

昭和29年11月5日第三種郵便物認可
平成25年4月25日（毎月25日発行）
第1099号

Vol. 104 No. 4
April 2013

CODEN: FKIZA4
ISSN 0016-254X

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

第104巻 第4号 (1099)

平成25年4月25日

特 集 号

油症とPCB及びダイオキシン関連化合物

研 究 報 告 第 24 集

責任編集者 古江増隆

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

Guest Editor Masutaka Furue

福岡医誌

Fukuoka Acta Med.

油症と PCB 及びダイオキシン関連化合物に関する研究

報告集 第 24 集

(福岡医学雑誌 第 104 巻 第 4 号 平成 25 年 4 月)

目 次

序 言	古江 増隆…71
油症における特異抗核抗体の検討	辻 博…73
油症患者におけるダイオキシン類異性体ごとの症状ならびに異性体間の濃度と半減期の関係	松本 伸哉・赤羽 学・神奈川芳行・梶原 淳睦 内 博史・古江 増隆・今村 知明…78
油症患者における血清アディポカイン濃度に関する研究	内 博史・古江 増隆…85
油症認定患者における IL-21, TGF- β の検討	鍛塚 大・小池 雄太・清水 和宏・宇谷 厚志…88
油症認定患者における, 制御性 T 細胞産生サイトカイン IL-10, IL-35 の検討	小池 雄太・鍛塚 大・清水 和宏・宇谷 厚志…91
長崎県カネミ油症検診者の血清尿酸値	吉村 俊朗・川崎 涼子・吉村 俊祐 宮崎禎一郎・向野 晃弘・米澤 武人…95
油症患者における顎関節症に関する臨床的検討	川崎 五郎・吉富 泉・梅田 正博…100
血液中ダイオキシン, PCB 類濃度測定のカロスチェック	梶原 淳睦・戸高 尊・平川 博仙・堀 就英 安武 大輔・宮脇 崇・飛石 和大・高尾 佳子 平田 輝昭・内 博史・古江 増隆…104
油症患者血液中ダイオキシン類分析における新しい大量注入法の検討 (英文)	戸高 尊・内 博史・平川 博仙・梶原 淳睦・古江 増隆…110
2004 年から 2010 年の期間における油症患者血液中ダイオキシン類濃度の推移 (英文)	戸高 尊・内 博史・平川 博仙 高尾 佳子・梶原 淳睦・古江 増隆…118
LC/MS/MS を用いた血液試料中の水酸化ポリ塩化ビフェニル (OH-PCBs) 測定法の改良 (英文)	飛石 和大・鈴木 茂・戸高 尊・平川 博仙・堀 就英 梶原 淳睦・平田 輝昭・飯田 隆雄・内 博史・古江 増隆…128
2010 年度油症認定患者血液中の水酸化ポリ塩化ビフェニル (OH-PCBs) 濃度 (英文)	飛石 和大・鈴木 茂・戸高 尊・平川 博仙・堀 就英 梶原 淳睦・平田 輝昭・飯田 隆雄・内 博史・古江 増隆…136
ダイオキシン母体曝露による胎児副腎ステロイド合成系への影響と性差	武田 知起・服部友紀子・藤井美彩紀 田浦 順樹・石井 祐次・山田 英之…143

血液中 PCB 異性体分離分析におけるアルカリ分解温度の検討

堀 就英・山本 貴光・石黒 靖尚・飯田 隆雄
梶原 淳睦・平田 輝昭・内 博史・古江 増隆…152

2,2',3,4',5,5'-六塩素化ビフェニル (CB146) の in vitro 代謝の動物種差

太田 千穂・原口 浩一・加藤 善久・遠藤 哲也・古賀 信幸…161

The Twenty-four Reports of the Study on Yusho
—PCBs and Dioxin-Related Compounds—
(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 104, No. 4, 2013)

CONTENTS

Foreword	M. Furue···71
Antibodies to Specific Nuclear Antigens in Patients with Yusho	H. Tsuji···73
Relationships between Concentrations of Dioxin Isomers and Symptoms, and among Concentrations and Half-Lives of Dioxin Isomers, in Patients with Yusho Disease S. Matsumoto, M. Akahane, Y. Kanagawa, J. Kajiwara, H. Uchi, M. Furue and T. Imamura···78	
Adipokine Profile of Yusho Patients	H. Uchi and M. Furue···85
Serum Levels of IL-21 and TGF- β in the Yusho Patients Y. Kuwatsuka, Y. Koike, K. Shimizu and A. Utani···88	
Serum Levels of IL-10 and IL-35 in Yusho Patients Y. Koike, Y. Kuwatsuka, K. Shimizu and A. Utani···91	
Increased Rate of Serum Uric Acid Levels in Yusho Sufferers T. Yoshimura, R. Kawasaki, S. Yoshimura, T. Miyazaki, A. Mukaino and T. Yonezawa···95	
A Clinical Study of TMJ Arthrosis in Yusho Patients G. Kawasaki, I. Yoshitomi and M. Umeda···100	
Inter-Laboratory Crosscheck Study of Dioxins and PCBs in Human Blood Samples J. Kajiwara, T. Todaka, H. Hirakawa, T. Hori, D. Yasutake, T. Miyawaki, K. Tobiishi, Y. Takao, T. Hirata, H. Uchi and M. Furue···104	
Development of a Newly Large-Volume Injection System for Dioxin Determinations in Blood of Yusho Patients T. Todaka, H. Uchi, H. Hirakawa, J. Kajiwara and M. Furue···110	
The Changes in Dioxin Concentrations in the Blood of Yusho Patients from 2004 to 2010 T. Todaka, H. Uchi, H. Hirakawa, Y. Takao, J. Kajiwara and M. Furue···118	
Improvement of Measurement Method for Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Blood Samples using LC/MS/MS K. Tobiishi, S. Suzuki, T. Todaka, H. Hirakawa, T. Hori, J. Kajiwara, T. Hirata, T. Iida, H. Uchi and M. Furue···128	
Concentration of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in the Blood of Yusho Patients in 2010 K. Tobiishi, S. Suzuki, T. Todaka, H. Hirakawa, T. Hori, J. Kajiwara, T. Hirata, T. Iida, H. Uchi and M. Furue···136	

- The Gender-Specific Effect of Maternal Exposure to Dioxin on Fetal Steroidogenesis in the Adrenal Gland
T. Takeda, Y. Hattori, M. Fujii, J. Taura, Y. Ishii and H. Yamada···143
- Examination of Alkali Digestion Temperature in Isomer Specific Analysis of PCB in Whole Blood Sample
T. Hori, T. Yamamoto, Y. Ishiguro, T. Iida,
J. Kajiwara, T. Hirata, H. Uchi and M. Furue···152
- Species Difference in the Metabolism of 2,2',3,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (CB146) by Animal and Human Liver Microsomes
C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo and N. Koga···161

序 言

厚生労働省全国油症治療研究班・班長

九州大学大学院医学研究院・教授

古 江 増 隆

Foreword

Masutaka FURUE

Chief of The Study Group for Yusho

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

Professor, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University

A mass poisoning, involving at least 2000 individuals, occurred in Kyushu (Western Japan) in 1968. The incident is called Yusho, oil disease, as it was caused by ingestion of rice bran oil that was contaminated with Kanechlor-400, a commercial brand of Japanese polychlorinated biphenyls (PCBs). It was later found the rice oil had been contaminated with not only PCBs but also polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), polychlorinated quaterphenyls (PCQs) and others.

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

A method for quantification of PCBs in the blood was developed after 1973, five years after the outbreak of Yusho. The blood polychlorinated quaterphenyls (PCQs) levels were then added to the diagnostic criteria of Yusho as a relatively specific marker. Although the blood levels of dioxins were very low, we developed a sensitive method of qualifying the blood level of dioxins which allowed us to detect low levels of dioxins in 5 ml of blood. Notably, the sensitive method revealed that the blood levels of 2,3,4,7,8-penta-CDF remained very high in the Yusho patients even 40 years had passed since its occurrence, leading to add the blood levels of 2,3,4,7,8-penta-CDF in the diagnostic criteria in Sep. 29th, 2004.

The clinical and basic studies and follow-up of patients conducted by this study group are extremely important not only for supporting patients' health but also for understanding the potential and prolonged effects of exposure to PCBs and dioxins in humans. From this point of view, a patient-consultation system for Yusho has been established from 2002. The Yusho consultants keep in touch with the patients by direct interview, by phone or by mail. Various types of questionnaire were carried out by Yusho consultants. Statistical correlations were analyzed between blood PeCDF levels and clinical/laboratory manifestations in addition to questionnaire comments.

Patients with Yusho still complain various subjective and objective symptoms. We very much appreciate the contribution and participation of the patients in health examinations for follow-up of Yusho each year. I also deeply thank all of the members of the study group and the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare for their efforts to help and support patients' health and well-being.

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

厚生労働省全国油症治療研究班の第 24 報告集を刊行することができましたことを大変うれしく思っております。平成 23 年度と平成 24 年度の研究成果ならびに関連分野の情報などをまとめております。油症は 1968 年（昭和 43 年）に西日本一帯の広範囲な住民の方々が、熱媒体として使用されていた PCB の混入した食用米ぬか油を摂取したことによって起こった食中毒事件です。その後、研究班によって PCDF などのダイオキシン類も混入していたことがつきとめられ、油症は PCB 類とダイオキシン類による複合中毒であったことが証明されました。事件発生 5 年後くらいから PCB の血中濃度測定が可能になりました。その後、PCQ も油症に比較的特異的に検出されることが判明し診断基準に加わりました。ダイオキシン類は血中にごくわずかにしか含まれていないために、その定量は困難な状況でしたが、研究班内での技術改良により少ない血液量で再現性のあるダイオキシン類測定が可能となり、超微量測定の妥当性・精度・再現性などの解析を行った後に、血液中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) 値が油症診断基準（平成 16 年 9 月 29 日補遺）に追補されました。

患者さんの健康管理と健康相談の窓口として、2002 年から油症相談員システムを立ち上げました。油症相談員は検診での直接面接、電話や手紙による問診や相談受付などを行ないます。油症相談員の活躍によって、従来よりも信頼性の高いアンケート調査を行なうことが可能となりました。そのようなアンケート調査や実際の検診結果などと血液中のダイオキシン類濃度を統計学的に比較することが可能となりました。本報告集の論文はその成果の一部です。いくつかの研究成果は油症ニュース (<http://www.kyudai-derm.org/part/yusho/index.html>) にとりあげて、認定者の方々に送付しております。毎年検診に参加いただいている認定者の方々に御礼申し上げますとともに、油症検診 (<http://www.kyudai-derm.org/yusho/index.html>) にお力添えをいただいている班員の方々、そして各県の行政の方々、厚生労働省担当課の皆様にも深く感謝申し上げます。

謝辞：本誌は、平成 23 年度および平成 24 年度において厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）（課題番号：H24 - 食品 - 指定 - 014）を受け実施した研究の成果です。ここに記して謝意を表します。

油症における特異抗核抗体の検討

北九州津屋崎病院 内科

辻 博

Antibodies to Specific Nuclear Antigens in Patients with Yusho

Hiroshi Tsuji

Department of Internal Medicine, Kitakyushu-Tsuyazaki Hospital

Abstract To investigate chronic immune effects of polychlorinated biphenyl (PCB) and polychlorinated dibenzofuran (PCDF), autoantibodies including anti-Smith (Sm) antibody, anti-ribonucleoprotein (RNP) antibody, anti-centromere antibody and anti-double-stranded DNA (dsDNA) antibody, were studied in 168 patients with Yusho and 54 controls in 2012. Autoantibodies were present in some patients of Yusho; 1 case (0.6%) for anti-Sm antibody, 4 cases (2.4%) for anti-centromere antibody and 11 cases (6.5%) for anti-dsDNA antibody. However, these autoantibodies were not demonstrated in any controls. There was a significantly higher prevalence of elevated anti-centromere antibody in subjects with high PCB concentration than in those with low PCB concentration. We conclude that anti-centromere antibody is present in patients with Yusho, and it may be associated with blood PCB concentration.

Key words : Yusho · Antinuclear antibody · Anti-centromere antibody · PCB

はじめに

本邦において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九州を中心に発生した油症では、原因油の分析から油症の原因物質としてポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)の毒性影響が大きいと考えられる¹⁾²⁾。PCDFは、狭義のダイオキシンであるポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(PCDD)およびコプラナーPCBとともにダイオキシン類と総称され、これらの物質の毒性は細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体(Ah受容体)を介すると考えられている³⁾。しかし、その機構の詳細は未だ不明である。油症発生以来40年以上が経過し種々の症状は軽快しているが、重症例においては体内のPCB濃度が今なお高く血中PCBの組成には未だに特徴的なパターンが認められ、慢性中毒に移行

していると推定される^{4)~6)}。2001年度より福岡県油症一斉検診においてダイオキシン類の測定が開始され、油症患者では現在においても未だに血中PCDF濃度が高値であり、PCDFの体内残留が推測される⁷⁾。

最近、PCBあるいはダイオキシン類が内分泌攪乱物質として正常なホルモン作用を攪乱し、生殖機能の障害、悪性腫瘍の発生、免疫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、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、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¹⁰⁾。そして、2007年度福岡県油症一斉検診において、血中PCB低濃度群に比べ高濃度群に抗核抗体の出現を有意に高頻度に認めた。さ

correspondence author : Hiroshi Tsuji, M.D., Ph.D.
Department of Internal Medicine, Kitakyushu-Tsuyazaki Hospital, Watari 1693, Fukutsu, Fukuoka 811-3307, Japan
Tel : +81-940-52-0034 Fax : +81-940-52-2779
E-mail : htsuji@kitakyu-hp. or. jp.

らに、血中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) 低濃度群に比べ高濃度群に抗核抗体の出現を有意に高頻度に認め、油症における抗核抗体の出現に PCB および PCDF の関与が示唆された。抗核抗体は細胞の核に対する自己抗体であり、抗核抗体を構成する特異自己抗体として抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗セントロメア抗体および抗 double-stranded DNA (dsDNA) 抗体等が知られている¹¹⁾。

今回、2012 年度福岡県油症一斉検診において油症に認められる抗核抗体の性状を明らかにするために抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体等の特異抗核抗体を測定し、油症原因物質である PCB および 2,3,4,7,8-PeCDF の特異抗核抗体に対する慢性的影響について検討した。

対象および方法

2012 年度福岡県油症一斉検診の受診者 255 例にアンケートによるインフォームドコンセントを実施し、抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体等の抗核抗体を構成する特異自己抗体の測定による免疫機能検査に同意が得られた 251 例を対象者とした。採血は午前中の空腹時に行なった。抗 Sm 抗体 (MESACUP3-テスト Sm, 医学生物学研究所)、抗 RNP 抗体 (抗 RNP 抗体 (E) [S], ティーエフピー)、抗セントロメア抗体 (MESACUP2-テスト CENP-B, 医学生物学研究所) は enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法で、抗 dsDNA 抗体は radioimmunoassay (RIA) 硫酸塩析法 (リコンビジェン抗 DNAPII キット, 三菱化学メディエンス) で測定した。

PCB の測定は福岡県保健環境研究所、福岡市保健環境研究所、北九州市環境科学研究所および北九州生活科学センターで、2,3,4,7,8-PeCDF の測定は福岡県保健環境研究所で行なった。血中 PCB 濃度は 2012 年度福岡県油症一斉検診において測定した 251 例の測定値を用い、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 2012 年度福岡県油症一斉検診に最も近い時期に測定した 2001 年度 1 例、2002 年度 1 例、2006 年度 6 例、2007 年度 10 例、2008 年度 17 例、2009 年度 15 例、2010 年度 72 例、2011 年度 24 例、2012 年度 83 例の計 229 例の測

定値を用い、特異抗核抗体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、異常値の出現頻度の比較は χ^2 検定で行なった。

結 果

2012 年度福岡県油症一斉検診を受診し、抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体の測定に同意が得られた 251 例の内訳は女性 141 例、男性 111 例、平均年齢は 61.7 ± 16.2 (11-95) 歳であり、油症患者 168 例、未認定患者 54 例、観察者 4 例、初回受診者 25 例であった。血中 PCB 濃度と年齢の間に有意の正の相関 ($r=0.5736$, $P < 0.001$) を、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と年齢の間に有意の正の相関 ($r=0.3439$, $P < 0.001$) を認めた。

2012 年度福岡県油症一斉検診の受診者 251 例中、抗 Sm 抗体が測定下限値 7.0 U/ml を超える上昇を認めたものは 1 例であった。75 歳、男性の油症患者で、9.1 U/ml と基準値 10.0 U/ml 以下であった。抗 RNP 抗体は、全例において測定下限値 7.0 U/ml 以下であった。抗セントロメア抗体が測定下限インデックス値 5.0 以上の上昇を認めたものは 6 例であり、その内訳は女性 4 例、男性 2 例で、油症患者 4 例、観察者 1 例、初回受診者 1 例であった。そして、インデックス値が基準値 10.0 を超えるものは 4 例であり、その内訳は女性 3 例、男性 1 例で、油症患者 3 例、観察者 1 例であった。抗 dsDNA 抗体が測定下限値 2.0 IU/ml を超える上昇を認めたものは 13 例であった。13 例の内訳は女性 6 例、男性 7 例であり、油症患者 11 例、初回受診者 2 例であった。そして、抗 dsDNA 抗体が基準値 6.0 IU/ml を超えるものは油症患者 2 例であった。抗 Sm 抗体、抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体のいずれか 1 項目以上の上昇を認めるものは 19 例であり、内訳は女性 9 例、男性 10 例で、油症患者 15 例、観察者 1 例、初回受診者 3 例であった。そして、基準値を超えるものは抗セントロメア抗体が 4 例と最も多く、次いで抗 dsDNA 抗体を 2 例に認めた。抗セントロメア抗体の上昇を認めたものに膠原病、強皮症、CREST 症候群を認めなかった。油症患者 168 例について未認定患者 54 例を対照者として抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗セントロメア抗体

Table 1 Antibodies to specific nuclear antigens in patients with Yusho and controls

No.	Yusho	Controls
	168	54
anti-Sm antibody	1 (0.6%)	0
anti-RNP antibody	0	0
anti-centromere antibody	4 (2.4%)	0
anti-dsDNA antibody	11 (6.5%)	0

Table 2 Antibodies to specific nuclear antigens in Yusho patients with high PCB concentration and subjects with low PCB concentration

No.	PCB concentration	
	≥ 1.2 ppb	< 1.2 ppb
	90	161
anti-Sm antibody	1 (1.1%)	0
anti-RNP antibody	0	0
anti-centromere antibody	5 (5.6%)*	1 (0.6%)
anti-dsDNA antibody	4 (4.4%)	9 (5.6%)

* $P < 0.05$ vs. PCB concentration < 1.2 ppb.

Table 3 Antibodies to specific nuclear antigens in Yusho patients with high 2,3,4,7,8-PeCDF concentration and subjects with low 2,3,4,7,8-PeCDF concentration

No.	2,3,4,7,8-PeCDF concentration	
	≥ 30 pg/g lipids	< 30 pg/g lipids
	89	140
anti-Sm antibody	1 (1.1%)	0
anti-RNP antibody	0	0
anti-centromere antibody	2 (2.2%)	2 (1.4%)
anti-dsDNA antibody	3 (3.4%)	8 (5.7%)

および抗 dsDNA 抗体上昇の出現頻度について検討した (Table 1). 油症患者 168 例中 1 例 (0.6%) に抗 Sm 抗体の上昇を, 4 例 (2.4%) に抗セントロメア抗体の上昇を, 11 例 (6.5%) に抗 dsDNA 抗体の上昇を認めましたが, 対照者にこれらの抗体の上昇を認めたものはみられなかった.

2012 年度福岡県油症一斉検診の受診者 251 例について血中 PCB 濃度 1.2 ppb 以上の 90 例を血中 PCB 高濃度群, 血中 PCB 濃度 1.2 ppb 未満の 161 例を血中 PCB 低濃度群として, 両群間の抗 Sm 抗体, 抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体の出現頻度について検討を行なった (Table 2). 血中 PCB 高濃度群の平均血中 PCB 濃度は 1.96 ± 0.92 ppb, 血中 PCB 低濃度群の平均血中 PCB 濃度は 0.59 ± 0.32 ppb であった. 抗 Sm 抗体を PCB 高濃度群に 1 例 (1.1%) 認めた. 抗セントロメア抗体は血中 PCB 低濃度群 1 例 (0.6%) に対し血中 PCB 高濃度群 5 例 (5.6%) に認め, 有意に高頻度であった ($P < 0.05$). 抗

dsDNA 抗体は血中 PCB 低濃度群に 9 例 (5.6%), 血中 PCB 高濃度群に 4 例 (4.4%) 認め, 両群間に差をみなかった.

2012 年度福岡県油症一斉検診の受診者 251 例中, 血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が測定された 229 例について血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 30 pg/g lipids 以上の 89 例を血中 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群, 30 pg/g lipids 未満の 140 例を低濃度群として両群間の抗 Sm 抗体, 抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体上昇の頻度について検討を行なった (Table 3). 高濃度群の平均血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 228.6 ± 240.16 pg/g lipids, 低濃度群の平均血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 12.8 ± 7.4 pg/g lipids であった. 抗 Sm 抗体を高濃度群に 1 例 (1.1%) 認めた. 抗セントロメア抗体の上昇を血中 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群に 2 例 (2.2%), 低濃度群に 2 例 (1.4%) 認め, 両群間に差をみなかった. また, 抗 dsDNA 抗体は 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に 8 例 (5.7%), 高

濃度群に3例(3.4%)認め、両群間に差をみなかった。

考 察

油症における免疫機能への影響については血中 PCB 濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認めることが報告されている。油症発症 28 年後の 1996 年の甲状腺機能検査において、甲状腺ホルモンは血中 PCB 濃度 3.0 ppb 以上の PCB 高濃度群と 3.0 ppb 未満の PCB 低濃度群の間に差がみられなかったが、抗サイログロブリン抗体を PCB 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¹²⁾。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、油症において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¹⁰⁾。そして、2007 年度福岡県油症一斉検診において、血中 PCB 濃度と免疫グロブリン IgA, リウマチ因子との間に有意の相関を認め、血中 PCB 低濃度群に比べ高濃度群に抗核抗体の出現を有意に高頻度に認めた。さらに、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と免疫グロブリン IgA, リウマチ因子の間にも有意の相関を認め、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ高濃度群に抗核抗体の出現を有意に高頻度に認めた。油症における免疫グロブリン IgA およびリウマチ因子の上昇、抗核抗体の出現に PCB および PCDF が関与している可能性が考えられ、液性免疫に対する PCB および PCDF の慢性的影響が示唆された。抗核抗体は細胞の核に対する自己抗体であり、抗核抗体を構成する特異自己抗体として核内リボ核蛋白を対応抗原とする抗 Sm 抗体および抗 RNP 抗体、セントロメア A, B, C 蛋白を対応抗原とする抗セントロメア抗体、dsDNA を対応抗原とする抗 dsDNA 抗体等が知られている¹¹⁾。

油症において認められる抗核抗体の性状を明らかにするため抗核抗体を構成する特異自己抗体として抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体を検討した。2012 年度

福岡県油症一斉検診の受診者 251 例中、抗 Sm 抗体を 1 例に、抗セントロメア抗体を 6 例に、抗 dsDNA 抗体を 13 例に上昇を認めたが、抗 RNP 抗体は認められなかった。油症患者 168 例中、抗 Sm 抗体を 0.6%に、抗セントロメア抗体を 2.4%に、抗 dsDNA 抗体を 6.5%に上昇を認めたが、対照者にはいずれの抗体の上昇もみられなかった。そして、基準値を超えるものは抗セントロメア抗体を最も多く認め、抗セントロメア抗体上昇の出現頻度は血中 PCB 低濃度群の 0.6%に比べ血中 PCB 高濃度群において 5.6%と有意に高頻度であった。油症において、抗セントロメア抗体の出現に PCB が関与している可能性が考えられ、慢性的影響が示唆される。抗セントロメア抗体は染色型が離散斑紋型を示す抗核抗体であり、セントロメア部分の DNA に結合した染色体の分離に関わるセントロメア A, B, C 蛋白質を対応抗原とする自己抗体である。抗セントロメア抗体は強皮症の軽症型である CREST 症候群に高率に出現することが知られているが、抗セントロメア抗体を認めた油症患者に膠原病、強皮症、CREST 症候群は認められなかった。

今回の検討では、2012 年度福岡県油症一斉検診の受診者において抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体を検討し、油症患者に抗 Sm 抗体、抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体の上昇を認めたが、対照者にはみられなかった。また、基準値を超えるものは抗セントロメア抗体が最も多く、上昇の出現頻度は血中 PCB 低濃度群に比べ血中 PCB 高濃度群において高頻度であった。油症発生以来 40 年以上が経過しているが、血中 PCB 濃度が高値の油症患者においては抗セントロメア抗体の上昇を認め、油症において抗セントロメア抗体の上昇に PCB の慢性的影響が示唆される。今回は抗核抗体について核内の多くの抗原に対応する特異自己抗体の中で抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体を検討したが、他の特異自己抗体についても検討が必要と考えられる。

総 括

2012 年度福岡県油症一斉検診の受診者 251 例(油症患者 168 例、未認定患者 54 例、観察者 4 例、初回受診者 25 例)において抗 Sm 抗体、抗 RNP

抗体, 抗セントロメア抗体および抗 dsDNA 抗体を測定した. 油症患者 168 例中, 1 例 (0.6%) に抗 Sm 抗体を, 4 例 (2.4%) に抗セントロメア抗体を, 11 例 (6.5%) に抗 dsDNA 抗体の上昇を認めしたが, いずれの抗体の上昇も対照者にはみられなかった. 抗 RNP 抗体の上昇は認められなかった. 基準値を超えるものは抗セントロメア抗体が最も多く, 次いで抗 dsDNA 抗体を認めた. 抗セントロメア抗体の出現頻度は血中 PCB 低濃度群に比べ血中 PCB 高濃度群において高頻度であり, 油症において抗セントロメア抗体の出現に PCB が関与している可能性が考えられる.

参 考 文 献

- 1) Masuda Y and Yoshimura H : Polychlorinated biphenyls and dibenzo- furans in patients with Yusho and their toxicological significance : A Review. Amer. J. Ind. Med. 5 : 31-44, 1984.
- 2) Oishi S, Morita M and Fukuda H : Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 43 : 13-22, 1978.
- 3) Gonzalez FJ, Liu SY and Yano M : Regulation of cytochrome P450 genes : molecular mechanism. Pharmacogenetics 3 : 51-57, 1993.
- 4) 飯田隆男, 芥野岑男, 高田智, 中村周三, 高橋克巳, 増田義人 : ヒトの血液中におけるポリ塩化ビフェニルおよびポリ塩化クアテルフェニルについて. 福岡医誌 72 : 185-191, 1981.
- 5) 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一 : 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニル異性体. 福岡医誌 76 : 150-152, 1985.
- 6) 増田義人, 原口浩一, 古野純典 : 油症患者における PCB 異性体の 30 年にわたる特異な残留. 福岡医誌 94 : 136-143, 2003.
- 7) 飯田隆男, 戸高尊, 平川博仙, 飛石和夫, 松枝隆彦, 堀就英, 中川礼子, 古江増隆 : 油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査 (2001 年). 福岡医誌 94 : 126-135, 2003.
- 8) Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP and Becker JL : Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Fundam. Appl. Toxicol. 21 : 433-441, 1993.
- 9) Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y and Kato S : Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. Nature 423 : 545-550, 2003.
- 10) 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.
- 11) Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH and Homburger HA : Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. Arch Pathol Lab Med. 124 : 71-81, 2000.
- 12) 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.

(Received for publication March 22, 2013)

油症患者におけるダイオキシン類異性体ごとの症状 ならびに異性体間の濃度と半減期の関係

¹⁾ 東京大学大学院医学系研究科 社会医学専攻

²⁾ 奈良県立医科大学 健康政策医学講座

³⁾ 福岡県保健環境研究所

⁴⁾ 九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

⁵⁾ 九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

松本伸哉¹⁾²⁾, 赤羽 学²⁾, 神奈川芳行¹⁾, 梶原淳睦³⁾, 内 博史⁴⁾⁵⁾,
古江増隆⁴⁾⁵⁾, 今村知明²⁾

Relationships between Concentrations of Dioxin Isomers and Symptoms, and among Concentrations and Half-Lives of Dioxin Isomers, in Patients with Yusho Disease

Shinya MATSUMOTO¹⁾²⁾, Manabu AKAHANE²⁾, Yoshiyuki KANAGAWA¹⁾, Jumboku KAJIWARA³⁾,
Hiroshi UCHI⁴⁾⁵⁾, Masutaka FURUE⁴⁾⁵⁾ and Tomoaki IMAMURA²⁾

¹⁾ *Division of Social Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo*

²⁾ *Department of Public Health, Health Management and Policy, Nara Medical
University School of Medicine*

³⁾ *Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences*

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

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

Abstract The relationships among dioxin isomers are not well understood. This study aimed to clarify the relationships among isomers using two methods. First, the relationships between isomers and symptoms were analyzed by analysis of variance. Second, concentrations and half-lives were determined for each isomer in each patient, and correlation coefficients for the concentrations and half-lives among isomers were calculated. Two isomers very similar to 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (2, 3, 4, 7, 8-PeCDF) were correlated with symptoms of Yusho disease. The correlation coefficients among three isomers similar to 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF were very high at 0.98, indicating that there may be a mechanism which maintains constant ratios among these isomers.

Key words : Yusho · Dioxins · Isomer · Half-life

背景と目的

油症は、1960年代後半に九州北部で発生したダイオキシン類による中毒事件である。当初は、polychlorinated biphenyl (PCB) が原因と考えられていた。しかし、研究の結果、主たる原因は、

ダイオキシン類の一つである、2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (PeCDF) であることが判明している¹⁾。

神奈川らは²⁾、主成分分析を用いて、2,3,4,7,8-PeCDF レベルがポリ塩化ビフェニル (PCB) とポリ塩化クアテルフェニル (PCQ) レベルに強

Corresponding Author : Shinya MATSUMOTO

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

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

く関連することを報告した。さらに、ざ瘡様皮疹や黒色面皰、総ビリルビンなどの油症症状の代表的なものに加えて、血糖値、関節痛、総コレステロール値、尿糖、赤血球沈降速度（2時間値）、チモール、およびナトリウム値と関連することも明らかにしている。また、我々は、これまでに2,3,4,7,8-PeCDFの濃度と、他のダイオキシン類濃度間の相関係数、半減期の逆数の相関係数を報告してきた³⁾。

しかしながら、各異性体が、どの症状を引き起こしやすいかは、まだ解明されていない。本研究では、油症患者のダイオキシン類の濃度から、異性体による症状の差異の有無を探ることを目的とした。具体的には、患者実態調査のアンケート結果⁴⁾と油症一斉検診における血中ダイオキシン類濃度との関係を導き出し、似たような症状を示すダイオキシン類異性体を特定する。

また、各種異性体間の関係が強いことにより発生する疑似的関係の可能性を求めるため、関係が強く現れた異性体間の濃度および半減期の相関係数を求めた。さらに、実態調査とダイオキシン類濃度の関係から、2,3,4,7,8-PeCDFの症状と似ている異性体のすべての組み合わせについて、濃度と半減期の逆数の相関係数を求めた。

方 法

本研究では、二つの分析を実施した。一つは、各異性体と症状との関係を求めた。もう一つは、症状との関係が強かった異性体同士で濃度の関係を求めた。

1. ダイオキシン類の各異性体濃度と症状の関係

対象は、平成21年度に実施された油症実態調査に回答された患者1,131名の内、平成13年度～20年度までの油症患者一斉検診を受診し、ダイオキシン類濃度を測定した患者585名の内、Octachlorodibenzofuran (OCDF)の測定結果が3回のうち、最初の2回が検出限界以下で、最後の1回が、すべての患者の全測定における最大値を示した1名の患者を除いた。ダイオキシン類濃度を複数回測定した患者は、測定結果の算術平均をもって代表値とした。

油症実態調査のアンケート項目と2,3,4,7,8-PeCDF濃度を用いて分散分析を行い、PeCDF

濃度と症状の関係の強さの指標を計算し、濃度と関連の強さを検討した。また、油症患者の症状等は、加齢に伴う要因も大きいと考えられることや、全年齢の患者を対象に分散分析を実施すると、ダイオキシン類濃度が年齢と相関を有しているため加齢に伴う症状が現れることから、60歳未満、60歳以上75歳未満、75歳以上の三つの年齢別に分散分析を実施した。さらに、症状の有無により、2,3,4,7,8-PeCDF濃度の平均値を計算した。

2. ダイオキシン類の各異性体濃度と半減期の相関係数

平成14年から平成22年までに3回以上測定した患者455名を対象とした。その内2,3,4,7,8-PeCDF濃度が50pg/glipid以上であった患者は179名、200pg/glipid以上は90名である。

患者ごとの半減期を求めるために、患者ごとに計測年を独立変数として、各異性体の濃度の2の対数を従属変数として、線形回帰を実施した。線形回帰式の傾きは、各患者の濃度の変化率を表す。この濃度の変化率の負の逆数が、各患者の異性体ごとの半減期である。このように求めた、各患者の濃度の変化率の異性体間の相関係数を求めた。また、濃度の平均値の異性体間の相関係数を求めた。データ分布の特性上、半減期としてではなく、逆数の濃度の変化率を用いて分析を実施した。

結 果

1. ダイオキシン類の各異性体濃度と症状の関係

60歳未満の患者を対象に、ダイオキシン類濃度と症状の有無で分散分析を行い、P値が5%以下の異性体の数が多い順に20位までの症状を並べた結果を表1に示す。表中の斜体文字の箇所がP値5%以下で関係があると考えられる組み合わせである。

上位に挙がっている症状であっても、P値が大きく、油症の原因物質と考えられる2,3,4,7,8-PeCDFとの関係がないと考えられる症状は、「痛風」「椎間板ヘルニア」「皮膚・爪の病気」であった。これら3つの症状と関係が強い異性体は、1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 3,3',4,4',5,5'-HxCBであった。この中で、20位までの症状のうち、P値が5%以下の症状の数をみ

表1 ダイオキシン類異性体濃度と症状の分散分析結果 P値 斜体は5%以下 (60歳未満) 上位20症状

2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-TCDD	2,3,4,7,8-PeCDF	1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,7,8-PeCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDD	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,4,6,7,8-HxCDF	1,2,3,4,6,7,8-HxCDF	1,2,3,4,6,7,8-HxCDF	OCDF	OCDD	3,3',4,4',5,5'-HxCB	3,3',4,4',5-PeCB	3,4,4',5-TCB	3,3',4,4',5-TCB
0.1554	0.2466	0.0360	0.0407	0.1114	0.0019	0.0031	0.0209	0.0251	0.0063	0.0181	0.6960	0.0058	0.0446	0.5140	0.3652
0.6091	0.1438	0.0443	0.0124	0.0089	0.0337	0.0199	0.0423	0.0020	0.0112	0.5062	0.8591	0.0021	0.3985	0.0237	0.7670
0.3052	0.1491	0.0014	0.0000	0.0382	0.1506	0.0248	0.0000	0.0000	0.0000	0.7889	0.9430	0.0030	0.3262	0.3678	0.9050
0.9178	0.0000	0.0862	0.0141	0.0002	0.2475	0.1045	0.0444	0.0142	0.0030	0.0270	0.8368	0.1130	0.2208	0.1276	0.7308
0.0388	0.1365	0.4744	0.5148	0.0033	0.0486	0.0028	0.7479	0.5780	0.9600	0.0004	0.8716	0.0156	0.0741	0.1879	0.7873
0.0396	0.1502	0.0009	0.0000	0.4880	0.1561	0.0721	0.0007	0.0000	0.0000	0.8133	0.8368	0.6554	0.1730	0.7809	0.7308
0.5841	0.0113	0.0058	0.0004	0.3041	0.8178	0.7137	0.0032	0.0024	0.0021	0.9694	0.1627	0.8980	0.7563	0.3681	0.2334
0.8928	0.5568	0.0555	0.0010	0.8022	0.0349	0.0772	0.0138	0.0007	0.0029	0.5451	0.8716	0.0255	0.5243	0.0192	0.7873
0.2053	0.2367	0.0362	0.0229	0.0308	0.3520	0.1049	0.1337	0.0181	0.0106	0.0082	0.8476	0.7143	0.0682	0.7203	0.7482
0.4880	0.8158	0.0160	0.0001	0.8813	0.6002	0.9903	0.0092	0.0019	0.0019	0.9450	0.6297	0.4411	0.4984	0.7839	0.7861
0.3068	0.8463	0.0231	0.0012	0.8806	0.5555	0.4873	0.0017	0.0020	0.0054	0.7774	0.0759	0.4638	0.3230	0.4145	0.8946
0.7831	0.7944	0.0433	0.0016	0.8695	0.8194	0.3874	0.0155	0.0020	0.0014	0.5062	0.8591	0.7508	0.5431	0.8362	0.7670
0.1894	0.1192	0.0041	0.0022	0.4336	0.1639	0.0926	0.0790	0.0095	0.0144	0.6608	0.7986	0.1058	0.7465	0.1115	0.1825
0.0773	0.9132	0.0230	0.0314	0.4800	0.3307	0.3264	0.0820	0.0522	0.0277	0.0383	0.2713	0.1947	0.4434	0.0314	0.1304
0.0078	0.0180	0.2039	0.5444	0.0285	0.0507	0.0831	0.4030	0.4535	0.7134	0.1983	0.7024	0.0001	0.4949	0.0002	0.5234
0.2001	0.2647	0.0107	0.0000	0.2936	0.6435	0.1138	0.0072	0.0000	0.0000	0.4820	0.7986	0.9310	0.9520	0.8231	0.6701
0.1796	0.2037	0.0965	0.0026	0.6176	0.0559	0.0155	0.2988	0.0038	0.0130	0.9636	0.8076	0.0309	0.9119	0.2494	0.6842
0.8383	0.4327	0.1555	0.0246	0.1300	0.0187	0.1238	0.3925	0.0314	0.0240	0.0691	0.5426	0.0086	0.9238	0.0779	0.9461
0.4473	0.3275	0.0503	0.0372	0.9403	0.9424	0.3667	0.0226	0.0427	0.0401	0.7161	0.4507	0.5666	0.4497	0.8908	0.7028
0.5107	0.5246	0.2511	0.7854	0.7064	0.0080	0.0003	0.6611	0.8210	0.9888	0.0139	0.9430	0.0000	0.5796	0.0001	0.9050
															0.6814
															0.9461
															0.8878
															0.6952

ると、2,3,4,7,8-PeCDFと同程度の症状が上
がっており、強い関係があると考えられるのは、
1,2,3,4,7,8-HxCDFと1,2,3,6,7,8-HxCDFで
あった。2,3,4,7,8-PeCDFと似たような症状を
示す異性体としては、1,2,3,4,7,8-HxCDFと1,
2,3,6,7,8-HxCDFであった。また、この2異性
体ほど似ていないが、かなり似ている異性体とし
て、1,2,3,7,8-PeCDD、1,2,3,6,7,8-HxCDD、3,
3',4,4',5,5'-HxCBがあった。

2. ダイオキシン類の各異性体濃度と半減期の逆 数の相関係数の関係

対象全患者の半減期の逆数の相関係数を表2-
1(a)に、濃度の相関係数を表2-1(b)に示
す。1,2,3,4,7,8-HxCDFと1,2,3,6,7,
8-HxCDFの濃度の相関係数が0.9559と極めて
高い。

2,3,4,7,8-PeCDF濃度50pg/glipidの患者の
半減期の逆数の相関係数を表2-2(a)に、濃度
の相関係数を表2-2(b)に示す。1,2,3,4,7,
8-HxCDFと1,2,3,6,7,8-HxCDFの濃度の相関
係数が0.9782と極めて高い。

2,3,4,7,8-PeCDF濃度が200pg/glipid以上の
患者の半減期の逆数の相関係数を表2-3(a)に
示す。濃度の相関係数を表2-3(b)に示す。1,
2,3,4,7,8-HxCDFと1,2,3,6,7,8-HxCDFの濃
度の相関係数が0.9800と極めて高い。

相関係数は、-1から1までの範囲であらわさ
れる。絶対値が0.3程度でも弱い相関があるとみ
なす。絶対値が0.7を超えると強い相関があると
みなす。今回の結果の0.98というのは、この基
準をはるかに上回っていた。

考 察

症状との各異性体濃度の分散分析の結果、3異
性体(2,3,4,7,8-PeCDF、1,2,3,4,7,8-HxCDF、
1,2,3,6,7,8-HxCDF)は共通の症状に関係があ
る傾向を示していた。また、他の3異性体(3,3',
4,4',5,5'-HxCB、1,2,3,7,8-PeCDD、1,2,3,6,7,
8-HxCDD)も、それほど強くはないが、似たよう
な症状を示していた。二つの異性体で似たような
症状を示す場合には、(1)一方の異性体の毒性が
強く、この症状を引き起こし、体内負荷量に相関
がある場合。(2)各異性体が独立して、同様の症

状を引き起こす場合の二つが考えられる。しかし、
各異性体が独立して同様の症状を引き起こすこと
は、各異性体の毒性を毒性等価係数(TEF)とし
て評価されることは、異なる毒性を有すること
になる。2,3,4,7,8-PeCDFは、油症患者の毒性
等量(TEQ)として大きな部分を占めているため、
2,3,4,7,8-PeCDFよりも、他の異性体が個別に
症状を発生しているとは考えにくい。また、理論
的には、油症発生以降に全患者が同じ割合で異性
体を含むものを摂取続けることにより、体内負荷
量に相関が発生することもありえるが、ダイオキ
シン類の規制強化がなされており、そのような摂
取が発生しているとは考えにくい。

「油症研究30年の歩み⁵⁾表4-2」と「油症研
究II⁶⁾表1-4」から、ライスオイル中のダイオ
キシン類濃度と体内のダイオキシン類濃度を同一
の表(表3)にまとめた。さらに、ライスオイル
中の濃度を体内の濃度で除した値を比率列すると
共に、2,3,4,7,8-PeCDFを基準とした値を比率
の比列とした。比率の比は、2,3,4,7,8-PeCDF
と同程度減少していないと大きな値となる。その
結果、2,3,4,4',5'-PeCBと2,3,3',4,4'-PeCBは、
初期濃度が高く、2,3,4,7,8-PeCDFと同程度に
減少しているが、似たような症状を示していない。
摂取の比率に個人差があり、排泄率に個人差があ
る可能性が考えられた。

濃度の相関係数では、1,2,3,4,7,8-HxCDFと
1,2,3,6,7,8-HxCDFの間の相関係数が極めて高
かった。2,3,4,7,8-PeCDF濃度が200pg/g lipid
以上の患者では、相関係数0.98であった。相関
係数が0.7であっても強い相関があるとみなされ
ることから、相関係数0.98から、特殊な状況が想
定される。半減期の相関係数の方が低く、半減期
の患者ごとの違いは、濃度の患者ごとの違いより
も大きい。患者ごとに異なる半減期が存在しつつ、
偶然の結果として、現在の濃度の相関が生み出さ
れたとは考えにくいことから、濃度の比を一定に
保つ仕組みが存在するものと推察された。

異性体の濃度と症状の関係だけの分析では、
個々の異性体の半減期が異なることを前提とした
場合、偶然の結果と考えられなくもない。しかし、
濃度の相関係数や、半減期の相関係数が高いこと
も考慮すると、偶然の産物と考えるのは難しく、
異性体間で、症状や半減期に影響を与える、何ら

表2-1 (a) 全患者の半減期の相関係数

	1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDD	2,3,4,7,8-PeCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-HxCDF	3,3',4,4',5,5'-HxCB
1,2,3,7,8-PeCDD	1.0000	0.6780	0.6110	0.4146	0.5212	0.5904
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.6780	1.0000	0.6013	0.4471	0.3738	0.5537
2,3,4,7,8-PeCDF	0.6110	0.6013	1.0000	0.6503	0.6401	0.5993
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.4146	0.4471	0.6503	1.0000	0.6764	0.3979
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.5212	0.3738	0.6401	0.6764	1.0000	0.4536
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.5904	0.5537	0.5993	0.3979	0.4536	1.0000

表2-1 (b) 全患者の濃度の相関係数

	1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDD	2,3,4,7,8-PeCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-HxCDF	3,3',4,4',5,5'-HxCB
1,2,3,7,8-PeCDD	1.0000	0.7824	0.7195	0.7097	0.7861	0.7453
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.7824	1.0000	0.7699	0.7976	0.8088	0.6062
2,3,4,7,8-PeCDF	0.7195	0.7699	1.0000	0.9621	0.9219	0.8241
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.7097	0.7976	0.9621	1.0000	0.9559	0.7392
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.7861	0.8088	0.9219	0.9559	1.0000	0.7461
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.7453	0.6062	0.8241	0.7392	0.7461	1.0000

