

昭和29年11月5日第三種郵便物承認
令和3年6月25日
(年4回3, 6, 9, 12月の25日発行)
第1167号

Vol. 112 No. 2
June 2021

CODEN : FKIZA4
ISSN 0016-254X

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

第 112 卷 第 2 号 (通卷 1167 号)

令和 3 年 6 月 25 日

特 集 号

油症とPCB及びダイオキシン関連化合物

研 究 報 告 第 28 集

責任編集者 辻 学

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

Editor Gaku Tsuji

福岡医誌

Fukuoka Acta Med.

FUKUOKA ACTA MEDICA

Vol. 112 No. 2, June 2021

福岡医学雑誌

昭和二十九年十一月五日第三種郵便物承認
令和三年六月二十五日発行

第百十二卷 第二号

定価

二〇〇〇円

油症と PCB 及びダイオキシン関連化合物に関する研究

報告集 第 28 集

(福岡医学雑誌 第 112 巻 第 2 号 令和 3 年 6 月)

目 次

序 言	辻 学…59
Aryl hydrocarbon receptor からみた油症の病態と治療開発 2020 古江 増隆, 石井 祐次, 月森 清己, 辻 学…61	辻 学…61
2009-2019 年度の油症検診における血中のポリ塩化クアテルフェニルの濃度と傾向 (英文) 佐藤 環, 小木曾俊孝, 上原口奈美, 戸高 尊, 平川 博仙, 堀 就英, 梶原 淳睦, 香月 進, 古江 増隆, 辻 学…90	辻 学…90
血液中ダイオキシン類および PCB 濃度測定のカロスチェック (2016 - 2019 年度) 新谷 依子, 堀 就英, 飛石 和, 平川 博仙, 佐藤 環, 安武 大輔, 戸高 尊, 梶原 淳睦, 香月 進, 辻 学, 古江 増隆…99	辻 学, 古江 増隆…99
油症患者における体脂肪率推定式の作成と半減期の再検証 松本 伸哉, 赤羽 学, 神奈川芳行, 古江 増隆, 辻 学, 今村 知明…110	辻 学, 今村 知明…110
油症患者の健康実態に関するアンケート調査自由記載のテキスト分析 赤羽 学, 松本 伸哉, 神奈川芳行, 古江 増隆, 辻 学, 今村 知明…120	辻 学, 今村 知明…120
2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル (PCB155) のラット, モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム, およびヒトチトクロム P450 による代謝 太田 千穂, 加藤 善久, 藤井由希子, 原口 浩一, 木村 治, 古賀 信幸…127	古賀 信幸…127
ダイオキシン低用量曝露母体の肝薬物代謝酵素活性に対するシークワサー由来 ポリメトキシフラボノイド: ノビレチンの <i>in vitro</i> 阻害効果 池田佳乃子, 佐野 宏江, 宮内 優, 太田 千穂, 古賀 信幸, 田中 嘉孝, 石井 祐次…136	石井 祐次…136
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin による出生児の性未成熟の機構解析: ゴナドトロピン放出ホルモン神経への影響 西田 恭子, 武田 知起, 山田 英之, 石井祐次…148	石井祐次…148
感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討 申 敏哲, 行平 崇, 小牧 龍二, 福永 貴之, 田中 哲子, 土井 篤, 吉村 恵…155	吉村 恵…155
油症における末梢血 CD4 陽性 T 細胞亜集団に関する検討 辻 博, 松村 潔…164	辻 博, 松村 潔…164

The Twenty-eighth Reports of the Study on Yusho
—PCBs and Dioxin-Related Compounds—
(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 112, No. 2, 2021)

