahara T. Atopic Dermatitis Control Tool (ADCT): A useful tool for self-evaluation in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2021 Dec;48(12):1951-1952. doi: 10.1111/1346-8138.16176. Epub 2021 Sep 27.

Kamikaseda Y, Uruno T, Kunimura K, Harada A, Saiki K, Oisaki K, Sakata D, Nakahara T, Kido-Nakahara M, Kanai M, Nakamura S, Ohkawa Y, Furue M, Fukui Y. Targeted inhibition of EPAS1-driven IL-31 production by a small-molecule compound. *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Aug;148(2):633-638. doi: 10.1016/j.jaci.2021.03.029. Epub 2021 Apr 2.

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

福永貴之, 行平崇, 小牧龍二, 田中哲子, 上村太亮, 亀山 広喜, 申敏哲. 舌への触・圧覚, 痛覚刺激が Valproic acid 曝露発達障害モデルラットの記憶力と学習能力に及ぼす影響. *Journal of Kumamoto Health Science University* (18), 2021.

Hong-bin Chen, Jorge Carlos Pineda Garcia, Shinako Arizono, Tomoki Takeda, Ren-shi Li, Yukiko Hattori, Hiroe Sano, Yuu Miyauchi, Yuko Hirota, Yoshitaka Tanaka, Yuji Ishii, DAPL1 is a novel regulator of testosterone production in Leydig cells of mouse testis. *Scientific Reports*, 10.1038/s41598-021-97961-6., 11(1): 18532 (2021).

Yingxia Song, Atsushi Kurose, Renshi Li, Tomoki Takeda, Yuko Onomura, Takayuki Koga, Junpei Mutoh, Takumi Ishida, Yoshitaka Tanaka, Yuji Ishii, Ablation of Selenbp1 Alters Lipid Metabolism via the Ppar α Pathway in Mouse Kidney., *International Journal of Molecular Sciences*, 10.3390/ijms22105334., 22(10): 5334 (2021)

Yukiko Hattori, Tomoki Takeda, Misaki Fujii, Junki Taura, Hideyuki Yamada, Yuji Ishii, Attenuation of growth hormone production at the fetal stage is critical for dioxin-induced developmental disorder in rat offspring., *Biochemical Pharmacology*, 10.1016/j.bcp.2021.114495, 186, 114495-114495, 2021.03,

Kainuma M, Mitoma C, Tsuji G, Onozuka D, Nakaguchi T, et al. The Association between Objective Tongue Color and the Static Blood Findings of Yusho Patients. *Asian Journal of Complementary and Alternative Medicine*, Vol 9(3), 89-97:2021.

Namiki T, Takayama S, Arita R, Ishii T, Kainuma K, Makino T, Mimura M, Yoshino T, Nogami T, Arai M, Sato J, Tanaka K, Nakae H, Igari H, Ozawa Y, Shiko Y, Kawasaki Y, Nezu M, Ito T. A structured summary of a study protocol for a multi-center, randomized controlled trial (RCT) of COVID-19 prevention with Kampo medicines (Integrative Management in Japan for Epidemic Disease by prophylactic study: IMJEDI P1 study). *Trials* volume 22, Article number: 23 (2021)

Takayama S, Kikuchi A, Makino T, Kainuma K, Namiki T, Ito T Basic pharmacological mechanisms and clinical evidence of the efficacy of hochuekkito against infectious diseases and its potential for use against COVID-19. *Traditional & Kampo medicine*.8:3-21;2021

江崎 景子, 下村 実奈代, 石迫 千里, 古川 眞希, 庄島 晴菜, 三池 優起子, 加藤 聖子, 山口 真一郎, 貝沼 茂三郎.大建中湯のより効果的な内服方法に関する試験,産婦人科漢方研究のあゆみ 37、6-10,2021