表2-2 (a) 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 50pg/g lipid 以上の患者の半減期の相関係数

	1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDD	2,3,4,7,8-PeCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-HxCDF	3,3',4,4',5,5'-HxCB
1,2,3,7,8-PeCDD	1.0000	0.6234	0.7155	0.6479	0.5260	0.6781
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.6234	1.0000	0.7989	0.6926	0.4217	0.4369
2,3,4,7,8-PeCDF	0.7155	0.7989	1.0000	0.8086	0.6569	0.6851
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.6479	0.6926	0.8086	1.0000	0.8142	0.5538
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.5260	0.4217	0.6569	0.8142	1.0000	0.6058
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.6781	0.4369	0.6851	0.5538	0.6058	1.0000

表2-2 (b) 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 50pg/g lipid 以上の患者の濃度の相関係数

	1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDD	2,3,4,7,8-PeCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-HxCDF	3,3',4,4',5,5'-HxCB
1,2,3,7,8-PeCDD	1.0000	0.7080	0.7003	0.7098	0.7719	0.6706
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.7080	1.0000	0.7716	0.8050	0.8165	0.5240
2,3,4,7,8-PeCDF	0.7003	0.7716	1.0000	0.9480	0.9183	0.5982
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.7098	0.8050	0.9480	1.0000	0.9782	0.5568
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.7719	0.8165	0.9183	0.9782	1.0000	0.6196
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.6706	0.5240	0.5982	0.5568	0.6196	1.0000

表2-3 (a) 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 200pg/g lipid 以上の患者の半減期の相関係数

	1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDD	2,3,4,7,8-PeCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-HxCDF	3,3',4,4',5,5'-HxCB
1,2,3,7,8-PeCDD	1.0000	0.5764	0.7524	0.7948	0.5781	0.7234
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.5764	1.0000	0.7826	0.6385	0.2413	0.3412
2,3,4,7,8-PeCDF	0.7524	0.7826	1.0000	0.8496	0.5897	0.6840
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.7948	0.6385	0.8496	1.0000	0.7915	0.7481
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.5781	0.2413	0.5897	0.7915	1.0000	0.7014
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.7234	0.3412	0.6840	0.7481	0.7014	1.0000

表2-3 (b) 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 200pg/g lipid 以上の患者の濃度の相関係数

	1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDD	2,3,4,7,8-PeCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-HxCDF	3,3',4,4',5,5'-HxCB
1,2,3,7,8-PeCDD	1.0000	0.7373	0.7781	0.7042	0.7314	0.6384
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.7373	1.0000	0.7784	0.7683	0.8059	0.6181
2,3,4,7,8-PeCDF	0.7781	0.7784	1.0000	0.8932	0.8950	0.6012
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.7042	0.7683	0.8932	1.0000	0.9800	0.5279
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.7314	0.8059	0.8950	0.9800	1.0000	0.5762
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.6384	0.6181	0.6012	0.5279	0.5762	1.0000

表3 カネミオイル中のダイオキシン類濃度と体内中のダイオキシン類濃度

	ライスオイル 中の濃度(ppb)	ライスオイル 中の TEQ(ppb)	体内中の濃度 (pg/g)	体内中の TEQ (pg/g)	比率	比率の比
2,3,7,8-TCDD	0	0	0			
四塩化-PCDDs	3	0	*			
1,2,3,7,8-PeCDD	7	3.5	0.016	0.008	438	106.28
五塩化-PCDDs	77	0	*			
1,2,3,4,7,8-HxCDD	8	0.8	0.008	0.0008	1000	46.55
1,2,3,6,7,8-HxCDD	40	4	0.049	0.0049	816	57.05
1,2,3,7,8,9-HxCDD	23	2.3	0.0092	0.00092	2500	18.62
六塩化-PCDDs	203	0	*			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	185	1.9	0.057	0.000585	3246	14.34
七塩化-PCDDs	160	0	*			
OCDD	120	0.1	0.86	0.000717	140	332.51
2,3,7,8-TCDF	660	66	0	0		
四塩化-PCDF	2570	0	*			
1,2,3,7,8-PeCDF	525	26	0	0		
2,3,4,7,8-PeCDF	1350	675	0.029	0.0145	46552	1
五塩化-PCDFs	3580	0	*			
1,2,3,4,7,8-HxCDF	890	89	0.01	0.001	89000	0.52
1,2,3,6,7,8-HxCDF	170	17	0.011	0.0011	15455	3.01
2,3,4,6,7,8-HxCDF	165	16.5	0	0		
六塩化-PCDFs	1259	0	0	0		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	255	2.6	0	0		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	11.5	0.1	0	0		
七塩化-PCDFs	42	0	*			
OCDF	76	0	0	0		
3,3',4,4'-TeCB	11500	5.75	0	0		
3,3',4,4',5-PeCB	630	63	0.22	0.022	2864	16.25
3,3',4,4',5,5'-HxCB	27	0.27	0.13	0.0013	208	223.81
2,3,4,4',5-PeCB	32000	3.2	0.67	0.000067	47761	0.97
2,3,3',4,4'-PeCB	28000	2.8	6.5	0.00065	4308	10.81
2,3,3',4,4',5-HxCB	2950	1.5	13	0.00661	227	205.07
Other Mono-ortho PCBs	91800	0				
Di-ortho PCBs	135100	0				
Tri-Ortho PCBs	7580	0				
Other PCBs	71000	0				

かの仕組みが存在する可能性が高いと考えられる。異性体間の濃度の比が一定に落ち着いた患者が、異性体の組成率が、患者体内の組成率と異なる食物などを摂取した場合、濃度の比を一定に保つ仕組みが働くため、高濃度の患者では、摂取による濃度への影響は小さい。しかし、各異性体の濃度の変化率への影響は相対的に大きく、相関係数への影響も、濃度より半減期に対して大きく影響し、小さくなる。

我々は、既に異性体から別の異性体への変性・代謝が、濃度と半減期の関係を一定に保つ仕組みとして機能することを示している⁴⁾。濃度の比を一定に保つ仕組みとして、異性体から別の異性体への変性・代謝が一つの可能性として存在するものと考えられる。

謝 辞

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

参 考 文 献

- 1) Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T and Kuwabara M. 2005. Overview of Yusho. J. Dermatol. Sci Suppl. (Suppl 1) : S3-S10.
- 2) Kanagawa Y, Matsumoto S, Koike S, Tajima B, Fukiwake N, Shibata S, Uchi H, Furue M and Imamura T : Association of clinical findings in Yusho patients with serum concentrations of polychlorinated biphenyls, polychlorinated quarterphenyls and 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran more than 30 years after the poisoning event. Environ Health 2008, 7 : 47.
- 3) 松本伸哉, 赤羽学, 神奈川芳行, 梶原淳睦, 戸高尊, 千葉貴人, 安川史子, 内博史, 古江増隆, 今村知明 : 血中ダイオキシン類の半減期の関係と想定される代謝機構, 福岡医学雑誌 102 (4) : 92-99, 2011.
- 4) 油症患者健康実態調査の解析に関する懇談会 : 油症患者に係る健康実態調査結果の報告 : 平成22年3月.
- 5) 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆編 : 油症30年の歩み, 九州大学出版会, ISBN 4-87378-642-8.
- 6) 古江増隆, 赤峰昭文, 佐藤伸一, 山田英之, 吉村健清編 : 油症研究II 治療と研究の最前線, 九州大学出版会, ISBN 978-4-7985-0007-2.

(Received for publication March 19, 2013)

油症患者における血清アディポカイン濃度に関する研究

¹⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

²⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

内 博 史¹⁾, 古 江 増 隆¹⁾²⁾

Adipokine profile of Yusho Patients

Hiroshi UCHI¹⁾ and Masutaka FURUE¹⁾²⁾

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

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

Abstract Serum levels of adipokines among Yusho patients and normal controls were measured. Compared with normal controls, serum levels of leptin were significantly lower, while those of RBP4 were significantly higher in Yusho patients. Dioxins may impair production of adipokines from adipose tissue, which would increase the risk to develop lifestyle-related diseases, such as diabetes mellitus and hypertension.

Key words : Adipokine · Dioxins · Lifestyle-related diseases

はじめに

ダイオキシン類は親油性であるため、脂肪組織は生体に取り込まれたダイオキシン類が分布する組織として重要である。アディポカインは脂肪細胞およびその間質から産生される生理活性物質の総称であり、生活習慣病の病態に強く関与している。本研究では代表的なアディポカインであるアディポネクチン、レプチン、RBP4、レジスチン、PAI-1、IGF-1、IL-6、TNF- α の血清濃度を測定し、油症患者と健常人で比較し、またダイオキシン類濃度との相関についても検討した。

方 法

平成18年度から21年度に福岡県油症検診を受診し、かつ1967年以前に出生した油症認定患者232名(女性131名、男性101名、平均年齢65.8

± 13.0)、健常者96名(女性65名、男性31名、平均年齢63.9 ± 11.3)についてアディポネクチン、レプチン、RBP4、レジスチン、PAI-1、IGF-1、IL-6、TNF- α の血清濃度をELISA法で測定し、血中ダイオキシン類濃度(2,3,4,7,8-PCDF, Total-PCDFs-TEQ, Total-TEQ)との相関を検討した。解析にはMann-Whitney U test, Spearman's correlation testを行った。データの解析は個人情報特定されないよう、連結不可能な匿名化データとして行った。

結 果

油症患者の血中ダイオキシン類濃度(pg/g lipid)は、健常者より有意に高値であった(23478PCDF 169.1 ± 16.4 vs 15.7 ± 0.9 , total PCDF TEQ 91.9 ± 8.9 vs 9.0 ± 0.5 , total TEQ 119.2 ± 9.7 vs 31.4 ± 1.7)。油症患者と健常者

Correspondence author : Hiroshi UCHI
Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan
Tel : +81-92-642-5213 Fax : +81-92-642-5201
E-mail : uchihir@dermatol.med.kyushu-u.ac.jp

表1 血清アディポカイン濃度の比較

	油症患者 (n=232)	対照群 (n=96)	p
アディポネクチン	5.22 ± 6.59 ng/ml	6.58 ± 7.49 ng/ml	0.02
レプチン	12.1 ± 32.7 mg/ml	11.0 ± 23.9 mg/ml	0.4
RBP4	39.4 ± 41.6 mg/ml	32.5 ± 44.9 mg/ml	0.02
レジスチン	13.8 ± 9.6 ng/ml	14.5 ± 10.3 ng/ml	0.6
PAI-1	6.1 ± 2.4 ng/ml	6.1 ± 2.5 ng/ml	0.9
IGF-1	117.0 ± 55.9 ng/ml	104.5 ± 46.3 ng/ml	0.06
IL-6	105.6 ± 603.5 pg/ml	18.5 ± 60.6 pg/ml	0.2
TNF- α	11.2 ± 44.0 pg/ml	6.9 ± 23.9 pg/ml	0.2

との血清アディポカイン濃度の比較を表1に示す。血清レプチン濃度は油症患者で有意に低下していた。一方血清RBP4濃度は油症患者で有意に上昇していた。しかしいずれのアディポカインも血中ダイオキシン類濃度との有意な相関を認めなかった。

考 察

ダイオキシン類は生体内に長期にわたり残留するため慢性毒性が懸念されている。ダイオキシン中毒患者のコホート調査は、耐糖能異常や高血圧、高脂血症といったいわゆる生活習慣病の有病率が高いことが知られている¹⁾⁻³⁾。レプチンは脂肪細胞から産生され、視床下部に存在する受容体を介して摂食を抑制し、エネルギー消費を亢進させる。体内に脂肪が蓄積するとレプチン産生は亢進し体重減少に傾く一方、脂肪が減少するとレプチン産生は低下し、体重増加に傾くことでエネルギー代謝の恒常性を維持していると考えられている⁴⁾。またレプチンには強力な糖代謝改善作用があるが、肥満状態では高レプチン血症となっているにも関わらず、レプチン抵抗性が生じ、レプチンの作用が減弱することが知られている⁵⁾。一方RBP4は以前からレチノール特異的な輸送蛋白として知られていたが、RBP4ノックアウトマウスではインスリン感受性が亢進することから、RBP4が2型糖尿病発病に重要な役割を果たしていることが明らかになった⁶⁾。また肥満や2型糖尿病患者において血清RBP4値が上昇していることや、インスリン抵抗性改善薬の投与によりRBP4値が正常化することが報告された⁷⁾。今回の報告ではダイオキシン類濃度との相関は認められなかったものの、油症患者において血清レプチン濃度の低下および血清RBP4濃度の上昇を認め

た。これまでの疫学調査で、油症患者では有意な糖尿病有病率の上昇は認められていないが、アディポカイン産生の調節がダイオキシン類によって障害され、耐糖能に影響を与えている可能性があり、今後さらに詳細な検討が必要と考えられる。

結 論

油症患者で血清レプチン濃度の低下および血清RBP4濃度の上昇を認めたが、ダイオキシン類濃度との相関は認めなかった。

参 考 文 献

- 1) Wang SL, Tsai PC, Yang CY and Guo YL : Increased risk of diabetes and polychlorinated biphenyls and dioxins : a 24-year follow-up study of the Yucheng cohort. *Diabetes Care* 31 : 1574-1579, 2008.
- 2) Consonni D, Pesatori AC, Zocchetti C Sindaco R, D'Oro LC, Rubagotti M and Bertazzi PA : Mortality in a population exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident in 1976 : 25 years of follow-up. *Am J Epidemiol* 167 : 847-858, 2008.
- 3) Lee DH, Lee IK, Porta M Steffes M and Jacobs DR Jr : Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and the prevalence of metabolic syndrome among non-diabetic adults : results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Diabetologia* 50 : 1841-1851, 2007.
- 4) Friedman JM : Leptin at 14 y of age : an ongoing story. *Am J Clin Nutr* 89 : 973S-979S, 2009.
- 5) Coppari R and Björbæk C : Leptin revisited : its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 11 : 692-708, 2012.
- 6) Yang Q, Graham TE, Mody N Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L and Kahn BB : Serum retinol binding protein 4

- contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436 : 356-362, 2005.
- 7) Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U and Kahn BB :

Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med.* 354 : 2552-2563, 2006.

(Received for publication March 22, 2013)

油症認定患者における IL-21, TGF- β の検討

¹⁾長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚病態学

²⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

鍛塚 大¹⁾, 小池 雄太²⁾, 清水和宏¹⁾, 宇谷厚志¹⁾

Serum Levels of IL-21 and TGF- β in the Yusho Patients

Yutaka KUWATSUKA¹⁾, Yuta KOIKE²⁾, Kazuhiro SHIMIZU¹⁾ and Atsushi UTANI¹⁾

¹⁾Department of Dermatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

²⁾Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan.

Abstract Aryl hydrocarbon receptor (AhR), recognized as a dioxin receptor, is expressed on the surface of helper T (Th) 17 cells. As PCBs and PCDFs are still detected in the sera of the Yusho patients, we hypothesized dysregulation of Th17 cells in the Yusho patients. In the present study, we measured IL-21 and TGF- β in the Yusho patients which induce differentiation from Th0 to Th17 cells. Serum levels of IL-21 were lower than those of controls ($p < 0.05$). Meanwhile, serum levels of TGF- β were decreased relative to controls, but not significant. These results may imply differentiation from Th0 cells to Th17 cells is not induced in the Yusho patients.

Key words : IL-21 · TGF- β · Yusho

はじめに

1968年カネミ油症事件発生後40年以上経過し、初期に認められた激しい症状は消退傾向にあるが、今でもご瘡様の皮膚症状、咳や痰などの呼吸器症状、しびれや頭重などの神経症状、全身倦怠感など多彩な症状が残存している。油症の原因であるカネミオイルには Polychlorinated biphenyls (PCB), Polychlorinated quarterphenyls (PCQ) 及び Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) を含む dioxin 類が混在している事がわかっている¹⁾。しかし、これらのダイオキシン類は自己代謝が進まず、また代謝経路が不明であることより治療薬の開発が遅れ、油症患者血清中には依然として高濃度のダイオキシン類が検出されている。Aryl hydrocarbon receptor (AhR) は 2, 3, 7, 8-tet-

rachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) や PCB などのダイオキシン類のレセプターとして、肺や肝臓をはじめとして幅広く発現が報告され²⁾、遺伝子の転写を誘導し、ダイオキシン類の代謝経路を知る上で重要視されている。最近の研究により AhR は、T 細胞の中では regulatory T (Treg) 細胞と helper T (Th) 17 細胞で強い発現が見られるが、Th1 細胞、Th2 細胞にはほとんど発現が見られないことが明らかにされた³⁾⁴⁾。今回我々は、油症認定患者の免疫異常について Th 細胞を中心に更に検討すべく、Th0 細胞から Th17 細胞への分化および維持に必要なサイトカインである IL-21 と TGF- β に関して検討を行い、また油症患者におけるダイオキシン値とそれらサイトカインとの相関を検討した。

Correspondence author : Dr. Yutaka KUWATSUKA
Department of Dermatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, 852-8501, Japan
Tel : 81-95-819-7331 ; Fax : 81-95-849-7335
E-mail : y-kuwa83@nagasaki-u.ac.jp

実験方法

①サンプル：2005年から2009年に施行された長崎県油症検診受診者のうち、同意を得られかつ PCB, PCQ, PCDF の測定を行った油症認定患者の血清を用いた。

②血清 IL-21 の測定：油症認定患者 33 名および年齢をあわせた健常人 32 名を対象とした。ヒト IL-21 ELISA キット (R&D 社製) を用いて測定を行った。

③血清 TGF- β の測定：油症認定患者 26 名および年齢をあわせた健常人 26 名を対象とした。ヒト TGF- β ELISA キット (R&D 社製) を用いて測定を行った。

④検査値との相関：油症患者データベースを元に、血清採取時の PCB, PCQ, PCDF との相関を検討した。

⑤統計的処理：測定した数値の統計的処理に、Mann-Whitney の U 検定, Spearman の順位相関係数の検定を使用した。

実験結果

①血清 IL-21 の測定結果：長崎県の油症患者 33 名、および健常人 32 名の平均年齢は各々 71.8 \pm 7.0 歳および 70.3 \pm 9.7 歳で有意差はなかった。検討した油症患者におけるダイオキシン濃度は PCB 3.22 \pm 1.41 ppb, PCQ 0.34 \pm 0.39 ppb,

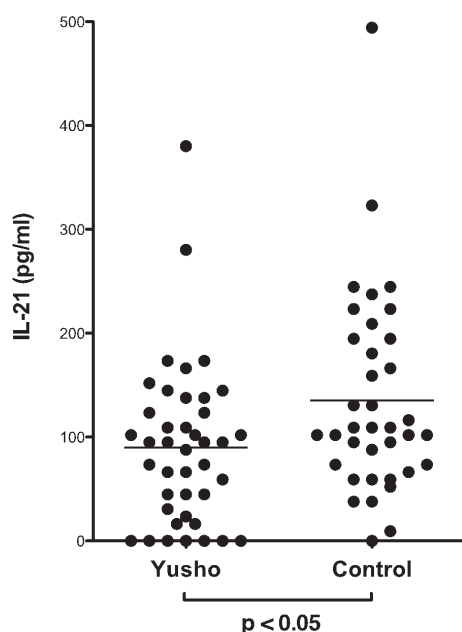


図1 油症患者ならびにコントロール患者血清中の IL-21 値

PCDF 234.2 \pm 151.5 pg/g lipids であった。IL-21 値は油症患者 94.3 \pm 79.0 pg/ml および健常人 135.4 \pm 96.0 pg/ml であり、油症認定患者血清において有意な減少が認められた ($p < 0.05$, 図1)。次に、油症認定患者血清中の IL-21 値と PCB, PCQ, PCDF 値に関し検討を行ったが相関は認められなかった。

②血清 TGF- β の測定結果：長崎県の油症患者 26 名、および健常人 26 名の平均年齢は各々 72.7 \pm 6.2 歳および 74.3 \pm 5.6 歳で有意差はなかった。検討した油症患者におけるダイオキシン濃度は PCB 2.90 \pm 1.30 ppb, PCQ 0.40 \pm 0.35 ppb, PCDF 245.8 \pm 149.6 pg/g lipids であった。TGF- β 値は油症患者 0.97 \pm 0.28 ng/ml および健常人 1.02 \pm 0.21 ng/ml であり、有意な差は得られなかった ($p=0.4$, 図2)。つづいて、油症認定患者血清中の TGF- β 値と PCB, PCQ, PCDF 値に関し検討を行ったが相関は認められなかった。また、IL-21 値と TGF- β 値との相関もみられなかった。

考 察

AhR は生体内の種々の細胞で発現しており、ダイオキシン類のレセプターであることが知られている。AhR は T 細胞の中では特に Th17 細胞に有意に発現していることが判明しており⁵⁾⁶⁾、AhR のリガンドの一つである 6-formylindolo [3,

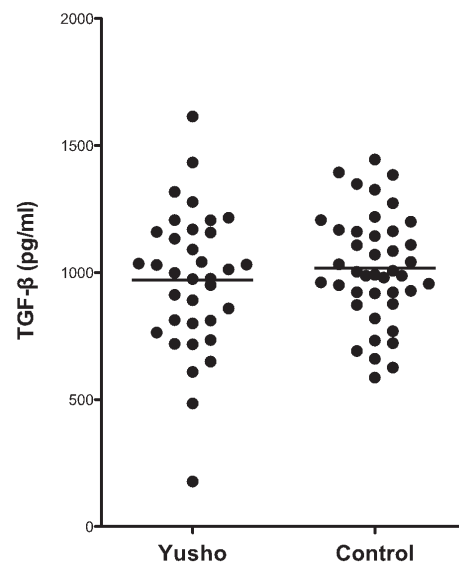


図2 油症患者ならびにコントロール患者血清中の TGF- β 値

2-b] carbazole は Th17 細胞の分化増殖を誘導した⁵⁾⁷⁾. その一方で, ダイオキシンの一つである TCDD は Treg 細胞を誘導するが, Th17 細胞の分化は誘導しなかった⁵⁾. 現在のところ, AhR はリガンドの種類によって異なる免疫誘導をするという見解だが, その詳細な機序や理由は明らかでない.

IL-21 は Th17 細胞分化誘導条件下で Th17 細胞から自己産生される他, 濾胞ヘルパー T 細胞, Th2 細胞, NKT 細胞からも産生され, Th17 細胞の増殖に深く関わっていることが報告されている⁸⁾. また, TGF- β は IL-6 と共存環境下において, ナイーブ T 細胞を Th17 細胞へと分化誘導する重要な因子とされている⁵⁾. 以前の検討で我々は油症患者血清中では健常者と比較して IL-17 が有意に上昇していることを確認し, Th17 細胞が活性化されていることを推測した (論文投稿予定). そこで, ナイーブ T 細胞を Th17 細胞へ分化誘導するサイトカインである TGF- β や IL-21 が油症患者血清中で上昇しているのではないかと仮定した. しかし, 予想に反して TGF- β 値は油症患者と健常人とで優位な差が見られず, また IL-21 値は有意に油症患者血清中で低下しており, Th17 細胞への分化は示唆されなかった. その原因は不明であるが, 油症患者では, PCB や PCDF などのダイオキシソ類は AhR を介して Th17 細胞を活性化する一方で, IL-21 や TGF- β を介した Th17 細胞分化の経路がネガティブフィードバックをうけている可能性が考えられた. しかし, 今回油症患者の血清 IL-21, TGF- β 値は PCQ, PCDF, PCB 値に加え, 血清 IL-17 値との相関も見られなかった. 今後も油症患者における Th17 細胞の分化メカニソムに関してさらなる検討が必要と考えられる.

結 論

油症患者は現在でもダイオキシソ類の血中濃度が高く, 様々な症状を有している. 油症患者におけるサイトカインの動きを解析し, T 細胞を中心とした免疫機構について検討を進め, 油症患者の病態解明, QOL 向上に繋がるよう役立てていきたい.

謝 辞

PCB, PCQ, PCDF のデータを提供して頂いた長崎県環境保健研究センターならびに福岡県保健環境研究所の方々にこの場をかりて御礼申し上げます.

参 考 文 献

- 1) Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters--what we have learned from Yusho disease. *Environ Res.* 86 : 2-11, 2001.
- 2) Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI and Bradfield CA : Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 44 : 911-917, 1993.
- 3) Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y and Kishimoto T : Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 : 9721-9726, 2008.
- 4) Kramer JM and Gaffen SL : Interleukin-17 : a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol* 78 : 1083-1093, 2007.
- 5) Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF and Bettelli E : Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453 : 65-71, 2008.
- 6) Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S and Kumar D : The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol* 11 : 854-861, 2010.
- 7) Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L and Renault JC : The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453 : 106-109, 2008.
- 8) Nurieva R, Yang XO, Matinez G, Zhang Y, Oanopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM and Dong C : Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448 : 480-483, 2007.

(Received for publication March 19, 2013)

油症認定患者における，制御性 T 細胞産生サイトカイン IL-10, IL-35 の検討

¹⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

²⁾長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚病態学

小池 雄太¹⁾, 鋤塚 大²⁾, 清水和宏²⁾, 宇谷厚志²⁾

Serum Levels of IL-10 and IL-35 in Yusho Patients

Yuta KOIKE¹⁾, Yutaka KUWATSUKA²⁾, Kazuhiro SHIMIZU²⁾ and Atsushi UTANI²⁾

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

²⁾Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences, Nagasaki University

Abstract We thought that dioxin and dioxin-like compound receptor AhR expressed on the surface of regulatory T (Treg) cells and Th17 cells could regulate immunological functions in the Yusho patients. In the present study, we measured Treg cell related cytokines IL-10 and IL-35 in the Yusho patients. Serum levels of IL-10 were higher, but not significant ($p = 0.06$), and serum levels of IL-35 were increased ($p = 0.006$) in comparison with healthy controls. These results imply Treg cell activation in the Yusho patients.

Key words : Yusho · Treg · IL-10 · IL-35

はじめに

1968年カネミ油症事件発生後40年以上経過し、初期に認められた激しい症状は消退傾向にあるが、今でもざ瘡様の皮膚症状、咳や痰などの呼吸器症状、しびれや頭重などの神経症状、全身倦怠感などの全身症状など多彩な症状が残存している。油症の原因であるカネミオイルには Polychlorinated biphenyls (PCB), Polychlorinated quarterphenyls (PCQ) 及び Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) を含む dioxin 類が混在している事がわかっている¹⁾。しかし、これらのダイオキシン類は自己代謝が進まず、また代謝経路が不明であることより治療薬の開発が遅れ、油症患者では依然として高濃度のダイオキシン類が検出されている。Aryl hydrocarbon receptor (AhR) は 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) や PCB などのダイオキシン類のレセプターとして、肺や

肝臓をはじめとして幅広く発現が報告され²⁾、遺伝子の転写を誘導し、ダイオキシン類の代謝経路を知る上で重要視されている。最近の研究により AhR は、T 細胞の中では regulatory T (Treg) 細胞と helper T (Th) 17 細胞で強い発現が見られるが、Th1 細胞、Th2 細胞にはほとんど発現が見られないことが明らかにされた³⁾⁴⁾。油症認定患者の免疫異常について Th 細胞を中心に更に検討すべく、今回我々は Treg 細胞から産生される免疫寛容誘導に重要な役割を果たすサイトカインである IL-10 と IL-35 に関して検討を行い、また油症患者におけるダイオキシン値とそれらサイトカインとの相関を検討した。

実験方法

①サンプル：2005年から2009年に施行された長崎県油症検診受診者のうち、同意を得られかつ PCB, PCQ, PCDF の測定を行った油症認定患者

correspondence author : Atsushi UTANI, MD, PhD

Professor and Chairman, Department of Dermatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852-8523, Japan.

の血清を用いた。

②血清 IL-10 の測定：油症認定患者 33 名および年齢を合わせた健常人 32 名を対象とした。ヒト IL-10 ELISA キット (R&D 社製) を用いて測定を行った。

③血清 IL-35 の測定：油症認定患者 26 名および年齢を合わせた健常人 26 名を対象とした。ヒト IL-35 ELISA キット (Uscn Life Science Inc 社製) を用いて測定を行った。

④検査値との相関：油症患者データベースを元に、血清採取時の PCB, PCQ, PCDF との相関を検討した。

⑤統計的処理：測定した数値の統計的処理に、Mann-Whitney の U 検定, Spearman の順位相関係数の検定を使用した。

実験結果

①血清 IL-10 の測定結果：長崎県の油症患者 33 名, および健常人 32 名の平均年齢は各々 72.9 ± 1.4 歳および 70.4 ± 1.3 歳で有意差はなかった。検討した油症患者におけるダイオキシン濃度は PCB 2.82 ± 0.28 ppb, PCQ 0.38 ± 0.05 ppb, PCDF 243.6 ± 25.8 pg/g lipids であった。IL-10

値は油症患者 34.0 ± 4.28 pg/ml および健常人 23.8 ± 1.05 pg/ml であり, 有意差は得られなかったが油症認定患者血清において IL-10 値が高い傾向が見られた ($p=0.06$, 図 1)。続いて, 油症認定患者血清中の IL-10 値と PCB, PCQ, PCDF 値に関し検討を行ったが相関は認められなかった (図 1)。

②血清 IL-35 の測定結果：長崎県の油症患者 26 名, および健常人 26 名の平均年齢は各々 71.4 ± 1.3 歳および 70.3 ± 1.3 歳で有意差はなかった。検討した油症患者におけるダイオキシン濃度は PCB 2.90 ± 0.20 ppb, PCQ 0.36 ± 0.07 ppb, PCDF 244.2 ± 26.3 pg/g lipids であった。IL-35 値は油症患者 76.0 ± 15.7 pg/ml および健常人 51.0 ± 16.2 pg/ml であり, 油症認定患者血清において有意な上昇 ($p=0.006$) が認められた (図 2)。つづいて, 油症認定患者血清中の IL-35 値と PCB, PCQ, PCDF 値に関し検討を行ったが相関は認められなかった (図 2)。また, IL-10 値と IL-35 値との相関もみられなかった (図 3)。

考 察

ダイオキシン類のレセプターである AhR は生

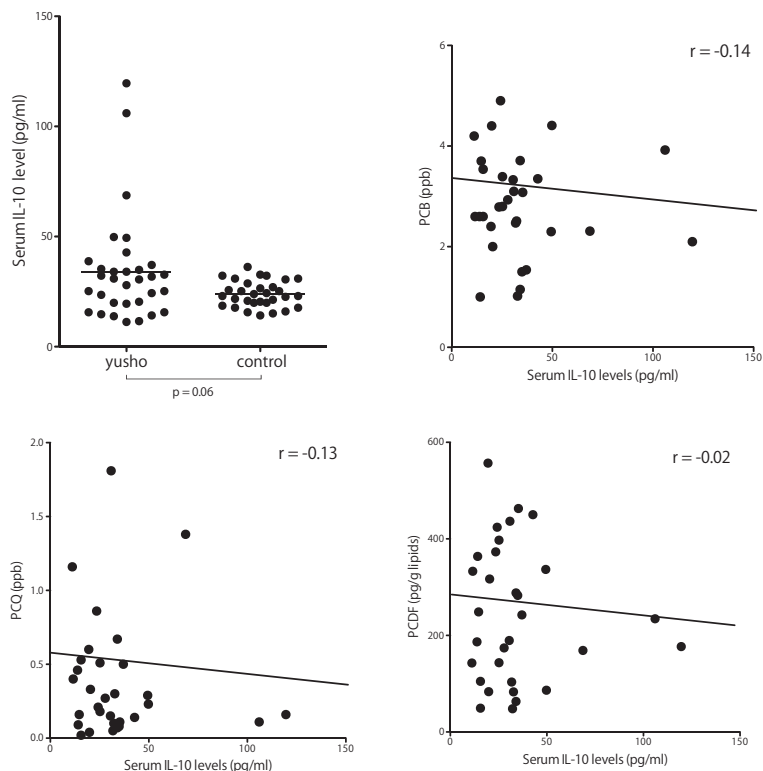


図 1 油症患者血清中の IL-10 値及びダイオキシンとの相関

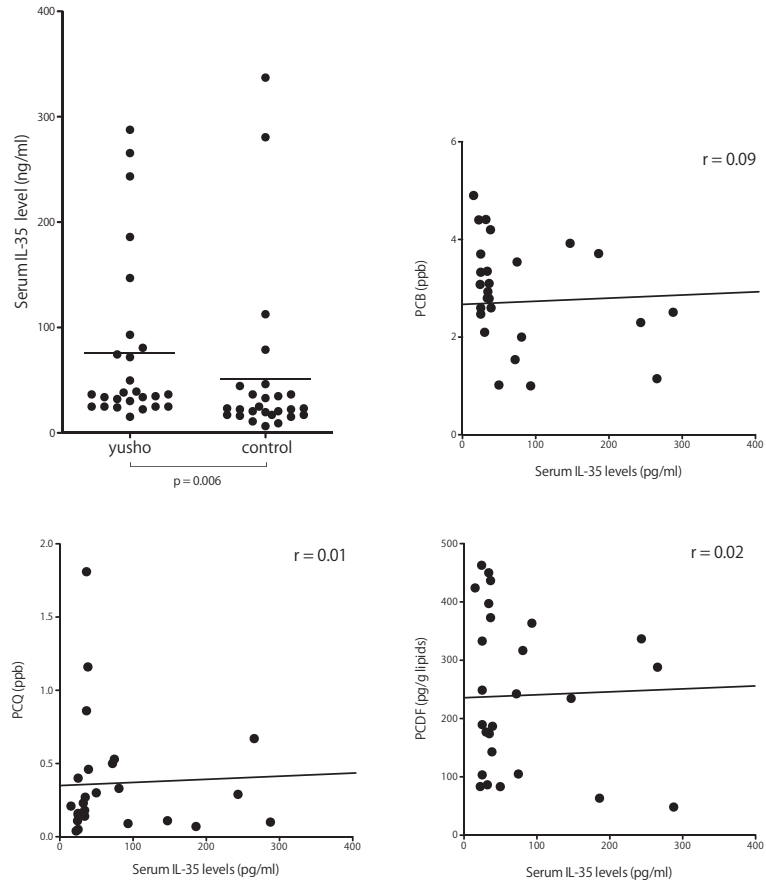


図2 油症患者血清中の IL-35 値及びダイオキシンとの相関

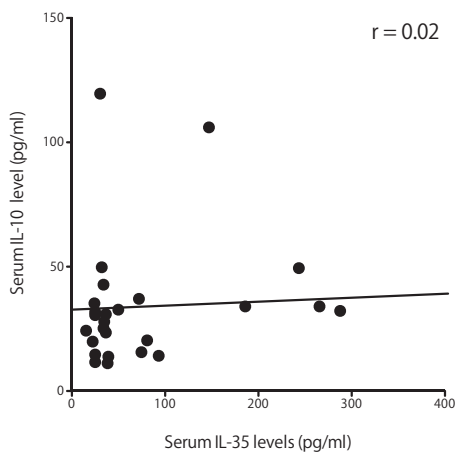


図3 油症患者血清中の IL-10 値と IL-35 値の相関

体内の種々の細胞で発現している。T細胞の中では Treg 細胞と Th17 細胞に発現し、またそれらへの分化を制御することが明らかにされた⁵⁾⁶⁾。TCDD 等外因性の AhR リガンド、FICZ 等内因性の AhR リガンドを Treg に添加すると、IL-10 が産生された⁶⁾。また Th17 細胞から IL-17 が産生されるが、AhR を介した刺激は IL-17 産生を抑制する STAT 1 の機能を阻害することで、IL-17 の産生を亢進させることが報告されている³⁾。これらより、ダイオキシンが生体内の Treg 細胞、Th17 細胞に対して、AhR を介してサイトカインを産生させる機序が想定される。一方、TCDD をマウスに投与すると Treg 細胞が誘導され⁵⁾、これに対して、TCDD と同程度の強い親和性で AhR に結合する 6-formylindolo [3, 2-b] carbazole では Th17 細胞が誘導された⁵⁾⁷⁾。現在のところ AhR はリガンドの種類によって異なる免疫誘導をするという見解だが、その理由は明らかでない。

IL-10 は種々の Th 細胞から産生され、病原体

の排除や自己免疫反応における過剰な免疫反応の制御, 腸管免疫系の恒常性の維持に関与している。特に, AhR を発現しているためダイオキシン類の影響をうけると考えられる Treg においては, TGF- β , IL-35 とともに抑制性サイトカインとして分泌され, 免疫制御に大きく寄与している⁸⁾。IL-35 は 2007 年に同定された抑制性サイトカインである。Treg 細胞から産生され, 直接 T 細胞に作用して IL-10 産生を増強し自己免疫反応を制御するのみならず, Treg 細胞の分化・増殖も誘導する。近年発見されたサイトカインであるためヒトの臨床における検討はほぼないが, マウスにおける自己免疫性関節炎の病態緩和⁹⁾, 炎症性腸疾患の発症抑制¹⁰⁾などが示されてきた。

今回の研究で, 油症患者は健常人と比較し, 血清 IL-10 値は高値である傾向を示し, また血清 IL-35 値は有意に高値であった。油症患者において, Treg より分泌される IL-10 及び IL-35 が増加しているという結果は, 油症患者生体内で AhR を介したダイオキシン刺激により Treg 細胞が分化誘導されている可能性, あるいはダイオキシンが Treg 細胞表面の AhR を刺激してサイトカインを転写している可能性を示唆する。各油症患者の血清 IL-10 値及び IL-35 値と, PCB, PCQ, PCDF 値は相関が見られず, Treg 細胞を誘導あるいはサイトカインを転写する特定のダイオキシンを推測するに至らなかった。また, 各油症患者血清中の IL-10 値と IL-35 値とを比較したが, 有意な相関はなかった。今後も油症患者における Treg 細胞の分化メカニズムに関してさらなる検討が必要と考えられる。

結 論

油症患者は現在でもダイオキシン類の血中濃度が高く, 様々な症状を有している。油症患者におけるサイトカインの動きを解析し, T 細胞を中心とした免疫機構について検討を進め, 油症患者の病態解明, QOL 向上に繋がるよう役立てていきたい。

謝 辞

PCB, PCQ, PCDF のデータを提供して頂いた長崎県環境保健研究センターならびに福岡県保健

環境研究所の方々にこの場をかりて御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters--what we have learned from Yusho disease. *Environ Res* 86 : 2-11, 2001.
- 2) Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI and Bradfield CA : Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 44: 911-917, 1993.
- 3) Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y and Kishimoto T : Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 : 9721-9726, 2008.
- 4) Kramer JM and Gaffen SL : Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol* 78 : 1083-1093, 2007.
- 5) Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF and Bettelli E : Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453 : 65-71, 2008.
- 6) Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S and Kumar D : The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol* 11 : 854-861, 2010.
- 7) Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L and Renauld JC : The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453 : 106-109, 2008.
- 8) Noma T : Helper T cell paradigm: Th17 and regulatory T cells involved in autoimmune inflammatory disorders, pathogen defense and allergic diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 33 : 262-271, 2010.
- 9) Kochetkova I, Golden S, Holderness K, Callis G and Pascual DW : IL-35 stimulation of CD39 + regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10. *J Immunol* 184 : 7144-7153, 2010.
- 10) Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y and Vignali KM : The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450 : 556-559, 2007.

(Received for publication March 22, 2013)

長崎県カネミ油症検診者の血清尿酸値

¹⁾長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 リハビリテーション科学講座 (医学部保健学科)

²⁾長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療展開学講座 (長崎大学第一内科(神経内科))

³⁾長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 保健学専攻

吉村俊朗¹⁾, 川崎涼子¹⁾, 吉村俊祐²⁾, 宮崎禎一郎²⁾, 向野晃弘²⁾, 米澤武人³⁾

Increased Rate of Serum Uric Acid Levels in Yusho Sufferers

Toshiro YOSHIMURA¹⁾, Ryoko KAWASAKI¹⁾, Shunsuke YOSHIMURA²⁾, Teiichiro MIYAZAKI²⁾,
Akihiro MUKAINO²⁾ and Takehito YONEZAWA³⁾

¹⁾Unit of Rehabilitation Sciences, Graduateschool of Biomedical Sciences, Nagasaki University

²⁾Unit of Translational Medicine, Graduateschool of Biomedical Sciences, Nagasaki University

³⁾Health Sciences, Graduateschool of Biomedical Sciences, Nagasaki University

Abstract We measured serum uric acid levels in Yusho sufferers annually from 2007 to 2012 in Nagasaki prefecture. We observed an increased rate of serum uric acid levels in 38.2% of the male and 5.5% of the female sufferers. There was no relation among serum uric acid value, Body Mass Index, liver function, blood polychlorinated biphenyls and hypersensitive C reactive protein. We conclude that it is unclear if blood polychlorinated biphenyls may play a role in the increase of serum uric acid levels in Yusho sufferers.