CONTENTS

Foreword	G. Tsuji··· 59
Pathogenic Implication of Aryl Hydrocarbon Receptor for Yusho and Its Therapeutic Approach 2020	M. Furue, Y. Ishii, K. Tsukimori and G. Tsuji··· 61
Polychlorinated Quaterphenyl Concentrations in the Blood and Their Patterns in Subjects Examined for a Possible Diagnosis of Yusho from FY 2009 to 2019	T. Sato, T. Kogiso, N. Kamiharaguchi, T. Todaka, H. Hirakawa, T. Hori, J. Kajiwara, S. Katsuki, M. Furue and G. Tsuji···90
Inter-Laboratory Cross-Comparison Study of Dioxins and PCBs Analyses in Human Blood Samples (From FY 2016 to 2019)	Y. Shintani, T. Hori, K. Tobiishi, H. Hirakawa, T. Sato, D. Yasutake, T. Todaka, J. Kajiwara, S. Katsuki, G. Tsuji and M. Furue···99
Estimation Formula of Body Fat Ratio and Revalidation of the Half-Lives of Dioxin-Like-Compounds in the Blood of Yusho Patients	S. Matsumoto, M. Akahane, Y. Kanagawa, M. Furue, G. Tsuji and T. Imamura···110
Text Mining Analysis for Yusho Patients' Survey	M. Akahane, S. Matsumoto, Y. Kanagawa, M. Furue, G. Tsuji and T. Imamura···120
Metabolism of 2,2',4,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl (PCB155) by Rat, Guinea Pig and Human Liver Microsomes and Human Cytochrome P450s	C. Ohta, Y. Kato, Y. Fujii, K. Haraguchi, O. Kimura and N. Koga···127
<i>The in Vitro</i> Inhibitory Effects of Nobiletin, a Polymethoxyflavonoid from <i>Citrus Depressa</i> , on the Hepatic Enzyme Activity of Dams Maternally Exposed to Low-Dose 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	K. Ikeda, H. Sano, Y. Miyauchi, C. Ohta, N. Koga, Y. Tanaka and Y. Ishii···136
Mechanism Whereby Maternal Exposure to Dioxin Causes Sexual Immaturity of the Offspring : Effects on Neurons Secreting Gonadotropin-Releasing Hormone	K. Nishida, T. Takeda, H. Yamada and Y. Ishii···148
Effect of Cinnamon on Benzo[a]pyrene-Treated Rats using Quantitative Threshold Evaluation	MC. Shin, T. Yukihiro, R. Komaki, T. Fukunaga, T. Tanaka, A. Doi and M. Yoshimura···155
CD4 Positive T Lymphocyte Subpopulations in Patients with Yusho	H. Tsuji and K. Matsumura···164

序 言

厚生労働省全国油症治療研究班・班長

九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター長・准教授

辻 学

Foreword

Gaku TSUJI

Chief of The Study Group for Yusho

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

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

A mass poisoning, involving at least 2300 individuals, occurred in Kyushu (Western Japan) in 1968. The incident is called Yusho, oil disease, as it was caused by ingestion of rice bran oil that was contaminated with Kanechlor-400, a commercial brand of Japanese polychlorinated biphenyls (PCBs). It was later found that the rice oil had been contaminated with not only PCBs but also polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), polychlorinated quaterphenyls (PCQs) and others.

Yusho is, thus, recognized as a poisoning by a mixture of PCBs, dioxins and related compounds. For 50 years the patients have been suffering from various symptoms such as general malaise, headache, acneform eruption, dark-brownish nail pigmentation, increased discharge from the eyes with swelling of eyelids, pigmentation of oral mucosa, peripheral neuropathy, irregular menstruation in women.

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

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

Patients with Yusho still complain various subjective and objective symptoms. Although definitive therapy for Yusho has not been proposed yet, basic and clinical researches by us and others have revealed that some Japanese Kampo drugs such as Keishibukuryogan and Orengedokutou are potential candidates for treatments by modulating aryl hydrocarbon receptors. Finally, we very much appreciate the contribution and participation of the patients in health examinations for follow-up of Yusho each year. I also deeply thank all the members of the study group and the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare for their efforts to help and support patients' health and well-being.

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

この度、厚生労働省全国油症治療研究班の第28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31年度と令和2年度の研究成果ならびに関連分野の情報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PCB（ポリ塩化ビフェニル）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（ポリ塩化ジベンゾフラン）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。ダイオキシン類は血中にごくわずかにしか含まれていないために、その定量は困難な状況でしたが、研究班内での技術改良により少ない血液量で再現性のあるダイオキシン類測定が可能となり、2001年（平成13年）は福岡県の検診でパイロット的に測定を行い、2002年（平成14年）以降は全国の検診で測定を開始しました。これらのデータを妥当性・精度・再現性などの面から解析しました。その結果、血液中2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran（PeCDF）値を診断基準に追補することが妥当と考えられ、油症診断基準（平成16年9月29日補遺）が作成されました。