Key words : Uric acid · PCB · Yusho · BMI · Highsensitive CRP

はじめに

1968年、熱交換目的に使用されていた塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyls: PCBs) が米ぬか油に混入し、西日本の広範囲に食中毒として油症が発生した¹⁾。また、米ぬか油の製造工程での高熱処理によってPCBsと塩素化ベンゼンは熱分解され、ポリ塩化ジベンゾフラン (polychlorinated dibenzofurans: PCDFs) やポリ塩化ジベンゾダイオキシン (polychlorinated dibenzo-p-dioxins: PCDDs) が生成される。汚染された米ぬか油には、PCBsやコプラナー PCB だけでなく、ポリ塩化クオターフェニール (polychlorinated quarterphenyl: PCQ), PCDFs, PCDDs およびそれらの関連物質も含まれていた。

カネミ油症検診者では、血清クレアチン・キ

ナーゼ値 (以下、血清CK) の上昇や血清アルドラーゼ値の低下が高頻度に認められることを報告した²⁾。そして血清CKの上昇は、運動量もしくはBUN等との相関が認められていて、血中PCBs濃度高値がその要因の一つである可能性を報告してきた^{3)~5)}。

長崎県カネミ油症検診者において、尿酸高値の頻度が高いことに着目した。今までに尿酸に関して言及した論文が乏しいので、血液中の尿酸値の上昇に関して検討した。

対象と方法

2007年~2012年までのカネミ油症検診者の血清尿酸値が測定されたのべ1026名 (男性366名, 女性660名) を対象とした。血清尿酸値に関して、男性の基準値3.7~7.0mg/dl, 女性の基準値2.5

correspondence author : Toshiro YOSHIMURA

Unit of Rehabilitation Sciences, Graduateschool of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, 852-8520, Japan

mail address : toshiroy@nagasaki-u.ac.jp,

～7.0mg/dlに基づき各年度の尿酸値が上昇している(7.1mg/dl以上)率をカネミ油症認定群と未認定群でそれぞれ求めた。また、痛風あるいは高尿酸血症で服薬中で尿酸値が正常なものも尿酸値上昇群として計算した。あわせて、2010年、2011年、2012年においては高感度CRPの値も求めた。PCBsの血液濃度は2008年、2009年、2010年で検討し、BMI、尿酸と高感度CRPとの相関を求めた。PCBs血液濃度は長崎県衛生研究所で測定した値を用い、尿酸と高感度CRPの値はSRL(株)で測定したものをを用いた。また、検診データから、身長、体重を用い、BMI(体格指数:Body Math Index)を下記の式で計算した。BMI = 体重(kg) ÷ (身長(m) × 身長(m))。尿酸値とBMI、尿酸値と高感度CRPの値の相関も求めた。2007年のGOT、GPT、 γ GPTと尿酸値の相関も計算した。

統計学的処理

カネミ油症認定群と未認定群間で年齢の差の検定をMann-WhitneyのU検定を行い、尿酸は対応のないt検定を行った。また、認定群と未認定群で尿酸上昇の異常率はカイ二乗検定を行った。

結 果

1. 対象となった検診者の年齢

対象となった検診者の各年の年齢中央値は女性の認定者で69歳から72歳、未認定者59歳から63歳、男性の認定者で61歳から65歳、未認定者で56歳から70歳であった(表1 A, B)。2007年は男性未認定群で、2008年、2009年、2010年は女性に認定群で、それぞれ、年齢が有意に低かった($p < 0.05$)。

2. BMIは認定群と未認定群で差を認めなかった(表2 A, B)。

3. 尿酸

尿酸の異常率は、女性の認定群で5.5%、未認定群で4.7%、認定群と未認定群を合わせて5.1%の異常率を呈した(表3 A)。男性では認定群で38.2%、未認定群で31.8%の異常率を呈したが、認定群と未認定群で異常率に有意差は認めなかった(表3 B)。また、各年の尿酸の平均値は、女性

で4.4から6.2mg/dl(表4 A)、男性で5.5mg/dlから6.3mg/dlであったが(表4 B)、男性、女性いずれでも、認定群と未認定群で平均値に有意差を認めなかった(表4 A, B)。男性が女性よりも尿酸値は高値を示していた。

4. 高感度CRP

高感度CRPは、認定群と未認定群で差を認めなかった(表5 A, B)。

5. PCBs血液濃度、尿酸値とBMI、尿酸値と高感度CRPの相関、尿酸値と肝機能の相関

2008年、2009年、2010年の血液PCBs濃度とBMIは2009年女性の認定群でのみ相関を認めた($r = -0.284$, $p < 0.05$)が、2008年、2010年では相関はなく、一定の値を示さなかった。また、血液PCBs濃度と血清尿酸値の相関も認めなかった。尿酸値とBMIの相関も認めなかった。2007年でGOT、GPT、 γ GPTの肝機能と尿酸の相関係数に関して検討したが、有意な関連は認めなかった。2010年、2011年、2012年で尿酸と高感度CRPとの相関を検討したが、両因子には関連を認めなかった。

2007年の尿酸とGOT、GPT、 γ GPTとの相関はなかった。

考 察

長崎県油症検診者のうち、男性ではカネミ油症として認定された群において、38.2%に血清尿酸値の異常を認め、未認定群で31.6%に異常を認めた。女性では認定者で5.5%に、未認定者で4.7%に異常を認めた。しかし、認定者群で有意に増加していることは明らかではなかった。また、PCBs、肝機能、BMI、高感度CRPとの関係も明らかにできなかった。

尿酸はプリンヌクレオチドの異化亢進により主に肝臓で産生される場合と塩基から再び糖とリン酸を結合してヌクレオチドに回収されるリボース5リンプリン塩基がPRPPの存在下にそれぞれのヌクレオチドに代謝されるサルベージ経路の働きが低下することにより産生されることが知られている。

尿酸は体内に一定量存在することで強力な抗酸化作用を示し⁶⁾、ヒト血清中の抗酸化物質全体の

表 1 A 年齢 女性

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
認定	70(41-94)	69(42-86)	70(47-89)	72(48-89)	72(41-89)	72(36-86)
未認定	61(37-83)	62(17-84)	59(19-83)	63(21-83)	59(22-86)	62(23-90)

表 1 B 年齢 男性

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
認定	73(34-86)	61(36-87)	62(36-88)	64(41-86)	65(45-87)	63(39-88)
未認定	52(33-80)	56(16-85)	58(24-87)	62(36-83)	62(40-89)	70(41-86)

表 2 A BMI 女性

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
認定	23.6 ± 4.6 (n=69)	23.1 ± 4.2 (n=44)	22.8 ± 4.0 (n=67)	23.1 ± 4.2 (n=55)	22.9 ± 4.0 (n=58)	23.6 ± 4.4 (n=54)
未認定	23.7 ± 3.9 (n=36)	24.3 ± 3.6 (n=80)	23.4 ± 3.8 (n=41)	24.2 ± 3.7 (n=56)	23.8 ± 3.9 (n=50)	24.0 ± 4.4 (n=46)

表 2 B BMI 男性

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
認定	23.2 ± 2.8 (n=35)	23.8 ± 3.1 (n=58)	23.9 ± 2.7 (n=39)	23.6 ± 3.1 (n=40)	23.0 ± 2.9 (n=44)	23.0 ± 2.7 (n=41)
未認定	22.9 ± 3.1 (n=23)	23.2 ± 3.3 (n=34)	23.9 ± 4.8 (n=39)	24.1 ± 3.5 (n=51)	24.3 ± 3.1 (n=42)	25.5 ± 4.1 (n=45)

表 3 A 尿酸異常率 (%) 女性

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	total
認定	6.0(n=67)	2.6(n=77)	4.2(n=71)	1.8(n=57)	5.3(n=56)	7.5(n=53)	5.5(n=381)
未認定	5.6(n=36)	6.7(n=45)	2.3(n=43)	0(n=56)	4(n=50)	4.3(n=46)	4.7(n=279)

表 3 B 尿酸異常率 (%) 男性

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	total
認定	14.3(n=35)	36.2(n=58)	20.5(n=39)	32.5(n=39)	37.5(n=44)	29.3(n=41)	38.2(n=186)
未認定	26.1(n=23)	20.6(n=34)	23.1(n=40)	23.5(n=40)	25.6(n=43)	25.5(n=46)	31.6(n=180)

表 4 A 血清尿酸値 (mg/dl) 女性

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
認定	4.8 ± 1.1 (n=67)	4.7 ± 1.2 (n=77)	4.9 ± 1.1 (n=71)	4.9 ± 1.1 (n=57)	4.9 ± 1.3 (n=58)	4.9 ± 1.1 (n=53)
未認定	4.4 ± 1.3 (n=36)	4.8 ± 1.3 (n=45)	4.6 ± 1.1 (n=43)	4.7 ± 1.1 (n=56)	4.6 ± 1.1 (n=50)	5.0 ± 1.1 (n=46)

表 4 B 血清尿酸値 (mg/dl) 男性

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
認定	5.5 ± 1.5 (n=35)	6.1 ± 1.7 (n=58)	6.0 ± 1.9 (n=39)	6.2 ± 1.6 (n=40)	5.9 ± 1.4 (n=44)	6.1 ± 1.1 (n=41)
未認定	6.3 ± 1.5 (n=23)	6.1 ± 1.4 (n=34)	6.3 ± 1.4 (n=40)	6.1 ± 1.4 (n=51)	6.0 ± 1.5 (n=43)	6.2 ± 1.6 (n=46)

表 5 A 血清高感度 CRP (ng/ml) 女性

	2010	2011	2012
認定	1095 ± 2540 (n=37)	670 ± 1060 (n=52)	947 ± 1897 (n=51)
未認定	847 ± 1717 (n=31)	761 ± 1866 (n=47)	1241 ± 3639 (n=41)

表 5 B 血清高感度 CRP (ng/ml) 男性

	2010	2011	2012
認定	778 ± 748 (n=32)	1432 ± 2531 (n=43)	834 ± 912 (n=41)
未認定	1982 ± 3143 (n=37)	1553 ± 3411 (n=41)	969 ± 1650 (n=45)

約半分を占める⁷⁾。さらに、運動ストレス時の抗酸化物質として作用し⁸⁾、酸化傷害に対する防御機構として尿酸合成が亢進している可能性を示唆されている。

20歳から68歳を対象とした、高尿酸血症（男7.1mg/dl以上、女性6.1mg/dl以上）の発生頻度を肥満度（Brocaの変法）別に報告し、男性で、肥満度79%以下で8.3%、80%台で9.2%、90%台で9.2%、100%台で10.3%、110%台で12.0%、130%台で18%、140%以上で18.8%、女性では肥満度79%以下で0%、80%台で2.0%、90%台で3.6%、100%台で5.3%、110%台で3.2%、120%台で6.4%、130%台で3.5%、140%以上で7.8%と報告している⁹⁾。カネミ油症として認定された群において、男性では、38.2%に血清尿酸値の異常を認め、未認定群で31.6%に異常を認めた。女性では認定者で5.5%に、未認定者で4.7%に異常を認めた。報告されたものより、対象年齢が高齢ではあるが、BMIの平均値からみると肥満度はほぼ100%前後と推定され、長崎県油症検診者男性において、血清尿酸値の異常を呈する率が高い可能性がある。

PCBsの上昇したぞうアザラシの血清で尿酸が上昇していたとする報告¹⁰⁾、ゴミ焼却炉での勤務者で尿酸値とCoplanar PCBのTEQと相関を認めたとする報告がある¹¹⁾。

男性の油症認定者では、未認定者と比較し、体重が減少していた¹²⁾、また、カネミ油症においては、酸化ストレスに晒されているとも報告されていて¹³⁾、PCBが尿酸の代謝に影響を及ぼしていることも可能性としては考えられる。

CRPはインターロイキン（interleukin；IL）-6、IL-1、腫瘍壊死因子 α （tumor necrosis factor；TNF- α ）などの炎症性サイトカインの刺激によって肝臓で産生されるが、気道上皮細胞、マクロファージ、腎臓、神経細胞などでも産生される。そして、CRPは単なる炎症マーカーではなく、動脈硬化と関係する血管内皮細胞、マクロファージ、血管平滑筋などに受容体を介して作用し、生理活性物質を変動させて動脈硬化の形成に積極的に関与することが明らかにされつつある。大動脈硬化部位には補体とともにCRPが確認されていて、血中に存在するCRPが沈着するだけでなく、少なくともその一部は血管壁でも産生される

と推測されている。一方、CRPはオプソニンとして働くことで酸化LDLのマクロファージによる貪食作用を活性化するとともに、内皮細胞において酸化LDL受容体の発現を促進し、また、マクロファージや血管平滑筋に対しては活性酸素の産生を促す。本研究では、高感度CRPと尿酸、高感度CRPとBMIの相関も明らかにできなかった。さらに、尿酸とPCBの血液濃度との関与、肝機能との関与、BMIとの関与も明らかにできなかった。血清尿酸値の上昇は、未認定群でも認められているので、遺伝的な因子なども考慮しておく必要がある。

結 論

長崎県の男性のカネミ油症認定者で血清尿酸値の異常が38.2%に認められ、女性では5.5%に認められた。この異常にPCBsが関係している可能性は明らかにできなかった。

謝 辞

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

参 考 文 献

- 1) Kuratsune M, Yoshimura T, Matsuzaka J and Yamaguchi A. Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ Health Perspect* 1 : 119-128, 1972.
- 2) 吉村俊朗, 沖田実, 中野治郎, 白石裕一, 岩永洋, 友利幸之介, 岡本眞須美: カネミ油症検診者に見られる血清クレアチンキナーゼとアルドラーゼの異常, *福岡医誌* 94 : 97-102, 2003.
- 3) 吉村俊朗, 沖田実, 東登志夫, 上山裕文, 伊藤聖: カネミ油症検診者におけるクレアチンキナーゼ上昇の意義, *福岡医誌* 88 : 216-219, 1997.
- 4) 吉村俊朗, 沖田実, 川副巧成, 中野治郎, 中尾洋子: カネミ油症検診者における血清クレアチンキナーゼ上昇の要因に関する検討, *福岡医誌* 90 : 246-250, 1999.
- 5) 吉村俊朗, 沖田実, 福田卓, 藤本武士, 中尾洋子: カネミ油症検診者における血清CK上昇の意義—ラット筋細胞膜のfreeze fracture法による変化—, *福岡医誌* 92 : 123-234, 2001.
- 6) Glantzounis G, Tsimoyiannis E, Kappas A and Galaris D : Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des* 11 : 4145-4151, 2005.

- 7) Becker BF : Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Med.* 14 : 615-631, 1993.
- 8) 三上俊夫 : 尿酸は運動ストレス時の抗酸化物質として作用する. *体力科学* 49 : 742, 2000.
- 9) 斎藤征夫, 加藤孝之, 岡本和士, 前田清, 大塚亨, 高橋玲, 岡本伸夫, 柳生聖子, 橋本修二 : 肥満の血圧, 血清脂質, 肝機能, 血糖, 尿酸に及ぼす影響について, *日衛誌* 43 : 962-968, 1988.
- 10) Beckmen KB, Lowenstine LJ, Newman J, Hill J, Hanni K and Gerber J. : Clinical and pathological characterization of northern elephant seal skin disease. *J Wildl Dis.* 33 : 438-449, 1997.
- 11) Kitamura K, Kikuchi Y, Watanabe S, Waechter G, Sakurai H and Takada T. : Health effects of chronic exposure to polychlorinated dibenzo-P-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and coplanar PCB (Co-PCB) of municipal waste incinerator workers. *J Epidemiol.* 10 : 262-270, 2000.
- 12) 吉村俊朗, 川崎涼子, 中野治郎, 栢田智子, 徳田昌紘, 中田るか, 片岡英樹, 佐賀里昭, 沖田実 : 【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 23 集】 事件発生時, 生後から思春期と成人であったカネミ油症検診者の骨密度の差 (原著論文/特集) *福岡医誌* 102 : 130-133, 2011.
- 13) Shimizu K, Ogawa F, Thiele JJ, Lee JB, Bae S and Sato S. : Increased levels of urinary nitrite and nitrotyrosine in Yusho victims 40 years after accidental poisoning with polychlorinated biphenyls in Nagasaki, Japan. *J Appl Toxicol.* 28 : 1040-1044, 2008.

(Received for publication March 19, 2013)

油症患者における顎関節症に関する臨床的検討

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医療科学講座 口腔腫瘍治療学分野

川崎 五郎, 吉富 泉, 梅田 正博

A Clinical Study of TMJ Arthrosis in Yusho Patients

Goro KAWASAKI, Izumi YOSHITOMI and Masahiro UMEDA

*Department of Clinical Oral Oncology, Unit of Translational Medicine,
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences*

Abstract In the present study, we clarified the TMJ symptoms of Yusho patients. An epidemiologic examination was carried out to identify TMJ arthrosis in patients with Yusho. The patients were collected during annual Yusho examinations in 2012. Nine of 187 patients had TMJ symptoms. The symptoms were pain, trismus, and a clicking sound of the TMJ. We diagnosed these patients with TMJ arthrosis. The rate of TMJ arthrosis in Yusho patients was 4.8%, being similar to the rate of TMJ arthrosis in general.

The PCB concentration in the blood of these 9 patients was 2.76 ppb, and the average blood PCB concentration of all patients was 2.98 ppb. We identified no relationship between the blood PCB concentration and TMJ arthrosis.

Key words : Yusho · TMJ arthrosis · PCB

はじめに

油症患者の口腔領域における臨床症状としては、口腔粘膜色素沈着、口腔乾燥症、歯肉炎などが主症状として報告されており¹⁾、現在でも一部の症状が持続している患者もみられる。

これまでわれわれは、長崎県における油症歯科検診において、口腔粘膜色素沈着、歯周疾患および歯牙異常などについて精査し検討してきたが、特に口腔粘膜色素沈着については現在でも多くの患者において認められる。

一方、油症発症直後にはあまり認められていなかった顎関節の症状については、近年何らかの症状の訴えを持つ患者が増加しているという報告がなされている²⁾。そこで平成24年度の長崎県における歯科検診においては、上記の検診項目に付

け加えて、顎関節の症状についても問診と診察を行った。今回、それらの検診結果に基づき油症患者における顎関節症の症状について臨床的な検討を行い、血中PCB濃度との関係についても検討したので報告する。

対象および方法

平成24年度長崎県油症検診（長崎市および五島市）において歯科検診を行った患者187名（認定95名、未認定92名）を対象とした。歯科検診を行った際に、顎関節部に関する症状を主訴としていた患者および歯科的問診を行った際に顎関節部に異常を訴えた患者を対象として、アンケート調査および診察を行った。アンケート調査の項目としては、1)顎関節部の痛みの程度、2)日常生活への支障の程度、3)顎関節部の機能、4)日

Correspondence author : Goro KAWASAKI, DDS, PhD
Department of Clinical Oral Oncology, Unit of Translational Medicine, Course of Medical and Dental Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-7-1, Sakamoto, Nagasaki, 852-8588, Japan
Tel : +81-95-849-7696 Fax : +81-95-849-7700
E-mail : gkawa@nagasaki-u.ac.jp

常生活の活動および行動，について問診し検討を行った。

1) については，安静時，開閉口時および摂食時の痛みの程度について調査し，Visual Analog Scale (VAS)を用いて，痛みなしの状態を0，考えうる最もひどい痛みの状態を10として定量的に記録した。2) についても同様にVAS法を用いて記録した。

3) については，小項目として，顎関節の疼痛，筋肉の疼痛，口の開けにくさ，顎が引っかかる感じ，関節の雑音について問診し，症状のないものを1，最も症状のひどいものを4として4段階で評価した。

4) については小項目として，食事，開口，睡眠，嚥下，会話，仕事や勉強，について支障の有無を問診し，3)と同様に4段階で評価した。

診察に関しては，自力開口距離および強制開口距離を測定し，顎関節部の触診および咀嚼筋の触診にて疼痛の有無や部位を確認した。

さらに，各患者の平成24年度の採血データから得られた血中PCB濃度，高感度CRPおよび白血球数の値との関係についても検討した。

結 果

1. 顎関節症状について (表1)

検診を受診した187名中9名(男性3名女性6名)の患者に顎関節症の所見が認められた。問診における顎関節部の主症状としては，疼痛が3例，顎関節部の雑音が3例および開口障害が3例であった。

顎の機能に関するアンケート(複数回答可)では，筋肉の痛みが3例，関節雑音が6例，開口し

にくいのが4例で，症状の程度はすべて2または3であった。VAS法における疼痛の程度は全て5以下であった。

日常生活に関するアンケート(複数回答可)では，支障のみられる項目では，食事に関するものが4例，開口に関するものが3例であったが，VAS法における支障の程度は全て5以下であった。

診察結果では，自力開口量は10mmから48mmで，強制開口距離は25mmから48mmであった。

開閉口時の顎関節部の触診所見では，関節痛が1例に，筋痛が3例に認められた。

なお，全9症例において腫脹や発熱などの炎症所見は認められなかった。

2. 血液検査結果との関連について (表2)

9症例の血中PCB濃度は0.14ppbから5.18ppbで平均2.76ppbであった。全体の平均値は2.98ppbで，そのうち認定患者の平均値は3.37ppbであった。また，高感度CRP値(基準値1500ng/ml)は50ng/mlから1150ng/mlに分布しており，白血球数は，3800/ulから9400/ulに分布していた。血液検査では明らかな炎症所見を示す結果は認められなかった。

考 察

顎関節症の定義に関しては，「顎関節症とは顎関節や咀嚼筋の疼痛，関節雑音，開口障害または顎運動異常を主要症候とする慢性疾患の総括診断名であり，その病態には咀嚼筋障害，関節包・靭帯障害，関節円板障害，変形性関節症などが含まれる。」とされている³⁾。これにより，従来あいま

表1 顎関節症の患者の臨床所見

症例	性別	年齢	主症状	自力開口量 (mm)	強制開口量 (mm)
1	M	66	関節雑音	48	55
2	F	65	開口障害	38	48
3	M	55	疼痛	40	50
4	F	55	筋痛(咬筋, 側頭筋)	40	44
5	F	67	関節痛	40	48
6	F	61	開口障害	25	33
7	F	30	開口障害	10	20
8	F	60	関節雑音	45	52
9	M	57	関節雑音	46	54

表2 顎関節症状を有する患者の血液 PCB 濃度, PCB パターン, 高感度 CRP および白血球

症例	PCB 濃度 (ppb)	PCB パターン	高感度 CRP (ng/ml)	白血球数 (μ l)
1	5.04	A	1150	3700
2	3.43	A	50	3400
3	2.48	B	260	9400
4	1.71	B	92	4400
5	3.81	A	323	3800
6	2.01	A	321	5200
7	0.14	B	108	7300
8	1.02	B	328	5200
9	5.18	A	191	4700

いであった顎関節症の概念が明らかとなり, 他の顎関節の疾患や顎関節に類似の症状を示す疾患との鑑別が明瞭となった。

顎関節症と診断するためには, 1) 顎関節や咀嚼筋等の疼痛, 2) 関節雑音, 3) 開口障害ないし顎運動異常の主要症候のうち, 少なくとも一つ以上を有することが必要条件となる³⁾。今回のいずれの症例においても上記の症状の一つ以上有しており, 顎関節症と診断することが可能であると思われた。

顎関節症は, 咀嚼筋障害 (I 型), 関節包・靭帯障害 (II 型), 関節円板障害 (III 型), 変形性関節症 (IV 型) および I から IV 型に該当しないもの (V 型) に症型分類される。外傷性顎関節症や他の炎症性疾患との鑑別が必要な場合もあるが, 今回の症例では CRP や白血球数の増加はなく, また, 外傷の既往や腫脹などの臨床所見も認められなかった。

顎関節症の疫学調査では, 一般集団において, 開口障害がみられるものは 5% 未満であり⁴⁾, 関節雑音の発症率は変動性が大きい⁵⁾ため疫学的検討は困難であるとされている⁵⁾。開口障害は, 顎関節症では訴えの多い症状であるが, その原因は, 疼痛によるものや関節円板の障害によるものなど様々である。顎関節の正常可動域は, 上下中切歯間距離で表され, 本邦では男性で 48~55mm, 女性で 44~49mm とされており, 開口制限の基準は 40mm 以下である⁶⁾⁷⁾。今回の症例群では, 40mm 以下は 6 例であったもののうち 3 例は 40mm で, 高度の開口障害を認めた症例は 2 例のみであった。

顎関節痛に関する研究では, 一般集団のなかで

臨床症状を訴えない 40~75% に運動制限や関節音の他覚症状がみられ, 28~33% に疼痛を主体とする自覚症状を有するとする報告がある⁸⁾。また, 別な報告では, 顎関節痛の罹患率は 3~15% と比較的高いにもかかわらず顎関節痛の発生率は 2~4% と低く見積もられているとされている⁹⁾。顎関節部の疼痛に関しても疫学的調査を行うことは困難であると思われるが, 上記の発症率 3~15% に比較した場合, 今回のわれわれの調査結果では, 疼痛を訴えたものが 3 名 (1.6%) とやや低い傾向が認められた。油症患者には顎関節症の訴えが多いとの報告もあるが, 今回の検診結果では, 受診者 187 名中 9 名に顎関節の症状が認められ, 顎関節の発症率は 4.8% で, 油症地区における顎関節症の発症率は一般と有意な差はないものと思われた。

血中 PCB 濃度との関係については, 顎関節症の患者と他の患者の平均値について明らかな差はみられなかった。しかしながら, 顎関節の症状は変動することも多く, また, 自覚症状はなくとも顎関節症状を有することもあるため, 今後画像検査における顎関節部の形態変化を含めた検討を要するものと考えられた。

総 括

2012 年度長崎県油症検診における顎関節症の発生率は 4.8% で, 一般における顎関節症の発症率とほぼ同様の発症率であった。顎関節症の患者 9 名中 2 名に高度の開口障害が認められた。顎関節症を有する油症患者の血中 PCB 濃度は 0.14ppb から 5.18ppb で平均 2.76ppb であった。顎関節の症状を有しない患者の血中 PCB 濃度と

の明らかな差はなかった。

謝 辞

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

参 考 文 献

- 1) 福山宏, 日高雄一, 佐野茂, 青野正男: 油症患者の血中 PCB と口腔内色素沈着の関係について. 福岡医誌 68 : 128-132, 1977.
- 2) 赤羽学, 松本伸也, 今村知明, 神奈川芳行, 吉村健清, 吉江増隆, 内博史, 安川史子: 一般成人を対象とした健康実態調査とカネミ油症患者実態調査との比較に関する研究 平成 23 年度分担研究報告書. 30-37, 2012.
- 3) 飯塚忠彦: 顎関節症診療のガイドライン. 日本顎関節学会編: 顎関節症, pp8-14, 永末書店, 東京, 2003.
- 4) De Kanter RJAM and Truin GJ : Prevalence in the Dutch adult population and a meta-analysis of signs and symptoms of temporomandibular disorders. J Dent Res 72 : 1509-1518, 1993.
- 5) Wanman A and Agerberg G : Temporomandibular joint sounds in adolescents, a longitudinal study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 69 : 2-9, 1990.
- 6) 塚原宏泰, 依田哲也, 坂本一郎, 森田伸, 三井妹美, 小野富昭, 榎本昭二: 日本人成人顎関節健康者における最大開口量についての統計学的検討. 日口外誌 44 : 159-167, 1998.
- 7) 湯浅秀道, 栗田賢一, 永坂佳規, 外山正彦, 塩島勝, 有地榮一郎, 河合幹: 若年者における最大開口域と年齢との関係. 口科誌 45 : 416-422, 1996.
- 8) Lipton JA and Ship JA : Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. J Am Dent Assoc 124 : 115-121, 1993.
- 9) LeResche L : Epidemiology of temporomandibular disorders : implications for the investigation of etiologic factors. Crit Rev Oral Biol Med 8 : 291-305, 1990.

(Received for publication March 22, 2013)

血液中ダイオキシン, PCB 類濃度測定のカロスチェック

¹⁾福岡県保健環境研究所

²⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

³⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

梶原 淳睦¹⁾, 戸高 尊²⁾, 平川 博仙¹⁾, 堀 就英¹⁾, 安武 大輔¹⁾, 宮脇 崇¹⁾,
飛石 和大¹⁾, 高尾 佳子¹⁾, 平田 輝昭¹⁾, 内 博史²⁾³⁾, 古江 増隆²⁾³⁾

Inter-Laboratory Crosscheck Study of Dioxins and PCBs in Human Blood Samples

Jumboku KAJIWARA¹⁾, Takashi TODAKA²⁾, Hironori HIRAKAWA¹⁾, Tsuguhide HORI¹⁾,
Daisuke YASUTAKE¹⁾, Takashi MIYAWAKI¹⁾, Kazuhiro TOBISHI¹⁾, Yoshiko TAKAO¹⁾,
Teruaki HIRATA¹⁾, Hiroshi UCHI²⁾³⁾ and Masutaka FURUE²⁾³⁾

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

²⁾*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University,
Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582*

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

Abstract We developed an analytical method for accurately determining the concentrations of dioxin and polychlorinated biphenyls(PCBs) in a blood volume of 5 g. Inter-laboratory crosscheck is available for maintaining the quality of dioxin and PCB analysis. We carried out the crosschecks of dioxin and PCB analysis in the blood with domestic analysis organizations. Two crosschecks each of dioxin and PCB analysis were carried out from 2007 through 2011. As a result, the findings of our analysis accorded well with the analyses of the other organizations. We believe that our analytical method is sufficiently reliable.

Key words : Cross-check · Dioxin · PCB · Blood

はじめに

血液中ダイオキシン, ポリ塩化ビフェニール(PCB) 類の分析は人体試料が対象であるため大量の試料を集めることが困難であり, ダイオキシン, PCB 分析の中でも特に微量分析が求められる。さらに土壌や水などの環境試料や焼却灰と比べ分析実施機関数や分析実績も少ない。このため人体試料中ダイオキシン, PCB 類分析の精度管理を実施する機会はほとんどないのが現状である。我々

は2002年以降, 当所で開発した血液5gを用いたダイオキシン, PCB類一斉分析法^{1)~3)}を日常の分析に用いている。この分析法の妥当性を検証するため2007年より同一試料の血液中ダイオキシン, PCB類濃度の測定を国内の分析機関に依頼し, 得られた分析結果と我々の分析結果を比較することで, 当所で行っているダイオキシン, PCB類一斉分析法の信頼性を検証した。

correspondence author : Jumboku KAJIWARA
Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan
E-mail : kajiwara@fihes. pref. fukuoka. jp

実験方法

1. 分析試料

数名のボランティアから採取した血液をプールし国内の分析機関に配布しダイオキシン, PCB 類の測定を依頼した. 各検査機関に配布した血液量は1件体当たり10~60mlであった. 表1に各年の試料, 測定対象化学物質を示した.

2. ダイオキシン類分析方法

当所での血液中ダイオキシン類の分析方法は ASE による脂肪抽出, 硫酸処理, カラムクリーンアップを用いた分析法¹⁾²⁾を用い, 国内の分析機関は概ね厚生労働省暫定法に準拠した各分析機関で通常行っている分析法⁴⁾を用いた.

ダイオキシン類の毒性等価量 (TEQ) の計算には WHO が 2005 年に発表した毒性等価係数 (TEF: WHO-05) を用いて計算し, 検出限界以下の異性体は検出限界値の 1/2 をその濃度として計算した.

3. PCB 類分析方法

当所での血液中 PCB 類の分析方法は ASE による脂肪抽出, 硫酸処理, カラムクリーンアップの後, GPC による精製を用いた分析法¹⁾³⁾を用い, 国内の分析機関はそれぞれ各分析機関で通常行っている分析法を用いるよう依頼した. 各分析機関の血液中 PCB 分析法の概要を表2に示した.

表1 各年のクロスチェック概要

年度	分析対象 検体	分析対象 化学物質	参加機関
2007	血液	ダイオキシン	5
2008	血液	PCB	6
2010	血液	ダイオキシン	8
2011	血液	PCB	7

(倫理面への配慮)

ダイオキシン, PCB 類の測定は, プールした血液を使用し, 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 (受付番号第 21-3 号 (1)平成 22 年 5 月 10 日承認).

実験結果と考察

1. 血液中ダイオキシン類濃度分析

血液中ダイオキシン濃度測定のカロスチェックは 2007 年に 1 種類の検体を 5 機関で測定し, 2020 年に 2 種類の検体を 8 機関で測定し比較した.

2007 年の血液中ダイオキシン濃度の測定結果を表3に示す. 血液中ダイオキシン濃度の5機関の平均値は PCDD: 0.98pg/血液 1g, PCDF: 0.068pg/血液 1g, Non-Ortho-PCB: 0.37pg/血液 1g, Mono-Ortho-PCB: 68pg/g 血液 1g, Total 重量 72pg/血液 1g であった. CV はそれぞれ 67.1, 5.3, 10.1, 6.5 および 5.6% であった. 変動の大きい異性体は 1,2,3,4,6,7,8-HeCDD と OCDD であり, 共に CV は 70% を超えた. 原因は両異性体の我々の測定値が他機関の約 4 倍であったことによる. 1,2,3,4,6,7,8-HeCDD と OCDD の測定値が大きく異なった原因は ASE 抽出に起因すると考えられるが詳細は不明であり, 今後検討する必要がある. しかし, 両異性体の毒性等価係数 (TEF) はそれぞれ 0.01 と 0.0003 であり, 毒性等価量 (TEQ) への影響は小さい. 表4に脂肪重量当たりの TEQ での測定結果を示した. Total TEQ は 5 機関の平均で 13pg-TEQ/g lipid. CV は 6.4% であった. 従って, ダイオキシン類の毒性評価で通常比較される脂肪重量当たりの TEQ で評価する場合, 各分析機関間の変動は小さく 5 機関の分析結果は良く一致することが確認できた. よって我々の血液中ダイオキシン, PCB 類一斉分

表2 各分析機関の血液中 PCB 分析フローの概要

	分析フロー概要	分析機関
1	アルカリ分解→溶媒抽出→カラム精製→GC/MS 測定	A, B
2	溶媒抽出→カラム精製→GC/MS 測定	C, D
3	溶媒抽出→アルカリ分解→溶媒抽出→カラム精製→GC/MS 測定	E
5	ASE 抽出→硫酸処理→カラム精製→GPC 精製→GC/MS 測定	F

表3 血液中ダイオキシン類測定結果 (2007 年)

	分析機関毎の平均値 (pg/g wet)					5 機関の集計						
	A	B	C	D	F	Mean	Med.	SD	Max	Min	CV	
PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	0.0034	0.0033	0.0035	ND	ND						
	1,2,3,7,8-PeCDD	0.014	0.016	0.015	0.016	0.018	0.016	0.015	0.0015	0.019	0.014	9.7%
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.0057	0.0078	0.0068	0.0085	0.010	0.0073	0.0071	0.0015	0.010	0.0054	20.9%
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.048	0.047	0.046	0.042	0.060	0.048	0.047	0.0065	0.061	0.037	13.6%
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.0082	0.0075	0.0090	0.0092	0.012	0.0089	0.0089	0.0018	0.014	0.0060	19.7%
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.058	0.046	0.055	0.053	0.18	0.074	0.055	0.052	0.20	0.044	70.8%
	OCDD	0.58	0.56	0.62	0.56	2.0	0.83	0.58	0.60	2.2	0.53	72.7%
	Total PCDDs	0.72	0.69	0.76	0.69	2.3	0.98	0.72	0.66	2.4	0.66	67.1%
	Total PCDDs-TEQ	0.025	0.026	0.025	0.025	0.029	0.026	0.025	0.0023	0.030	0.021	8.8%
PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	0.0044	0.0033	0.004	ND	ND						
	1,2,3,7,8-PeCDF	0.0027	0.0030	ND	ND	ND						
	2,3,4,7,8-PeCDF	0.030	0.029	0.031	0.027	0.029	0.029	0.030	0.0019	0.032	0.024	6.6%
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.0097	0.010	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.00098	0.012	0.0070	9.6%
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.010	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.00084	0.013	0.0095	7.7%
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	ND	ND	ND						
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.0047	0.0035	0.0043	0.0065	ND						
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.0087	0.0073	0.0072	0.0079	ND						
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	ND	ND	ND						
	OCDF	ND	ND	ND	ND	ND						
	Total PCDFs	0.070	0.064	0.069	0.067	0.050	0.068	0.069	0.0036	0.072	0.060	5.3%
	Total PCDFs-TEQ	0.012	0.011	0.012	0.011	0.012	0.012	0.012	0.00066	0.013	0.010	5.7%
Non-ortho PCBs	3,4,4',5'-TeCB(#81)	0.0082	ND	0.0089	0.0095	ND						
	3,3',4,4'-TeCB(#77)	0.016	0.018	0.0093	0.011	ND						
	3,3',4,4',5'-PeCB(#126)	0.18	0.24	0.22	0.27	0.19	0.22	0.22	0.036	0.31	0.18	16.5%
	3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)	0.11	0.13	0.14	0.13	0.12	0.13	0.13	0.010	0.15	0.11	8.2%
	Total Non-Ortho PCBs	0.32	0.38	0.38	0.42	0.31	0.37	0.37	0.038	0.46	0.32	10.3%
	Total Non-Ortho PCBs-TEQ	0.021	0.028	0.026	0.031	0.022	0.026	0.026	0.0037	0.035	0.021	14.5%
Mono-ortho PCBs	2',3,4,4',5'-PeCB(#123)	0.63	0.73	0.70	0.56	0.73	0.67	0.68	0.078	0.82	0.54	11.7%
	2,3',4,4',5'-PeCB(#118)	36	37	37	36	31	35	36	2.4	38	31	6.7%
	2,3,3',4,4'-PeCB(#105)	6.1	6.9	6.9	6.2	6.4	6.5	6.4	0.38	7.1	6.0	5.9%
	2,3,4,4',5'-PeCB(#114)	2.3	2.7	2.8	2.9	2.2	2.6	2.7	0.30	3.0	2.0	11.6%
	2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167)	5.0	5.3	5.5	5.6	4.0	5.1	5.3	0.59	5.9	3.9	11.7%
	2,3,3',4,4',5'-HxCB(#156)	13	13	14	14	12	13	13	1.0	15	11	8.0%
	2,3,3',4,4',5'-HxCB(#157)	3.4	3.1	3.5	3.4	2.8	3.2	3.4	0.29	3.6	2.6	8.8%
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(#189)	1.5	1.8	2.0	1.6	1.6	1.7	1.7	0.17	2.0	1.5	10.1%
	Total Mono-Ortho PCBs	67	70	73	70	61	68	69	4.4	73	59	6.5%
	Total Mono-Ortho PCBs-TEQ	0.0020	0.0021	0.0022	0.0021	0.0018	0.0020	0.0021	0.00013	0.0022	0.0018	6.5%
	Total	69	71	74	71	63	70	70	3.9	75	62	5.6%
	Total TEQ	0.060	0.067	0.066	0.069	0.063	0.065	0.065	0.0038	0.072	0.060	5.9%
	脂肪含量 (mg/g)	5.1	5.2	4.8	5.5	4.7	5.1	5.1	0.33	5.9	4.6	6.4%
	使用血液量 (g)	30	20	10	7	5						

表4 血液中ダイオキシン類測定結果 (TEQ, 2007年)

	分析機関毎の測定値					5機関の集計					
	A	B	C	D	E	Mean	Median	SD	Max	Min	CV
PCDDs-TEQ	4.9	5.0	5.3	4.6	6.2	5.2	5.0	0.62	6.2	4.6	11.9%
PCDFs-TEQ	2.3	2.2	2.6	2.0	2.5	2.3	2.3	0.21	2.6	2.0	9.0%
Non-Orth PCBs-TEQ	4.2	5.4	5.4	5.7	4.8	5.1	5.4	0.59	5.7	4.2	11.7%
Mono-Ortho-PCBs-TEQ	0.39	0.41	0.45	0.39	0.39	0.41	0.39	0.027	0.45	0.39	6.6%
Total TEQ	12	13	14	13	14	13	13	0.83	14	12	6.4%

(pg-TEQ/g lipid)

表5 血液中ダイオキシン類測定結果 (TEQ, 2010年)

	分析機関毎の測定値								7機関の集計				
	A	B	C	D	E	F	G	Mean	SD	Max	Min	CV	
Sample 1	PCDDs-TEQ	2.0	2.6	3.0	2.6	3.9	2.8	3.6	2.9	0.63	3.9	2.0	21.6%
	PCDFs-TEQ	0.99	1.3	1.2	0.98	1.5	1.4	1.4	1.3	0.20	1.5	0.98	15.8%
	Non-Orth PCBs-TEQ	2.2	1.7	2.5	2.4	3.2	2.3	2.5	2.4	0.46	3.2	1.7	19.2%
	Mono-Ortho-PCBs-TEQ	0.23	0.20	0.26	0.22	0.32	0.24	0.29	0.25	0.041	0.32	0.20	16.3%
	Total TEQ	5.4	5.8	7.0	6.2	8.9	6.8	7.7	6.8	1.2	8.9	5.4	17.5%
Sample 2	PCDDs-TEQ	1.9	2.1	3.3	2.6	2.4	2.5	2.9	2.5	0.47	3.3	1.9	18.6%
	PCDFs-TEQ	0.72	1.0	1.5	0.85	1.0	1.1	0.99	1.0	0.25	1.5	0.72	24.3%
	Non-Orth PCBs-TEQ	0.52	0.23	1.2	0.62	0.66	0.65	0.84	0.67	0.30	1.2	0.23	44.3%
	Mono-Ortho-PCBs-TEQ	0.058	0.046	0.089	0.057	0.058	0.062	0.012	0.054	0.023	0.089	0.012	42.3%
	Total TEQ	3.2	3.4	6.1	4.1	4.1	4.2	4.8	4.3	0.96	6.1	3.2	22.4%

(pg-TEQ/g lipid)

析法のダイオキシン類測定値は妥当であると判断した。

2010年の血液中ダイオキシン濃度のクロスチェックは2種類の検体を8機関で測定したが、1機関のPCDDsとPCDFsの測定値のZスコアが2を超えたので、この機関の測定値を異常値として解析から除外し、7機関の測定結果で解析した。血液中ダイオキシン濃度の7機関のTotal PCDDs, PCDFs, Non-Ortho PCBs, Mono-Ortho PCBs, Total TEQの平均値はSample 1が2.9, 1.3, 2.4, 0.25, 6.8pg-TEQ/g lipid, Sample2が2.5, 1.0, 0.67, 0.054, 4.3pg-TEQ/g lipidであった。CVはそれぞれSample 1が21.6, 15.8, 19.2, 16.3, 17.5%, Sample 2が18.6, 24.3, 44.3, 42.3, 22.4%であった(表5)。今回CVが大きかった原因はクロスチェックに用いた血液試料のTotal TEQの平均値が6.8と4.3pg-TEQ/g lipidで低濃度であったこと、分析脂肪濃度の測定値のバラツキが大きかったこと、分析機関毎の検出下限値の違いによる影響が考えられた。Sample重

量ベースのCVはSample 1が11.8, 15.0, 10.0, 8.4, 6.2%, Sample 2が7.6, 11.6, 30.0, 45.5, 4.1%であり、脂肪重量ベースのCVに比べ1/2程度である。検出下限値はPCDDsが0.098~4.0pg/g lipid, PCDFsが0.036~4.0pg/g lipid, Non-Ortho PCBsが0.12~15pg/g lipid, Mono-Ortho PCBsが0.3~71pg/g lipidに設定されており、低濃度の試料の分析では測定値に対する影響が大きくなった可能性がある。我々の測定値は表5のFに示したが、平均値と良く一致しており血液中ダイオキシン, PCB類一斉分析法のダイオキシン類測定値は妥当であると判断した。2010年のクロスチェックでは各分析機関間のSample重量ベースでの変動は小さく分析結果は良く一致することが確認できたので、脂肪重量の確定には注意する必要がある。また、分析機関毎の検出下限値の違いについても検討が必要であった。

表6 血液中 PCB 測定結果 (2008 年)

	分析機関毎の測定値						6 機関の集計					
	A	B	C	D	E	F	Mean	Median	SD	Max	Min	CV
MoCBs	1.7	0.53	0	2.0	NA	NA	1.0	1.1	0.93	2.0	0	-
DiCBs	0.40	0.39	0	1.9	NA	NA	0.66	0.39	0.82	1.9	0	-
TrCBs	6.2	5.8	5.9	5.4	4.3	5.4	5.5	5.6	0.68	6.2	4.3	12.5%
TeCBs	40	36	33	29	38	37	36	37	4	40	29	11.9%
PeCBs	110	90	83	81	91	93	91	91	10	110	81	11.2%
HxCBs	320	420	350	330	370	330	350	340	37	420	320	10.6%
HpCBs	280	260	250	250	280	260	260	260	14	280	250	5.3%
OcCBs	65	55	48	56	66	55	57	55	6.7	66	48	11.7%
NoCBs	7.2	8.6	6.4	6.3	7.0	7.4	7.2	7.1	0.83	8.6	6.3	11.6%
DeCBs	3.1	3.6	3.2	2.8	3.3	3.0	3.1	3.1	0.28	3.6	2.8	8.8%
Total PCBs	830	880	780	760	850	790	820	810	46	880	760	5.6%

(pg/g-wet)

表7 血液中 PCB 測定結果 (2010 年)

	分析機関毎の測定値								7 機関の集計				
	A	B	C	D	E	F	G	Mean	SD	Max	Min	CV	
MoCBs	0	0	0	0	1.5	NA	NA	0.25	0.61	0	1.5	-	
DiCBs	0	0	0	0	2.4	NA	NA	0.40	0.97	0	2.4	-	
TrCBs	0	0.65	0	0	1.2	0.70	0.30	0.42	0.49	0	1.2	-	
TeCBs	6.0	6.9	6.5	3.8	7.3	6.3	6.3	6.1	1.2	3.8	7.3	19.9	
PeCBs	15	21	14	14	19	19	19	17	3.1	14	21	18.0	
Sample 1 HxCBs	210	200	180	160	210	200	200	190	18	160	210	9.2	
HpCBs	170	160	140	160	170	160	150	160	12	140	170	7.5	
OcCBs	42	37	37	37	45	35	30	39	3.6	30	45	9.4	
NoCBs	1.0	4.5	4.8	3.8	4.2	4.6	4.4	3.8	1.4	1.0	4.8	37.3	
DeCBs	0	2.0	2.0	1.5	1.7	2.0	1.7	1.5	0.78	0	2.0	50.8	
Total PCBs	450	430	390	380	460	420	400	420	32	380	460	7.6	
MoCBs	0	0	0	0	1.2	NA	NA	0.19	0.47	0	1.2	-	
DiCBs	0	0	0	0	2.2	NA	NA	0.37	0.90	0	2.2	-	
TrCBs	0	0.65	0.82	0	1.8	0.70	0.56	0.66	0.66	0	1.8	-	
TeCBs	3.0	4.8	3.6	2.3	5.0	3.6	4.0	3.7	1.0	2.3	5.0	27.9	
PeCBs	8.0	10	8.7	7.1	9.9	9.3	10	8.9	1.2	7.1	10	13.1	
Sample 2 HxCBs	74	70	65	53	72	68	76	67	7.6	53	74	11.3	
HpCBs	46	49	39	40	51	45	45	45	4.7	39	51	10.5	
OcCBs	9.0	8.2	7.6	6.8	9.6	6.6	7.1	8.0	1.2	6.6	10	15.1	
NoCBs	0	0.94	1.2	1.0	1.0	1.1	1.2	0.87	0.44	0	1.2	50.5	
DeCBs	0	0.49	0.51	0.40	0.50	0.70	0.42	0.43	0.23	0	0.70	54.0	
Total-PCBs	140	140	130	110	150	130	140	130	15	110	150	11.2	

(pg/g-wet)

2. 血液中 PCB 類濃度

血液中 PCB 類濃度測定のカロスチェックは 2008 年に 1 種類の検体を用いて, 2011 年には 2 種類の検体を用いて実施した. 2008 年の血液中 PCB 濃度の分析機関ごとの測定結果を表 6 に示した. 全分析機関の Total PCB 濃度の平均値は 820pg/血液 1g, CV は 5.6% であり, 各分析機関の分析結果は良く一致した. 各分析機関の PCB の同族体ごとの組成もよく一致している. 各同族体濃度の変動率もほぼ 10% 程度 (5.3~12.5%) でありよく一致している. 今回の配布試料中では HxCBs が最も主要な同族体 (43%) であり, HxCBs 濃度の変動が Total PCB 濃度の変動に最も大きく影響していると推察される. また, 6 機関中我々を含む 2 機関は MoCBs, DiCBs の定量を行っていないが両同族体は合計でも Total PCB 濃度の 0.5% 以下であり, Total PCB 濃度の測定にはほとんど影響しない. 主要な異性体の順位は #153, #180, #138, #182, #118 の順であり, これら 5 異性体で Total PCB 濃度の約 55% を占めているが, この結果も各分析機関でほぼ一致していた.

2011 年の血液中 PCB 濃度の 7 機関の Total PCB 濃度の平均値は Sample 1 が 420pg/g-wet, Sample 2 が 130 pg/g-wet, 分析機関間の CV はそれぞれ 7.6% と 11.2% で良く一致した (表 7). 主要な同族体 (PeCBs-OcCBs) 濃度の CV もほぼ 10% 程度 (7.5~15.1%) でありよく一致している. 2011 年の試料中も HxCBs が最も主要な同族体 (38~51%) であり, HxCBs 濃度の変動が Total PCB 濃度の変動に最も大きく影響していると推察される. また, 7 機関中我々を含む 2 機関は MoCBs, DiCBs の定量を行っていないが両同族体は合計でも Total PCB 濃度の 0.8~2% であり, Total PCB 濃度の測定にはほとんど影響しなかった. 主要な異性体の順位は #153, #180, #138,

#170, #182, の順であり, これら 5 異性体で Total PCB 濃度の約 56% を占めているが, この結果も各分析機関でほぼ一致していた.

血液中 PCB 類濃度測定のカロスチェックの結果は 2008 年, 2010 年とも各分析機関の測定値は良く一致していた. 従って, 我々の血液中ダイオキシン, PCB 類一斉分析法での PCB 類測定値は妥当であると判断した.

総 括

2007 年~2011 年に血液中ダイオキシン, PCB 類のカロスチェックを 2 回ずつ実施した. 今回クロスチェックを実施した分析機関間の測定値と我々の分析法の測定値は 1 機関を除いて良く一致し, 我々の分析法の妥当性は確認された.

謝 辞

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

参 考 文 献

- 1) Todaka T, Hirakawa H, Tobiishi K and Iida T : New Protocol of Dioxin Analysis in Human Blood. Fukuoka Igaku Zasshi 94 : 148-157, 2003.
- 2) 戸高尊, 平川博仙, 堀就英, 飛石和夫, 飯田隆雄 : ヒト血液中ダイオキシン類の抽出・精製法の改良および油症患者血液中ダイオキシン類濃度, 福岡医誌 96 : 185-191, 2005.
- 3) 堀就英, 飛石和夫, 芦塚由紀, 中川礼子, 戸高尊, 平川博仙, 飯田隆雄 : ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 及び高分解能ガスクロマトグラフィー/高分解能質量分析計 (HRGC/HRMS) による血中 PCB 異性体別分析, 福岡医誌 96 : 220-226, 2005.
- 4) 厚生省 : 血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル 2000.

(Received for publication March 26, 2013)

Development of a Newly Large-Volume Injection System for Dioxin Determinations in Blood of Yusho Patients

Takashi TODAKA¹⁾, Hiroshi UCHI³⁾, Hironori HIRAKAWA²⁾,
Jumboku KAJIWARA²⁾ and Masutaka FURUE¹⁾³⁾

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

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

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

Abstract We developed a more effective method to measure the concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), and non-*ortho*-coplanar polychlorinated biphenyls (non-*ortho* PCBs) in the blood of Yusho patients using high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) equipped with a newly large-volume injection system. The new injection system linked a LaviStoma system with a unique stomach-shaped inlet liner (SSIL) and a solvent-cut large-volume (SCLV) injection system. This approach made it possible to introduce volumes up to 200 μ l into the HRGC/HRMS in comparison with the 20 μ l volume of the previously reported conventional SCLV method. Based on experiments conducted using the same blood sample, the concentrations of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs obtained by the developed method showed a close correlation to that by the conventional SCLV method. By improving the injection method, the operation time and labor for the purification procedure from blood could be reduced. Furthermore, the developed method was more effective than the conventional SCLV method for recovery of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs.

Key words : Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins · Polychlorinated dibenzofurans · Non-*ortho*-coplanar polychlorinated biphenyls · Human blood · Yusho

Introduction

Over 40 years have passed since the outbreak of Yusho disease, and Yusho patients still have much higher concentrations of PCDFs in their blood than do unaffected persons¹⁾. Therefore, a follow-up study of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCB concentrations in the blood of Yusho patients is very important when considering the health care of these patients. We previously developed an analytical method for accurately determining the concentrations of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs at a blood volume of 5 g^{2)~4)}. Moreover, we measured the concentrations of

PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs in the blood collected from Yusho patients during medical health examinations performed from 2002 to 2010^{5)~10)}. However, there are still some problems concerning the purification procedures from human blood.

In the purification procedure of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs from human blood, the toluene eluate (40 ml) obtained by final column chromatography is concentrated to about 200 μ l with a sample concentrator, and must subsequently be concentrated to 20 μ l with a solvent evaporation under a nitrogen gas stream. This micro-concentration procedure is very trouble-

Corresponding author : Takashi TODAKA
Tel. : 092-921-9946 ; Fax : 092-928-1203
E-mail address : todaka@fihes.pref.fukuoka.jp

some and time-consuming, and the recovery of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs may be affected. Therefore, it is necessary to develop a large-volume injection system that can handle volumes up to 200 μ l of sample solution.

The large-volume injection system using SCLV injectors is based on the selective separation of the solvent from the pre-column, and venting only to the solvent through a solvent-cut valve, while the analytic compounds are focused and condensed in a cold trap component and are separated by the analytic column. Because most interfering matrices in an injected sample can be removed by the pre-column of a SCLV injection system, the analytical column can use a narrow-bore (0.15 mm) column¹¹⁾. However, this injection system has the drawback that the volume of injection is limited because the capacity of the straight inlet liner is small.

A LaviStoma system, which employs a large-volume injection procedure using a unique large-capacity SSIL, has been reported to be the most useful for analysis of environmental samples¹²⁾. The large-volume sample (200 μ l) injected into the SSIL remains in the liquid phase. Then, the solvent is evaporated and the sample is concentrated under a carrier gas stream and the concentrated sample flows into the analytical column. In a LaviStoma system, most of the solvent vapor is excreted via the split vent line. However, the remaining small amount of solvent vapor after a short time of solvent concentration in the SSIL might flow into the analytical column. Therefore, the analytical column cannot be a narrow-bore (0.15 mm) column. Furthermore, a longer period of solvent concentration in the SSIL results in the loss of analytes. The method linked a LaviStoma system and a SCLV injection system is expected to make possible the introduction of sample volumes up to 200 μ l as compared to the 20 μ l volume of the conventional SCLV method. Moreover, when the solvent concentration in the SSIL is insufficient, the injected solvent containing the analytes is vented to waste through a solvent

cut valve by the SCLV system.

In the present study, we developed a newly large-volume injection technique that linked a LaviStoma system and a SCLV injection system in order to overcome the drawbacks of the two injection techniques described above.

Materials and Methods

1. Materials

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

2. Sample preparation

The extraction and purification of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs from human blood was performed using a previously reported method^{2)~4)}.

3. Analysis of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs

Concentrations of the PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs were measured using HRGC/HRMS equipped with a LaviStoma system and a SCLV injection system. The analytical conditions were as follows : the gas chromatograph was an HP-7890 A (Agilent Technologies Inc., USA) equipped with a CombiPAL (CTC Analytics AG, Switzerland), an AutoSpec-Premier, (Micromass Ltd., UK), a SCLV injection system (SGE Ltd.,

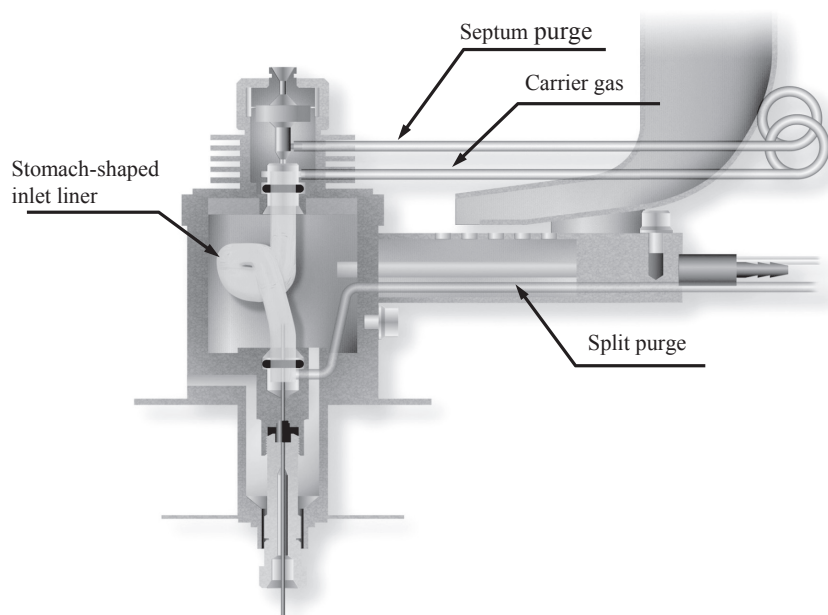


Fig. 1 Inside structure of a LaviStoma system.

Australia) and a LaviStoma system (AiSTI SCIENCE, Japan) (Fig. 1); the column used was an BPX-5 fused silica pre-capillary column, 0.25 mm i.d. \times 7 m, 0.25 μ m film thickness (SGE Ltd., Australia); the analytical column, 0.15 mm i.d. \times 30 m (SGE Ltd., Australia). The injection temperature and ion source temperature were maintained at 120°C and 280°C, respectively, and the carrier gas (helium) flow rate (constant flow) was 1.3 ml/min. The ionizing energy, accelerating voltage, and trap current were 40 eV, 7.8 kV and 750 μ A, respectively. PCDDs, PCDFs and non-*ortho* PCBs were analyzed in a single-ion recording mode. The resolution was maintained at 10000 at 10%. PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs were quantified using one molecular (M)⁺ ion, ($M + 2$)⁺ ion, and ($M + 4$)⁺ ion.

Results and discussion

A newly large-volume injection system was developed to overcome the drawbacks of a LaviStoma system and a SCLV injection system. The principle of the method is as follows: In the first stage, the injector is kept at a low temperature, and the large volume of sample injected into the SSIL remains in the liquid phase in the liner. In

the second stage, the solvent is evaporated and the sample is concentrated under carrier gas flow. In the third stage, the sample is introduced into an analytical column by raising the temperature of the SSIL in the splitless mode. Finally, in the last stage, the residual solvent or high-boiling-point impurities are purged out in the split mode (Fig. 2). By an SCLV injection system, the solvent and the analytic compound in the samples are separated by the pre-column to remove the various interferences in the sample. The solvent is then vented to waste through a solvent cut valve. The analytic compounds are focused at the head of the analytical column by a cold trap component, and the analytical column is then heated by the temperature program, and the analytic compounds are separated and determined (Fig. 3).

Several parameters for the operation of the LaviStoma system were optimized. The initial injector temperature was set near the solvent boiling point to enable solvent evaporation according to LaviStoma advisable temperature program. Because the solvent used in the analysis was toluene and its boiling point is 110°C, the initial injector temperature was set at 120°C. The analytical conditions were as follows: the injection

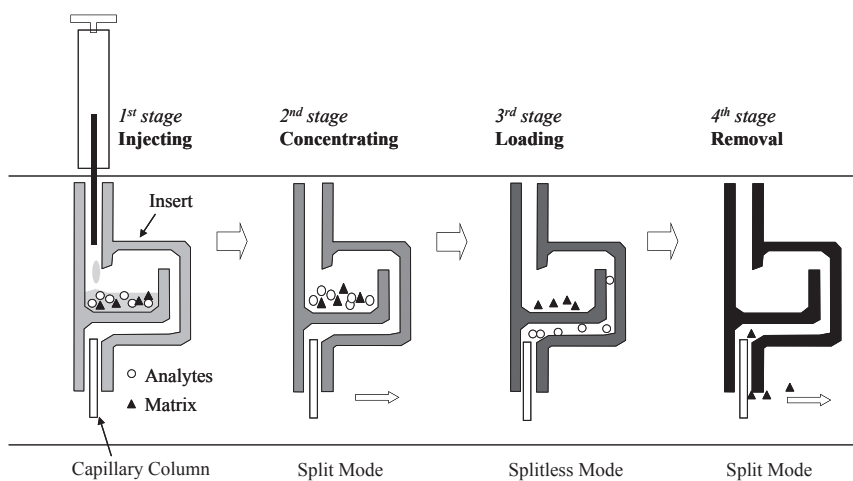


Fig. 2 Principle of injection method with a LaviStoma system.

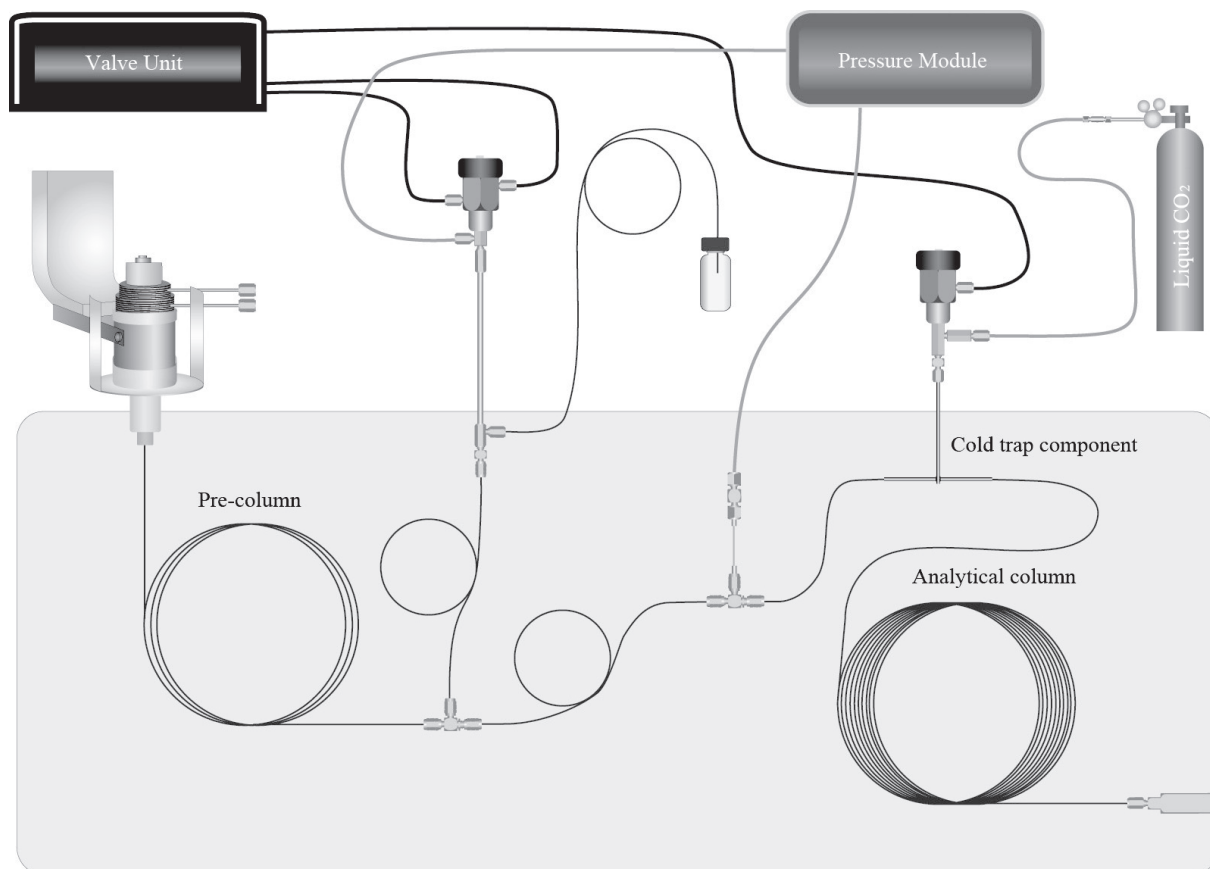


Fig. 3 Principle of a LaviStoma-SCLV system developed in the present study.

temperature was maintained at 120°C for 1 min, heated from 120°C to 290°C at a rate of 120°C/min, and maintained at 290°C for 20.3 min; meanwhile, the column oven temperature was maintained at 160°C for 3.75 min, heated from 160°C to 300°C at a rate of 20°C/min, maintained at 300°C for 12 min, cooled to 195°C at a rate of 70°C/min, maintained at 195°C for 0.5 min, heated to 300°C at a rate of 3°C/min, and then maintained at 300°C for 1.75 min.

Because the injection volume, the purge time, the vent flow rate, and the vent time are critical factors for the operation of a LaviStoma-SCLV system, the relationships between these parameters were examined at different volumes; thus, 25, 50, 100, and 200 µl of the standard solutions (0.01 ng ml⁻¹) of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs were injected using a LaviStoma-SCLV system under the operating conditions mentioned above. The optimization was conducted by comparing the peak areas of individual congeners of these compounds for a LaviStoma-SCLV system with those for the conventional SCLV system. The optimization purge times for injection of the standard solution volumes of 25, 50, 100, and 200 µl were 3.75, 3.75, 3.75, and 4.75 min, respectively, and the vent flow rates were 150, 300, 300, and 300 ml/min, respectively, with vent times of 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 min, respectively. Under these conditions, the relationship between the peak area of an individual congener and the injected volumes (25, 50, 100, and 200 µl) of the standard solution of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs was examined. When each volume of the standard solution was injected 3 times with a LaviStoma-SCLV system, the calibration curves of individual congeners of these compounds all showed good linearity ($R > 0.99$) in the range of 25–200 µl, and the relative standard deviations of three replicate determinations for different injection volume of the standard solution were all below 20%, indicating good reproducibility.

We performed a preliminary study regarding

the calibration curves of the individual congeners of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs with a LaviStoma-SCLV system. Calibration standard solutions ranging from 0.5 to 50 pg ml⁻¹ were prepared by diluting the standard solution (0.25 ng ml⁻¹) of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs, and volumes of 100 µl were injected into the LaviStoma-SCLV system. The calibration curves of individual congeners of these compounds all showed good linearity ($R > 0.99$), and the relative standard deviation at each dose was less than 20%.

The concentrations of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs measured by the developed method and the previously reported method using the conventional SCLV method were compared for blood samples collected from 22 normal subjects. The concentrations of individual congeners of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs prepared by both methods were nearly the same, and the total toxicity equivalency factor (TEQ) levels were almost equal to those obtained by the conventional SCLV method. These findings indicate that the developed method is essentially equivalent to the conventional SCLV method. However, recovery of the ¹³C-labeled internal standard was increased about 20% overall compared with the conventional SCLV method. In addition, the developed method demonstrated high reproducibility based on experiments conducted using the same control serum sample for 12 weeks (Table 1). These data indicated that the developed method is applicable for the determination of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs in the blood of Yusho patients.

In the previously reported method, the dioxin fractions (40 ml) eluted with toluene for final purification procedure from human blood were concentrated to about 200 µl with a sample concentrator. Moreover, the sample had to be concentrated to 20 µl with solvent evaporation under a nitrogen gas stream. This procedure is very troublesome and time-consuming, and the recovery of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs

Table 1 Reproducibility test of the developed method conducted using the same control serum sample for 12weeks

Congeners	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipid)											
	Week											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2,3,7,8-TetraCDD	1.6	1.7	1.4	1.3	1.9	2.0	1.4	1.2	1.2	1.4	1.7	1.5
1,2,3,7,8-PentaCDD	5.2	6.1	6.2	6.5	7.2	6.4	6.1	6.4	6.8	7.0	6.8	5.4
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	5.3	7.0	5.9	5.6	5.6	3.6	6.9	7.0	7.5	5.7	5.6	11.0
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	50	51	42	44	44	47	47	45	41	43	44	44
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	11	9.1	7.1	8.7	6.7	5.7	8.5	8.3	8.0	7.0	7.9	7.0
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	145	178	119	113	105	96	112	144	162	133	120	121
OctaCDD	1427	1432	1379	1453	1017	1046	1546	1480	1301	1187	1195	1420
2,3,7,8-TetraCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,2,3,7,8-PentaCDF	1.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2,3,4,7,8-PentaCDF	6.6	4.8	6.0	5.4	5.2	5.6	6.3	5.3	5.3	5.0	4.7	5.8
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	7.7	5.7	6.2	6.7	5.8	6.2	6.1	5.5	4.4	5.5	5.5	5.1
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	6.0	6.1	5.9	6.5	5.3	5.6	5.7	5.9	5.5	5.0	4.9	6.6
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	ND	ND	ND	ND	ND	2.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	14	13	15	15	14	12	15	14	13	11	14	14
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OctaCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TriCB-77	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TriCB-81	43	38	40	39	37	41	41	38	36	35	37	43
PentaCB-126	23	20	24	23	21	23	25	25	25	21	22	25
HexaCB-169	19	18	22	19	19	19	19	19	19	16	18	19
Total PCDD	1645	1684	1561	1633	1188	1207	1728	1692	1527	1383	1382	1610
Total PCDF	41	35	40	40	36	42	40	37	34	33	35	38
Total PCDD/PCDF	1686	1719	1601	1673	1224	1249	1767	1729	1560	1416	1417	1648
Total Non-ortho PCBs	90	81	92	86	82	88	89	88	84	77	82	92
Total	1776	1800	1692	1759	1305	1336	1856	1817	1644	1493	1499	1740
TEQ from PCDDs	15	17	15	15	16	15	15	16	16	16	16	15
TEQ from PCDFs	3.8	3.0	3.5	3.4	3.1	3.9	3.5	3.2	3.0	2.9	2.9	3.3
TEQ from PCDDs/PCDFs	19	20	18	19	19	19	19	19	19	19	19	18
TEQ from non-ortho PCBs	2.9	2.6	3.1	2.9	2.7	2.9	3.0	3.1	3.0	2.6	2.7	3.1
Total TEQ	22.0	22.3	21.2	21.5	21.8	22.0	21.9	21.9	21.7	21.2	21.4	21.2
Lipid (%)	0.31	0.31	0.28	0.29	0.33	0.27	0.27	0.27	0.30	0.29	0.29	0.28

ND : less than the determination limit.

CDD : chlorinated dibenzo-*p*-dioxin.

CDF : chlorinated dibenzofuran.

CB : chlorinated biphenyl.

may be affected. The developed method made it possible to introduce volumes up to 200 μl into the system. Consequently, the micro-concentration procedure by a solvent evaporation under nitrogen gas stream could be excluded, and it was possible to reduce the time and labor involved, and lessen the danger of the escape of PCDDs,

PCDFs, and non-*ortho* PCBs. These findings indicate that the developed method was more effective than the previously reported method for efficiency of operation procedure and determination of PCDDs, PCDFs, and non-*ortho* PCBs.

Acknowledgment

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

References

- 1) Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T and Kuwabara M : Overview of Yusho. *J. Dermatol. Sci.* 1 : 3-10, 2005.
- 2) Todaka T, Hirakawa H, Tobihi K and Iida T : New protocol for dioxin analysis of human blood. *Fukuoka Igaku Zasshi* 94 : 148-157, 2003.
- 3) Iida T and Todaka T : Measurement of dioxins in human blood : improvement of analytical method. *Ind Health* 41 : 197-204, 2003.
- 4) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K and Iida T : Improvement in dioxin analysis of human blood and their concentrations in blood of Yusho patients. *J. Dermatol. Sci.* 1 : 21-28, 2005.
- 5) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K and Iida T : Follow-up survey of dioxins concentrations in the blood of Yusho patients in 2002-2003. *Fukuoka Igaku Zasshi* 96 (5) : 249-258, 2005.
- 6) Todaka T, Hirakawa H, Kajiwara J, Hori T, Tobiishi K, Onozuka D, Iida T, Yoshimira T and Furue M : Dioxin concentration in the blood of patients collected during medical check-up for Yusho in 2004-2005. *Fukuoka Igaku Zasshi* 98 : 222-231, 2007.
- 7) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Iida T and Furue M : Concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-*ortho* and mono-*ortho* polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. *Chemosphere* 66 : 1983-1989, 2007.
- 8) Todaka T, Hori T, Hirakawa H, Kajiwara J, Yasutake D, Onozuka D, Iida T and Furue M : Congener-specific analysis of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 127 elderly residents in Nakagawa Town, Fukuoka Prefecture, Japan. *Chemosphere* 73 : 865-872, 2008.
- 9) Todaka T, Hori T, Hirakawa H, Kajiwara J, Yasutake D, Onozuka D, Iida T and Furue M : Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients over 35 years after the incident. *Chemosphere* 74 : 902-909, 2009.
- 10) Todaka T, Hori T, Yasutake D, Yoshitomi H, Hirakawa H, Onozuka D, Kajiwara J, Iida T, Yoshimura T and Furue M : Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood collected from Yusho patients during medical check-ups performed from 2004-2007. *Fukuoka Igaku Zasshi* 100(5) : 156-165, 2009.
- 11) Matsumura T, Masuzaki Y, Ezaki T, Ohashi M and Morita M : Detection of low femto gram dioxins -Development of column switching-solvent cut large volume/multiple injection cryofocus trap GC-HRMS. *Organohalogen compounds* 45 : 25-28, 2000.
- 12) Saito K, Ohmura A, Takekuma M, Sasano R, Matsuki Y and Makazawa H : Application of a novel large-volume injection method using a stomach-shaped inlet liner in capillary gas chromatographic trace analysis of dioxins in human milk and plasma. *Anal. Sci.* 70 : 661-666, 2007.

(Received for publication March 19, 2013)

(和文抄録)

油症患者血液中ダイオキシン類分析における新しい大量注入法の検討

¹⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

²⁾福岡県保健環境研究所

³⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

戸高 尊¹⁾, 内 博史³⁾, 平川博仙²⁾, 梶原淳睦²⁾, 古江増隆¹⁾³⁾

油症患者血液中 PCDDs, PCDFs および non-ortho PCBs 分析を新しい大量注入装置を装備した高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析法 (HRGC/HRMS) を用いて検討した. 新しい大量注入装置は胃袋型インサートを備えた LaviStoma システムと Solvent-cut large-volume injection (SCLV) システムを連結して用いた. この装置を用いて, 注入条件を検討した結果, 200 μ l の試料注入が可能となった. 同一の血液を用いて行った従来の SCLV 法との比較検討の結果, 本法は従来法と同様な結果が得られることが確認された. 本法は従来の SCLV 法に比べ, 血液試料の前処理段階で費やす時間を短縮することができ, PCDDs, PCDFs および non-ortho PCBs の回収率も約 20%向上した.

The Changes in Dioxin Concentrations in the Blood of Yusho Patients from 2004 to 2010

Takashi TODAKA¹⁾, Hiroshi UCHI³⁾, Hironori HIRAKAWA²⁾, Yoshiko TAKAO²⁾,
Jumboku KAJIWARA²⁾ and Masutaka FURUE¹⁾³⁾

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

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

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

Abstract We measured the concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), and polychlorinated biphenyls (PCBs) in blood collected from Yusho patients during medical health examinations performed from 2004 to 2010. Out of the 242 and 200 Yusho patients who received medical health examinations in 2004 and 2010, respectively, the concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs in the blood of 136 patients were measured in both of those years. The concentrations of individual congeners of PCDDs, PCDFs, and PCBs in the blood of these 136 Yusho patients measured in 2004 were compared with those measured in 2010. Among individual congeners of PCDDs, PCDFs, and PCBs, most congeners of these compounds did not significantly decrease from 2004 to 2010. However, the concentrations of 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptaCDD, octaCDD, 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexaCDF, tetraCB 52/69, pentaCB 101, octaCB 198/201, and octaCB 196/203 in the blood of Yusho patients were significantly decreased from 2004 to 2010. In addition, the concentrations of 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDD, 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF, and 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDF tended to decrease slightly from 2004 to 2010. These findings suggest that the PCDDs, PCDFs, and PCBs have remained in the blood of Yusho patients for a very long time, with over 40 years having passed since the outbreak of Yusho.

Key words : Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins · Polychlorinated dibenzofurans · Non-*ortho*-coplanar polychlorinated biphenyls · Human blood · Yusho

Introduction

The Yusho poisoning accident, which affected over 1800 people, occurred in 1968 in western Japan, and was caused by the ingestion of rice bran oil that contained the following contaminants : PCBs, PCDFs, PCDDs, polychlorinated quarterphenyls (PCQs), and polychlorinated terphenyls (PCTs)¹⁾. Since the Yusho outbreak, medical care services and health examinations of the subjects have been carried out by the Yusho study group. In 2001, the measurement of PCDDs,

PCDFs, and non-*ortho* PCBs in the blood has become possible using small amounts of blood collected from participants in annual medical health examinations of Yusho patients^{2)~4)}. We have measured the concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood collected from Yusho patients in medical health examinations since 2002^{5)~7)}. Moreover, we have carried out a congener-specific analysis of non-dioxin-like PCBs in the blood of Yusho patients since 2004^{8)~10)}. Based on these results, we have previously reported that the concentra-

Corresponding author : Takashi TODAKA
Tel. : 092-921-9946 ; Fax : 092-928-1203
E-mail address : todaka@fihes.pref.fukuoka.jp

tions of 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDD, 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexaCDF, 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDF, hexaCB-169, hexaCB-156, hexaCB-157, heptaCB-181, and heptaCB-189 in the blood of Yusho patients were higher than those of normal controls^{5)~10)}. These nine congeners can be considered the important congeners for evaluating the dioxin exposure of Yusho patients. In particular, 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF is still present at very high concentrations. The data regarding PCDDs, PCDFs, and PCBs in the blood of Yusho patients may provide useful information related to the health risk of these compounds in Yusho patients.

In this study, out of 242 and 200 Yusho patients who received medical health examinations in 2004 and 2010, respectively, the concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs in the blood of 136 patients were measured in both of those years. We compared the individual congener concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs in the blood of these 136 Yusho patients measured in 2004 with those measured in 2010 and studied the changes in the concentrations of these compounds in the blood of Yusho patients from 2004 to 2010.

Materials and Methods

1. Sampling

Medical health examinations of Yusho patients have been conducted annually to determine their health status since the Yusho incident. The medical health examination is open not only to those persons officially registered as Yusho patients but also to Yusho-suspected persons who regard themselves as potential victims. Both officially registered Yusho patients and Yusho-suspected persons are examined based on the "Diagnostic Criteria for Yusho"¹¹⁾. The blood samples examined in this study were collected from 242 and 200 participants who received medical health examinations in 2004 and 2010, respectively, and each of whom gave informed consent to participate in this study. Blood samples of 10 ml were collected using a vacuum blood-col-

lecting tube containing heparin and were stored at 4 °C until analyses for the concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs.

2. Materials

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

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

The extraction and purification of PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs, and non-dioxin-like PCBs from blood sample were performed using a previously reported method²⁾⁸⁾. Concentrations of the PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs and concentrations of 56 non-dioxin-like PCB congeners were also performed using a previously reported method²⁾⁸⁾.

4. Quality control

To evaluate the accuracy and reliability of the analysis of PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs, and non-dioxin-like PCBs, our laboratory has prepared human blood samples for quality control and conducted quality control studies of the analysis of these compounds since 2008. Our results were compared with those of various laboratories that performed measurements of

PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs, and non-dioxin-like PCBs in human blood in Japan, and tests confirmed that the results obtained by our laboratories in each quality control study were almost identical to those obtained by the different organizations performing the analysis. These results indicated that our laboratory's analytical methods regarding PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs, and non-dioxin-like PCBs in human blood provided correct results.

5. Data analysis

To estimate the total toxic equivalents (TEQ) concentrations, we introduced ND (less than the detection limit) values to half values of the detection limit and calculated based on the toxic equivalency factor (TEF) values proposed by the World Health Organization (WHO)¹²⁾.

Results and discussion

We measured the concentrations of PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs, and non-dioxin-like PCBs in blood collected from Yusho patients during medical health examinations performed from 2004 to 2010⁵⁾⁻¹⁰⁾. Out of 242 and 200 Yusho patients who received medical health examinations in 2004 and 2010, respectively, the concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs were measured in the blood of 136 patients in both years. The individual congener concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs in the blood of these 136 Yusho patients measured in 2004 were compared with those measured in 2010 (Tables 1-2).

The total TEQ concentrations of PCDDs, PCDFs, non-*ortho* PCBs, and mono-*ortho* PCBs in the blood of 136 Yusho patients in 2004 and 2010 were 5.2-533 (mean : 91, median : 60) and 8.2-640 (mean : 95, median : 68) pg TEQ g⁻¹ lipid, respectively. The TEQ concentrations of PCDDs, PCDFs, non-*ortho* PCBs, and mono-*ortho* PCBs in the blood of Yusho patients were 17, 59, 13, and 1.9 pg TEQ g⁻¹ lipid in 2004, respectively, and 18, 58, 17, and 2.2 pg TEQ g⁻¹ lipid in 2010, respectively.

Regarding the non-dioxin-like PCB concentrations, the sums of the concentrations of 56 PCB congeners in the blood in 2004 and 2010 were 83-1613 (mean : 538, median : 451) and 83-2539 (mean : 613, median : 514) ng g⁻¹ lipid, respectively. The arithmetic mean concentrations of triCBs, tetraCBs, pentaCBs, hexaCBs, heptaCBs, octaCBs, and nonaCBs in the blood of Yusho patients were 1.7, 15, 20, 236, 209, 52, and 4.3 ng g⁻¹ lipid in 2004, respectively, and 2.1, 15, 21, 270, 249, 50, and 5.1 ng g⁻¹ lipid in 2010, respectively. These findings indicated that the concentrations of PCDFs and octaCBs in the blood of Yusho patients tended to decrease slightly from 2004 to 2010.

We have previously reported that the concentrations of 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDD, 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexaCDF, 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDF, hexaCB-169, hexaCB-156, hexaCB-157, heptaCB-181, and heptaCB-189 in the blood of Yusho patients were higher than those of the normal controls⁵⁾⁻¹⁰⁾. These nine congeners can be considered the characteristic congeners in the blood of Yusho patients. Of these nine congeners, the concentrations of 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDD, 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexaCDF, and 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDF were 50, 174, 47, and 18 pg TEQ g⁻¹ lipid in 2004, respectively, and 48, 172, 37, and 16 pg TEQ g⁻¹ lipid in 2010, respectively, indicating that 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexaCDF decreased significantly from 2004 to 2010. In addition, the concentrations of 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDD, 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF, and 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDF tended to decrease slightly from 2004 to 2010.

The concentrations of 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF in the blood of 136 patients were under 100 pg TEQ g⁻¹ lipid in 73 patients and over 100 pg TEQ g⁻¹ lipid in 63 patients. In the over 100 pg TEQ g⁻¹ lipid group, the arithmetic mean TEQ concentrations of PCDDs, PCDFs, non-*ortho* PCBs, and mono-*ortho* PCBs in the blood of 63 patients were 23, 113, 14, and 2.5 pg TEQ g⁻¹ lipid in 2004, respectively, and 24, 109, 19, and 3.1 pg TEQ g⁻¹ lipid in 2010, respectively, with the total TEQ

Table 1 Concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood of 136 Yusho patients

Congeners	Concentration (pg g ⁻¹ lipid)										Ratio 2010/2004
	2004					2010					
	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	
2,3,7,8-TetraCDD	1.3	1.3	0.7	4.4	0.5	1.8	1.7	0.9	4.6	0.5	1.3
1,2,3,7,8-PentaCDD	9.4	8.3	4.9	33	1.0	10.5	9.6	5.8	45	1.5	1.1
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	2.6	2.4	1.7	8.5	1.0	2.9	2.5	2.0	14	1.0	1.1
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	50	39	41	247	4.8	48	36	39	267	3.5	1.0
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	4.4	3.6	3.4	23	1.0	4.1	3.3	3.8	26	1.0	0.9
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	50	45	25	196	16	39	30	30	269	1.0	0.8
OctaCDD	727	638	372	2305	181	642	550	383	2881	158	0.9
Total PCDDs	844	760	408	2459	205	748	667	427	3321	179	0.9
2,3,7,8-TetraCDF	1.7	1.4	1.4	9.5	0.5	2.2	1.7	1.9	11	0.5	1.3
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.9	0.5	0.8	5.4	0.5	1.2	0.5	1.0	6.4	0.5	1.3
2,3,4,7,8-PentaCDF	174	86	219	1240	4.1	172	83	222	1494	4.0	1.0
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	47	15	76	514	1.0	37	13	66	488	1.0	0.8
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	18	9.6	23	176	1.0	16	8.3	24	199	1.0	0.9
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	ND					ND					
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	ND					ND					
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	2.7	2.1	3.5	32	1.0	2.7	1.0	4.4	39	1.0	1.0
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	ND					ND					
OctaCDF	ND					ND					
Total PCDFs	250	125	315	1946	13	237	126	312	2249	14	0.9
TriCB-77	ND					ND					
TriCB-81	ND					ND					
PentaCB-126	87	69	65	441	5.0	107	90	72	491	5.0	1.2
HexaCB-169	134	114	92	604	11	207	172	137	713	25	1.5
Total Non-ortho PCBs	237	218	130	711	26	326	309	174	868	53	1.4
PentaCB-105	3258	2512	2494	563	15888	3452	2804	2377	432	16172	1.1
PentaCB-114	1867	1481	1543	208	8872	2236	1766	2017	187	15773	1.2
PentaCB-118	15467	11924	11378	2355	62223	18181	14882	12003	2170	78269	1.2
PentaCB-123	271	219	217	5.0	1385	240	194	198	5.0	1228	0.9
HexaCB-156	26245	19985	25066	5.0	154846	33219	24528	33080	2956	229740	1.3
HexaCB-157	7622	5572	7044	351	41426	8257	5982	8940	627	58707	1.1
HexaCB-167	3407	2627	2501	483	14958	4443	3374	3182	391	20412	1.3
HeptaCB-189	3880	2859	3355	5.0	18640	4811	3768	4440	332	31411	1.2
Total Mono-ortho PCBs	62018	51818	40270	231294	5971	74838	66303	51732	336132	7807	1.2
TEQ from PCDDs	17	15	9.4	63	2.4	18	16	10	79	3.2	1.1
TEQ from PCDFs	59	29	75	442	1.7	58	28	75	519	1.8	1.0
TEQ from PCDDs/PCDFs	76	43	83	505	4.1	76	46	84	599	5.3	1.0
TEQ from non-ortho PCBs	13	11	7.7	50	0.8	17	16	9.3	60	2.0	1.3
TEQ from mono-ortho PCBs	1.9	1.6	1.2	6.9	0.2	2.2	2.0	1.6	10	0.2	1.2
TEQ from dioxin-like PCBs	15	13	8.6	54	1.0	19	17	10	65	2.4	1.3
Total TEQ	91	60	87	533	5.2	95	68	89	640	8.2	1.0

ND : less than the determination limit.

SD : standard deviation.

CDD : chlorinated dibenzo-*p*-dioxin.

CDF : chlorinated dibenzofuran.

CB : chlorinated biphenyl.

Table 2 Concentrations of non-dioxin-like PCBs in blood of 136 Yusho patients

Congeners	Concentration (pg g ⁻¹ lipid)										Ratio 2010/2004
	2004					2010					
	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	
TriCB-28	1637	1400	938	5649	5.0	2071	1420	3194	24812	5.0	1.3
TriCB-29	36	31	20	136	5.0	37	5.0	207	2274	5.0	1.0
TetraCB-44	404	379	204	2057	32	304	262	193	1513	5.0	0.8
TetraCB-47/48	581	519	259	1887	47	421	359	333	3302	69	0.7
TetraCB-49	277	255	138	943	63	212	193	129	929	5.0	0.8
TetraCB-52/69	1179	1022	764	5555	346	902	708	687	5396	213	0.8
TetraCBs-56/60	625	479	445	2842	120	260	204	184	1086	5.0	0.4
TetraCB-63	112	93	69	313	5.0	116	113	75	460	5.0	1.0
TetraCB-66	1591	1245	1299	8427	303	1800	1369	1318	7727	221	1.1
TetraCB-70	230	210	112	964	78	226	211	132	598	5.0	1.0
TetraCB-71	185	178	111	1035	27	34	21	37	252	5.0	0.2
TetraCB-74	9589	7656	7296	41967	1491	11070	8954	7650	37856	1043	1.2
PentaCB-85	214	172	178	1535	5.0	182	147	216	2253	5.0	0.8
PentaCB-87	740	623	419	2196	118	786	703	411	1949	5.0	1.1
PentaCB-92	681	538	520	3262	88	640	541	456	2679	55	0.9
PentaCB-93/95/98	755	695	346	2104	86	566	509	275	1491	137	0.7
PentaCB-99	13726	11016	9962	65276	1738	14780	12806	9414	42666	1877	1.1
PentaCB-101	1695	1359	1194	7854	137	1605	1397	1046	6360	249	0.9
PentaCB-107/108	681	552	508	2958	62	872	770	560	2988	5.0	1.3
PentaCB-110	395	334	260	2116	103	344	308	249	2391	13	0.9
PentaCB-117	1251	835	1346	7781	5.0	1505	1052	1607	10720	121	1.2
HexaCB-128	740	551	577	3514	116	839	721	634	4793	5.0	1.1
HexaCB-130	3852	3085	3162	20530	233	4570	3660	3701	22015	5.0	1.2
HexaCB-132	273	239	174	1183	19	223	179	187	1093	5.0	0.8
HexaCB-134	29	10	31	125	5.0	9	5	17	128	5.0	0.3
HexaCB-135	458	381	303	1774	67	394	354	264	1595	5.0	0.9
HexaCB-137	5086	3965	4092	29712	340	5993	5010	4565	26719	661	1.2
HexaCB-138	53373	44069	35405	205304	7821	58674	51816	37737	199342	7723	1.1
HexaCB-139/149	815	632	689	5831	72	158	98	229	1981	5.0	0.2
HexaCB-141	263	193	179	992	5.0	264	229	221	1384	5.0	1.0
HexaCB-146	19123	16719	11740	58115	2330	23939	21039	14793	81359	2680	1.3
HexaCB-147	519	458	380	2409	5.0	573	464	445	2266	5.0	1.1
HexaCB-151	1163	849	958	6212	141	1106	895	892	6528	122	1.0
HexaCB-153	118186	100550	77336	370468	19014	138781	116999	91574	579924	19887	1.2
HexaCB-163/164	31822	28212	20914	99134	3176	34793	29612	21969	115312	3806	1.1
HeptaCB-170	34126	28711	23470	108309	4220	40057	33346	27943	149018	5279	1.2
HeptaCB-172	5302	4383	3630	17760	571	6682	5362	4826	26992	858	1.3
HeptaCB-177	7817	6463	5814	33944	1116	9882	7897	7398	47138	1239	1.3
HeptaCB-178	8362	6198	6140	29710	1134	10843	8273	8026	48382	1319	1.3
HeptaCB-179	202	157	149	734	15	165	133	144	1008	5.0	0.8
HeptaCB-180	103060	81290	75715	344881	12390	125285	96126	95919	585746	17585	1.2
HeptaCB-181	250	161	299	2295	5.0	263	183	307	2190	5.0	1.1
HeptaCB-182/187	39481	29990	30850	152875	4979	44976	32308	37924	261657	5717	1.1
HeptaCB-183	8546	6534	6767	34797	997	9015	7056	7508	54151	1251	1.1
HeptaCB-191	1691	1331	1303	7837	161	1864	1541	1413	6713	134	1.1
OctaCB-194	15751	12525	11498	56366	2086	19811	15190	16249	107018	2162	1.3
OctaCB-195	3488	2773	2483	11877	521	3902	3231	3034	22012	415	1.1
OctaCB-196/203	13567	10986	9659	51001	1969	10810	8164	8435	57870	1186	0.8
OctaCB-198/201	16434	12294	12799	67982	2803	10247	7383	8510	53490	1323	0.6
OctaCB-200	400	306	324	1888	52	442	320	453	4069	5.0	1.1
OctaCB-202	2262	1820	2047	11623	5.0	4000	2888	3227	21096	458	1.8
OctaCB-205	597	463	398	1745	70	636	552	442	2302	5.0	1.1
NonaCB-206	2823	2470	1543	6971	465	3380	2907	1974	12974	509	1.2
NonaCB-207	451	401	250	1271	95	498	444	303	2048	5.0	1.1
NonaCB-208	978	864	525	2592	192	1247	1084	705	3967	193	1.3
DecaCB-209	1323	1161	636	3637	330	1690	1484	903	6400	364	1.3
Total TrCBs	1673	1446	941	5714	10	2107	1461	3332	27086	10	1.3
Total TeCBs	14773	12624	8830	48761	4741	15346	13666	8890	44750	1999	1.0
Total PeCBs	20137	17039	12760	77397	2548	21280	19622	12035	58830	2821	1.1
Total HxCBs	235702	202136	146270	678796	36780	270316	224179	167770	988345	36910	1.1
Total HpCBs	208837	170203	148503	706642	26133	249029	203976	184742	1181297	34482	1.2
Total OcCBs	52498	41433	37999	202466	8025	49848	37084	39413	267856	5801	0.9
Total NoCBs	4252	3776	2257	10723	760	5126	4514	2905	18989	844	1.2
Total PCBs	537872	450709	342814	1612505	82803	613053	513823	400524	2538991	83461	1.1

CB : chlorinated biphenyl ; SD : standard deviation.