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

謝辞：本誌は、厚生労働行政推進調査事業費（食品の安全確保推進研究事業（カネミ油症に関する研究））研究課題名（課題番号）：食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究（21KA2003）によって刊行されています。深く感謝申し上げます。

Aryl hydrocarbon receptor からみた油症の病態と治療開発 2020

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

³⁾九州大学大学院薬学研究院 細胞生物薬学分野

⁴⁾福岡市立こども病院 周産期センター産科

古江 増隆¹⁾²⁾, 石井 祐次³⁾, 月森 清己⁴⁾, 辻 学¹⁾²⁾

Pathogenic Implication of Aryl Hydrocarbon Receptor for Yusho and Its Therapeutic Approach 2020

Masutaka FURUE¹⁾²⁾, Yuji ISHII³⁾, Kiyomi TSUKIMORI⁴⁾ and Gaku TSUJI¹⁾²⁾

¹⁾*Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital, Fukuoka 812-8582, Japan*

²⁾*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan*

³⁾*Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan*

⁴⁾*Department of Obstetrics, Perinatal Center, Fukuoka Children's Hospital, Fukuoka 813-0017, Japan*

Abstract

In 1968, more than 2,000 peoples were exposed to high concentrations of dioxin-like compounds by eating rice bran oil contaminated with 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF), polychlorinated biphenyls, and polychlorinated quaterphenyls. These Yusho (oil disease in Japanese) patients have been suffered from various symptoms such as general malaise, chloracne, hyperpigmentation, sputum and cough, hyperesthesia or numbness of extremities since then. The blood concentrations of 2,3,4,7,8-PeCDF, major causal agent for toxicity, are still very high in many Yusho patients even now. Dioxins exert their major toxicity by binding and activating aryl hydrocarbon receptor (AHR) and subsequent generation of reactive oxygen species (ROS). In addition, recent studies have revealed a pathogenic role of AHR in manifestation of various Yusho symptoms. Moreover, medicinal agents which inhibit AHR activation and ROS production (antioxidative AHR inhibitor) may be applicable for the treatment of Yusho patients. In this review, we summarize current topics on Yusho and its therapeutic approach with special reference to AHR.

Key Words : Yusho, aryl hydrocarbon receptor, chloracne, dioxin, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, reactive oxygen species, nuclear factor-erythroid 2-related factor-2, treatment

はじめに

福岡県、長崎県を中心とした西日本で、高温で加熱して精製していたカネミ米ぬか油（カネミ

油）に、熱媒体として使用されていたカネクロール（KC-400）が混入して食中毒事件（以下、油症）が発生した¹⁾。1968年のことである。KC-400は polychlorinated biphenyls (PCBs) 製品であった



図1 現在の油症班（班長：辻 学）の取り組み

油症は1968年に発生したダイオキシン類による食中毒である。主たる原因毒性物質は2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF)であったことが明らかになっている。50年以上経過した2020年現在でも多くの患者の血中には高濃度の2,3,4,7,8-PeCDFが検出される。発生時には塩素痤瘡や色素沈着などの特徴的な皮膚症状が発症したことが知られている。●は油症班の現在の取り組みをリストアップしている。◎は油症班がこれまでに刊行した刊行物を示す。すべてホームページからダウンロードできる。

が、汚染したカネミ油にはPCBsに加えPCBsが高熱化学反応によって変化して新生した polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), polychlorinated quaterphenyl (PCQ), polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs) などのダイオキシンおよびダイオキシン類化合物（以下、ダイオキシン類）も高濃度に含まれていたことが油症治療研究班（以下、油症班）によって明らかにされた²⁾³⁾。すなわち高濃度のPCBsやダイオキシン類を摂食することでヒトに発生した中毒症状が油症だったのである²⁾³⁾。

個々の有機塩素化合物の毒性は毒性相対比 (toxic equivalent; TEQ) として算出される [すなわち毒性が最も高い2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) を基準値:1とした時の毒性等価係数 (toxic equivalency factor; TEF) にその化合物の濃度を乗じたもの]⁴⁾⁵⁾。油症の場合、PCDFsとくに2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PeCDF) のTEQが