Table 3 Concentrations of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the blood of 63 Yusho patients

Congeners	Concentration (pg g ⁻¹ lipid)										Ratio 2010/2004
	2004					2010					
	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	
2,3,7,8-TetraCDD	1.4	1.4	0.8	4.4	0.5	1.8	1.8	0.7	4.5	0.5	1.3
1,2,3,7,8-PentaCDD	12	11	5.3	33	4.1	13	12	6.3	45	5.5	1.1
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	2.9	2.6	1.8	8.5	1.0	3.0	2.7	1.8	9.6	1.0	1.1
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	76	64	45	247	23	72	59	43	267	18	0.9
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	5.1	4.1	3.9	23.1	1.0	4.8	3.5	4.3	25.8	1.0	0.9
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	49	44	20	113	16	40	34	24	142	16	0.8
OctaCDD	712	627	323	1760	265	627	600	272	1509	231	0.9
Total PCDDs	858	760	358	1976	324	762	707	308	1665	292	0.9
2,3,7,8-TetraCDF	2.2	1.8	1.8	9.5	0.5	2.7	2.4	1.9	9.5	0.5	1.2
1,2,3,7,8-PentaCDF	1.1	0.5	0.9	5.4	0.5	1.4	1.3	1.1	6.4	0.5	1.3
2,3,4,7,8-PentaCDF	334	266	234	1240	106	327	246	247	1494	101	1.0
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	93	61	93	514	14	73	45	84	488	8.7	0.8
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	32	23	29	176	6.6	29	18	31	199	5.3	0.9
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	ND					ND					
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	ND					ND					
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	3.1	2.4	4.1	32	1.0	3.0	1.0	5.3	39	1.0	1.0
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	ND					ND					
OctaCDF	ND					ND					
Total PCDFs	470	370	350	1946	135	442	343	363	2249	129	0.9
TriCB-77	ND					ND					
TriCB-81	ND					ND					
PentaCB-126	82	67	54	354	27	104	92	58	371	33	1.3
HexaCB-169	191	169	95	604	49	288	264	137	713	79	1.5
Total Non-ortho PCBs	289	276	125	711	91	404	379	162	826	134	1.4
PentaCB-105	2970	2211	2159	12894	901	3177	2671	1964	11095	547	1.1
PentaCB-114	2760	2198	1738	8872	848	3265	2568	2428	15773	255	1.2
PentaCB-118	14399	11013	10143	59893	4613	17136	14295	9911	50706	3063	1.2
PentaCB-123	238	194	201	1268	5.0	199	158	143	763	5.0	0.8
HexaCB-156	41947	34051	28060	154846	7320	52477	41598	38809	229740	10584	1.3
HexaCB-157	11699	9609	7933	41426	1996	13562	10318	10584	58707	2866	1.2
HexaCB-167	3745	2790	2280	10040	1002	4830	4034	2795	12413	678	1.3
HeptaCB-189	5776	4989	3627	18640	960	7159	6255	5135	31411	1346	1.2
Total Mono-ortho PCBs	83534	76106	41977	231294	22680	101805	86418	56908	336132	31016	1.2
TEQ from PCDDs	23	20	10	63	7.5	24	21	11	79	8.4	1.1
TEQ from PCDFs	113	90	82	442	34	109	83	85	519	34	1.0
TEQ from PCDDs/PCDFs	136	111	90	505	44	133	104	95	599	43	1.0
TEQ from non-ortho PCBs	14	13	6.7	43	4.7	19	18	7.8	47	6.8	1.4
TEQ from mono-ortho PCBs	2.5	2.3	1.3	6.9	0.7	3.1	2.6	1.7	10	0.9	1.2
TEQ from dioxin-like PCBs	16	15	7.6	48	5.5	22	21	9.1	51	7.8	1.3
Total TEQ	152	124	94	533	50	155	125	99	640	51	1.0

ND : less than the determination limit.

SD : standard deviation.

CDD : chlorinated dibenzo-*p*-dioxin.

CDF : chlorinated dibenzofuran.

CB : chlorinated biphenyl.

Table 4 Concentrations of non-dioxin-like PCBs in blood of 63 Yusho patients

Congeners	Concentration (pg g ⁻¹ lipid)										Ratio 2010/2004
	2004					2010					
	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	Mean	Median	SD	Maximum	Minimum	
TriCB-28	1455	1293	753	5552	5	1799	1355	2843	23195	5.0	1.2
TriCB-29	33	29	20	103	5	14	5.0	22	155	5.0	0.4
TetraCB-44	376	375	143	727	32	291	250	202	1513	5.0	0.8
TetraCB-47/48	572	503	274	1887	203	387	325	219	981	114	0.7
TetraCB-49	263	245	130	943	63	195	187	123	822	39	0.7
TetraCB-52/69	1133	1032	685	5555	412	851	696	592	3588	213	0.8
TetraCBs-56/60	635	482	407	2215	212	230	196	140	848	16	0.4
TetraCB-63	102	92	56	270	14	105	101	63	343	5.0	1.0
TetraCB-66	1359	1095	1115	8427	370	1563	1234	1139	7727	393	1.2
TetraCB-70	214	206	90	507	78	227	196	132	554	5.0	1.1
TetraCB-71	174	181	74	414	27	33	19	41	252	5.0	0.2
TetraCB-74	10149	8560	7094	39804	3138	11812	10985	7442	36309	1678	1.2
PentaCB-85	205	142	216	1535	5.0	166	139	136	765	5.0	0.8
PentaCB-87	870	696	494	2196	118	868	731	411	1849	230	1.0
PentaCB-92	637	522	415	2290	155	614	537	372	1895	118	1.0
PentaCB-93/95/98	732	671	355	2104	262	546	503	264	1300	137	0.7
PentaCB-99	17312	13690	11281	65276	3109	17672	15165	9690	42666	2450	1.0
PentaCB-101	1699	1400	1163	7854	403	1608	1551	1005	5468	257	0.9
PentaCB-107/108	603	503	432	2733	90	776	665	458	2704	158	1.3
PentaCB-110	401	328	304	2116	103	327	304	190	904	13	0.8
PentaCB-117	1846	1302	1692	7781	371	2157	1475	2057	10720	200	1.2
HexaCB-128	704	517	549	3514	116	758	669	487	2567	5.0	1.1
HexaCB-130	5377	4446	3596	20530	1386	6366	5490	4224	22015	761	1.2
HexaCB-132	289	230	200	1183	19	257	250	202	1093	5.0	0.9
HexaCB-134	30	21	31	125	5.0	8.9	5.0	14	78	5.0	0.3
HexaCB-135	440	362	292	1482	87	393	342	257	1366	66	0.9
HexaCB-137	7459	6491	4561	29712	1925	8653	7601	5000	26719	2095	1.2
HexaCB-138	69560	58451	36880	205304	11277	73822	65117	36267	180473	12511	1.1
HexaCB-139/149	867	637	800	5831	227	185	108	292	1981	5.0	0.2
HexaCB-141	243	186	153	698	5.0	266	234	189	784	5.0	1.1
HexaCB-146	22641	19630	11394	54823	6602	28025	25173	13411	68473	6284	1.2
HexaCB-147	547	471	381	2409	5.0	595	489	388	1938	32	1.1
HexaCB-151	1139	855	931	6212	194	1108	945	943	6528	127	1.0
HexaCB-153	137161	116874	76399	370468	34902	157687	137334	80118	439299	36601	1.1
HexaCB-163/164	40776	35709	21668	99134	9457	43177	37969	21462	115312	10673	1.1
HeptaCB-170	44220	37360	23504	108309	8667	51223	44361	26696	139874	12957	1.2
HeptaCB-172	6505	5337	3597	16557	1354	8041	6773	4379	19830	2019	1.2
HeptaCB-177	8913	6864	5565	27107	1887	10953	8762	6266	31362	1596	1.2
HeptaCB-178	8939	6593	6123	26070	2132	11332	9616	6939	32620	2425	1.3
HeptaCB-179	190	152	140	734	15	152	116	127	607	5.0	0.8
HeptaCB-180	118964	91306	72617	327796	27414	143590	122711	83312	430540	36375	1.2
HeptaCB-181	410	268	368	2295	5.0	418	331	374	2190	5.0	1.0
HeptaCB-182/187	41652	29939	29847	135156	9745	45902	36081	30698	161535	9238	1.1
HeptaCB-183	9816	7437	6687	33400	1597	9947	8389	5996	33924	1692	1.0
HeptaCB-191	2359	2077	1389	7837	428	2570	2200	1402	6713	723	1.1
OctaCB-194	17614	13867	10535	48181	4062	21831	17305	13357	68732	5337	1.2
OctaCB-195	4338	3477	2472	11200	1013	4743	3946	2546	14070	1223	1.1
OctaCB-196/203	15764	12452	9282	42874	3770	12733	9778	7609	39257	2863	0.8
OctaCB-198/201	17786	13093	12139	56904	4394	10954	8551	7219	36874	2570	0.6
OctaCB-200	416	300	308	1622	65	442	328	324	1858	30	1.1
OctaCB-202	2187	1776	2183	9378	5.0	4049	3206	2802	13128	839	1.9
OctaCB-205	779	674	398	1745	201	824	710	417	1919	220	1.1
NonaCB-206	3421	3192	1536	6971	1016	4030	3657	1812	9594	1139	1.2
NonaCB-207	527	493	252	1271	112	573	549	253	1378	189	1.1
NonaCB-208	1090	1009	521	2592	267	1397	1238	665	3456	376	1.3
DecaCB-209	1415	1316	665	3637	376	1823	1624	995	6400	459	1.3
Total TrCBs	1489	1333	759	5602	10	1813	1360	2842	23200	10	1.2
Total TeCBs	14977	12554	8427	47266	6619	15694	13881	8441	41621	3270	1.0
Total PeCBs	24306	20708	13940	77397	6508	24735	21727	11900	58830	3880	1.0
Total HxCBs	287232	249993	144887	678796	92983	321301	279874	149860	789674	69328	1.1
Total HpCBs	241968	186405	143053	655834	57360	284128	237441	157370	825526	74268	1.2
Total OcCBs	58885	46213	36020	167010	14479	55576	45451	33068	175626	13548	0.9
Total NoCBs	5037	4674	2240	10723	1394	6000	5381	2642	13878	1848	1.2
Total PCBs	633894	540320	333305	1575459	192600	709247	608464	343987	1868770	201307	1.1

CB : chlorinated biphenyl ; SD : standard deviation.

concentrations of these dioxin-like compounds ranging from 50–533 (mean : 152, median : 124) and 51–640 (mean : 155, median : 125) pg TEQ g⁻¹ lipid in 2004 and 2010, respectively (Table 3). With regard to the non-dioxin-like PCB concentrations, the sums of the concentrations of 56 PCB congeners in the blood in 2004 and 2010 were 193–1575 (mean : 634, median : 540) and 201–1869 (mean : 709, median : 608) ng g⁻¹ lipid, respectively. The arithmetic mean concentrations of triCBs, tetraCBs, pentaCBs, hexaCBs, heptaCBs, octaCBs, and nonaCBs in the blood of Yusho patients were 1.5, 15, 24, 287, 242, 59, and 5.0 ng g⁻¹ lipid in 2004, respectively, and 1.8, 16, 25, 321, 284, 56, and 6.0 ng g⁻¹ lipid in 2010, respectively (Table 4). The concentrations of PCDFs and octaPCBs in the blood of Yusho patient tended to slightly decrease from 2004 to 2010. With respect to the characteristic congeners in the blood of Yusho patients, the concentration of 1,2,3,4,7,8-hexaCDF was found to significantly decrease from year to year. Among non-dioxin-like PCB congeners that present at high concentration over 1000 pg g⁻¹ lipid in the blood of Yusho patients, the concentrations of tetraCB 52/69, pentaCB 101, octaCB 198/201, and octaCB 196/203 were shown to significantly decrease from 2004 to 2010. These results were almost the same as those obtained in 136 Yusho patients.

According to the results of the present study, no significant decrease could be confirmed in most congeners of PCDDs, PCDFs, and PCBs in the blood of Yusho patients from 2004 to 2010. Hence, it is thought that the concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs in the blood of Yusho patients measured in 2010 probably reflect the effects of dioxin exposure via the intake of food. However, the concentrations of 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptaCDD, octaCDD, 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexaCDF, tetraCB 52/69, pentaCB 101, octaCB 198/201, and octaCB 196/203 in the blood of Yusho patients decreased significantly from 2004 to 2010. In addition, the concentrations of 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDD, 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF, and 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDF tended to

decrease slightly from 2004 to 2010. These findings suggest that the PCDDs, PCDFs, and PCBs have remained in the blood of Yusho patients for a very long time, with over 40 years having passed since the outbreak of Yusho, and are very difficult to excrete from the body.

In the future, the collection of these data from many more patients would be indispensable. Further research regarding the concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs in the blood of Yusho patients to more accurately assess the effects of these compounds in Yusho patients is needed.

Acknowledgment

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

References

- 1) Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura Y and Masuda Y : Yusho : a human disaster caused by PCBs and related compounds. Fukuoka : Kyushu University Press, 1996.
- 2) Todaka T, Hirakawa H, Tobiishi K and Iida T : New protocol for dioxin analysis of human blood. Fukuoka Igaku Zasshi 94 : 148–157, 2003.
- 3) Iida T and Todaka T : Measurement of dioxins in human blood : improvement of analytical method. Ind Health. 41 : 197–204, 2003.
- 4) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K and Iida T : Improvement in dioxin analysis of human blood and their concentrations in blood of Yusho patients. J. Dermatol. Sci. 1 : 21–28, 2005.
- 5) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K and Iida T : Follow-up survey of dioxins concentrations in the blood of Yusho patients in 2002–2003. Fukuoka Igaku Zasshi 96 : 249–258, 2005.
- 6) Todaka T, Hirakawa H, Kajiwara J, Hori T, Tobiishi K, Onozuka D, Iida T, Yoshimira T and Furue M : Dioxin concentration in the blood of patients collected during medical check-up for Yusho in 2004–2005. Fukuoka Igaku Zasshi 98 : 222–231, 2007.
- 7) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Iida T and Furue M : Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-ortho and mono-ortho

- polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. *Chemosphere* 66 : 1983-1989, 2007.
- 8) Todaka T, Hori T, Hirakawa H, Kajiwara J, Yasutake D, Onozuka D, Iida T and Furue M : Congener-specific analysis of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 127 elderly residents in Nakagawa Town, Fukuoka Prefecture, Japan. *Chemosphere* 73 : 865-872, 2008.
 - 9) Todaka T, Hori T, Hirakawa H, Kajiwara J, Yasutake D, Onozuka D, Iida T and Furue M : Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients over 35 years after the incident. *Chemosphere* 74 : 902-909, 2009.
 - 10) Todaka T, Hori T, Yasutake D, Yoshitomi H, Hirakawa H, Onozuka D, Kajiwara J, Iida T, Yoshimura T and Furue M : Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood collected from Yusho patients during medical check-ups performed from 2004-2007. *Fukuoka Igaku Zasshi* 100 : 156-165, 2009.
 - 11) Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T and Kuwabara M : Overview of Yusho. *J. Dermatol. Sci.* 1 : 3-10, 2005.
 - 12) Van den Berg M, Birnbaum L, Denison M, DeVito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N and Peterson R. E : The 2005 World Health Organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Tox. Sci.* 93 : 223-241, 2006.

(Received for publication March 19, 2013)

(和文抄録)

2004年から2010年の期間における油症患者血液中 ダイオキシン類濃度の推移

¹⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

²⁾福岡県保健環境研究所

³⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

戸高 尊¹⁾, 内 博史³⁾, 平川博仙²⁾, 高尾佳子²⁾, 梶原淳睦²⁾, 古江増隆¹⁾³⁾

油症患者のダイオキシン類による人体汚染とその健康影響を把握する目的で、平成16年から22年度の期間に油症患者から採取した血液中PCDDs, PCDFsおよびPCBs濃度の測定を行った。平成16および22年度に油症検診を受診した患者は、それぞれ242および200名で、その中で136名の患者が両年度に受診を行った。平成16年度に測定した136名の油症患者血液中PCDDs, PCDFsおよびPCBsの各異性体濃度を平成22年度の測定結果と比較した。その結果、油症患者血液中PCDDs, PCDFsおよびPCBsのほとんどの異性体が、平成16年から22年の期間に濃度減少を示さなかった。しかしながら、油症患者血液中1,2,3,4,6,7,8-heptaCDD, octaCDD, 1,2,3,4,7,8-hexaCDF, tetraCB52/69, pentaCB101, octaCB198/201およびoctaCB196/203の濃度は、平成16年度の結果と比べて減少していた。加えて、1,2,3,6,7,8-hexaCDD, 2,3,4,7,8-pentaCDFおよび1,2,3,6,7,8-hexaCDFの濃度も減少傾向を示した。

Improvement of Measurement Method for Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Blood Samples using LC/MS/MS

Kazuhiro TOBIISHI¹⁾²⁾, Shigeru SUZUKI²⁾, Takashi TODAKA³⁾, Hironori HIRAKAWA¹⁾, Tsuguhide HORI¹⁾, Jumboku KAJIWARA¹⁾, Teruaki HIRATA¹⁾, Takao IIDA⁴⁾, Hiroshi UCHI³⁾⁵⁾ and Masutaka FURUE³⁾⁵⁾

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

²⁾*Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu University
1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501*

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

⁴⁾*Kitakyusyu Life Science Center*

1-4 Nakabaru-Shin-cho, Tobata-ku, Kitakyusyu 804-0003

⁵⁾*Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital
Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582*

Abstract Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) are well known as metabolites of PCBs in the human body. We improved a measurement method for OH-PCBs in blood samples using LC/MS/MS. A new 2 μ m particle column was used, and the analytical conditions for the LC/MS/MS measurements were optimized. The improved method is more sensitive than the conventional method for 5g blood samples. And, this method is effective at determining the concentrations of OH-PCBs, PCBs and dioxins from the same sample without special treatment of the sample such as derivatization.

Key words : Blood · OH-PCB · LC/MS/MS

Introduction

Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs; Fig. 1) are well known as metabolites of PCBs in the human body. Sakiyama et al.¹⁾ reported that OH-PCBs were derivatized with dimethyl sulfate, and the methoxylated PCBs were determined using HRGC/HRMS. Matsu-moto et al.²⁾ reported that methylation by trimethylsilyldiazomethane was an effective derivatization method. And, Yasutake et al.³⁾ reported a measurement method without derivatization using HRGC/HRMS. On the other hand, R.J. Letcher et al.⁴⁾ determined the concentra-

tions of OH-PCBs in the plasma of Canadian polar bears using a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) technique.

We previously developed an analytical method for measuring the concentrations of PCDDs,

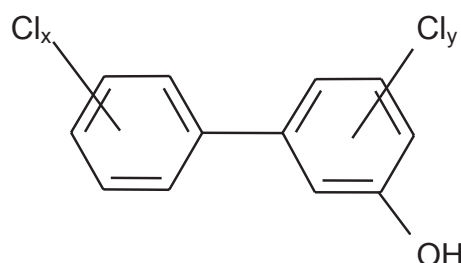


Fig. 1 Structure of hydroxylated polychlorinated biphenyls

correspondence author : Kazuhiro TOBIISHI
Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135 Japan
E-mail : tobiishi@fihes.pref.fukuoka.jp

PCDFs and Co-PCBs in human blood samples.⁵⁾ And, we reported a measurement method for determination of OH-PCBs in human blood samples using LC/MS/MS with an electrospray ionization interface in a negative ion and selective reaction monitoring mode.⁶⁾

In this study, we improved a measurement method for OH-PCBs in 5g blood samples using LC/MS/MS. This method is sensitive and effective at determining the concentrations of OH-PCBs, PCBs and dioxins from the same sample, and does not need a special treatment such as derivatization.

Materials and Methods

1. Chemicals and reagents

OH-PCBs standards were purchased from Wellington Laboratories, Inc., Ontario, Canada and Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Massachusetts, US. These OH-PCBs standards are listed in Table 1. Each 1 mg/L standard solution was prepared by dilution with acetonitrile. Labeled standards of OH-[¹³C₁₂]-PCBs, as internal standards, are listed in Table 2. 4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB (4'-OH-CB159) was used as a syringe spike. The standard solution for calibration curve contains all OH-PCB congeners as

Table 1 OH-PCBs standards

Compounds	Abbreviations	
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	4-OH-CB109	4H109
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	3'-OH-CB138	3H138
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	4-OH-CB146	4H146
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	4'-OH-CB172	4H172
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	4-OH-CB187	4H187

Table 2 OH-[¹³C₁₂]-PCBs for internal standards

Compounds	Abbreviations	
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	4-OH-CB109	M4H109
4-OH-2',3,4',5-PeCB	4'-OH-CB120	M4H120
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	3'-OH-CB138	M3H138
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	4-OH-CB146	M4H146
4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB	4'-OH-CB159	M4H159
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	4'-OH-CB172	M4H172
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	4-OH-CB187	M4H187

shown in Table 1 and 2.

Acetonitrile, methanol, Ammonium acetate and ultra pure water of LC/MS grade were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan. A silver nitrate/silica gel, other reagents and solvents used in this study were of the analytic grade of dioxin that is commercially available. A cartridge of Envi-18 (500mg/6mL glass tube) was purchased from Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, US.

2. Sample preparation

Each 5g blood sample was loaded into an extraction cell filled with Isolute. After 15 hours of freeze-drying with a freeze dryer (VirTis Co. Inc., New York, US), OH-[¹³C₁₂]-PCBs, [¹³C₁₂]-PCDDs, [¹³C₁₂]-PCDFs and [¹³C₁₂]-PCBs were added as internal standards. Acetone : n-hexane (1 : 4, v/v) was used as the extraction solvent for an accelerated solvent extractor (ASE-200, Thermo Scientific Dionex, California, US). After the extract was evaporated to near dryness, it was dissolved in n-hexane and treated with concentrated sulfuric acid overnight. The separated hexane layer was applied to a silver nitrate/silica gel column (0.5g). The first fraction containing PCDDs, PCDFs and Co-PCBs was eluted with 15mL of n-hexane. OH-PCBs were eluted with 15mL of 50% dichloromethane/n-hexane as the second fraction. The eluate was concentrated to near dryness with a multiple sample concentrator, and dissolved in 2mL of methanol. After the methanol solution was loaded onto an Envi-18 cartridge with 4mL of methanol, the eluate was concentrated under nitrogen flow and transferred to an LC injection vial with 0.2mL of methanol. A flow chart of this method is shown in Fig. 2.

3. LC/MS/MS measurement

All LC/MS/MS analysis was performed using an Alliance 2695 series high-performance Liquid Chromatograph Separations Module equipped with Quattro micro API mass spectrometer (Waters Corporation, Massachusetts, US). An

analytical column, L-column 2 ODS, 2.1 mm × 100 mm, 2 μm (CERI, Tokyo, Japan) was used under a linear gradient solvent condition with the flow rate set at 0.2 mL/min. For conventional method, an L-column 2 ODS, 2.1 mm × 150 mm, 5 μm was

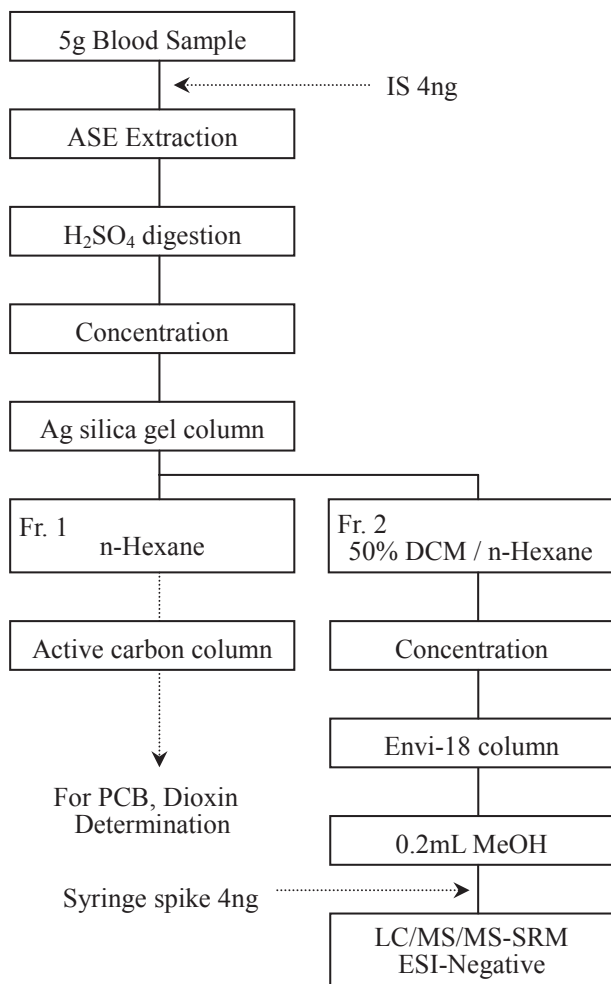


Fig. 2 Flow chart of the measurement method for OH-PCBs in blood samples

used. The initial mobile phase was 40 : 60 methanol/2mM ammonium acetate in ultra pure water. The injection volume was 20 μL.

Detection was performed on a quadrupole analyzer operated in negative electrospray ionization (ESI-) and in selected reaction monitoring acquisition mode (SRM). Nitrogen was used as the cone and desolvation gas. The potential applied onto the capillary was 1.0 kV. Cone and collision potentials were optimized for each molecule. Argon was used as the collision gas. Other analytical conditions for the LC/MS/MS measurements are summarized in Table 3.

Results and Discussion

1. LC/MS/MS measurement

1-1. Optimization of collision energy and product ions

Figure 3 shows the product ion mass spectra of OH-HpCBs under different collision energy ; (A) stands for the collision energy of 20 eV, and (B) for that of 40 eV. A single peak of $[M-H]^-$ ions (m/z 408.7) was observed from the spectrum (A) in the negative ion scanning mode. It means that no product ion was produced. On the other hand, $[M-HCl]^-$ ions (m/z 372.7) and $[Cl]^-$ ions (m/z 34.8) were observed from the spectrum (B). Figure 4 shows the chromatograms of each product ion. Peak intensity of $[M-H]^-$ ions was the highest of the three. Though peak intensity of $[Cl]^-$ ions was the lowest of the three, the signal-noise ratio

Table 3 Analytical conditions for the LC/MS/MS measurement

Flow Rate	0.2 mL/min.
Injection Volume	20 μL
Column Temperature	50°C
Mobile Phase	2mM Ammonium acetate : Methanol = 60 : 40 → 5 : 95 linear gradient
Temperature ; Source	120°C
Desolvation	350°C
Gas Flow ; Cone	Nitrogen, 50 L/hr
Desolvation	Nitrogen, 600 L/hr
Voltage ; Cone	30-50 V
Capillary	1.0kV
Collision	Argon, 15eV
Ionization	ESI-Negative

was the best. The chlorine ion was selected as the product ion; therefore, m/z 408.79 \rightarrow 34.97 was monitored for OH-HpCBs. Other mass methods for the LC/MS/MS measurement are summarized in Table 4.

1-2. Comparison of LC columns

Chromatograms of OH-HpCBs in the standard solution were compared between the 2 μ m particle column and the conventional column. The chromatograms of the conventional column (2.1mm \times 150mm, 5 μ m) and the 2 μ m particle column (2.1mm \times 100mm, 2 μ m) are presented in Fig. 5 and 6, respectively. As a result, the

signal-noise ratio of the chromatogram obtained using the 2 μ m particle column was better than that of the conventional column. It is considered that the analysis time can be set shorter using a 2 μ m particle column than a 5 μ m particle column.

1-3. Optimization of injection volume

Figure 7 shows the chromatograms of OH-HpCBs at various injection volumes (5–80 μ L). The peak shape was normal up to 20 μ L, but collapsed from 40 μ L. Therefore, the injection volume was fixed to 20 μ L.

1-4. Calibration curve

Figure 8 shows the calibration curve of

Table 4 Analytical conditions for the LC/MS/MS measurement

Compounds	Precursor ion \rightarrow product ion	
	m/z	
OH- PeCBs	$^{12}\text{C}_{12}^-$	340.87 \rightarrow 34.97
	$^{13}\text{C}_{12}^-$	352.91 \rightarrow 34.97
OH- HxCBs	$^{12}\text{C}_{12}^-$	374.83 \rightarrow 34.97
	$^{13}\text{C}_{12}^-$	386.87 \rightarrow 34.97
OH- HpCBs	$^{12}\text{C}_{12}^-$	408.79 \rightarrow 34.97
	$^{13}\text{C}_{12}^-$	420.83 \rightarrow 34.97

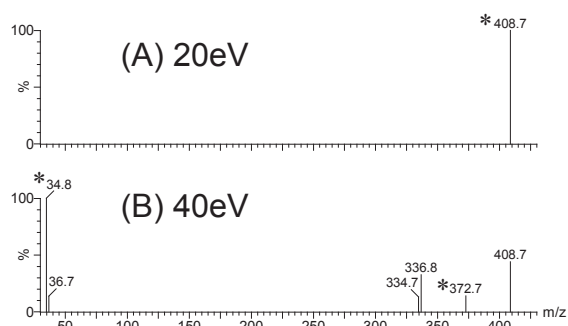


Fig. 3 Product ion mass spectra of OH-HpCBs under different collision energy

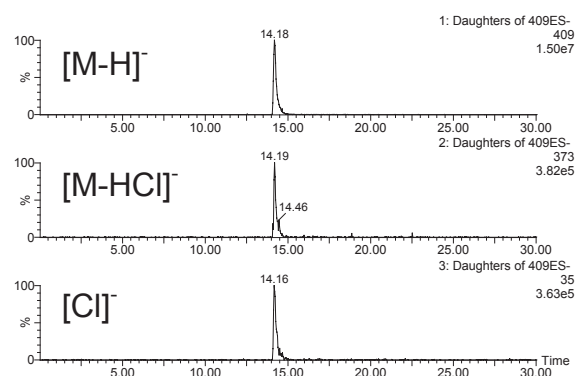


Fig. 4 Chromatograms of each product ion

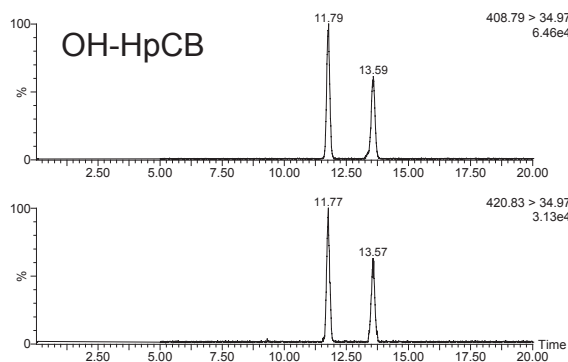


Fig. 5 LC/MS/MS chromatograms of OH-HpCBs with a column of L-column2 ODS (2.1mm \times 150mm, 5 μ m)

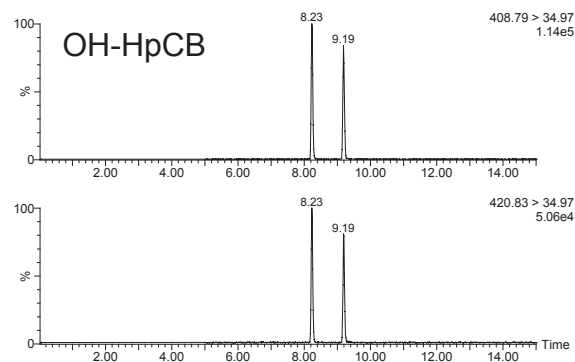


Fig. 6 LC/MS/MS chromatograms of OH-HpCB with a column of L-column2 ODS (2.1mm \times 100mm, 2 μ m)

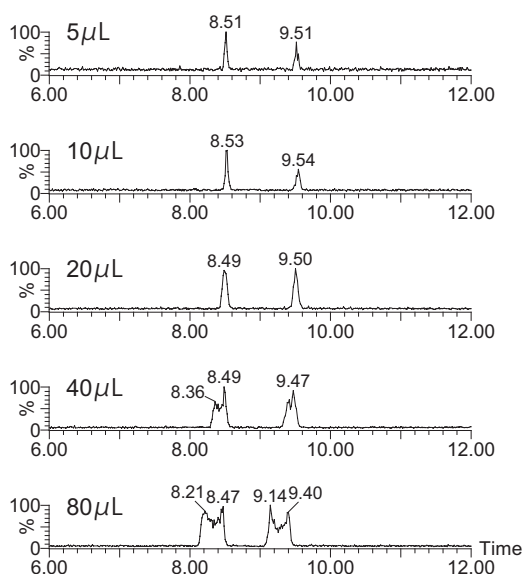


Fig. 7 Chromatograms of OH-HpCBs at various injection volumes

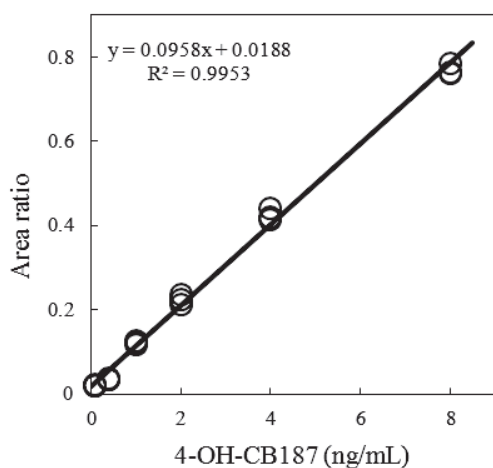


Fig. 8 Calibration curve of 4-OH-CB187 (0.1 ~8.0 ng/mL ; IS 4.0 ng/mL)

4-OH-CB187, which ranged from 0.1 to 8.0 ng/mL. The curve showed good linearity. The correlation coefficients were calculated from the concentration and the peak area ratio of 4-OH-CB187 to 4-OH-[$^{13}\text{C}_{12}$]-CB187.

2. Measurement of OH-PCBs in blood samples

Chromatograms of OH-HpCBs in blood sample were compared between the improved method and the conventional method. The chromatograms of the conventional method and the improved method are presented in Fig. 9 and 10, respectively. The signal intensity was high but background level was also high in Fig. 9. On the other hand, the signal intensity in Fig. 10 was relatively lower but the resolution of the chromatogram was much higher than conventional method.

Figure 11 illustrates the LC/MS/MS chromatograms of hydroxylated penta- through hepta-chlorinated biphenyls in the blood of Yusho patient. Peaks of 4-OH-CB109, 4-OH-CB146 + 3-OH-CB153, 4-OH-CB187 and 4'-OH-CB172 were detected, but 4-OH-CB146 and 3-OH-CB153 could not be separated in these analytical conditions, while 3'-OH-CB138 could not be observed because of low recovery. We suspected that 3'-OH-CB138 degrades under sulfuric acid treatment.

In conclusion, we improved measurement method for OH-PCBs in blood samples using

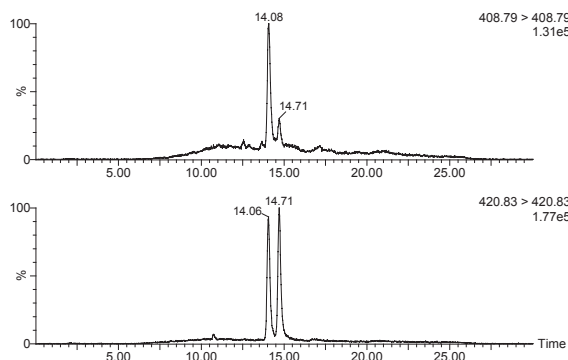


Fig. 9 Chromatograms of OH-HpCBs in blood under the conventional method

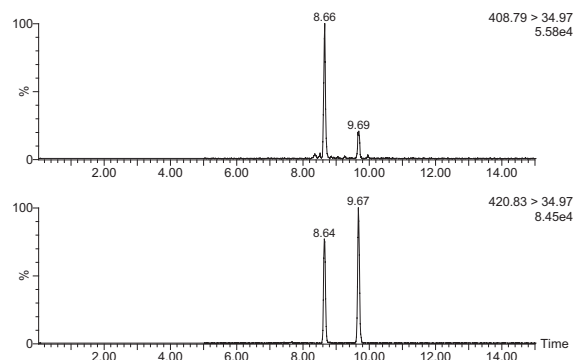


Fig. 10 Chromatograms of OH-HpCBs in blood under the improved method

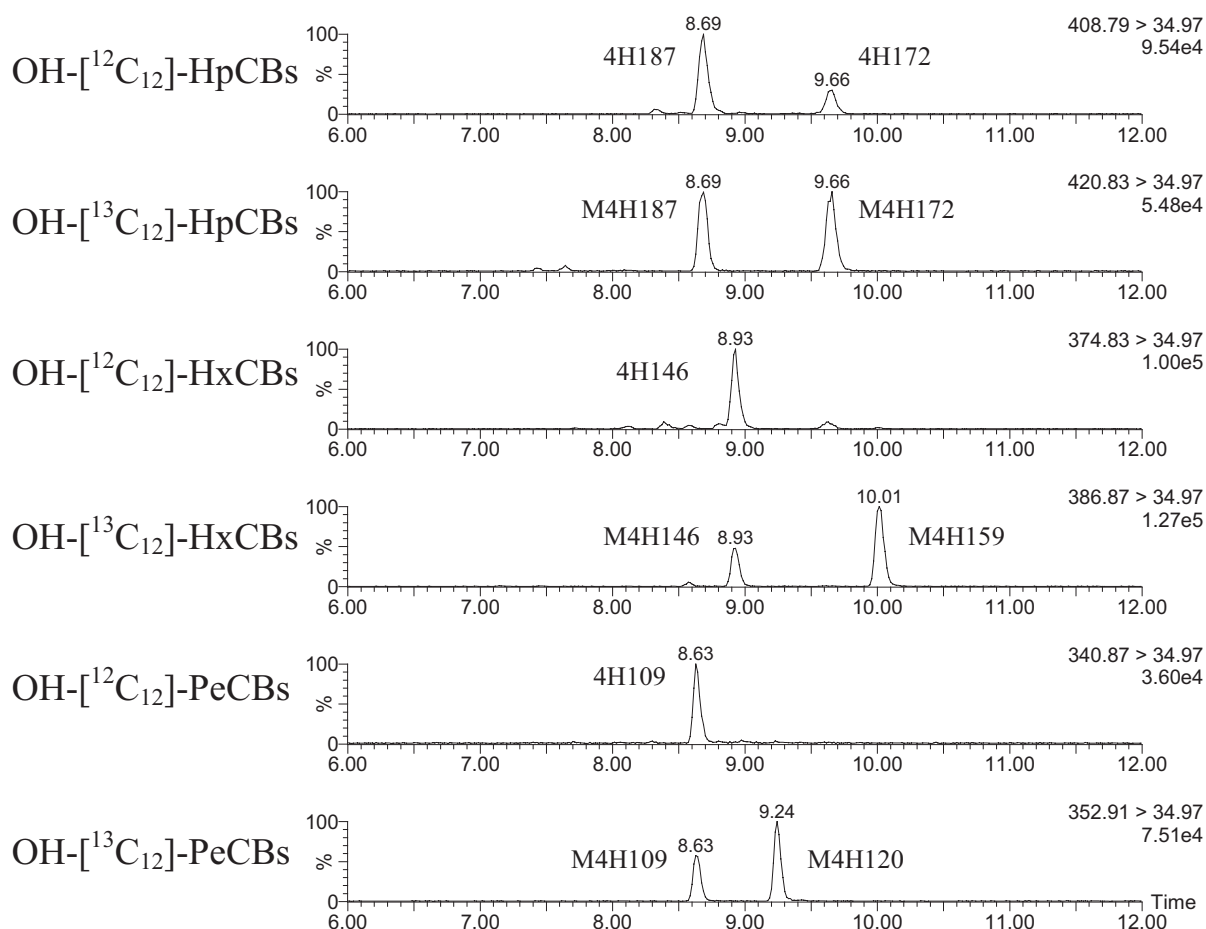


Fig. 11 LC/MS/MS chromatograms of OH-PCBs in the blood of Yusho patient

LC/MS/MS. Improved method was sensitive and effective at determining the concentrations of OH-PCBs, PCBs and dioxins from a single blood sample without special treatment.

Acknowledgements

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

References

- 1) Sakiyama T, Yamamoto A, Kakutani N, Fukuyama J and Okumura T : Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the aquatic environment : Levels and congener profiles in sediments from Osaka, Japan. *Organohalogen Comp.* 69 : 1380-1383, 2007.
- 2) Matsumoto K, Iseki N, Kameda H, Okumura T, Kashima Y and Shiozaki T : The highly effective methylation method for hydroxylated polychlorinated biphenyls. *Organohalogen Comp.* 68 : 2442-2445, 2006.
- 3) Yasutake D, Hori T, Kurokawa Y, Kajiwara J, Tsutsumi T and Amakura Y : The Measurement of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls without Derivatization using High-resolution Gas Chromatograph/High-resolution Mass Spectrometer. *Organohalogen Comp.* 73 : 625-628, 2011.
- 4) R J Letcher, H X Li and S G Chu : Determination of hydroxylated polychlorinated biphenyls (HO-PCBs) in blood plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Anal. Toxicology* 29 : 2005.
- 5) Todaka T, Hirakawa H, Tobiishi K and Iida T : New protocol of dioxin analysis in human blood. *Fukuoka Igaku Zasshi* 94 : 148-157, 2003.
- 6) Tobiishi K, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Kajiwara J, Hirata T, Iida T, Uchi H and Furue M : Measurement Method for Hydroxylated

Polychlorinated Biphenyls in the Blood of Yusho Patients by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Fukuoka

Igaku Zasshi 102 : 153-158, 2011.

(Received for publication March 26, 2013)

(和文抄録)

LC/MS/MS を用いた血液試料中の 水酸化ポリ塩化ビフェニル(OH-PCBs)測定法の改良

¹⁾福岡県保健環境研究所

²⁾中部大学大学院 応用生物学研究科

³⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

⁴⁾北九州生活科学センター

⁵⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

飛石 和大¹⁾²⁾, 鈴木 茂²⁾, 戸高 尊³⁾, 平川 博仙¹⁾, 堀 就英¹⁾, 梶原 淳睦¹⁾,
平田 輝昭¹⁾, 飯田 隆雄⁴⁾, 内 博史³⁾⁵⁾, 古江 増隆³⁾⁵⁾

水酸化ポリ塩化ビフェニル(OH-PCBs)は、人体内における PCB の主要代謝物である。LC/MS/MS を用いた血液試料中の OH-PCBs 測定法の改良を行った。新しい粒径 2 μ m の LC カラムを採用し、LC/MS/MS 測定条件の最適化を行った。改良法では、5g の血液試料で従来法より感度が向上した。また、誘導体化のような試料の特別な処理も不要で、OH-PCB 類、PCB 類およびダイオキシン類の同一試料による同時定量も可能である。

Concentration of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in the Blood of Yusho Patients in 2010

Kazuhiro TOBIISHI¹⁾²⁾, Shigeru SUZUKI²⁾, Takashi TODAKA³⁾, Hironori HIRAKAWA¹⁾, Tsuguhide HORI¹⁾, Jumboku KAJIWARA¹⁾, Teruaki HIRATA¹⁾, Takao IIDA⁴⁾, Hiroshi UCHI³⁾⁵⁾ and Masutaka FURUE³⁾⁵⁾

¹⁾*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences*

39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135

²⁾*Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu University*

1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501

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

Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582

⁴⁾*Kitakyusyu Life Science Center*

1-4 Nakabaru-Shin-cho, Tobata-ku, Kitakyusyu 804-0003

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

Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582

Abstract Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) are formed as major metabolites of PCBs by cytochrome P450 enzyme-mediated oxidation. It has been reported that their total concentration in serum samples of Yusho patients ranged from 390 to 1300 pg/g.

We measured the concentration of OH-PCBs in blood collected from 183 Yusho patients living in Japan in 2010. The major OH-PCB metabolites were 4-OH-CB187 (ND-1300 pg/g-wet), 4-OH-CB146 + 3-OH-CB153 (8.4-1200 pg/g-wet), 4-OH-CB109 (ND-530 pg/g-wet) and 4'-OH-CB172 (ND-380 pg/g-wet). The total OH-PCBs ranged from 36 to 3800 pg/g-wet.