高く、汚染したカネミ油の総TEQの77%をPCDFsが、58%を2,3,4,7,8-PeCDFが占めている⁶⁾。ちなみに2,3,7,8-TCDDのTEF:1と比較すると、2,3,4,7,8-PeCDFのTEFは0.3でありその毒性は高い⁵⁾。汚染油中に高濃度に含まれていたPCBsのTEFはかなり低いため、PCBsによる毒性すなわちTEQsは低値だったわけである。

発生当時、高濃度で混入していたPCBsの血中濃度を測定することは可能であったが、油症の毒性を特徴づけている2,3,4,7,8-PeCDFの血中濃度を高い再現性をもって測定することは困難であった。しかしその後の油症班の分析技術の進歩によって可能となり⁷⁾、2004年から2,3,4,7,8-PeCDFの血中濃度が油症診断基準に追加された。油症では、全身倦怠感、頭重・頭痛、腹痛、手足のしびれ・疼痛、関節の腫脹・疼痛、咳嗽・喀痰、眼脂過多（マイボーム腺分泌過多）などさまざまな症状がみられた（図1）⁸⁾⁹⁾。中でも特徴的だった

たのは痤瘡様皮疹（塩素痤瘡）や皮膚粘膜の色素沈着であった^{8)~10)}。検査値では血中トリグリセリド上昇などを認めた¹¹⁾。発生当初から油症班による検診が継続され、これらの臨床症状とPCB・ダイオキシン類血中濃度との関連性が報告された¹²⁾¹³⁾。

現在の油症班の主な研究内容を図1に示した。長年にわたる学術的報告は、本誌の特別号として隔年に刊行され、2019年には第27集が発刊されている。また書籍として「Yusho」(英文)、「油症研究30年の歩み」,「油症研究Ⅱ」が九州大学出版会から刊行された。Journal of Dermatological Science 誌から Supplement として「Long-term effects of polychlorinated biphenyls and dioxins in humans-Lessons from Yusho」も刊行された。油症に関するすべての書籍は、ホームページからダウンロード可能である (<https://www.kyudai-derm.org/part/yusho/index.html>)。また九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センターの取り組みについてもホームページを参照いただきたい (<http://www.yusho.hosp.kyushu-u.ac.jp/>) (図1)。

カネミ油症は塩素痤瘡などの特徴的な症状に加え、血中PCBsやPCQsの性状や濃度、血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度を基準に総合的に診断されてきた。2012年には、「カネミ油症患者に関する施策の総合的な推進に関する法律」が制定され (https://elaws.e-gov.go.jp/search/elawsSearch/elaws_search/lsg0500/detail?lawId=424AC100000082#D)、その付帯決議として油症発生当時、油症患者と同居し、カネミ倉庫製のPCB等が混入していた当時のカネミ油を摂取した方で、現在、なんらかの心身の症状を有している人も認定されるようになった。また付随する指針として、「ダイオキシン類の生物学的毒性の解明及び症状の緩和並びにダイオキシン類の排泄促進その他の治療方法の開発等のため更なる調査及び研究の推進」が油症班に求められている (<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000139996.html>)。2020年7月7日現在、認定者2,049人(うち生存者1,285人)、同居家族認定者305人(うち生存者283人)となっている。

油症に関する初期および最新の知見は、すでに増田義人¹⁴⁾、内博史¹⁵⁾ならびに三苦千景ら^{16)~18)}の総説に詳述されている。本稿の目的

は、その後の臨床研究や基礎研究の成果を含めて油症研究の最新の情報を紹介し、併せてダイオキシン受容体とも称される芳香族炭化水素受容体(aryl hydrocarbon receptor; AHR)に主眼を置いて油症の病態と治療に迫ることである。