A positive relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCBs was observed, but no significant relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCDD/DFs was observed.

Key words : Yusho · Blood · OH-PCB

Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are one of the persistent and bioaccumulative chemicals. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) are well known as metabolites of PCBs formed by the cytochrome P450 enzyme-mediated oxidation of PCBs. Enomoto et al.¹⁾ investigated the concentrations of OH-PCBs in the Japanese human blood plasma reporting that the major congeners and levels were 4-OH-CB109 10-230 pg/g-wet, 4-OH-CB146 13-340 pg/g-wet and 4-OH-CB187 12-110 pg/g-wet. Linderholm et

al.²⁾ reported that the highest OH-PCB metabolite in serum samples from 9 Yusho patients was 4-OH-CB187 followed by 4-OH-CB146, 4-OH-CB109 and 4'-OH-CB120; further, that the total of 6 OH-PCB metabolites ranged between 390 and 1300 pg/g serum with a mean value of 780 pg/g serum.

Sato et al.³⁾ measured the concentrations of OH-PCBs in human urine and blood sample taken from same person. They indicated that the pattern and order of detected OH-PCBs were different between blood and urine samples.

In this study, we measured the concentrations

correspondence author : Kazuhiro TOBIISHI
Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135 Japan
E-mail : tobiishi@fihes.pref.fukuoka.jp

of OH-PCBs, PCBs, PCDDs and PCDFs in blood collected from 183 Yusho patients living in Japan in 2010, and we compared the blood concentrations of these compounds.

Materials and Methods

1. Sampling

The blood samples examined in this study were collected from 183 Yusho patients at their medical checkups in 2010; all gave their informed consent. 10 mL of blood samplings were collected using a vacuum blood-collecting device containing heparin and stored at 4°C until analyze for concentrations of OH-PCBs, PCBs, PCDDs and PCDFs.

2. Chemicals and reagents

OH-PCBs standards were purchased from Wellington Laboratories, Inc., Ontario, Canada and Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Massachusetts, US. These OH-PCBs standards are listed in Table 1. Each 1 mg/L standard solution was prepared by dilution with acetonitrile. Labeled standards of OH-[¹³C₁₂]-PCBs, as internal standards, are listed in Table 2. 4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB (4'-OH-CB159) was used as a

syringe spike. Acetonitrile, methanol, Ammonium acetate and ultra pure water of LC/MS grade were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan. A cartridge of Envi-18 (500mg / 6mL glass tube) was purchased from Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, US.

3. Sample preparation

Each 5g blood sample was loaded into an extraction cell filled with Isolute. After freeze-drying, OH-[¹³C₁₂]-PCBs, [¹³C₁₂]-PCDDs, [¹³C₁₂]-PCDFs and [¹³C₁₂]-Co-PCBs were added as internal standards. Acetone : n-hexane (1 : 4, v/v) was used as the extraction solvent for an accelerated solvent extractor (ASE-200, Thermo Scientific Dionex, California, US). After the extract was evaporated to near dryness, it was dissolved in n-hexane and treated with sulfuric acid overnight. The separated hexane layer was applied to a silver nitrate/silica gel column. The first fraction containing PCDDs, PCDFs and Co-PCBs was eluted with 15mL of n-hexane. OH-PCBs were eluted with 15mL of 50% dichloromethane/n-hexane as the second fraction. The eluate was concentrated to near dryness with a multiple sample concentrator, and dissolved in 2mL of methanol. After the methanol solution was loaded onto an Envi-18 cartridge with 4mL of methanol, the eluate was concentrated under nitrogen flow and transferred to an LC injection vial with 0.2mL of methanol. A flow chart of this method is shown in Fig. 1. The details of the sample preparations are described in another paper.⁴⁾

4. Determination of OH-PCBs

All LC/MS/MS analysis was performed using an Alliance 2695 series high-performance Liquid Chromatograph Separations Module equipped with Quattro micro API mass spectrometer (Waters Corporation, Massachusetts, US). An analytical column, L-column 2 ODS, 2.1 mm × 100 mm, 2 μm (CERI, Tokyo, Japan) was used under a linear gradient solvent condition with the flow

Table 1 OH-PCBs standards

Compounds	Abbreviations	
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	4-OH-CB109	4H109
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	3'-OH-CB138	3H138
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	4-OH-CB146	4H146
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	4'-OH-CB172	4H172
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	4-OH-CB187	4H187

Table 2 OH-[¹³C₁₂]-PCBs for internal standards

Compounds	Abbreviations	
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	4-OH-CB109	M4H109
4-OH-2',3,4',5,5'-PeCB	4'-OH-CB120	M4H120
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	3'-OH-CB138	M3H138
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	4-OH-CB146	M4H146
4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB	4'-OH-CB159	M4H159
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	4'-OH-CB172	M4H172
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	4-OH-CB187	M4H187

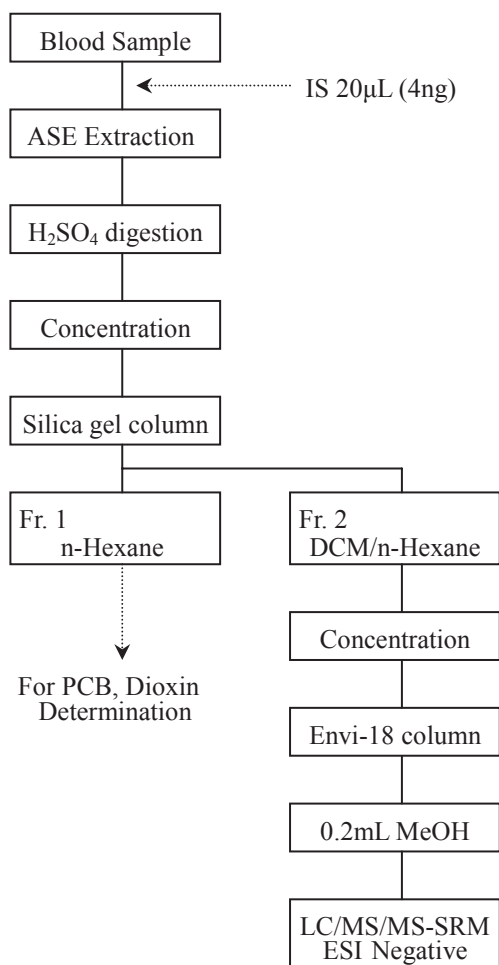


Fig. 1 Flow chart of the measurement method for OH-PCBs in blood samples

rate set at 0.2mL/min. The initial mobile phase was 40 : 60 methanol/2mM ammonium acetate in ultra pure water. The injection volume was 20 μ L.

Detection was performed on a quadrupole analyzer operated in negative electrospray ionization (ESI-) and in selected reaction monitoring acquisition mode (SRM). Nitrogen was used as the cone and desolvation gas. The potential applied onto the capillary was 1.0 kV. Cone and collision potentials were optimized for each molecule. Argon was used as the collision gas. The details of the operating conditions for the LC/MS/MS measurements are described in another paper.⁵⁾

Results and Discussion

1. Analysis of OH-PCBs in blood samples

Peaks of 4-OH-CB109, 4-OH-CB146 + 3-OH-CB153, 4-OH-CB187 and 4'-OH-CB172 were detected. Figure 2 shows the structure of OH-PCBs detected in the blood of Yusho patients. These chemicals have the similar structure ; 3, 5-substituted chlorinated-4-hydroxybiphenyls.

4-OH-CB146 and 3-OH-CB153 could not be separated in this study, while 3'-OH-CB138 could

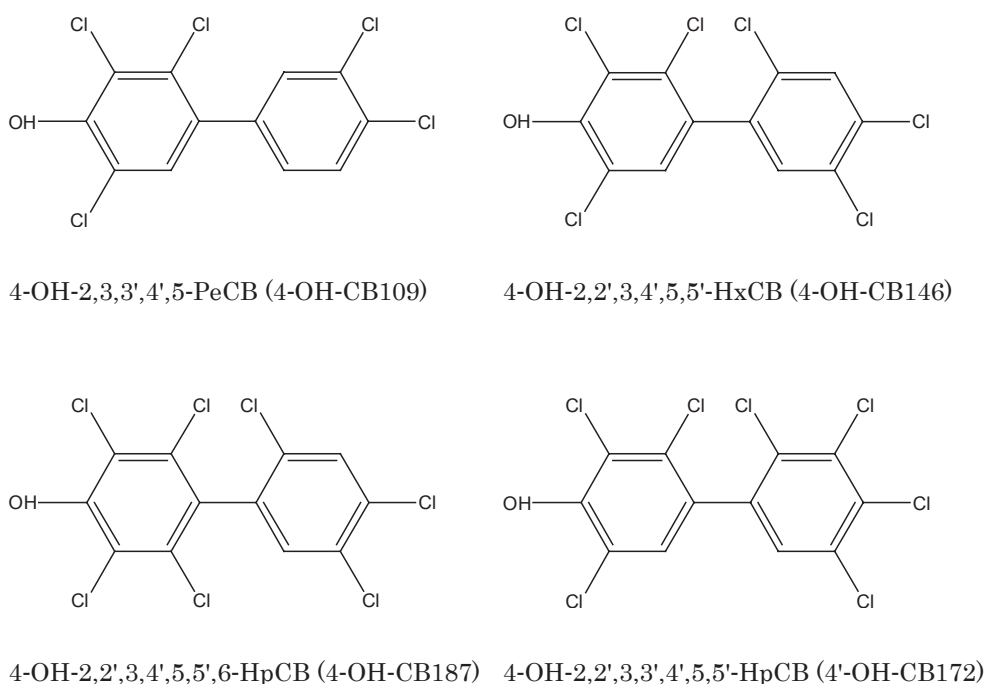


Fig. 2 Structure of OH-PCBs detected in the blood of Yusho patients

Table 3 Concentrations of OH-PCBs, PCBs, PCDDs and PCDFs in the blood of Yusho patients collected in 2010 (pg/g-wet, n = 183)

Congeners	Mean	Median	Min.	Max.	SD	CV
4-OH-CB109	67	49	ND	530	68.8	1.02
4-OH-CB146 + 3-OH-CB153	96	71	8.4	1200	106	1.10
4-OH-CB187	120	77	ND	1300	131	1.12
4'-OH-CB172	29	20	ND	380	35.1	1.22
Total OH-PCBs	310	230	36	3800	340	1.09
Total PeCBs	150	130	11	830	111	0.734
Total HxCBs	1000	820	80	6300	785	0.774
Total HpCBs	840	620	86	6600	793	0.942
Total PCBs	2300	1800	210	15000	1800	0.799
Total PCDDs	2.4	2.0	0.49	7.5	1.32	0.558
Total PCDFs	0.70	0.31	0.034	5.5	0.922	1.32
Total PCDD/DFs	3.1	2.7	0.54	11	1.79	0.584
Total Co-PCBs	1.0	0.90	0.13	4.8	0.686	0.663
Total dioxins	4.1	3.8	0.74	13	2.23	0.545
Lipid (%)	0.25	0.25	0.15	0.62	0.0606	0.238

SD : Standard deviation ; CV : Coefficient of variation ; CB : chlorinated biphenyl ; Pe : penta ; Hx : hexa ; Hp : hepta ; ND : not detected ; PCDD : polychlorinated dibenzo-p-dioxin ; PCDF : polychlorinated dibenzofuran ; Co: coplanar.

not be observed because of low recovery. We suspected that 3'-OH-CB138 degrades under sulfuric acid treatment.

2. Concentrations of OH-PCBs in blood samples

Concentrations of OH-PCBs, PCBs, PCDDs and PCDFs in the blood of the 183 Yusho patients are summarized in Table 3. The major OH-PCB metabolite (range) was 4-OH-CB187 (ND-1300 pg/g-wet) followed by 4-OH-CB146 + 3-OH-CB153 (8.4-1200 pg/g-wet), 4-OH-CB109 (ND-530 pg/g-wet) and 4'-OH-CB172 (ND-380 pg/g-wet). The total of 4 OH-PCBs ranged between 36 and 3800 pg/g-wet with a mean value of 310 pg/g-wet. These results were in good agreement with those reported by Linderholm et al.

3. Relationship between the concentrations of OH-PCBs and related compounds

Figure 3 shows the relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCBs in the blood of Yusho patients. A positive relationship

between the concentrations of OH-PCBs and PCBs was observed. But, no significant relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCDD/DFs was observed (Fig. 4). The concentrations of OH-PCBs and lipid were also not correlated (Fig. 5).

Figure 6 shows the relationships between the

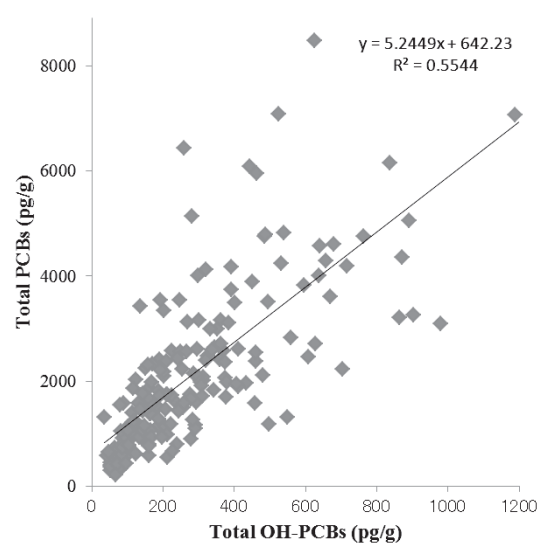


Fig. 3 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCBs in the blood of Yusho patients

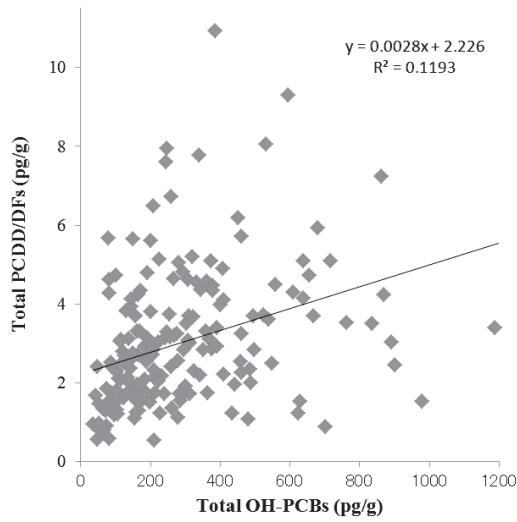


Fig. 4 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCDD/DFs in the blood of Yusho patients

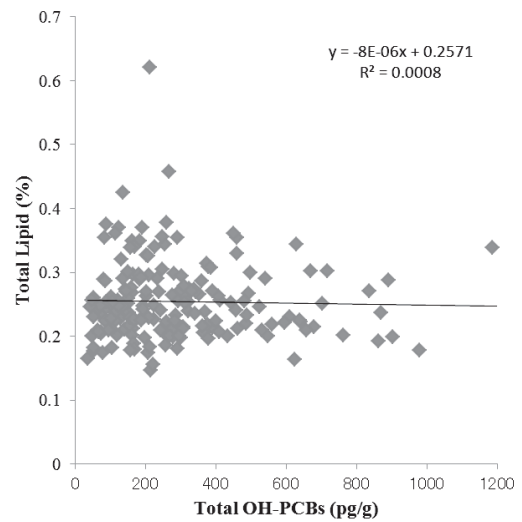


Fig. 5 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and lipid in the blood of Yusho patients

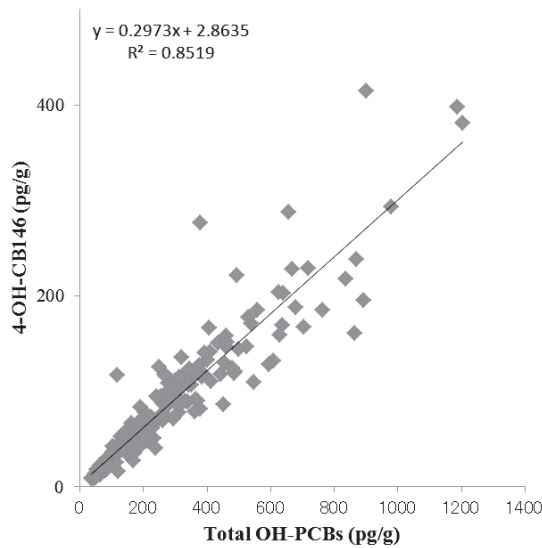


Fig. 6 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and their congeners

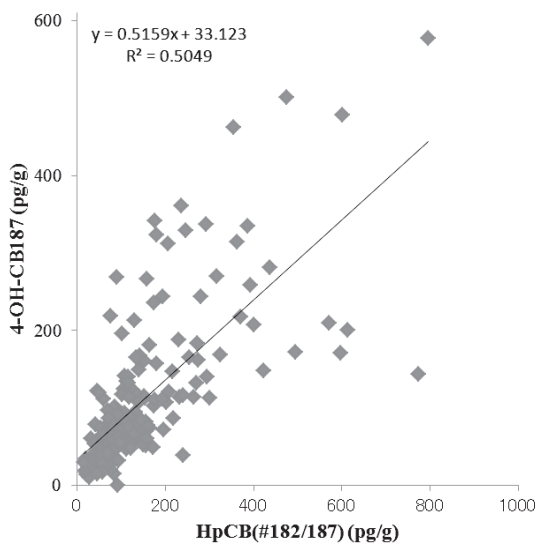
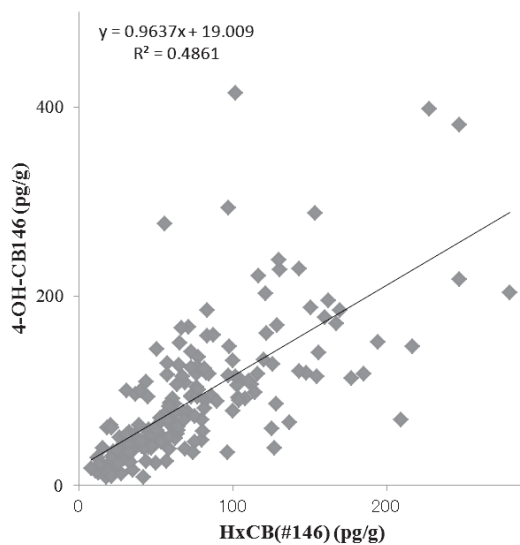
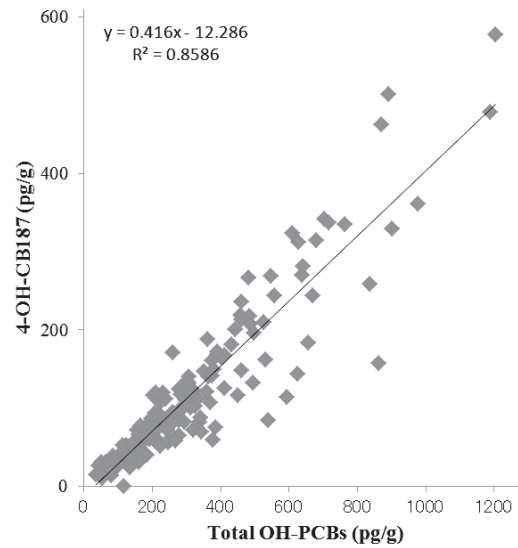


Fig. 7 Relationship between the concentrations of OH-PCB congeners and related PCBs

concentrations of OH-PCBs and their congeners (4-OH-CB146 and 4-OH-CB187). Significant relationships between the concentrations of OH-PCBs and their congeners were observed.

Figure 7 shows the relationships between the concentrations of OH-PCB congeners and related PCBs (4-OH-CB146/HxCB (#146) and 4-OH-CB187/HpCB (#182/187)). Positive relationships between the concentrations of OH-PCB congeners and related PCBs were observed.

In conclusion, we measured the blood samples from 183 Yusho patients for OH-PCBs using LC/MS/MS technique. The total OH-PCBs ranged from 36 to 3800 pg/g-wet. A positive relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCBs was observed, but no significant relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCDD/DFs was observed.

Acknowledgements

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

References

- 1) Enomoto T, Nishino Y, Matsuda M, Kawano M and Wakimoto T : Hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites (HO-PCBs) in human blood plasma-Development of analytical methods and their residue in Japanese general population-J. Environ. Chem. 16 : 51-59, 2006.
- 2) Linderholm L, Masuda Y, Athanasiadou M and Bergman Å : PCB and PCB metabolites in serum from Yusho patients 37 years after accident. Organohalogen Comp. 69 : 2141-2144, 2007.
- 3) Sato N, Yonekubo J, Ezaki T, Suzuki M, Matsumura C, Haga Y and Nakano T : Measurement of Accumulation of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Human Urine and Blood. Organohalogen Comp. 74 : 76-79, 2012.
- 4) Todaka T, Hirakawa H, Tobiishi K and Iida T : New protocol of dioxin analysis in human blood. Fukuoka Igaku Zasshi 94 : 148-157, 2003.
- 5) Tobiishi K, Suzuki S, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Kajiwara J, Hirata T, Iida T, Uchi H and Furue M : Improvement of Measurement Method for Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Blood Samples using LC/MS/MS. Fukuoka Igaku Zasshi 104 : 128-135, 2013.

(Received for publication March 26, 2013)

(和文抄録)

2010 年度油症認定患者血液中の水酸化ポリ塩化 ビフェニル(OH-PCBs)濃度

¹⁾福岡県保健環境研究所

²⁾中部大学大学院 応用生物学研究科

³⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

⁴⁾北九州生活科学センター

⁵⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

飛石 和大¹⁾²⁾, 鈴木 茂²⁾, 戸高 尊³⁾, 平川 博仙¹⁾, 堀 就英¹⁾, 梶原 淳睦¹⁾,
平田 輝昭¹⁾, 飯田 隆雄⁴⁾, 内 博史³⁾⁵⁾, 古江 増隆³⁾⁵⁾

水酸化ポリ塩化ビフェニル (OH-PCBs) は、人体内における PCB の主要代謝物である。OH-PCBs は体内でチトクローム P450 酵素誘導により PCB から生成され、油症認定患者の血清から 390-1300pg/g の濃度で検出された報告がある。

2010 年度に 183 名の油症患者から採取した血液中の OH-PCBs 濃度を測定し、これら化合物の濃度を比較した。主要な PCB の代謝物は、4-OH-CB187 (ND-1300 pg/g-wet), 4-OH-CB146 + 3-OH-CB153 (8.4-1200 pg/g-wet), 4-OH-CB109 (ND-530 pg/g-wet), 4'-OH-CB172 (ND-380 pg/g-wet) であり、その合計は 36-3800 pg/g-wet であった。

また、OH-PCBs と PCB 濃度には正の関係が認められたが、OH-PCBs と PCDD/DFs の濃度には有意な関係は認められなかった。

ダイオキシン母体曝露による胎児副腎ステロイド合成系への影響と性差

九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

武田 知 起, 服部友紀子, 藤井美彩紀, 田浦 順 樹, 石井 祐 次, 山田 英 之

The Gender-Specific Effect of Maternal Exposure to Dioxin on Fetal Steroidogenesis in the Adrenal Gland

Tomoki TAKEDA, Yukiko HATTORI, Misaki FUJII, Junki TAURA, Yuji ISHII and Hideyuki YAMADA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Abstract Maternal exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) causes a number of toxic effects on development such as growth retardation and sexual immaturity in the offspring. However, the toxic mechanism remains unknown. Our previous studies have revealed that single oral administration of TCDD (1 µg/kg) to pregnant rats at gestational day (GD) 15 attenuates the fetal expression of testicular steroidogenic proteins such as steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) and cytochrome P450 (CYP) 17 by targeting the fetal production of pituitary gonadotropins. In addition, we provided evidence that TCDD-produced damage on the fetal pituitary-gonad axis leads to imprint defects in sexual behaviors at adulthood. In this study, we investigated whether TCDD also affects fetal steroidogenesis in the adrenal gland. When pregnant Wistar rats were orally treated with TCDD, the fetal expression of CYP21, CYP11B1 and CYP11B2 mRNAs was either induced or tended to be induced in the male adrenal gland during GD17 and GD19, while the expression of mRNAs coding for StAR, CYP11A1 and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase was insensitive to TCDD treatment. The above alterations did not seem to be caused through a change in the upstream regulator, because TCDD exhibited little ability to attenuate the expression of adrenocorticotropin, a pituitary hormone stimulating adrenal steroidogenesis, in the male and female fetuses. In contrast to the males, TCDD effect on the adrenal gland was not observed in the female fetuses. These results suggest that maternal exposure to TCDD disrupts fetal steroidogenesis in adrenal as well as gonadal glands in a male specific manner, and the mechanism underlying the effect on adrenal gland is independent of the alteration of pituitary regulator.

Key words : 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD) · Adrenal · Steroidogenesis · Fetus · Sex difference

はじめに

2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) に代表されるダイオキシン類は, 生体に対して多岐にわたる毒性を引き起こす¹⁾. 中でも, 妊娠期や授乳期の母親への低用量曝露によって児に出現する後世代毒性は, 他の毒性に比較して閾値が低いこと, ならびに世代を越えて影響が及ぶことから問題が大きい²⁾. 具体的には, TCDD 曝

露母体より出生した児が成長したのちに, 精子産生能の低下, 排卵低下および交尾行動障害等の性未成熟, ならびに低体重, 知能低下および社会行動の異常等の発達障害が惹起される. 近年の多くの研究により, その障害発生機構として性ステロイド攪乱作用が一端を担う可能性が見出されている³⁾⁻¹⁰⁾. 例えば, 性ステロイドシグナリングに対する影響³⁾⁶⁾⁹⁾, 受容体の発現減少⁴⁾¹⁰⁾, 性ステロイド合成/分泌抑制⁷⁾および代謝酵素の誘導⁵⁾⁸⁾

Corresponding author : Hideyuki YAMADA
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University
Tel : + 81-92-642-6585 Fax : + 81-92-642-6588
E-mail : hyamada@phar.kyushu-u.ac.jp

等である。しかし、これらがどの種の障害に直結するかは理解されていない。

当研究室では後世代毒性の発現機構解明を目指し、ラットを用いた研究を実施している。これまでに、妊娠 (gestational day; GD) 15 日目の母体への 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD の経口投与により、出生前後の児の脳下垂体において luteinizing hormone (LH) の合成が低下し、これを起点に精巣の steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) や cytochrome P450 (CYP) 17 等の性ステロイド合成系タンパク質の発現低下、ならびに成長後の交尾行動障害が惹起されることを明らかにしている^{11)~14)}。これは、胎児期に低下する LH の補給により、TCDD 依存的な StAR や CYP17 の発現低下^{11)~14)}のみならず、成長後の交尾行動障害¹³⁾が改善する事実に基づく。一方、TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 母体曝露が GD20 の雌胎児卵巣の StAR 等の性ステロイド合成系に及ぼす影響は雄に比較すると小さく¹³⁾、また生殖腺以外の胎児ステロイド産生臓器である副腎、胎盤および視床下部の StAR および CYP17 の発現は、少なくとも GD20 胎児においては影響がないこと¹⁵⁾も見出している。しかし、性ステロイド以外のステロイド

の合成系が周産期の児に特異的な障害を受けるか否かについては全く明らかになっていない。

性ステロイド以外のステロイドホルモンとして知られるのが、糖質コルチコイドおよび鉱質コルチコイドの副腎皮質ホルモンである。これらは、性ステロイドと同様にコレステロールを出発原料として種々の酵素反応を経て合成されるが、CYP21, CYP11B1 および CYP11B2 が合成を担う酵素として重要である¹⁶⁾ (Fig. 1)。副腎皮質ホルモンは、生体のストレス応答/恒常性維持 (血糖および電解質調節) に必須のホルモンであるが、胎児期における糖質コルチコイドの過剰状態は成長遅滞を引き起こすことが広く知られている^{17)~19)}。一方、脳、肺、骨および膝臓等の局所においては正常な発達に重要であるとの報告もある^{20)~23)}。従って、胎児期における副腎皮質ホルモンの変調は児の発育と密接に関わるため、TCDD による影響を明確にすることは、発達障害との関連性を論じる上で有用と考えられる。そこで本研究では、TCDD 母体曝露が胎児副腎のステロイド合成系に及ぼす影響を明らかにするため、副腎ステロイド合成酵素群の発現変動を解析した。

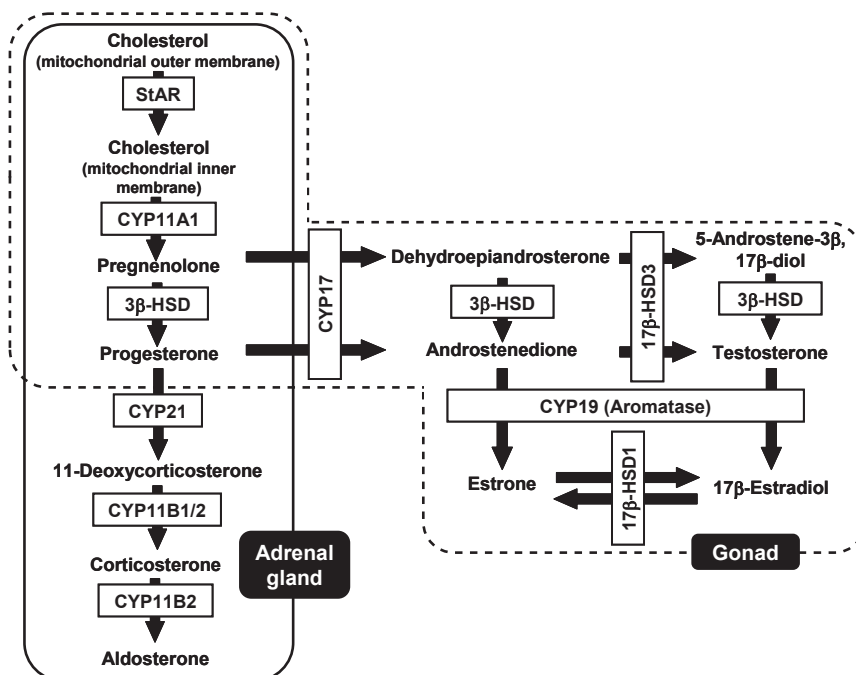


Fig. 1 The steroidogenic pathways in the adrenal and gonadal glands of rodents. Abbreviations used : CYP, cytochrome P450 ; HSD, hydroxysteroid dehydrogenase ; StAR, steroidogenic acute-regulatory protein.

Table 1 The design of primer sequence for real-time PCR

Target mRNA	Forward (5' → 3') Reverse (5' → 3')	Product size (bp)	Accession No. ^a
StAR	ACACTTTGGGGAGATGCCTG CGTGAGTTTGGTCTTTGAGG	109	U76419
CYP17	GCACAATCCTGAGGTGAAGA CTGATACGCAGCACTTCTCG	135	M31681
CYP11A1	TCAAAGCCAGCATCAAGGAG TTCTCGACCCATGGCATAGC	146	M22615
CYP21	GCTGACCCAGGAATTCTGTG GAGACAGCTGATGATACTGC	103	NM_057101
CYP11B1	TTCTTACCCAAGAGCTTGAC ATCTCGGATATGACACTCC	161	NM_012537
CYP11B2	TGCCTGGGATGTCATCTCTG TAGTGCAGCCACAATGCCAC	106	NM_012538
3β-HSD	AGATCTGGGCTATGTGCCAC CCCTTTCTGTCACTGAGACT	124	M38178
ACTH	TCACCACGGAAAGCAACCTG AGTCAAGGGCTGTTTCATCTC	104	NM_139326
β-actin	CACCATGTACCCAGGCATCGC AGCCACCAATCCACACAGAG	122	V01217

^aGenbank accession No. is shown.

実験方法

1. 実験材料

TCDD は, AccuStandard 社 (New Haven, CT, USA) より購入した. Corn oil は, 味の素株式会社の市販品を購入した. その他の試薬は, 実験に適した純度のものを使用した.

2. 動物実験

TCDD は 40 µg/mL acetone 溶液を調製し, 使用まで -30°C に保存した. 用時に必要量 corn oil と混和したのち, acetone を窒素ガスにて留去し, TCDD が 0.5 µg/mL となるように調製した.

Wistar 系雌性ラット (7 週齢) および雄性ラット (10 週齢) は, 九動株式会社 (佐賀県鳥栖市) より購入した. 雌雄ラットを一晩交配し, 翌日陰内に精子が確認された日を GD0 とした. GD15 に, TCDD (1 µg/kg/2 mL corn oil), あるいは対照群として corn oil (2 mL/kg) を投与した. GD16~20 に胎児を摘出し, 脳下垂体, 副腎, 生殖腺および血液を採取した. 採取した血液は, 室温にて 2 時間程度放置したのち, 4°C, 3,000 rpm に

て 15 分間遠心分離を行い血清とした. 臓器及び血清は, 液体窒素にて急速凍結し, 使用まで -80°C に保存した.

3. リアルタイム RT-PCR

mRNA 発現量は, リアルタイム reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて解析した²⁴⁾. 摘出臓器より, RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した. Total RNA は, PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ株式会社, 滋賀県大津市) を用いて, 添付説明書に従って cDNA を合成した. リアルタイム PCR は, Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies 社, Carlsbad, CA, USA) を使用し, 反応条件は [95°C, 20 秒-40 サイクル (95°C, 3 秒-60°C, 30 秒)] とした. この反応ののち, 増幅産物の特異性を確認するために融解曲線 [95°C, 15 秒-60°C, 1 分-60 to 95°C (0.3°C ずつ上昇, 各 15 秒)] を作製した. 使用したプライマーは Table 1 に示す. 目的遺伝子の発現量は, β-actin に対する相対値として解析した.

4. Enzyme immunoassay (EIA)

血清 adrenocorticotropin (ACTH) 濃度は、市販の ACTH EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals 社, Burlingame, CA, USA) を用いて、添付説明書に従って測定した。血清は測定時に滅菌水にて2倍希釈して使用した。

結 果

TCDD 母体曝露が胎児の副腎ステロイド合成系に及ぼす影響を解析する前に、陽性対照として TCDD の母体曝露が胎児生殖腺の性ステロイド合成系に及ぼす影響とその出現時期を検討した。ステロイドホルモンの原料であるコレステロールをミトコンドリア内へ輸送するタンパク質である StAR²⁵⁾ および性ステロイド合成に必須の酵素である CYP17²⁶⁾ の mRNA 発現変動を解析した結果、雄胎児精巣においては TCDD 依存的に StAR および CYP17 の発現が GD17~20 にかけて低下した (Fig. 2A)。一方、TCDD は雌胎児卵巣の StAR および CYP17 の発現に対しては影響を及ぼさなかった (Fig. 2B)。これらの結果は、既報¹³⁾¹⁵⁾ と同様の傾向を示し、TCDD が胎児生殖腺に及ぼす影響は雄に特異性が高いことが再確認された。

TCDD 母体曝露による胎児副腎のステロイド合成酵素の mRNA 発現変動を解析した結果、雄胎児では副腎皮質ホルモンの合成酵素である CYP21, CYP11B1 および CYP11B2 の発現が GD17~19 にかけて上昇ないし上昇傾向を示した (Fig. 3)。一方、StAR, CYP11A1 および 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) に関しては、検討期間内における有意な変動は観察されなかった (Fig. 3)。雌胎児においては、いずれも変化は認められなかった (Fig. 4)。また、副腎ステロイド合成の上位制御因子である脳下垂体の脳下垂体の ACTH の発現変動を解析した結果、mRNA および血清中濃度ともに、TCDD による変動は観察されなかった (Fig. 5)。

考 察

本研究では、TCDD 母体曝露 (1 μ g/kg, 経口) が胎児副腎のステロイド合成系に及ぼす影響を明らかにするため、副腎皮質ホルモン合成関連タンパク質の発現変動を解析した。その結果、StAR,

CYP11A1 および 3 β -HSD は無影響であったものの、副腎皮質ホルモン合成に必須である CYP21, CYP11B1 および CYP11B2 の発現が雄胎児特異的に誘導され、TCDD による胎児ステロイド合成攪乱作用は精巣に限定されないことが見出された。さらに、TCDD は胎児脳下垂体の ACTH の合成/分泌に対しては影響を及ぼさず、上位制御因子の変動では説明できないことが示唆された。本研究では、雄胎児特異的な変動の機構は明らかにできなかったが、CYP21, CYP11B1 および CYP11B2 のみで誘導が起こる事実から、副腎の部位特異的な障害を介する可能性が考えられる。副腎皮質は、外側より球状帯、束状帯および網状帯の3層から成り、球状帯は鉍質コルチコイド、束状帯は糖質コルチコイド、網状帯は性ステロイドを合成/分泌する¹⁶⁾。すなわち、各層間で酵素の発現水準が異なり、例えば CYP11B2 は球状帯のみで発現し、CYP11B1 は束状帯に最も多い²⁷⁾²⁸⁾。従って、誘導の分子種特異性を踏まえると、TCDD は球状帯および束状帯に対して選択的に作用することで CYP11B1 や CYP11B2 の発現を誘導する一方、網状帯に多く発現する StAR, CYP11A1 および 3 β -HSD には影響が起こり得なかった可能性がある。球状帯は、GD17~19 の間にレニン-アンギオテンシン系の刺激による分化が起こることが示唆されている²⁸⁾。これは、本研究で見出した CYP11B2 の発現誘導の時期と一致する。TCDD の周産期曝露は雄児マウスのアンギオテンシン II に対する感受性を高めることから²⁹⁾、雄胎児ラットにおいても同様の現象が起こることにより、分化が促進された可能性が考えられる。一方、TCDD が ACTH 以外の刺激物質あるいは副腎内での直接的な影響を介して雄胎児の副腎ステロイド合成系を選択的に誘導する可能性も否定はできない。事実、ラットへの TCDD 曝露により血中の ACTH 量は変動しないが、糖質コルチコイド量が雄のみで上昇傾向を示すことが報告されている³⁰⁾。ACTH 以外の発現促進因子としては、上述のアンギオテンシン II³¹⁾ のほか、束状帯に作用して糖質コルチコイドを増加させる corticotropin releasing hormone (CRH)³²⁾ および interleukin (IL) 6³³⁾ 等が TCDD の標的候補として挙げられる。TCDD はサルやマウスにおいて CRH および IL6 の発現を誘導することから³⁴⁾³⁵⁾,

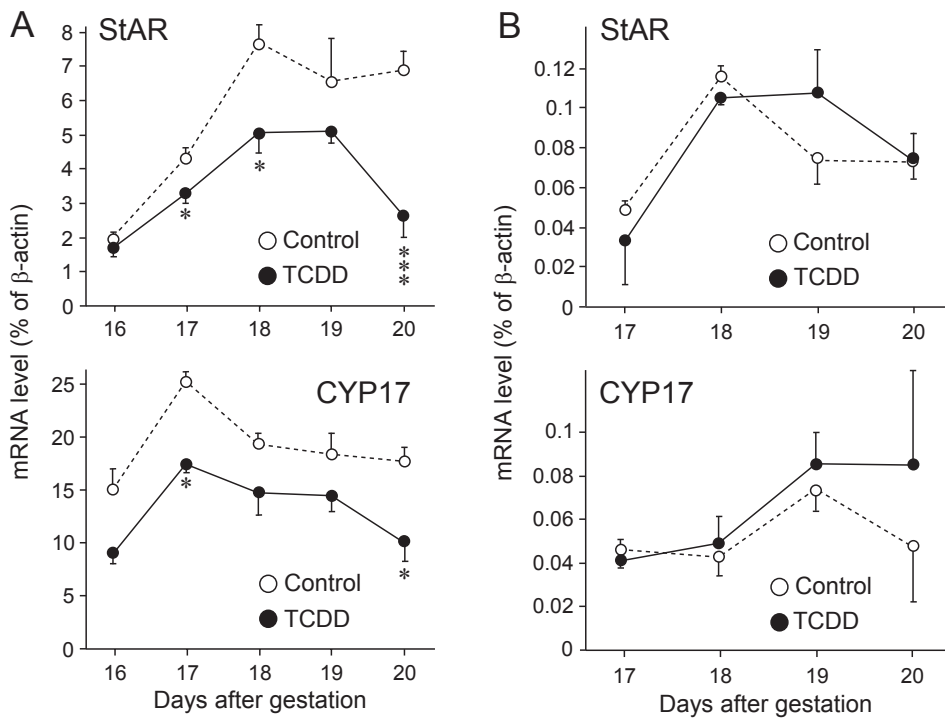


Fig. 2 Effect of maternal exposure to TCDD on the gonadal expression of StAR and CYP17 mRNAs in male (A) and female (B) fetal rats. Pregnant rats (GD15) were orally treated with TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$), and fetal gonads were removed from GD16 to GD20. The expression of target mRNAs was normalized by β -actin mRNA. Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 3-6 fetuses which were removed from different dams. Significantly different from control: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

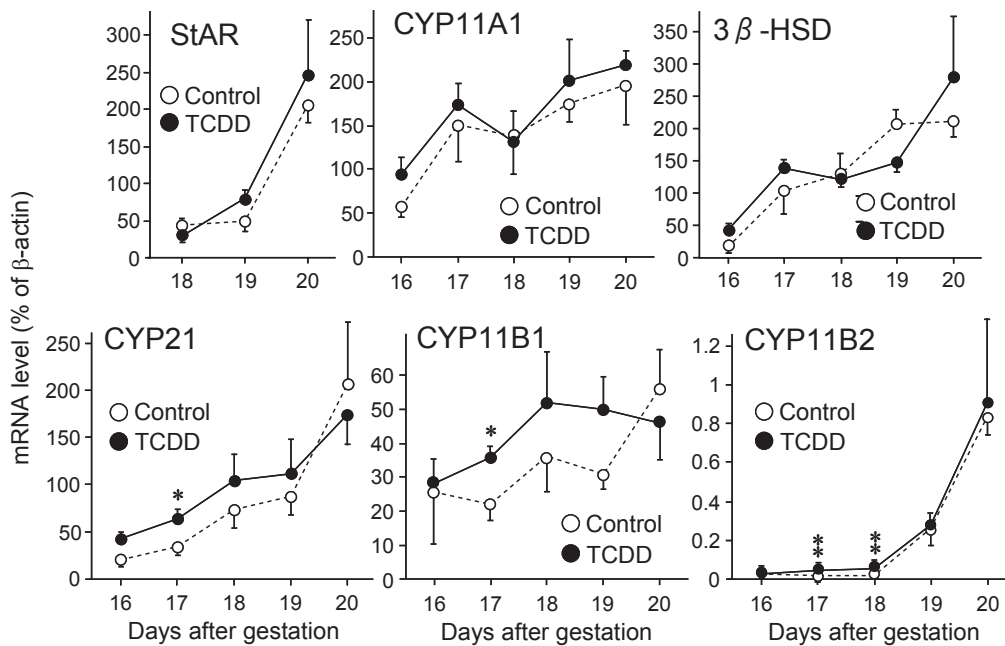


Fig. 3 Effect of TCDD on the fetal expression of steroidogenic protein mRNAs in the male adrenal. Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 3-6 fetuses which were removed from different dams. Significantly different from control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

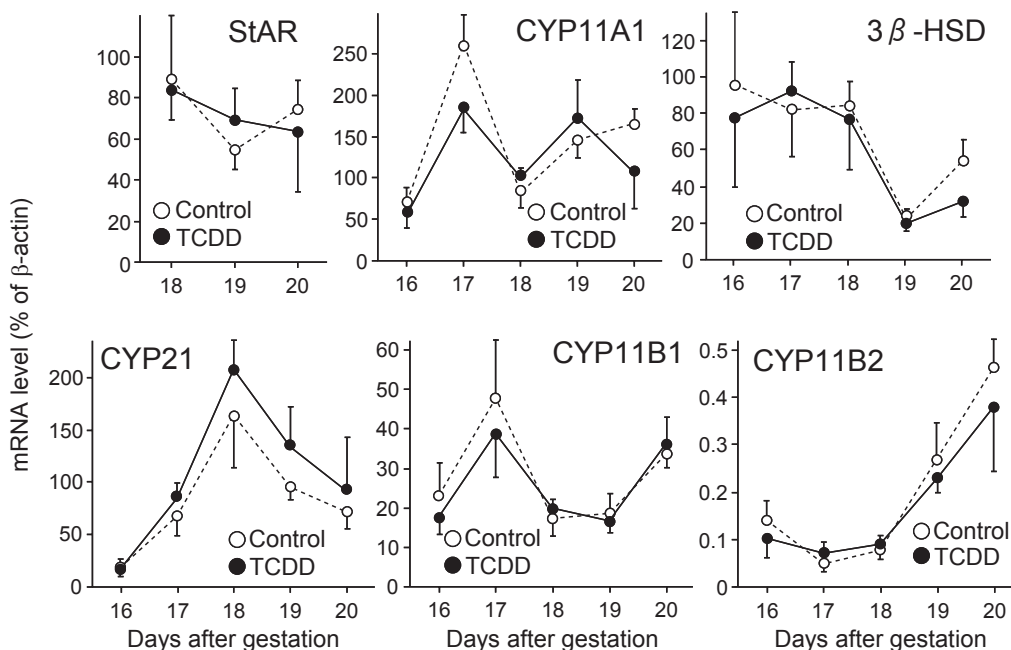


Fig. 4 Absence of TCDD effect on the fetal expression of steroidogenic protein mRNAs in the female adrenal. Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 3-6 fetuses which were removed from different dams.