1. AHR とその役割

化学物質受容体であるAHRには、PCB・ダイオキシン類をはじめとして、環境汚染物質あるいはタバコ煙に高濃度に含まれるベンゾピレン、ポリフェノールやフラボノイドなどの植物成分、皮膚や腸管微生物叢の代謝産物、トリプトファン紫外線代謝産物、薬剤など様々な化学物質が結合する^{19)~21)}。定常状態のAHRは、シャペロン蛋白群[heat shock protein 90 (HSP90), hepatitis B virus X-associated protein 2 (XAP-2), p23]そしてc-Srcと複合体を形成し細胞質内に存在する(図2)^{19)22)~25)}。リガンドが結合すると、AHRはc-Srcのリン酸化と並行して複合体から解離しながら核内移行し、AHR-nuclear translocator (ARNT)と2量体を形成し、標的遺伝子内のxenobiotic response elements (XREs)に結合することで、標的遺伝子の遺伝子発現を制御する。実に様々な遺伝子群がAHRの標的遺伝子に含まれるが²⁶⁾、そのなかでも化学物質代謝酵素であるcytochrome P450 1A1 (CYP1A1), CYP1A2やCYP1B1はAHR活性化に伴って特異的に発現されることが知られている^{19)22)~27)}。CYP1A1やCYP1B1はリガンドを分解代謝するのであるが、その際に活性酸素(reactive oxygen species; ROS)が産生される¹⁹⁾²³⁾(図2)。トリプトファン紫外線代謝産物やフラボノイドが比較的すみやかに代謝される一方で^{28)~30)}、TCDDなどのダイオキシン類はその安定した構造から代謝されづらく大量のROSが持続的に発生することになる¹⁹⁾³¹⁾。実際に油症患者では、尿中あるいは血中の酸化ストレスマーカーは健常人に比べて高値である³²⁾³³⁾。ROSによる酸化ストレスは細胞のDNA、蛋白、脂質を障害し、炎症性サイトカインを放出させる²³⁾³¹⁾³⁴⁾³⁵⁾。TCDDによるROS産生はAHRやCYP1A1をノックダウンした細胞では消失することから、AHR-CYP1A1軸に依存していることがわかる³⁶⁾。ちなみにAHRの遺伝子発現には核内転写因子であるNF1Cの多型性

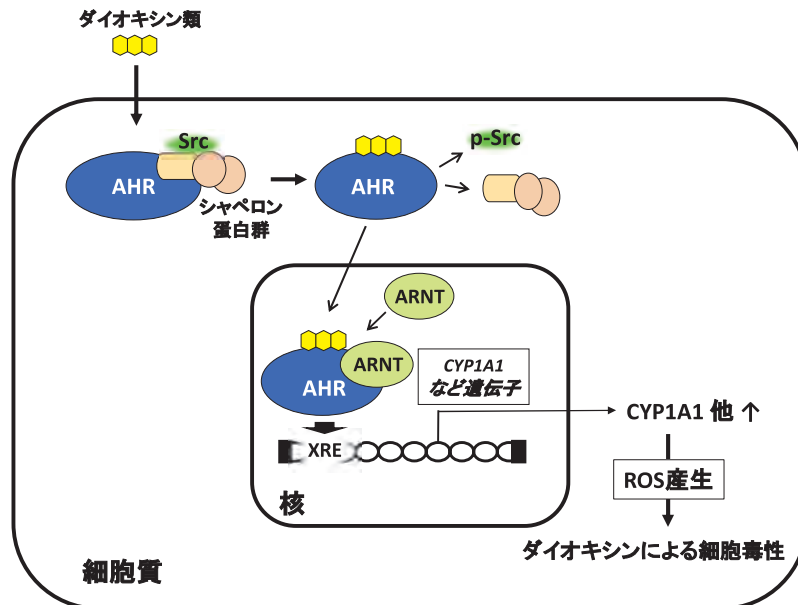


図2 ダイオキシン類は aryl hydrocarbon receptor (AHR) を活性化し酸化ストレスを誘導する。

定常状態の AHR は、シャペロン蛋白質群そして c-Src と複合体を形成し細胞質内に存在する。ダイオキシン類が結合すると、AHR は c-Src のリン酸化と並行して複合体から解離しながら核内移行し、AHR-nuclear translocator (ARNT) と 2 量体を形成し、標的遺伝子内の xenobiotic response elements (XREs) に結合することで、標的遺伝子の遺伝子発現を制御する。実に様々な遺伝子群が AHR の標的遺伝子に含まれるが、そのなかでも化学物質代謝酵素である cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)、CYP1A2 や CYP1B1 は AHR 活性化に伴って特異的に発現されることが知られている。CYP1A1 や CYP1B1 はリガンドを分解代謝するのであるが、その際に活性酸素 (reactive oxygen species ; ROS) が産生される。ダイオキシン類はその安定した構造から代謝されづらく大量の ROS が持続的に発生し細胞毒性を発揮する。