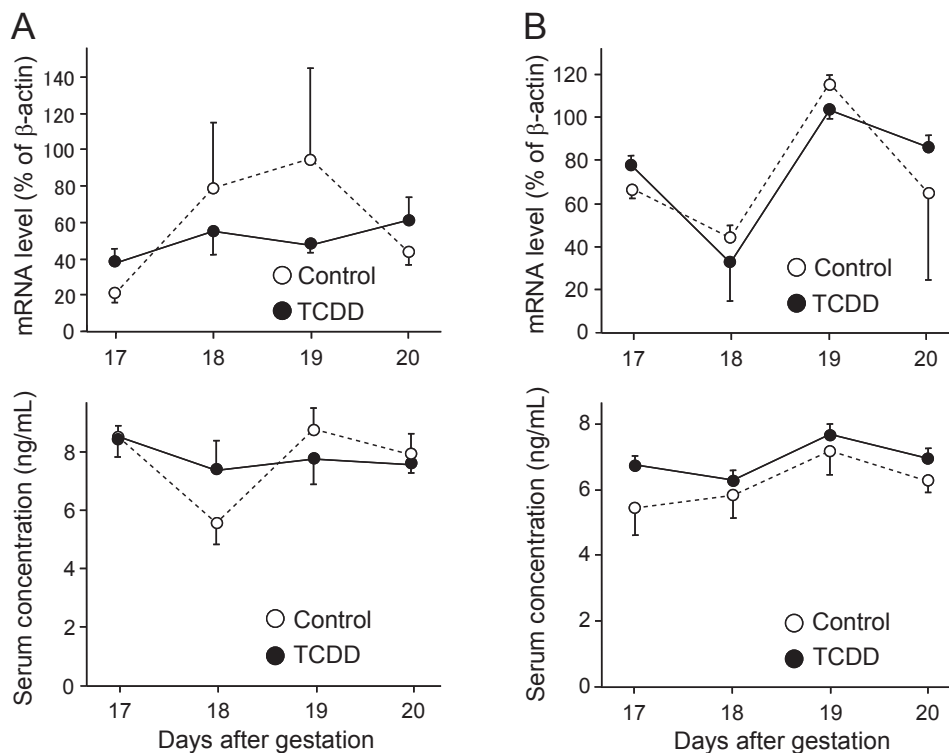


Fig. 5 Absence of TCDD effect on the pituitary expression of ACTH mRNA and serum concentration of ACTH in male (A) and female (B) fetuses. Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 3-6 fetuses which were removed from different dams.

雄胎児ラットにおいてこれらの変動が起こるか否かについても注視する必要がある。また、ダイオキシン類は細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体 (AhR) に結合し、多くの遺伝子上流に存在するコンセンサス配列 [xenobiotic responsive element (XRE)] への結合を介してそれらの遺伝子発現変動を引き起こす³⁶⁾。CYP21, CYP11B1 および CYP11B2 の遺伝子上流 10,000 base pair に関して XRE のコア配列 (5'-CACGC-3') を検索したところ、いずれも一ヶ所以上に存在が確認された。AhR は、胎児後期において副腎と肝臓に最も高発現するとの報告もあることから³⁷⁾、TCDD が AhR 依存的にこれらの遺伝子発現を誘導する可能性も無視できない。

本研究においては、TCDD による胎児生殖腺ステロイド合成系への影響の出現時期についても詳細に検討した。その結果、胎児精巣における StAR および CYP17 の発現低下は、GD17 より起こることが判明した。さらに、胎児卵巣においては影響が観察されず、雄胎児精巣に感受性が高いことが再確認された。胎児精巣に対する障害性は上位制御因子である脳下垂体の LH 低下に起因することは緒論で述べた通りである^{11)~14)}。しかし、LH 低下は GD19 以前には認められないことから¹⁴⁾、GD17~19 における影響は LH 低下以外の機構で惹起されることが想定される。その機構として、副腎皮質ホルモン合成系への影響との関連性が考えられる。糖質コルチコイドは精巣における性ステロイド合成を負に制御する^{38)~40)}。つまり、GD17~19 において副腎のステロイド合成が亢進する結果、精巣の性ステロイド合成低下が惹起された可能性が考えられる。この推定は、GD17~19 の雄胎児において精巣の StAR および CYP17 は低下するのに対し、副腎ステロイド合成系は誘導するという本研究結果と符合する。また、精巣の分化抑制に起因する可能性もある。生殖腺および副腎は、同一の始原生殖細胞を起点として steroidogenic factor-1 (SF1), dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X-chromosome, gene-1 (DAX1) および wingless-type MMTV integration site family, member 4 (Wnt4) 等の転写因子の発現に伴って選択的に分化する^{41)~43)}。我々は過去に、TCDD 母体曝露により胎児精巣において

SF1 の発現が低下すること¹¹⁾、ならびに胎児卵巣ではいずれも変動しないことを確認している (未発表データ)。従って、SF1 低下を介して精巣特異的に分化が抑制され、StAR 等の低発現に繋がった可能性も考えられる。これが事実ならば、雄胎児では精巣の分化減少に伴って過剰な副腎への分化が起こりうる一方で、雌胎児では卵巣分化が正常に起こるために副腎には影響が生じない、すなわち副腎への影響の性差が説明できる可能性がある。TCDD が両組織のステロイド合成系に及ぼす影響の機構を明らかにするため、副腎ステロイド量や生殖腺/副腎の分化への影響に着目した解析が今後必要であろう。

結 論

TCDD 母体曝露は、雄胎児特異的に副腎のステロイド合成系を誘導することが明らかになった。誘導を受ける酵素の分子種特異性から、TCDD は副腎皮質の球状帯や束状帯に対して選択的に影響する可能性が推定される。一方、脳下垂体 ACTH の変動は観察されず、上記の影響は上位制御因子の変動では説明できないことが示唆された。

謝 辞

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

参 考 文 献

- 1) Poland A and Knutson JC : 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22 : 517-554, 1982.
- 2) Peterson RE, Theobald HM and Kimmel GL : Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds : cross-species comparisons. *Crit. Rev. Toxicol.* 23 : 283-335, 1993.
- 3) Gallo MA, Hesse EJ, Macdonald GJ and Umbreit TH : Interactive effects of estradiol and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on hepatic cytochrome P-450 and mouse uterus. *Toxicol. Lett.* 32 : 123-132, 1986.
- 4) Romkes M, Piskorska-Pliszczynska J and Safe

- S : Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on hepatic and uterine estrogen receptor levels in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87 : 306-314, 1987.
- 5) Spink DC, Lincoln II DW, Dickerman HW and Gierthy JF : 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin causes an extensive alteration of 17 beta-estradiol metabolism in MCF-7 breast tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 6917-6921, 1990.
 - 6) Kharat I and Saatcioglu F : Antiestrogenic effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 271 : 10533-10537, 1996.
 - 7) Moran FM, Conley AJ, Corbin CJ, Enan E, VandeVoort C, Overstreet JW and Lasley BL : 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin decreases estradiol production without altering the enzyme activity of cytochrome P450 aromatase of human luteinized granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* 62 : 1102-1108, 2000.
 - 8) Badawi AF, Cavalieri EL and Rogan EG : Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17 β -estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 21 : 1593-1599, 2000.
 - 9) Khan S, Barhoumi R, Burghardt R, Liu S, Kim K and Safe S : Molecular mechanism of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor/Sp1 cross talk in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 20 : 2199-2214, 2006.
 - 10) Ohtake F, Baba A, Takeda I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y and Kato S : Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446 : 562-566, 2007.
 - 11) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y and Yamada H : Fetal pituitary gonadotropin as an initial target of dioxin in its impairment of cholesterol transportation and steroidogenesis in rats. *Endocrinology* 147 : 927-936, 2006.
 - 12) Taketoh J, Mutoh J, Takeda T, Ogishima T, Takeda S, Ishii Y, Ishida T and Yamada H : Suppression of fetal testicular cytochrome *P450 17* by maternal exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : a mechanism involving an initial effect on gonadotropin synthesis in the pituitary. *Life Sci.* 80 : 1259-1267, 2007.
 - 13) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T and Yamada H : Maternal exposure to dioxin disrupts gonadotropin production in fetal rats and imprints defects in sexual behavior. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329 : 1091-1099, 2009.
 - 14) Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y and Yamada H : Dioxin silences gonadotropin expression in perinatal pups by inducing histone deacetylases : a new insight into the mechanism for the imprinting of sexual immaturity by dioxin. *J. Biol. Chem.* 287 : 18440-18450, 2012.
 - 15) 武田知起, 田浦順樹, 藤井美彩紀, 古賀貴之, 石井祐次, 山田英之 : ダイオキシン母体曝露が胎児ステロイド産生臓器の性ステロイドホルモン合成系に及ぼす影響. *福岡医誌.* 102 : 159-166, 2011.
 - 16) Omura T and Morohashi K : Gene regulation of steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53 : 19-25, 1995.
 - 17) Seckl JR : Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur. J. Endocrinol.* 151 : U49-U62, 2004.
 - 18) Seckl JR and Meaney MJ : Glucocorticoid programming. *Ann. NY Acad. Sci.* 1032 : 63-84, 2004.
 - 19) Hewitt DP, Mark PJ and Waddell BJ : Glucocorticoids prevent the normal increase in placental vascular endothelial growth factor expression and placental vascularity during late pregnancy in the rat. *Endocrinology* 147 : 5568-5574, 2006.
 - 20) Gronowicz G, McCarthy MB and Raisz LG : Glucocorticoids stimulate resorption in fetal rat parietal bones in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 5 : 1223-1230, 1990.
 - 21) Ward RM : Pharmacologic enhancement of fetal lung maturation. *Clin. Perinatol.* 21 : 523-542, 1994.
 - 22) Komatsu S, Yamamoto M, Arishima K and Eguchi Y : Maternal adrenocortical hormones maintain the early development of pancreatic B cells in the fetal rat. *J. Anat.* 193 : 551-557, 1998.
 - 23) Matthews SG : Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr. Res.* 47 : 291-300, 2000.
 - 24) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H and Yamada H : Maternal exposure to dioxin reduces hypothalamic but not pituitary metabolism in fetal rats : a possible mechanism for a fetus-specific reduction in steroidogenesis. *J. Toxicol. Sci.* 35 : 365-373, 2010.
 - 25) Manna PR, Dyson MT and Stocco DM : Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression : present and future

- perspectives. *Mol. Hum. Reprod.* 15 : 321-333, 2009.
- 26) Payne AH and Youngblood GL : Regulation of expression of steroidogenic enzymes in leydig cells. *Biol. Reprod.* 52 : 217-225, 1995.
- 27) Morohashi K : Gonadal and Extragonadal Functions of Ad4BP/SF-1 : Developmental Aspects. *Trends Endocrinol. Metab.* 10 : 169-173, 1999.
- 28) Wotus C, Levay-Young BK, Rogers LM, Gomez-Sanchez CE and Engeland WC : Development of adrenal zonation in fetal rats defined by expression of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase. *Endocrinology* 139 : 4397-4403, 1998.
- 29) Aragon AC, Goens MB, Carbett E and Walker MK : Perinatal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure sensitizes offspring to angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc. Toxicol.* 8 : 145-154, 2008.
- 30) Pitt JA, Buckalew AR, House DE and Abbott BD : Adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone secretion by perfused pituitary and adrenal glands from rodents exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Toxicology* 151 : 25-35, 2000.
- 31) Rainey WE, Bird IM and Mason JI : Angiotensin-II-directed glomerulosa cell function in fetal adrenal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43 : 847-854, 1992.
- 32) Andreis PG, Neri G, Mazzocchi G, Musajo F and Nussdorfer GG : Direct secretagogue effect of corticotropin-releasing factor on the rat adrenal cortex : the involvement of the zona medullaris. *Endocrinology* 131 : 69-72, 1992.
- 33) Páth G, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M and Scherbaum WA : Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland : expression and effects on steroidogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 : 2343-2349, 1997.
- 34) Shridhar S, Farley A, Reid RL, Foster WG and Van Vugt DA : The Effect of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on corticotrophin-releasing hormone, arginine vasopressin, and pro-opiomelanocortin mRNA levels in the hypothalamus of the cynomolgus monkey. *Toxicol. Sci.* 63 : 181-188, 2001.
- 35) DiNatale BC, Schroeder JC and Perdew GH : Ah receptor antagonism inhibits constitutive and cytokine inducible IL6 production in head and neck tumor cell lines. *Mol. Carcinog.* 50 : 173-183, 2011.
- 36) Mimura J and Fujii-Kuriyama Y : Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* 1619 : 263-268, 2003.
- 37) Abbott BD, Birnbaum LS and Perdew GH : Developmental expression of two members of a new class of transcription factors : I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev. Dyn.* 204 : 133-143, 1995.
- 38) Orr TE and Mann DR : Role of glucocorticoid in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats. *Horm. Behav.* 26 : 350-363, 1992.
- 39) Gao HB, Shan LX, Monder C and Hardy MP : Suppression of endogenous corticosterone levels in vivo increases the steroidogenic capacity of purified rat Leydig cells in vitro. *Endocrinology* 137 : 1714-1718, 1996.
- 40) Rengarajan S and Balasubramanian K : Corticosterone induces steroidogenic lesion in cultured adult rat Leydig cells by reducing the expression of StAR protein and steroidogenic enzymes. *J. Cell. Biochem.* 103 : 1472-1487, 2008.
- 41) Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N and McMahon AP : Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397 : 405-409, 1999.
- 42) Keegan CE and Hammer GD : Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol. Metab.* 13 : 200-208, 2002.
- 43) Fujieda K and Tajima T : Molecular basis of adrenal insufficiency. *Pediatr. Res.* 57 : 62R-69R, 2005.

(Received for publication March 22, 2013)

血液中 PCB 異性体分離分析におけるアルカリ分解温度の検討

¹⁾福岡県保健環境研究所

²⁾公益財団法人北九州生活科学センター

³⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

⁴⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

堀 就英¹⁾, 山本貴光²⁾, 石黒靖尚²⁾, 飯田隆雄²⁾, 梶原淳睦¹⁾,
平田輝昭¹⁾, 内 博史³⁾⁴⁾, 古江増隆³⁾⁴⁾

Examination of Alkali Digestion Temperature in Isomer Specific Analysis of PCB in Whole Blood Sample

Tsuguhide HORI¹⁾, Takamitsu YAMAMOTO²⁾, Yasuhisa ISHIGURO²⁾, Takao IDA²⁾,
Jumboku KAJIWARA¹⁾, Teruaki HIRATA¹⁾, Hiroshi UCHI³⁾⁴⁾ and Masutaka FURUE³⁾⁴⁾

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

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

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

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

Abstract We compared concentrations of PCB congeners between conventional 80°C alkali digestion method and 30°C alkali digestion method using 22 individual blood samples collected during 2009 annual Yusho examinations. The mean concentration of tri-CB in 30 °C alkali digestion method was lower than that of conventional method. However, concentration of total PCBs, 2,3',4,4',5-pentaCB (PCB118), 2,2',4,4',5,5'-hexaCB (PCB153) and 2,3,3',4,4',5-hexaCB (PCB156), which were used as index for Yusho diagnosis, were equivalent between the methods. It was considered that the 30 °C alkali digestion method was available for blood PCB congener specific analysis in Yusho diagnosis.

Key words : Yusho · PCB · Blood · GC/MS

はじめに

全血試料中の PCB 定量分析では、量り取った血液を高濃度アルカリ条件下で加熱することで PCB 以外の油脂分や有機化合物等をけん化処理し(アルカリ分解)、未分解の有機化合物をヘキサン抽出する方法が一般的である¹⁾²⁾。アルカリ分解操作は、試験管に秤量した血液にアルカリエタノール溶液を加えて 80°C 以上に保ち、数時間加熱する方法が用いられる。しかし本手法は反応中に還流冷却を必要とするため一度に処理可能な件数が限られること、操作が煩雑で還流中に突沸が起

こりやすく危険を伴うなどの課題があった。今回、試験方法の改良を目的として、低温条件下(30°C)で行うアルカリ分解方法(低温アルカリ分解法)を検討したので報告する。なお本文中の「血液中 PCB 濃度」は、血液中の主要な PCB 同族体の濃度を総和した「Total PCB 濃度」と同義である。

実験方法

1. 分析試料

2009 年度の福岡県油症一斉検診においてインフォームドコンセントを得て PCB を測定した受診者血液を検討対象とした。従来のアルカリ分解

温度 (80°C) で血液中 PCB 濃度を測定した結果、比較的濃度が低かった受診者と濃度が高かった受診者 22 名 (低濃度群と高濃度群各々 11 名) を選び、低温アルカリ分解法の試験対象とした。22 名の血液試料を別途量り取り、低温アルカリ分解法で抽出・測定し、従来のアルカリ分解条件で得られた測定結果と比較した。

2. 分析方法

試薬は既報³⁾と同様のものを使用した。10mL 容丸底スピッツ管に血液約 2 g を正確に量り取り、¹³C でラベル化された PCB 内部標準物質 (3 ~ 10 塩素化物 20 種類, ノナン溶液) を各化合物につき 200 pg 相当になるよう正確に添加した。次に 1.5N 水酸化カリウム/エタノール溶液 3 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混合

した。

従来法では、スピッツ管上部に還流冷却管を取り付け、80°C に温度設定したアルミブロック恒温槽 (東京理化学器械製 MG-2200) 中で約 1 時間加熱還流してアルカリ分解を行い、放冷後抽出した。低温アルカリ分解法においては、スピッツ管に栓をして前述のアルミブロック恒温槽に装着し 30°C で約 12 時間静置した。

アルカリ分解後の実験操作は、両方法で共通とした。すなわち分解後の血液試料にヘキサン 2 mL を加えて密栓し、ミキサーで攪拌して抽出した。試料を 2000 rpm で 5 分間遠心分離し、上層のヘキサン層を別のスピッツ管に分取し、この抽出操作を繰り返した。抽出液の濃縮や精製、測定試料の調製等の手順は、既報³⁾と同様であった。測定には、関東化学製の HT8-PCB キャピラリー

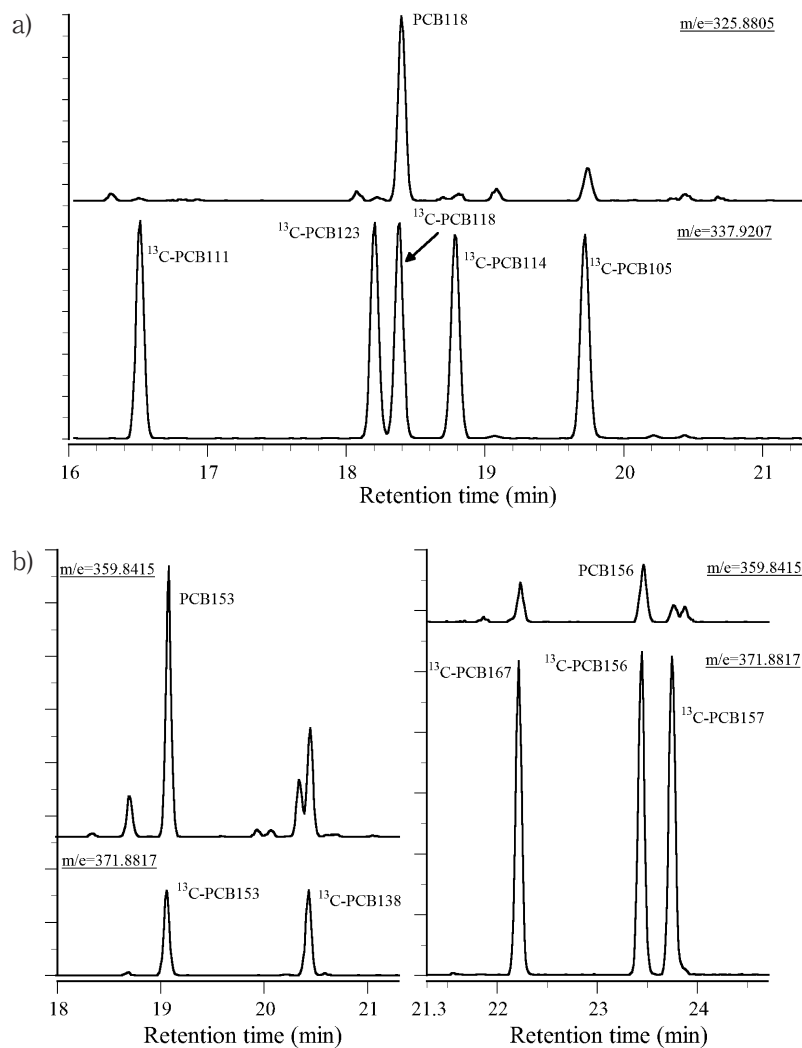


Fig. 1 HRGC/HRMS SIM chromatograms of a) pentaCBs and b) hexaCBs in extracts from blood sample under condition of 30°C alkali digestion

Table 1 Recovery rates of ^{13}C -labeled PCB standards in this study

	Low PCB concentration group (n=11)						High PCB concentration group (n=11)					
	80°C			30°C			80°C			30°C		
	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean
^{13}C -244'-TrCB (#28)	39	73	62	59	80	69	54	75	64	54	93	70
^{13}C -344'-TrCB (#37)	49	77	66	67	84	74	66	81	73	56	89	78
^{13}C -22'55'-TeCB (#52)	46	80	69	65	87	76	62	79	72	57	94	77
^{13}C -23'45'-TeCB (#70)	54	87	76	75	97	85	72	89	81	64	100	86
^{13}C -22'35'6'-PeCB (#95)	53	85	75	76	98	85	68	87	78	63	99	85
^{13}C -22'455'-PeCB (#101)	61	93	82	79	104	90	80	94	86	71	105	91
^{13}C -2'344'5'-PeCB (#123)	63	105	90	81	106	95	82	98	91	81	103	94
^{13}C -23'44'5'-PeCB (#118)	63	103	88	75	106	93	81	99	92	75	103	93
^{13}C -2344'5'-PeCB (#114)	62	104	90	74	109	92	80	102	93	74	100	91
^{13}C -233'44'-PeCB (#105)	61	104	88	77	105	93	82	100	92	78	101	93
^{13}C -22'44'55'-HxCB (#153)	63	106	89	72	112	93	81	104	94	72	102	91
^{13}C -22'344'5'-HxCB (#138)	63	106	90	75	112	94	82	103	94	79	102	93
^{13}C -233'44'5'-HxCB (#157)	63	106	92	88	114	104	87	106	97	96	117	103
^{13}C -22'33'55'6'-HpCB (#178)	60	104	87	73	112	90	82	105	93	77	97	88
^{13}C -22'344'55'-HpCB (#180)	63	105	89	84	112	100	86	102	94	94	112	102
^{13}C -22'33'44'5'-HpCB (#170)	66	110	92	87	127	111	91	107	99	101	120	108
^{13}C -233'44'55'-HpCB (#189)	63	108	90	79	117	102	87	105	97	93	115	99
^{13}C -22'33'44'55'-OxCB (#194)	64	120	90	71	109	96	82	107	96	86	106	92
^{13}C -22'33'44'55'6'-NoCB (#206)	49	90	70	68	114	94	70	88	79	78	105	89
^{13}C -22'33'44'55'66'-DeCB (#209)	24	58	41	63	98	81	40	59	50	71	93	78

カラム⁴⁾ (内径 0.25mm, 長さ 60 m) を装着した高分解能ガスクロマトグラフ・高分解能質量分析計 (HRGC/HRMS, Agilent 7890A/AutoSpec Premier) を用い, PCB 同族体 68 種類 (3~10 塩素化物) を測定対象化合物とした. 機器分析条件は既報³⁾と同様であった.

結果と考察

低温アルカリ分解法で調製した測定試料を HRGC/HRMS に注入して得たクロマトグラムの一例を Fig. 1 に示す. ここでは, 「血中 PCB パターン」の判定に用いられる指標異性体である 2, 3', 4, 4', 5-pentaCB (PCB118, ピーク 1 に相当), 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB (PCB153, ピーク 2 に相当) 及び 2, 3, 3', 4, 4', 5-hexaCB (PCB156, ピーク 5 に相当) 付近のクロマトグラムを示した. 3~10 塩素化物の測定クロマトグラム上に, 精製が不十分な場合に出現する夾雑ピークやベースラインの著しい変動等は認められなかった. アルカリ分解の温度条件を 30°C に変更した場合も, 血液由来成分による妨害の無い良好なクロマトグラムが

得られることが分かった.

Table 1 に本実験における PCB 内部標準物質の添加回収率を示した. 従来法及び低温アルカリ分解法ともに 4~9 塩素化物の平均回収率は 70~110% の良好な回収率を示した. 3 塩素化物では, 回収率が低下する傾向が両手法で認められた. PCB 低塩素化物は濃縮工程で揮散しやすく, 一部が損失したためと考えられる. 従来法 (80°C) における 10 塩素化物の回収率は, 低濃度群, 高濃度群ともに平均回収率で 40~50% と総じて低い傾向を示したが, 低温アルカリ分解法では平均で 80% 程度に改善した. アルカリ分解の温度が低くなり, 高塩素化物の脱塩素化反応が抑制されたためと考えられる. 従来法で認められた 10 塩素化物の分解の影響は, 定量対象のネイティブ体と内標準物質の ^{13}C ラベル体に対して同等であり, 本化合物の定量精度が著しく損なわれることはないと考えられる. また, 血液中の 10 塩素化物濃度の Total PCB 濃度に占める割合は低く, 全体の 0.5% に満たない⁵⁾⁶⁾. 仮にアルカリ分解の影響で 10 塩素化物の定量値が変動しても, 油

Table 2 Concentrations of dominant PCB congener in the eleven blood samples (low concentration group, 80°C alkali digestion)

Congener	Blood sample No.											Mean
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
244'-TrCB(#28)	2.6	3.5	2.7	3.7	3.3	2.4	1.4	3.0	2.7	2.9	5.2	3.0
244'5'-TeCB(#74)	12	7.9	6.1	7.1	15	4.1	7.2	5.8	8.8	8.1	24	10
23'44'-TeCB(#66)	1.9	2.6	2.5	1.8	2.8	1.0	0.71	2.5	2.3	1.7	5.1	2.2
22'455'-PeCB(#101)	1.4	1.0	2.8	2.6	1.8	1.8	0.66	3.0	1.1	1.5	3.5	1.9
22'44'5'-PeCB(#99)	10	8.0	14	12	14	7.2	7.5	15	13	9.0	23	12
23'44'5'-PeCB(#118)	19	18	16	10	28	8.5	8.5	12	19	14	36	17
2344'5'-PeCB(#114)	1.1	0.85	0.65	0.73	1.4	0.54	1.5	0.45	0.90	1.6	3.0	1.2
233'44'-PeCB(#105)	4.1	3.3	4.3	2.5	5.3	1.8	1.4	3.3	4.3	2.8	7.9	3.7
22'355'6'-HxCB(#151)	1.0	0.80	1.8	1.1	1.3	1.5	0.66	2.0	0.85	0.95	2.9	1.3
22'34'55'-HxCB(#146)	16	10	12	14	19	13	18	12	15	21	32	17
22'44'55'-HxCB(#153)	100	67	77	85	130	74	120	74	100	100	200	100
22'344'5'-HxCB(#137)	2.5	1.9	2.4	2.8	3.3	3.0	4.8	1.9	3.1	5.4	6.5	3.4
22'33'45'-HxCB(#130)	2.8	1.4	2.3	2.7	2.8	2.9	2.4	2.0	1.7	5.0	5.5	2.8
233'4'5'6'-HxCB(#164)	23	15	14	19	25	18	27	13	18	38	46	23
22'344'5'-HxCB(#138)	48	29	42	40	56	38	47	32	42	46	86	46
23'44'55'-HxCB(#167)	3.5	2.9	1.8	1.5	4.3	1.6	2.2	1.6	3.6	3.1	6.3	2.9
233'44'5'-HxCB(#156)	8.3	5.3	4.5	7.6	8.4	13	23	4.0	11	59	20	15
233'44'5'-HxCB(#157)	2.0	1.4	1.1	1.9	2.2	2.8	6.0	1.1	2.7	15	4.6	3.7
22'33'55'6'-HpCB(#178)	6.5	4.6	4.1	5.8	9.4	5.6	8.7	4.3	7.9	8.3	16	7.4
22'344'56'-HpCB(#182)	28	19	20	24	47	24	33	20	31	25	65	31
22'344'5'6'-HpCB(#183)	5.8	3.5	5.4	4.7	9.0	5.2	5.2	4.6	6.0	4.6	12	6.0
22'33'4'56'-HpCB(#177)	6.1	3.3	5.1	6.0	9.2	6.8	5.8	5.5	6.9	5.9	14	6.7
22'33'455'-HpCB(#172)	3.5	2.0	1.8	2.7	5.0	3.3	5.3	1.6	3.9	7.6	7.9	4.0
22'344'55'-HpCB(#180)	76	43	34	52	100	64	100	31	81	130	145	78
22'33'44'5'-HpCB(#170)	23	13	11	16	26	20	30	11	24	57	45	25
233'44'55'-HpCB(#189)	1.3	0.85	0.55	1.0	1.6	2.5	3.3	0.80	2.0	11	2.7	2.5
22'33'55'66'-OcCB(#202)	2.2	1.8	1.6	2.5	4.6	2.1	3.5	1.6	4.3	3.7	6.8	3.2
22'33'4'55'6'-/22'33'455'6'-OcCBs(#201/198)	5.1	3.9	2.7	4.3	9.1	4.9	7.7	2.8	8.4	10	13	6.5
22'344'55'6'-OcCB(#203)	4.2	3.7	2.4	4.0	9.1	4.6	7.4	2.7	7.5	11	14	6.4
22'33'44'56'-OcCB(#195)	2.0	1.2	1.1	1.5	3.4	1.9	2.4	1.2	2.4	3.8	4.4	2.3
22'33'44'55'-OcCB(#194)	10	7.4	4.3	7.9	18	11	16	4.7	15	25	24	13
22'33'455'66'-NoCB(#208)	0.80	0.65	0.55	0.78	1.0	0.74	1.1	0.60	1.4	1.7	2.1	1.0
22'33'44'55'6'-NoCB(#206)	2.0	2.3	1.4	1.6	3.7	2.3	2.6	1.4	3.5	5.2	5.1	2.8
22'33'44'55'66'-DeCB(#209)	1.6	1.5	1.3	1.8	1.9	1.4	1.8	1.3	1.9	3.4	3.4	1.9
Total TrCBs	2.7	3.9	2.9	4.0	3.7	2.9	1.6	3.4	3.1	3.2	5.2	3.3
Total TeCBs	16	13	12	14	20	7.8	9.1	12	14	12	33	15
Total PeCBs	38	34	44	33	55	23	21	39	42	33	82	40
Total HxCBs	210	140	160	180	250	170	250	150	200	300	410	220
Total HpCBs	150	89	83	110	210	130	190	80	160	250	310	160
Total OcCBs	24	18	13	21	46	25	37	14	39	55	64	32
Total NoCBs	2.8	3.3	2.4	2.8	5.2	3.4	4.2	2.3	5.6	7.5	8.0	4.3
Total PCBs	450	300	320	370	600	370	520	300	470	660	920	480

Table 3 Concentrations of dominant PCB congener in the eleven blood samples (low concentration group, 30°C alkali digestion)

Congener	Blood sample No.											Mean
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
244'-TrCB(#28)	2.0	2.3	2.0	3.4	3.4	1.5	1.1	3.1	2.3	3.0	4.3	2.6
244'5'-TeCB(#74)	11	7.2	5.6	7.0	14	3.9	7.4	5.6	8.5	7.7	22	9.0
23'44'-TeCB(#66)	2.0	2.5	2.2	1.6	2.6	0.85	0.75	2.5	2.5	1.8	4.5	2.1
22'455'-PeCB(#101)	1.1	1.0	2.4	2.8	1.9	1.8	0.65	3.1	1.2	1.6	3.1	1.9
22'44'5'-PeCB(#99)	8.8	8.1	13	12	13	7.7	7.8	16	13	8.4	19	12
23'44'5'-PeCB(#118)	18	18	15	10	26	7.9	8.2	12	19	14	33	16
2344'5'-PeCB(#114)	1.1	0.79	0.59	0.85	1.3	0.50	1.3	0.45	1.4	1.6	2.4	1.1
233'44'-PeCB(#105)	3.8	3.5	3.9	2.3	5.4	2.1	1.6	3.3	3.9	2.6	6.9	3.6
22'355'6'-HxCB(#151)	1.0	0.74	1.7	1.1	1.3	1.5	0.75	2.0	1.1	0.90	2.8	1.3
22'34'55'-HxCB(#146)	15	10	11	14	17	12	20	12	16	20	30	16
22'44'55'-HxCB(#153)	95	67	70	82	120	73	120	73	99	100	180	98
22'344'5'-HxCB(#137)	2.5	1.8	2.0	2.6	2.8	2.5	4.7	1.8	2.9	5.1	5.6	3.1
22'33'45'-HxCB(#130)	2.7	1.1	1.9	2.9	2.7	2.7	2.5	1.7	1.9	4.8	4.6	2.7
233'4'5'6'-HxCB(#164)	21	13	13	18	23	16	26	13	19	34	41	22
22'344'5'-HxCB(#138)	40	28	37	37	48	31	43	34	40	40	74	41
23'44'55'-HxCB(#167)	3.2	2.5	1.6	1.5	3.6	1.4	2.2	1.4	3.1	2.6	5.3	2.6
233'44'5'-HxCB(#156)	7.8	5.1	4.2	7.0	8.4	12	22	3.8	10	56	16	14
233'44'5'-HxCB(#157)	1.8	1.2	0.9	1.6	2.2	3.1	5.7	0.9	2.6	15	3.6	3.5
22'33'55'6'-HpCB(#178)	6.2	4.6	4.0	6.0	9.1	5.5	8.3	4.1	7.5	7.5	15	7.0
22'344'56'-HpCB(#182)	25	18	18	22	45	26	32	21	30	25	56	29
22'344'5'6'-HpCB(#183)	5.6	3.5	4.9	4.8	9.2	5.2	5.6	4.8	6.4	4.6	12	6.0
22'33'4'56'-HpCB(#177)	6.0	3.2	4.3	5.9	7.6	5.7	5.9	4.6	4.4	5.8	12	5.9
22'33'455'-HpCB(#172)	3.6	2.1	1.7	2.6	4.6	3.3	5.1	1.6	3.8	7.3	6.0	3.8
22'344'55'-HpCB(#180)	75	44	33	52	96	61	100	33	82	120	130	75
22'33'44'5'-HpCB(#170)	23	12	10	17	24	21	31	10	21	48	38	23
233'44'55'-HpCB(#189)	1.2	0.74	0.44	1.0	1.6	2.3	3.6	0.74	2.4	10	2.3	2.4
22'33'55'66'-OcCB(#202)	2.2	2.1	1.6	2.2	4.3	2.6	3.8	1.7	3.5	3.5	5.7	3.0
22'33'4'55'6'-/22'33'455'6'-OcCBs(#201/198)	5.6	4.5	2.9	4.6	10	6.0	9.4	3.0	9.0	8.9	14	7.0
22'344'55'6'-OcCB(#203)	5.8	4.3	2.8	4.7	12	7.1	10	3.1	8.8	11	14	7.5
22'33'44'56'-OcCB(#195)	2.4	1.6	1.2	1.7	3.9	2.4	2.5	1.1	2.7	4.1	4.2	2.5
22'33'44'55'-OcCB(#194)	10	7.5	4.0	7.9	17	12	16	4.7	15	24	23	13
22'33'455'66'-NoCB(#208)	0.85	0.79	0.59	0.90	1.0	1.1	1.4	0.69	1.4	1.9	2.1	1.2
22'33'44'55'6'-NoCB(#206)	2.2	2.0	1.3	1.6	3.7	2.5	2.9	1.3	3.1	5.5	5.0	2.8
22'33'44'55'66'-DeCB(#209)	1.4	1.8	1.5	2.3	2.5	1.9	2.3	1.4	2.4	3.0	3.1	2.1
Total TrCBs	2.0	2.3	2.3	3.5	3.4	1.5	1.2	3.1	2.3	3.0	4.3	2.6
Total TeCBs	15	11	11	13	19	7.1	9.4	12	13	12	30	14
Total PeCBs	36	34	41	33	54	23	21	40	42	32	71	39
Total HxCBs	190	130	150	170	230	160	250	150	200	280	360	210
Total HpCBs	150	90	80	110	200	130	190	80	160	230	270	150
Total OcCBs	26	20	13	22	48	31	42	14	40	53	62	34
Total NoCBs	3.4	3.1	2.4	3.0	5.4	4.0	4.7	2.4	5.3	8.0	7.8	4.5
Total PCBs	420	290	300	360	570	360	520	300	460	620	850	460

Table 4 Concentrations of dominant PCB congener in the eleven blood samples (high concentration group, 80°C alkali digestion)

Congener	Blood sample No.											Mean
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
244'-TrCB(#28)	4.2	10	23	12	8.3	20	5.6	13	8.8	3.3	17	11
244'5'-TeCB(#74)	29	51	95	130	110	170	70	220	92	56	150	110
23'44'-TeCB(#66)	4.1	21	28	9.3	8.7	19	8.2	17	11	2.6	20	13
22'455'-PeCB(#101)	3.0	3.1	12	4.0	7.7	7.4	5.1	3.9	4.4	5.9	12	6.2
22'44'5'-PeCB(#99)	79	80	69	50	65	90	96	190	78	35	150	89
23'44'5'-PeCB(#118)	43	130	180	140	110	180	120	330	140	53	510	170
2344'5'-PeCB(#114)	7.8	13	9.5	11	11	11	24	17	7.4	5.9	31	13
233'44'-PeCB(#105)	8.9	28	41	20	22	42	22	59	26	7.7	84	33
22'355'6'-HxCB(#151)	2.8	2.5	6.8	2.2	7.5	4.3	5.2	3.3	4.9	2.9	6.7	4.5
22'34'55'-HxCB(#146)	140	100	110	110	97	86	150	150	120	93	180	120
22'44'55'-HxCB(#153)	800	800	590	620	530	530	910	1400	900	450	1000	780
22'344'5'-HxCB(#137)	40	29	16	16	19	17	48	40	17	11	69	29
22'33'45'-HxCB(#130)	20	8.5	19	17	17	16	24	16	13	15	55	20
233'4'5'6'-HxCB(#164)	210	150	140	160	140	130	240	250	170	130	310	190
22'344'5'-HxCB(#138)	380	350	240	210	250	280	490	820	360	150	680	380
23'44'55'-HxCB(#167)	10	24	23	22	16	20	40	57	26	16	69	29
233'44'5'-HxCB(#156)	190	110	46	52	53	43	240	100	46	40	200	100
233'44'5'-HxCB(#157)	50	28	11	13	13	9.6	67	25	10.5	9.9	44	25
22'33'55'6'-HpCB(#178)	64	62	44	51	36	33	62	63	58	40	34	50
22'344'56'-HpCB(#182)	270	260	210	220	150	160	260	260	300	170	150	220
22'344'5'6'-HpCB(#183)	53	60	35	34	28	33	57	91	70	23	36	47
22'33'4'56'-HpCB(#177)	55	34	49	45	37	42	59	51	55	38	55	47
22'33'455'-HpCB(#172)	38	33	19	22	17	16	42	39	27	18	23	27
22'344'55'-HpCB(#180)	640	610	420	470	320	310	810	900	670	390	380	540
22'33'44'5'-HpCB(#170)	240	190	110	130	100	90	280	260	170	98	160	170
233'44'55'-HpCB(#189)	28	17	5.8	7.0	5.3	4.8	33	12	7.0	6.1	8.6	12
22'33'55'66'-OcCB(#202)	24	25	17	18	12	12	22	23	18	16	13	18
22'33'4'55'6'-/22'33'455'6'-OcCBs(#201/198)	52	54	36	38	26	24	55	52	44	33	26	40
22'344'55'6'-OcCB(#203)	56	56	33	34	24	27	55	55	39	26	21	39
22'33'44'56'-OcCB(#195)	21	22	12	13	9.8	10	25	21	20	8.7	7.8	15
22'33'44'55'-OcCB(#194)	100	100	57	64	47	43	110	100	78	60	37	73
22'33'455'66'-NoCB(#208)	5.9	6.5	4.8	4.6	4.1	2.8	6.3	7.8	3.0	3.2	3.2	4.7
22'33'44'55'6'-NoCB(#206)	16	17	11	11	9.8	8.6	21	21	10	7.2	5.5	13
22'33'44'55'66'-DeCB(#209)	6.5	8.9	7.7	7.6	7.0	5.5	8.8	11	4.2	4.8	3.8	6.9
Total TrCBs	4.2	10	23	13	8.6	21	5.8	13	9.1	3.8	18	12
Total TeCBs	36	77	140	140	120	200	88	240	110	64	190	130
Total PeCBs	150	270	340	240	230	350	290	620	270	120	830	340
Total HxCBs	1900	1600	1200	1200	1200	1100	2200	2900	1700	930	2700	1700
Total HpCBs	1400	1300	900	990	710	690	1600	1700	1400	790	850	1100
Total OcCBs	260	270	160	170	120	120	280	260	210	150	110	190
Total NoCBs	25	27	18	17	16	13	30	32	15	12	10	19
Total PCBs	3700	3600	2800	2800	2400	2500	4500	5700	3700	2000	4700	3500

Table 5 Concentrations of dominant PCB congener in the eleven blood samples (high concentration group, 30°C alkali digestion)

Congener	Blood sample No.											Mean
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
244'-TrCB(#28)	4.2	10	20	10	6.0	19	5.1	13	10	2.3	16	10
244'5'-TeCB(#74)	29	50	94	120	94	160	71	200	91	51	150	100
23'44'-TeCB(#66)	4.0	21	28	8.5	8.0	18	7.5	16	11	2.1	18	13
22'455'-PeCB(#101)	3.2	2.9	12	3.8	7.1	7.1	4.7	3.4	4.5	5.8	12	6.0
22'44'5'-PeCB(#99)	82	82	68	49	58	82	96	180	79	33	150	87
23'44'5'-PeCB(#118)	42	120	180	130	97	160	120	300	140	50	520	170
2344'5'-PeCB(#114)	6.6	11	9.2	10	9.3	9.3	24	16	6.6	5.5	29	12
233'44'-PeCB(#105)	8.4	27	41	19	19	39	22	59	25	7.0	83	32
22'355'6'-HxCB(#151)	2.8	2.8	7.3	2.3	7.9	4.4	5.8	3.5	4.6	2.8	7.5	4.7
22'34'55'-HxCB(#146)	140	100	110	120	94	85	160	140	110	83	180	120
22'44'55'-HxCB(#153)	800	790	580	600	490	510	890	1400	890	430	1000	770
22'344'5'-HxCB(#137)	36	26	15	14	16	16	43	34	15	10	68	27
22'33'45'-HxCB(#130)	19	7	17	15	15	16	22	15	12	13	52	18
233'4'5'6'-HxCB(#164)	190	130	130	140	120	110	220	220	160	110	310	170
22'344'5'-HxCB(#138)	330	310	220	190	200	240	420	720	330	130	670	340
23'44'55'-HxCB(#167)	9.3	23	24	22	16	16	34	50	24	13	62	27
233'44'5'-HxCB(#156)	190	110	43	48	46	37	210	99	43	36	180	95
233'44'5'-HxCB(#157)	48	25	10	11	11	8.5	61	22	9.4	8.0	41	23
22'33'55'6'-HpCB(#178)	62	62	43	48	33	32	62	63	55	39	34	48
22'344'56'-HpCB(#182)	280	260	200	210	150	160	270	270	310	170	150	220
22'344'5'6'-HpCB(#183)	53	61	36	33	27	34	64	91	71	21	38	48
22'33'4'56'-HpCB(#177)	47	28	41	35	31	33	53	44	46	31	42	39
22'33'455'-HpCB(#172)	35	31	18	20	15	14	39	35	27	16	21	24
22'344'55'-HpCB(#180)	620	590	400	440	290	280	770	850	650	370	370	510
22'33'44'5'-HpCB(#170)	220	180	100	120	85	80	260	250	170	91	150	160
233'44'55'-HpCB(#189)	28	17	5.9	5.8	4.9	3.7	30	12	7.0	5.4	7.9	12
22'33'55'66'-OcCB(#202)	24	26	16	18	13	12	22	24	22	18	11	19
22'33'4'55'6'-/22'33'455'6'-OcCBs(#201/198)	54	58	40	41	28	26	68	55	54	35	25	44
22'344'55'6'-OcCB(#203)	64	62	38	42	25	27	67	60	55	32	23	45
22'33'44'56'-OcCB(#195)	25	23	13	13	9.0	11	27	22	22	8.7	8.4	16
22'33'44'55'-OcCB(#194)	98	99	58	63	42	40	110	92	73	54	38	70
22'33'455'66'-NoCB(#208)	6.1	6.4	5.3	5.1	4.0	3.4	7.3	7.8	3.5	3.8	3.1	5.1
22'33'44'55'6'-NoCB(#206)	15	16	10	10	8.8	8.5	20	19	11	7.9	6.8	12
22'33'44'55'66'-DeCB(#209)	6.9	13	7.7	8.0	6.9	5.7	9.1	13	5.4	5.0	3.6	7.6
Total TrCBs	4.3	10	20	9.8	6.2	19	5.1	13	10	2.4	16	10
Total TeCBs	37	77	140	140	108	190	83	230	107	59	190	120
Total PeCBs	150	260	340	230	210	320	280	580	270	110	830	330
Total HxCBs	1800	1500	1200	1200	1000	1100	2100	2700	1600	850	2600	1600
Total HpCBs	1400	1200	850	900	640	640	1600	1600	1300	740	820	1100
Total OcCBs	270	270	170	180	120	120	310	260	230	150	110	200
Total NoCBs	24	26	18	17	14	14	31	31	16	13	11	20
Total PCBs	3600	3400	2700	2700	2100	2400	4300	5500	3600	1900	4600	3400

Table 6 PCB concentration ratio of 30°C alkali digestion experiment to 80°C alkali digestion experiment in both of low and high concentration group

Congener	Concentration ratio of 30°C digestion to 80°C digestion					
	Low PCB concentration group (n=11)			High PCB concentration group (n=11)		
	min	max	mean	min	max	mean
23'44'5-PeCB (#118)	0.90	1.02	0.96	0.89	1.02	1.00
22'44'55'-HxCB (#153)	0.90	1.00	0.98	0.92	1.00	0.99
233'44'5-HxCB (#156)	0.82	1.00	0.93	0.85	1.00	0.95
Total TrCBs	0.52	0.94	0.79	0.62	1.12	0.86
Total TeCBs	0.90	1.04	0.93	0.90	1.01	0.92
Total PeCBs	0.87	1.02	0.96	0.91	1.00	0.97
Total HxCBs	0.88	1.00	0.96	0.83	1.00	0.94
Total HpCBs	0.87	1.01	0.94	0.90	1.00	1.00
Total OcCBs	0.96	1.22	1.05	1.00	1.11	1.05
Total NoCBs	0.95	1.18	1.04	0.92	1.10	1.01
Total PCBs	0.92	1.00	0.96	0.88	0.98	0.97

症診断項目である血液中 PCB 濃度に与える影響は極めて小さいと考えられる。

血液中 PCB の定量結果を Table 2~5 に示した。Table 2 は、従来法で血液中 PCB 濃度が 1 ppb 未満の比較的低濃度を示した血液試料 11 例 (No. 1~11) の分析結果である。Table 3 は、この低濃度 11 例の血液を別途量り取り、低温アルカリ分解法で再分析した結果である。同様に Table 4 は、従来法で血液中 PCB 濃度が 2 ppb 以上の高濃度を示した 11 例 (No. 12~22) の分析結果を、Table 5 は同じ試料を低温アルカリ分解法で分析した結果を示す。表には、定量対象の PCB68 種異性体のうち、全被験者で全血重量あたり 1 pg/g 以上の濃度を示した 34 種の主要異性体の濃度を記載した。結果として、異なるアルカリ分解温度で分析を行った場合の各 PCB 同族体 (3~10 塩素化物) の検出傾向は、低濃度と高濃度の両群で一致し、6 塩素化体の濃度が最も高かった。

両手法間の定量値の一致性を確認するため Table 2~5 の結果をもとに、従来法 (80°C) で得られた濃度値に対する低温アルカリ分解法 (30°C) 濃度値の比を算出した (Table 6)。低濃度群、高濃度群ともに、低温アルカリ分解法では従来法に比べて 3 塩素化物の定量値がやや低くなり、抽出効率の低下が認められた。しかし 3 塩素化物の未抽出量は、油症診断項目の Total PCBs 濃度に与える影響としては小さく、Total PCBs 濃度比は、低濃度群で平均 0.96 (範囲 0.92~1.00)、

高濃度群では 0.97 (範囲 0.88~0.98) であった。また、同じく油症診断項目である「血中 PCB パターン」の判定に用いられる指標異性体の PCB118, PCB153 及び PCB156 の各濃度は、低濃度群、高濃度群ともに両手法間でよく一致していた。

総 括

低温アルカリ分解法を用いて血中 PCB の異性体分離分析を行った。油症診断の指標となる Total PCBs 濃度、2,3',4,4',5-pentaCB (PCB118) 濃度、2,2',4,4',5,5'-hexaCB (PCB153) 濃度及び 2,3,3',4,4',5-hexaCB (PCB156) 濃度は、血液中の濃度の高低にかかわらず、従来法を用いた場合とほぼ同等であった。低温アルカリ分解法は、油症検診受診者の血液中の PCB 測定に適用可能と考えられた。近年、油症検診の受診者数が増大する傾向にあり、従来法に比べて分析操作の効率性に優れる本法は有用と考えられる。

謝 辞

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

参 考 文 献

- 1) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人: 油症患者母乳及び血液中の全 PCB 異性体の分析,

- 福岡医誌 90 : 202-209, 1999.
- 2) 久保記久子, 赤木浩一, 畑野和広 : GC/MS/MS による血液中のポリ塩化ビフェニルの分析, 福岡市保健環境研究所報 31 : 95-98, 2005.
 - 3) 堀就英, 安武大輔, 芦塚由紀, 高橋浩司, 梶原淳陸, 平田輝昭, 内博史, 古江増隆 : 福岡県油症検診 (2007-2010 年度) 受診者における血液中 PCB 濃度と傾向, 福岡医誌 102 : 134-139, 2011.
 - 4) 松村千里, 鶴川正寛, 中野武, 江崎達哉, 大橋眞 : キャピラリーカラム (HT8-PCB) による PCB 全異性体の溶出順位, 環境化学 12 : 855-865, 2002.
 - 5) 堀就英, 飛石和夫, 芦塚由紀, 中川礼子, 戸高尊, 平川博仙, 飯田隆雄 : ゲル浸透クロマトグラフィ (GPC) 及び高分解能ガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析計 (HRGC/HRMS) による血中 PCB 異性体別分析, 福岡医誌 96 : 220-226, 2005.
 - 6) 堀就英, 安武大輔, 戸高尊, 平川博仙, 井上英, 梶原淳陸, 中川礼子, 芦塚由紀, 飯田隆雄, 吉村健清 : 福岡県油症検診 (2006 年度) 受診者における血液 PCB 濃度と性状, 福岡医誌 98 : 176-181, 2007.

(Received for publication March 26, 2013)

2,2',3,4',5,5'-六塩素化ビフェニル(CB146)の *in vitro* 代謝の動物種差¹⁾中村学園大学栄養科学部 食品衛生学研究室²⁾第一薬科大学 分析化学教室³⁾徳島文理大学香川薬学部 薬物動態学講座⁴⁾北海道医療大学薬学部 衛生薬学講座太田千穂¹⁾, 原口浩一²⁾, 加藤善久³⁾, 遠藤哲也⁴⁾, 古賀信幸¹⁾**Species Difference in the Metabolism of 2, 2', 3, 4', 5, 5'-Hexachlorobiphenyl (CB146) by Animal and Human Liver Microsomes**Chiho OHTA¹⁾, Koichi HARAGUCHI²⁾, Yoshihisa KATO³⁾, Tetsuya ENDO⁴⁾ and Nobuyuki KOGA¹⁾¹⁾*Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University, 5-7-1, Befu, Johnan-ku, Fukuoka 814-0198*²⁾*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka, 815-8511*³⁾*Kagawa School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 1314-1 Shido, Sanuki, Kagawa 769-2193*⁴⁾*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, 1757 Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293*

Abstract The *in vitro* metabolism of 2, 2', 3, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (hexaCB) (CB146) was examined using liver microsomes of rats, guinea pigs, hamsters and human. Untreated animal livers produced one metabolite (M-2) in rats, three metabolites (M-1, M-2 and M-3) in guinea pigs and no metabolite in hamsters. Pretreatment of phenobarbital (PB) resulted in a marked increase of M-1 in three animals and of M-2 in guinea pigs. In contrast, pretreatment of 3-methylcholanthrene showed a significant increase of M-3 in guinea pigs and a decrease of M-2 in rats. Human liver microsomes prepared from nine Caucasians mainly formed M-2 and M-3 at a ratio of 2 : 1 and two individuals also formed one more metabolite M-1. The formation of M-1 was significantly correlated with CYP2B6 activity. By comparison of the GC-MS data of three metabolites with synthesized authentic samples, M-1 and M-2 were determined to be 3'-hydroxy (OH)-CB146 and 4-OH-CB146, respectively. However, M-3 is unclear at present except the fact that it is OH-hexaCB. These results suggest that 3'-OH-CB146 is formed by PB-inducible cytochrome P450 (CYP2B enzymes) in animal and human livers and 4-OH-CB146 is a major metabolite in rat and human liver.

Key words : CB146 · Metabolism · Cytochrome P450 · Rat · Human

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs) は周知の通り、世界的な環境汚染物質の1つである。PCBは

脂溶性が極めて高いことから、生体内に取り込まれた後、脂肪組織や肝へ蓄積されるが、現在、PCB異性体として、2,2',4,4',5,5'-hexachlor-

Corresponding author : Nobuyuki KOGA
Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University, 5-7-1 Befu, Johnan-ku, Fukuoka 814-0198, Japan
Tel : +81-92-851-5415
E-mail : nobuyuki@nakamura-u.ac.jp

obiphenyl (hexaCB) (CB153), 2,2',3,4,4',5'-hexaCB (CB138), 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (heptaCB) (CB180), 2,2',3,3',4,4',5'-heptaCB (CB170) および 2,3,3',4,4',5'-hexaCB (CB156) が、哺乳動物の血液、脂肪組織および肝から高濃度で検出されている。これらはいずれも置換塩素数が6個以上で、2,4,5-三塩素置換ベンゼンあるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有するものばかりである^{1)~7)}。また、血液中からは PCB 異性体だけではなく、PCB 代謝物の 4-hydroxy (OH)-2,2',3,4',5,5',6-heptaCB (CB187), 4-OH-2,2',3,4',5,5'-hexaCB (CB146), 4-OH-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (CB107) および 3-OH-CB153 なども比較的高濃度で検出されている^{1)~6)}。PCB 異性体のうち、置換塩素数が5個以下のものやメタ-パラ位に水素が置換されたものは、肝小胞体に局在するチトクロム P450 (P450) により、比較的容易に水酸化され、胆汁を介して糞中へと排泄される⁸⁾⁹⁾。しかしながら、前述のような代謝物の場合、依然高い脂溶性を維持しているため長期にわたり残留しているものと思われる。

P450 による PCB の代謝は、芳香環が直接水酸化される場合と、エポキシド中間体を經由する場合の大きく2つの水酸化機構で進行することが知られている⁸⁾⁹⁾。後者の場合、塩素原子が NIH 転位を伴うことがあり、親 PCB 異性体として数種類が考えられている。例えば、ヒト血中で最も多く検出される 4-OH-CB187 の場合、CB187 と 2,2',3,4,4',5',6-heptaCB (CB183) が考えられる。当研究室では、CB187 のラットとモルモット肝ミクロゾーム (Ms) による代謝を調べ、両動物ともに主代謝物ではないが 4-OH-CB187 を生成することを報告した¹⁰⁾。次に、ヒト血中で2番目に多く検出される 4-OH-CB146 の場合、親 PCB 異性体として、CB146, CB138 および CB153 が考えられる (Fig. 1)。CB138 あるいは CB153 からは、それぞれ 4,5-あるいは 3,4-エポキシド中間体を經由し、さらに4位の塩素原子が NIH シフトすることによって生成されるが、CB146 からは、4位の直接水酸化によって生成される。これまで当研究室では、CB138 の *in vitro* 代謝を、ラット、モルモットおよびハムスター肝 Ms を用いて調べたが、いずれの動物からも 4-OH-CB146 は生成

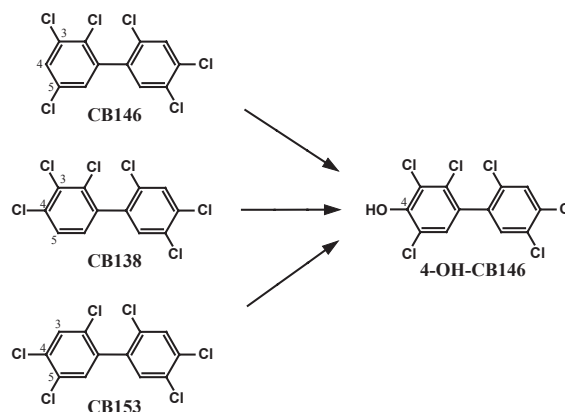


Fig. 1 The postulated parent PCB congeners of 4-OH-CB146

されなかった¹¹⁾。同様に、イヌ肝 Ms¹²⁾ およびモルモット肝 Ms¹³⁾ を用いて CB153 の *in vitro* 代謝を調べたが、4-OH-CB146 は生成されなかった。一方、CB146 の代謝については全く報告が見あたらない。

そこで本研究では、ラット、モルモット、ハムスターおよびヒト肝 Ms を用いて CB146 の *in vitro* 代謝における動物種差を調べた。また、代謝に関与する P450 分子種を明らかにするため、代表的な P450 誘導剤として知られている phenobarbital (PB) および 3-methylcholanthrene (MC) で前処理した動物肝 Ms でも同様に検討した。

実験方法

1. 実験材料

(1) CB146 の合成

CB146 は Cadogan の方法¹⁴⁾ で合成した。すなわち、2,4,5-trichloroaniline 1.0 g および 1,2,4-trichlorobenzene 3.0 g を tetrachloroethylene 10 ml で溶解し、さらに isopentyl nitrite 0.5 ml を加えて、110°C で 24 時間反応させた。反応物はアルミナカラム (100g, Merck) およびシリカゲルカラム (65 g, Merck) で部分精製した後、HPLC にて精製した。HPLC 条件は次の通りである。分取用カラム, ODS カラム (250 × 20 mm i.d., 5 μm, YMC 製); プレカラム, ODS プレカラム (50 × 20 mm i.d., YMC 製); 移動相, acetonitrile; 流速, 4 ml/min; 検出波長, 254 nm。なお、CB146 の化学構造は¹H-NMR および GC-MS により決定した。得られた CB146 の純度は、96.0%であった。

CB146 : $^1\text{H-NMR } \delta$ (ppm) : 7.162 (1H, d, J=2.01Hz, 4-H), 7.349 (1H, s, 3'-H), 7.558 (1H, d, J=2.56Hz, 6-H), 7.613 (1H, s, 6'-H). MS (EI) m/z (relative intensity, %) : 358 (100) $[\text{M}^+]$, 360 (188) $[\text{M}^+ + 2]$, 362 (153) $[\text{M}^+ + 4]$, 364 (66) $[\text{M}^+ + 6]$, 366 (21) $[\text{M}^+ + 8]$, 323 (28) $[\text{M}^+ - \text{Cl}]$, 288 (74) $[\text{M}^+ - \text{Cl}_2]$.

(2) 代謝物の合成

4-Methoxy (MeO)-CB146 および 3-MeO-CB153 は Hutzinger らの方法¹⁵⁾を若干改変して合成した. すなわち, 2,4,5-trichloroaniline 1.0 g を濃塩酸で塩酸塩とした後, 亜硝酸ナトリウム飽和水溶液を滴下し, これに acetonitrile で溶解した 2,3,6-trichlorophenol (Lancaster, UK) 2.0 g を加えて, 110°C, 2 時間反応させた. その後, chloroform にて抽出し, 次に 2M 水酸化ナトリウムで逆抽出を行い, 濃塩酸で弱酸性とした後, 再び chloroform で抽出した. 抽出物はアルミナカラム (100g, Merck) で部分精製した後, 上記と同様な条件で HPLC を行って 4-OH-CB146 と 3-OH-CB153 を分離精製した. 最後に diazomethane でメチル化し, これを GC-MS に供した.

6-MeO-CB146 は, 既報¹⁰⁾に従い, 合成した. また, 3'-MeO-CB146 および 4'-MeO-2,2',3,3',5,5'-hexaCB (CB133) は Cadogan の方法¹⁴⁾で合成した. すなわち, 2,3,5-trichloroaniline 1.0 g および 2,3,6-trichloroanisole (Lancaster, UK) 2.0 g を tetrachloroethylene 10 ml で溶解し, さらに isopentyl nitrite 0.5 ml を加えて, 110°C で 24 時間反応させた. 反応液は, 蒸発乾固させた後, シリカゲルカラム (65g, Merck) で部分精製し, HPLC にて精製した. 得られた予想化合物の分析は, GC-ECD および GC-MS にて行った.

GC-ECD の条件は次の通りである. 分析機器, ECD 付 HP5890 Series II ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製); カラム, DB-1 フェーズドシリカキャピラリーカラム (30 m \times 0.25 mm i. d., 0.25 μm 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 230°C; 注入口温度, 250°C; 検出器温度, 250°C; キャリアーガス, N_2 (1 ml/min).

4-MeO-CB146 : MS (EI) m/z (relative intensity) : 388 (100) $[\text{M}^+]$, 390 (188) $[\text{M}^+ + 2]$, 392 (149) $[\text{M}^+ + 4]$, 394 (62) $[\text{M}^+ + 6]$, 396 (16) $[\text{M}^+$

+ 8], 373 (44) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$, 345 (36) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3]$, 275 (46) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3\text{Cl}_2]$.

3-MeO-CB153 : MS (EI) m/z (relative intensity) 388 (100) $[\text{M}^+]$, 390 (193) $[\text{M}^+ + 2]$, 392 (147) $[\text{M}^+ + 4]$, 394 (68) $[\text{M}^+ + 6]$, 396 (17) $[\text{M}^+ + 8]$, 373 (7) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$, 345 (45) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3]$, 338 (13) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{Cl}]$, 275 (42) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3\text{Cl}_2]$.

6-MeO-CB146 : MS (EI) m/z (relative intensity) 388 (100) $[\text{M}^+]$, 390 (193) $[\text{M}^+ + 2]$, 392 (156) $[\text{M}^+ + 4]$, 394 (86) $[\text{M}^+ + 6]$, 396 (16) $[\text{M}^+ + 8]$, 338 (134) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{Cl}]$, 318 (29) $[\text{M}^+ - \text{Cl}_2]$, 275 (39) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3\text{Cl}_2]$.

3'-MeO-CB146 : MS (EI) m/z (relative intensity) 388 (100) $[\text{M}^+]$, 390 (198) $[\text{M}^+ + 2]$, 392 (156) $[\text{M}^+ + 4]$, 394 (69) $[\text{M}^+ + 6]$, 396 (17) $[\text{M}^+ + 8]$, 373 (8) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$, 345 (37) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3]$, 338 (12) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{Cl}]$, 275 (37) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3\text{Cl}_2]$.

4'-MeO-CB133 : MS (EI) m/z (relative intensity) 388 (100) $[\text{M}^+]$, 390 (190) $[\text{M}^+ + 2]$, 392 (142) $[\text{M}^+ + 4]$, 394 (63) $[\text{M}^+ + 6]$, 396 (14) $[\text{M}^+ + 8]$, 373 (36) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$, 345 (33) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3]$, 275 (40) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3\text{Cl}_2]$.

(3) 実験動物の薬物処理

雄性の Hartley 系モルモット (体重約 280 g), Wistar 系ラット (体重約 260 g) および Golden Syrian 系ハムスター (体重約 90 g) を, それぞれ未処理群, PB 前処理群および MC 前処理群の 3 群に分け, 1 群 4 匹とした. PB-Na 塩は生理食塩水に溶解し 80 mg/kg/day の用量で, 一方, MC はコーン油に溶解し 20 mg/kg/day の用量で, いずれも 3 日間腹腔内に投与した. 最終投与日の翌日に実験動物を屠殺して, 肝を摘出し, 常法により肝 Ms を調製した. なお, これらの動物実験は中村学園大学の実験動物委員会の承認を得た上で, 「中村学園大学 (含む短期大学部) 動物実験に関する規定」を遵守し実施した.

(4) ヒト肝マイクロゾーム

ヒト肝 Ms は, 白人男性 5 名 (HG32, HG64, HG74, HH74, HH81) および白人女性 4 名 (HH77, HH91, HH101, HK37) から個人別に調製されたものを BD Gentest 社 (Woburn, MA, USA) より購入した. 相関係数を算出するのに必要なヒト肝 Ms 中の各 P450 分子種の酵素活性は, 添付書

類のデータを使用した。

2. 肝 Ms による代謝

動物肝 Ms による CB146 の代謝は既報¹⁰⁾に準じて行った。すなわち、40 μ M CB146 を NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ および動物肝 Ms (1 mg protein) を 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計 1 ml として、37°C で 60 min インキュベート後、代謝物を chloroform-methanol (2:1) 1 ml と n-hexane 3 ml で 3 回ずつ抽出した。ヒト肝 Ms の場合には、スケールをすべて半量とし、同様に行った。抽出液は diazomethane でメチル化後、GC-ECD または GC-MS に付した。代謝物の定量は、CB146 の検量線を用いて行った。

3. その他

肝 Ms のタンパク質の定量は、Lowry らの方法¹⁶⁾に従って行った。なお、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

合成標品および代謝物の分子量は、GC-MS 2000 (島津製作所製) を用いて、EI モードで測定した。GC-MS 分析条件は次の通りである。カラム、DB-1 フューズドシリカキャピラリーカラム (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 70°C (1.5 min) - 20°C/min - 230°C (0.5 min) - 4°C/min - 280°C

(5 min); 注入口温度, 250°C; キャリアーガス, He (1 ml/min)。

¹H-NMR スペクトルの測定は日本電子製の JEOL GSX-500 (500 MHz) を用いて行った。試料は、chloroform-*d* に溶解し、tetramethylsilane を内部標準物質として用いた。

実験結果

1. 実験動物肝 Ms による代謝

ラット、モルモットおよびハムスターによる CB146 代謝を調べた。Fig. 2 には、未処理動物肝 Ms により生成された CB146 代謝物 (メチル化体) のガスクロマトグラムを示す。未処理 Ms の場合、ラットで 1 種類の代謝物 (M-2) が保持時間 16.75 min に、また、モルモットで 3 種類の代謝物 (M-1, M-2 および M-3) が保持時間 16.1 min, 16.75 min および 17.23 min に検出された。なお、ハムスターでは代謝物ピークは検出されなかった。

次に、各種動物肝 Ms による CB146 代謝物を定量した (Table 1)。代謝物の定量は CB146 未変化体の検量線を用いて行った。その結果、まず未処理ラット肝 Ms における M-2 の生成活性は 24.2 pmol/hr/mg protein であった。また、未処理モルモット肝 Ms における M-1, M-2 および M-3 の生成活性は、それぞれ 28.2, 1.3 および 4.7 pmol/hr/mg protein であり、M-1 が主代謝物であった。次に、PB 前処理した肝 Ms では、ラットの場合、M-1 が新たに生成され、その生成活性

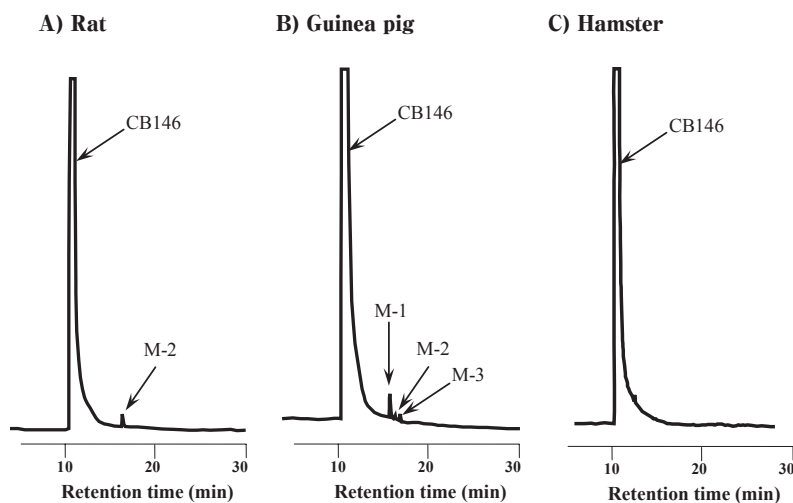


Fig. 2 Gas chromatograms of the methylated derivatives of CB146 Metabolites formed by liver microsomes from rat (A), guinea pig (B) and hamster (C).

Table 1 Effects of P450 inducers on CB146 metabolism by liver microsomes of rats, guinea pigs and hamsters

Treatment	Metabolite formed (pmol/hr/mg protein)		
	M-1	M-2	M-3
Rat			
Untreated	N. D.	24.2 ± 2.3 (1.0)	N. D.
PB-treated	51.7 ± 8.6*	28.0 ± 3.4 (1.2)	N. D.
MC-treated	N. D.	12.7 ± 5.6* (0.5)	N. D.
Guinea pig			
Untreated	28.2 ± 5.4 (1.0)	1.3 ± 1.6 (1.0)	4.7 ± 5.8 (1.0)
PB-treated	117.0 ± 13.2* (4.2)	7.1 ± 1.8* (5.6)	N. D.
MC-treated	26.1 ± 14.6 (0.9)	6.4 ± 5.2 (5.1)	18.2 ± 3.2* (3.9)
Hamster			
Untreated	N. D.	N. D.	N. D.
PB-treated	31.9 ± 5.5*	N. D.	N. D.
MC-treated	N. D.	N. D.	N. D.

N.D., not detected.

Each value represents mean ± S.D. of four animals and those in parentheses are the relative ratio of untreated animals.

*Significantly different from untreated animals ($p < 0.05$).

は 51.7 pmol/hr/mg protein と顕著であった。なお、M-2 は 1.2 倍に増加したに過ぎなかった。モルモットの場合、M-1 および M-2 は、それぞれ未処理の 4.2 倍および 5.2 倍に有意に増加したが、M-3 は全く検出されなかった。ハムスターの場合には、M-1 のみが新たに検出され、その生成活性は 31.9 pmol/hr/mg protein であった。一方、MC 前処理肝 Ms では、ラットの場合、M-2 のみが生成されたが未処理の約 50% に有意に減少した。モルモットの場合、M-2 と M-3 がそれぞれ未処理の 5.1 倍と 3.8 倍に増加したが、M-1 はほとんど変化なかった。また、ハムスターの場合、未処理と同様、代謝物は全く検出されなかった。

2. ヒト肝 Ms による代謝

9 名のヒト肝 Ms による CB146 代謝を個人別に調べた。その結果、Fig. 3 に示すように、すべてのヒト肝 Ms に共通して、M-2 が最も多く生成された。次いで 1 名を除き、M-3 が生成された。また、男性 2 名 (HG63, HH74) の肝 Ms では、M-2 と M-3 に加え、M-1 の生成も観察された。

さらに、3 種類の代謝物と主要な P450 活性との相関係数を算出したところ、M-1 の生成が総 P450 量および CYP2B6 と有意に相関することが認められた (Table 2)。なお、M-2 および M-3 の生成は、どの P450 分子種とも全く相関は認められなかった。さらに、性差を調べるために、男性 5 名と女性 4 名の平均を比較したところ、M-2 と M-3 の生成活性は、男性ではそれぞれ 8.0 ± 2.3 と 4.2 ± 3.3 pmol/hr/mg protein、女性ではそれぞれ 8.9 ± 1.7 と 4.0 ± 1.0 pmol/hr/mg protein であり、ほとんど違いは認められなかった。

3. 代謝物の化学構造

CB146 代謝物の化学構造を決定するため、100 倍量のスケール (100 ml) で代謝反応を行い、さらに代謝物をメチル化し、これを GC-MS に供した。その結果、M-1、M-2 および M-3 のメチル誘導体は、いずれも分子量 388 を有することから、3 種とも OH 体であることが明らかとなった (Table 3)。また、M-1 (メチル化体) では、フラグメントイオン $[M^+ - 43]$ (m/z 345) が比較的多

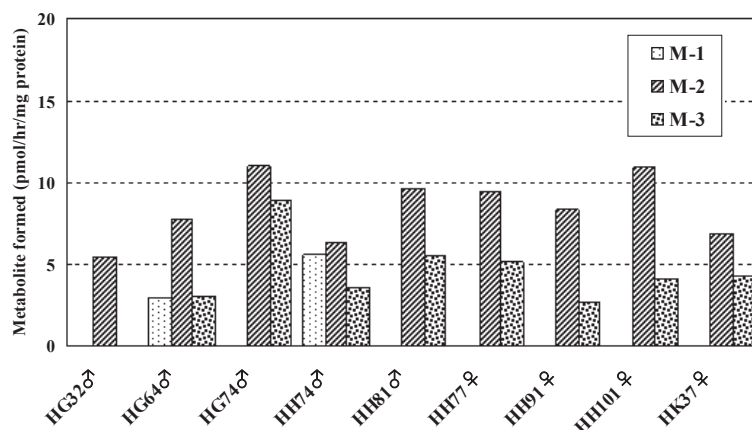


Fig. 3 Metabolism of CB146 by liver microsomes from nine human individuals

Table 2 Correlation coefficient between human P450 activities and three CB146 metabolites

Isoform	M-1	M-2	M-3
Total P450	0.747*	-0.378	-0.227
CYP1A2	-0.114	-0.037	0.020
CYP2A6	0.094	0.095	-0.096
CYP2B6	0.974**	-0.358	-0.158
CYP2C8	0.653	0.035	0.153
CYP2C9	0.290	0.252	0.167
CYP2C19	0.329	-0.105	0.475
CYP2D6	0.044	0.132	0.285
CYP2E1	0.587	-0.348	-0.345
CYP3A4	0.514	0.081	0.062

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Table 3 Mass spectral data and retention times of the methylated derivatives of three CB146 metabolites and its synthetic compounds

Compound	Molecular weight	Mass spectral data				Retention time (min) in GC-ECD
		[M ⁺]	[M ⁺ -15]	[M ⁺ -43]	[M ⁺ -50]	
M-1	388	100	9	26	10	16.11
M-2	388	100	32	22	-	16.75
M-3	388	100	-	-	-	17.23
6-MeO-CB146	388	100	-	-	134	14.14
3'-MeO-CB146	388	100	8	37	12	16.11
4'-MeO-CB133	388	100	36	33	8	16.27
3-MeO-CB153	388	100	7	45	13	16.67
4-MeO-CB146	388	100	44	36	8	16.75

-, not detected. CB133 (2, 2', 3, 3', 5, 5'-hexaCB); CB153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB).

く検出されたのに対し、M-2 (メチル化体) ではフラグメントイオン [M^+-15] (m/z 373) が多く検出された。これらの結果から、M-1 はメタ位すなわち 3 (3') 位あるいは 5 (5') 位に、また M-2 はパラ位すなわち 4 位あるいは 4' 位に OH 基を有することが示唆された。また、各代謝物の GC 保持時間およびマススペクトルを、別途合成した標準品と比較したところ、M-1 と M-2 のメチル化体が 3'-MeO-CB146 および 4-MeO-CB146 とほぼ一致したことから、M-1 と M-2 は、それぞれ 3'-OH-CB146 と 4-OH-CB146 であることが示唆された。なお、M-3 については、塩素 6 個の同位体ピークは検出されたものの明確なフラグメントイオンを検出するには至らなかったことから、現在のところ不明である。

考 察

ヒト血液中で 2 番目に多く検出される PCB 代謝物である 4-OH-CB146 の親 PCB 異性体を明らかにするため、ラット、モルモット、ハムスターおよびヒト肝 Ms による CB146 の代謝を調べた。その結果、本代謝物がラット、モルモットおよびヒトで生成されること、また、CB146 の代謝パターンに大きな動物種差があることが明らかとなった。Fig. 4 に動物肝およびヒト肝における CB146 の推定代謝経路を示す。未処理動物肝 Ms での主代謝物は、ラットでは 4-OH-CB146 (M-2)、モルモットでは 3'-OH-CB146 (M-1) であったが、一方、ハムスターでは代謝物が生成されなかった。また、PB 前処理により、ラット、モ

ルモットおよびハムスターのいずれの動物でも共通して、3'-OH-CB146 の生成が著しく促進され、その活性の強さは、モルモット>ラット>ハムスターの順であった。なお、MC 前処理により、4-OH-CB146 の生成が、ラットでは未処理の 50% に激減したのに対し、モルモットでは未処理の数倍に増加した。これまでに、我々はモルモットが、CB153, CB138 および CB187 のような 2,4,5-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体に対し、高い代謝能を有することを報告している¹⁰⁾¹¹⁾¹³⁾。今回、CB146 代謝においても同様に、モルモットにおいて特異的な代謝活性が観察された。

今回、4-OH-CB146 が CB146 の代謝物であることが初めて確認された。驚いたことに、ヒト肝 Ms では、ラット未処理肝 Ms と同様に、主代謝物であった。ヒト血液中において、4-OH-CB146 は、4-OH-CB187 の次に高い濃度で検出されている^{1)~7)}が、今回の結果は、これらの報告をよく支持するものであった。一方、PCB 製品 (60% 塩素含量) 中の CB146 含量は、CB153 と CB138 の含量がいずれも 10% 前後であるのに対し、1.6% 程度と少ないことが報告されている¹⁷⁾。これらの事実を考え合わせると、摂取された CB146 は徐々に生体に濃縮されていき、さらに肝でゆっくり代謝を受け、4-OH-CB146 のみが血液中に局在するようになったものと考えられる。血液中における PCB 代謝物の高残留性は、血中の甲状腺ホルモン輸送タンパクである transthyretin との親和性の強さ¹⁸⁾¹⁹⁾で議論されているが、詳細はよくわかっていない。

これまでに、我々は MC 誘導性のハムスター CYP2A8 が、2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (tetraCB) (CB52)²⁰⁾ や 2,3',4',5-tetraCB (CB70)²¹⁾ の 4-水酸化反応を触媒することを明らかにしている。今回、MC 前処理ハムスター肝 Ms で 4-OH-CB146 が生成されるものと考えられたが、CB187 代謝¹⁰⁾ の場合と同様に、全く活性が見られなかった。これらの結果から、CB146 や CB187 のように、3 位および 5 位に塩素置換された PCB 異性体は、CYP2A8 の基質にはならないのかもしれない。

今回、ヒト肝 Ms により、主に 4-OH-CB146 と M-3 が生成された。ヒト肝 P450 については、

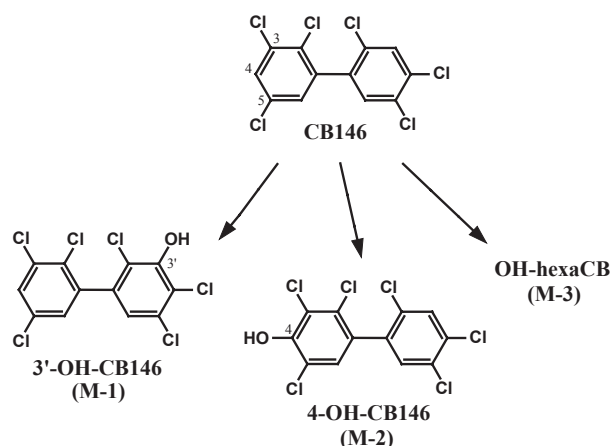


Fig. 4 Postulated metabolic pathways of CB146 in animal and human

CYP3A4 (CYP3A5 を含む), CYP1A2 および CYP2C9 がそれぞれ総 P450 含量の約 30%, 約 15% および約 15% を占めていること, また他の P450 分子種は 5% 以下であることが知られている^{22)~24)}. そこで, 4-OH-CB146 および M-3 の生成量とヒト肝 P450 活性との相関を調べたが, 有意な相関を示す P450 分子種は全く見あたらなかった. 結局, 両代謝物の生成に参与する P450 分子種の特定には至らなかった. この点は今後の研究課題である.

9名のうち, 男性2名 (HG64, HH74) の肝 Ms に, 3'-OH-CB146 の生成活性が認められた. 当初, ヒトにおける性差ではないかと考えられたが, 提供者の情報 (添付書類) を調べたところ, HG64 と HH74 の死因はそれぞれ脳血管障害および頭蓋内出血であり, 生前, 治療薬として前者は warfarin を, 後者は抗うつ薬 prozac とアンギオテンシン II 受容体拮抗薬 cozaar を使用していたこと, また, この2名の肝 Ms の CYP2B6 活性, すなわち (S)-mephenytoin N-脱メチル化活性が, 他より 2~13 倍高いことが判明した (データ未掲載). これらの事実から, 薬物摂取により CYP2B6 が誘導され, 3'-OH-CB146 の生成が促進されたものと考えられる. このように, 3'-OH-CB146 の生成には, 実験動物およびヒトで共通して, CYP2B 酵素が強く関与することが示唆された.

総括

1. ラット, モルモット, ハムスターおよびヒト肝 Ms による CB146 代謝を調べた結果, 3 種類の代謝物 (M-1, M-2 および M-3) が生成された. その生成パターンは動物間で大きく異なっていた.
2. GC-MS の結果から, 3 種類の代謝物はいずれも OH 体であり, 合成標品との比較から, M-1 は 3'-OH-CB146, M-2 は 4-OH-CB146 であると推定された. なお, M-3 の正確な構造は現在不明である.
3. 未処理 Ms では, 3'-OH-CB146 は, いずれの実験動物においても, PB 前処理により, その生成が増大した. 4-OH-CB146 は, ラットおよびモルモットの未処理 Ms で生成され, モルモットでのみ PB 前処理により数倍に増加した. M-3 はモルモットでのみ MC 前処理により, 数倍増加した.
4. 9名から調製されたヒト肝 Ms は, いずれも主代謝物として 4-OH-CB146 を生成した. また, このうち8名は M-3 も生成した. なお, 2名は 3'-OH-CB146 の生成活性も有していた.

以上の結果から, ヒト血中で高濃度検出される 4-OH-CB146 は, CB146 の主要な代謝物であること, また, 3'-OH-CB146 の生成は, PB 誘導性の P450 (CYP2B 酵素) により触媒されることが示唆された.

謝辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業, H24-食品-指定-014 古賀信幸), 日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 (B), No.24390049 原口浩一) および日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 (C), No. 23510083 加藤善久) の助成を受けたものである. ここに記して謝意を表します.

参考文献

- 1) Bergman Å, Klasson-Wehler E and Kuroki H : Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ. Health Perspect.* 102 : 464-469, 1994.
- 2) Sjödin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Björk J and Bergman Å : Influence of the consumption of fatty Baltic Sea fish on plasma levels of halogenated environmental contaminants in Latvian and Swedish men. *Environ. Health Perspect.* 108 : 1035-1041, 2000.
- 3) Sandau CD, Ayotte P, Dewailly E, Duffe J and Norström : Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs(OH-PCBs) and other chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit. *Environ. Health Perspect.* 108 : 611-616, 2000.
- 4) Fångström B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P and Bergman Å : Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ. Health Perspect.* 110 : 895-899, 2002.
- 5) Guvenius DM, Aronsson A, Ekman-Ordeberg G, Bergman Å and Noren K : Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated biphenyl ethers, polychlorinated biphenyls,

- polychlorobiphenyls, and pentachlorophenol. Environ. Health Perspect. 111 : 1235-1241, 2003.
- 6) Park JS, Linderholm L, Charles MJ, Athanasiadou M, Petrik J, Kocan A, Drobna B, Trnovec T, Bergman Å and Herts-Picciotto I : Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) in pregnant women from eastern Slovakia. Environ. Health Perspect. 115 : 20-27, 2007.
 - 7) Todaka T, Hori T, Yasutake D, Yoshitomi H, Hirakawa H, Onozuka D, Kajiwara J, Iida T, Yoshimura T and Furue M : Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood collected from Yusho patients during medical check-ups performed from 2004 to 2007. Fukuoka Igaku Zasshi 100 : 156-165, 2009.
 - 8) Safe S : Polyhalogenated aromatics : uptake, disposition and metabolism. In Kimbrough RD and Jensen AA (ed) : Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. pp. 131-159, Elsevier, 1989.
 - 9) 古賀信幸, 吉村英敏 : PCB と関連化学物質の代謝並びに代謝物の毒性. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆編 : 油症研究 - 30年の歩み -, pp 93-110, 九州大学出版会, 2000.
 - 10) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y and Koga N : In vitro metabolism of 2, 2', 3, 4', 5, 5', 6-heptachlorobiphenyl (CB187) by liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs. Xenobiotica 35 : 319-330, 2005.
 - 11) 古賀信幸, 金丸知代, 大石奈穂子, 加藤善久, 木村良平, 原口浩一, 増田義人 : 2,4,5,2',3',4'-六塩素化ビフェニルの *in vitro* 代謝における動物種差. 福岡医誌 92 : 167-176, 2001.
 - 12) Ariyoshi N, Koga N, Oguri K and Yoshimura H : Metabolism of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl with liver microsomes of phenobarbital-treated dog; the possible formation of PCB 2, 3-arene oxide intermediate. Xenobiotica 22 : 1275-1290, 1992.
 - 13) Ariyoshi N, Koga N, Yoshimura H and Oguri K : Metabolism of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl(PCB153) in guinea pig. Xenobiotica 27 : 973-983, 1997.
 - 14) Cadogan JIG : A convenient new method of aromatic arylation. J. Chem. Soc. : 4257-4258, 1962.
 - 15) Hutzinger O, Safe S and Zitko V : Polychlorinated biphenyls : Synthesis of some individual chlorobiphenyls. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 6 : 209-219, 1971.
 - 16) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275, 1951.
 - 17) Ballschmiter K, Rappe C and Buser HR : Chemical properties, analytical methods and environmental levels of PCBs, PCTs, PCNs and PBBs, In Kimbrough RD and Jensen AA(ed) : Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. pp 47-69, Elsevier, 1989.
 - 18) Brouwer A : Role of biotransformation in PCB-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone metabolism in laboratory and wildlife species. Biochem. Soc. Trans. 731-737, 1991.
 - 19) Malmberg T, Hoogstraate J, Bergman Å and Klasson-Wehler E : Pharmacokinetics of two major hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites with specific retention in rat blood. Xenobiotica 34 : 581-589, 2004.
 - 20) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H : Hamster liver cytochrome P450(CYP2A8) as a 4-hydroxylase for 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl. Biochem. Biophys. Res. Commun. 225 : 685-688, 1996.
 - 21) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H : Metabolism of 2, 3', 4', 5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. Chemosphere 37 : 1985-1904, 1998.
 - 22) Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP : Inter-individual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals : Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. J. Pharmacol. Exp. Ther. 270 : 414-423, 1994.
 - 23) Guengerich FP : Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. Chem.-Biol. Interact. 106 : 161-182, 1997.
 - 24) Guengerich FP : Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. AAPS Journal 8 : E101-111, 2006.

(Received for publication March 22, 2013)

福岡医学雑誌投稿規定

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

(* : 編集幹事)

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

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

平成 25 年 4 月 25 日 発行

発行所 **福岡医学** 会

〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1番1号 (九州大学医学部内)

TEL ダイヤルイン (092) 642-6896

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

(日本出版協会準会員番号 B211042 振替 01750-2-2233)

編集兼発行者 續 輝 久

印刷所 秀巧社印刷株式会社

福岡市南区向野2丁目13-29

一般財団法人 恵 愛 団

当財団は、売店・保険薬局・喫茶等の各種事業活動をとおして九州大学の医学研究を奨励助成し、九大病院における患者さんの診療、入院等の支援を行い、教職員並びに学生の皆様の学事研修等へ便宜を図り、医学の振興と社会文化の向上に寄与することを目的に明治44年に設立された公益法人です。以来100年に亘り活動してまいりましたが、本年11月1日付けで「一般財団法人」への移行登記を行い、新法人の活動を開始することになりました。

なお、一般財団法人恵愛団となりましたが事業理念は何ら変わりなく、今後も九大病院への支援を続けると共に「福岡医学雑誌」発行に協賛し、医学の発展と地域医療の振興に寄与してまいりますので、何卒よろしく願いいたします。



一般財団法人 恵 愛 団

〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1番1号
九州大学病院内
電話(092)642-6854 FAX(092)641-3266