が関与することが明らかになっている³⁷⁾。

TCDD によって細胞内に発生した ROS を中和すべく、抗酸化システムが作動しなければ細胞は死滅してしまう。確かに TCDD-AHR シグナルは、nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (NRF2) という転写因子を活性化し、NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) などの様々な抗酸化酵素群を発現亢進させている。ROS の産生を抑制する³⁸⁾³⁹⁾。化学的に安定な TCDD は持続的に AHR を活性化するため、NRF2-NQO1 軸が作動しても ROS 産生が上回り、細胞は酸化ストレス状態に陥るのだろうと考えられる²³⁾³¹⁾。

AHR は上皮細胞、間葉系細胞、血液細胞などあらゆる細胞が発現している¹⁹⁾²³⁾²⁵⁾²⁷⁾³¹⁾。AHR をノックアウトしたマウスでは、TCDD によるさまざまな毒性反応がみられないことから、AHR

はいずれの細胞においてもダイオキシン類の毒性発現に欠かせない受容体であると考えられる⁴⁰⁾⁴¹⁾。そのため人体においても、PCB 血中濃度や PeCDF 血中濃度と相関する油症に特有な臨床症状は、AHR 受容体の持続的な活性化おそらくは酸化ストレスが誘因である可能性が高い。

2. AHR 活性化からみた油症の臨床症状

1) 塩素痤瘡と色素沈着

塩素痤瘡 (chloracne) と色素沈着 (hyperpigmentation) は PCB やダイオキシン類高濃度曝露者にみられる特徴的な皮膚症状である。塩素痤瘡は油症ではもちろんのこと¹⁰⁾、1976 年に台湾で発生した PCBs および PCDFs 複合汚染食中毒である Yucheng⁴²⁾ や 1979 年にイタリアのセブソの工場爆発によって発生した TCDD 空気汚染事

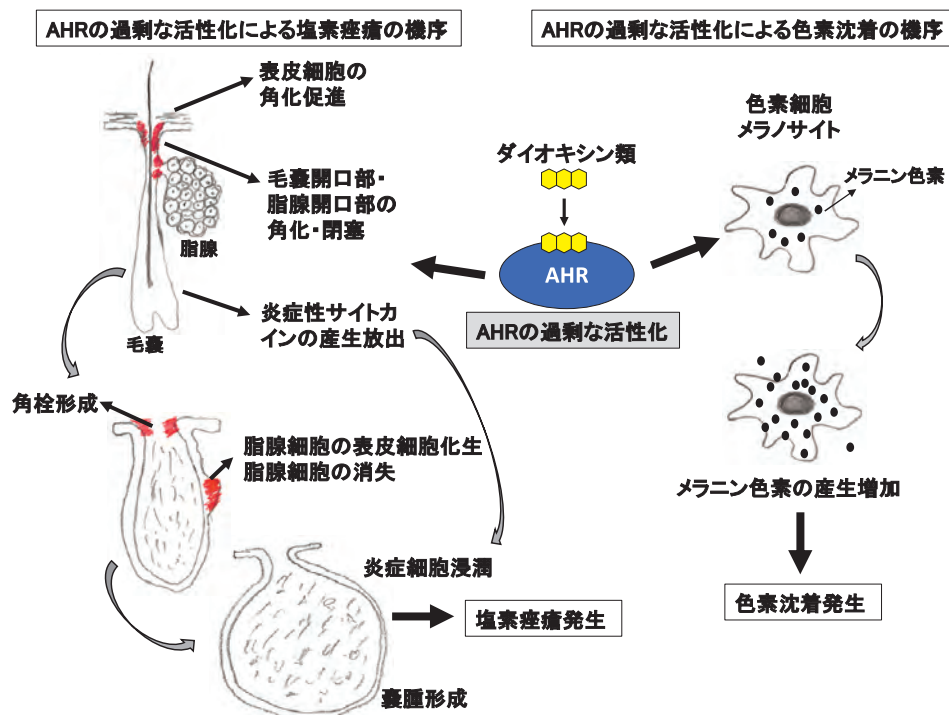


図3 ダイオキシン類による塩素痤瘡および色素沈着の発生機序

AHRが活性化されると表皮細胞の角化が亢進する。ダイオキシン類はAHRを過剰に活性化させるため、角化が異常に亢進し毛嚢開口部や脂腺開口部の角化・閉塞が発生する。脂腺細胞は表皮細胞が皮脂を分泌するように分化した特殊な細胞であるが、AHRの過剰な活性化は、脂腺細胞の皮脂分泌を阻害し脂腺細胞の表皮細胞化生を誘導するため脂腺細胞は萎縮消失する。脂腺が消失した毛嚢は毛嚢開口部の角栓形成も相まって嚢腫化し塩素痤瘡が発生する。

色素細胞（メラノサイト）はメラニン色素を産生している。AHRが活性化されると色素細胞によるメラニン産生能が亢進し色素沈着が発生する。

故^{43)~45)}でも報告されている。50年以上経過した現在でも油症患者の血中PCDFs濃度は一般人よりも高値であり、2015年の報告でも塩素痤瘡の重症度と血中PCBs濃度あるいは血中PCDFs濃度とは正の相関を示し、色素沈着は血中PCBs濃度との正の相関を認めている¹⁰⁾。

Suskindによる塩素痤瘡の組織像の詳細な継時的解析によると、毛嚢開口部および脂腺導管部の角化による角栓形成に始まり、次第に脂腺細胞の皮脂産生がとまり脂腺細胞が表皮角化細胞化し、脂腺が消失し嚢腫形成が起こるとされる⁴⁶⁾ (図3)。最近の様々な研究成果は、ダイオキシン類によるAHRの活性化が上記のような塩素痤瘡の組織像を引き起こす可能性が高いことを示唆している⁴⁷⁾⁴⁸⁾。基底層で分裂した表皮角化細胞は、基底層を離れ有棘細胞、顆粒細胞そして角質細胞へと分化し、角質細胞と角質細胞間脂質が皮膚のバリ

ア機能を維持する。この表皮細胞の最終分化の過程で、表皮細胞は特に顆粒細胞においてインボルクリン、ロリクリン、フィラグリンといった様々なバリア関連蛋白質を発現し、cornified cell envelopeを形成し正常な角質細胞への分化が誘導される。AHRはこれらの様々なバリア関連蛋白質の発現を亢進させることによって表皮細胞の角化を促進させる^{49)~57)}。ダイオキシン類もAHRを介して表皮角化細胞の分化を著明に促進させることが知られている(図3)^{58)~60)}。AHRは脂腺細胞にも発現している⁶¹⁾。脂腺は毛嚢に開口し、脂腺細胞で構成される。脂腺細胞は表皮角化細胞が皮脂を産生分泌するように分化した細胞であるが、TCDDの投与によって脂腺細胞のAHRが活性化されると皮脂分泌能は抑制され、脂腺細胞が表皮角化細胞様に形態変化することが示された⁶¹⁾ (図3)。脂腺細胞が表皮角化細胞化生する

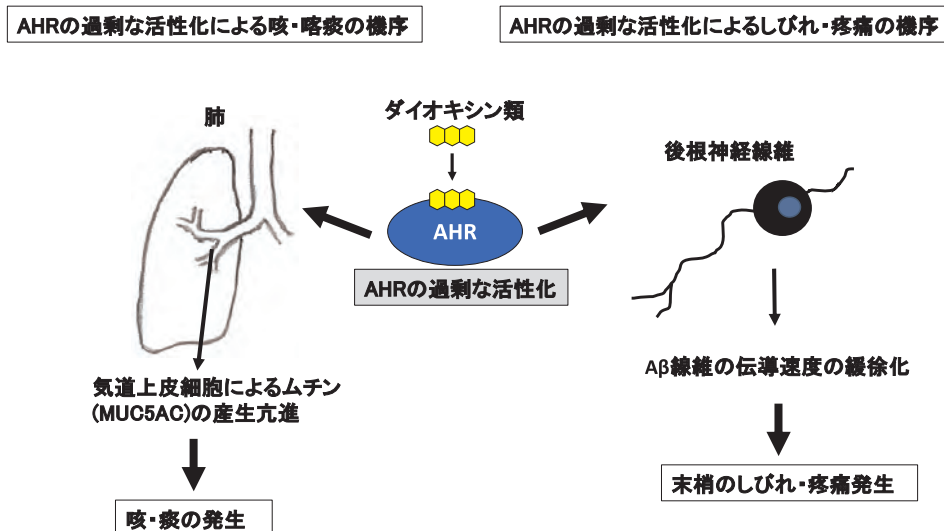


図4 ダイオキシン類による咳・痰およびしびれ・疼痛の発生機序

油症では咳・喀痰の増加や末梢のしびれ・疼痛が発生した。AHRが活性化されると気道上皮細胞によるムチン(MUC5AC)産生が亢進する。これが咳・喀痰の増加につながったのではないと思われる。

また脊髄後根神経線維の中でも、ダイオキシン類はA β 線維(太めの神経線維)の伝導速度を緩徐化させることがわかっている。これが末梢のしびれや疼痛に関与している可能性がある。

ために実質的に脂腺は萎縮消失してしまい空洞化し内部に角化亢進による角化物が堆積し角栓が形成され、次第に嚢腫構造を形成し塩素痤瘡が発生すると考えられる⁶¹⁾。TCDDによる表皮角化亢進は明らかにAHR依存性でありAHRの活性化を抑制すると角化亢進はみられない⁶²⁾。

以上のことより、正常状態ではAHRは表皮角化細胞の角化を促進しバリア機能を維持しているのであるが、高濃度のダイオキシン類曝露ではAHRが長期間過度に活性化されることにより、毛孔部や脂腺開口部の異常な角化亢進それに伴う角栓形成が起こる。脂腺細胞の脂腺への分化は止まり、脂腺細胞が表皮角化細胞化してしまい、脂腺細胞の萎縮消失、同部の嚢腫化が起こり、典型的な塩素痤瘡に発展すると考えられる(図3)。ダイオキシン類を投与されたサルやマウスの眼瞼マイボーム腺にも、表皮角化細胞化が生じ最終的に嚢腫化が起こることが報告されている⁶³⁾。追記であるが、表皮細胞が産生するinterleukin(IL)-24はフィラグリンの産生を抑制し皮膚バリアを低下させることが知られている⁶⁴⁾。IL-24はAHRの標的遺伝子の一つでありAHRが活性化されるとその発現は亢進する⁶⁵⁾。すなわちAHRの活性化は

IL-24を産生させて角化亢進を抑制するような作用を示しながらも、結果的には角化亢進を強く押し進める作用を示すことになる。またAHRの遺伝子多型によってIL-24の産生量が制御されていることも明らかになっている⁶⁵⁾。

色素細胞もAHRを発現している⁴⁸⁾⁶⁶⁾。ダイオキシン類によってAHRが活性化されると、色素細胞のメラニン色素産生が亢進し、色素沈着が発生すると考えられている(図3)⁴⁸⁾⁶⁶⁾⁶⁷⁾。実際に油症の色素沈着は、PCB血中濃度や2,3,4,7,8-PeCDF血中濃度と相関している^{13)68)~71)}。また油症患者妊娠中の胎児曝露の症例でも色素沈着が認められている⁷²⁾。タバコ煙中の汚染物質によるAHR活性化はヒト色素細胞の色素産生能を増強させ、この作用は紫外線B照射との相乗効果が認められる⁷³⁾。皮膚内のトリプトファンは紫外線Bのエネルギーによって6-Formylindolo[3,2-b]carbazole(FICZ)に変化し、AHRを強く活性化することが知られている²⁸⁾³⁵⁾。PM2.5と皮疹を調査した疫学調査によると、PM2.5の高濃度暴露群では日光曝露部位(顔面や手背)の老人性色素斑の発生頻度が有意に高いことが報告されている⁷⁴⁾。PM2.5中にもAHRを活性化する

環境汚染物質が数多く含まれていることから⁶⁶⁾⁶⁷⁾, AHR 活性化が色素細胞を活性化し色素産生を増強することで色素沈着が発生すると考えられる。

2) 咳嗽や喀痰の増加

油症患者では咳嗽や喀痰が高頻度にみられ、PCB 血中濃度や 2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度と相関している⁶⁹⁾⁷¹⁾。気道上皮細胞にも AHR は発現しており、ダイオキシン類によって AHR が活性化されると、気道上皮細胞の ROS 産生に伴って MUC5AC (ムチン成分) の産生亢進がおこる^{75)~77)} (図 4)。このことが咳嗽や喀痰の原因の一つではないかと思われる。自動車工場勤務者 201 名と近隣在住健常人 222 名の肺機能検査結果では、努力性肺活量や 1 秒量は PCDDs/PCDFs 曝露量と負の相関を示し、曝露量が増加すると肺機能検査は悪化することが報告されている⁷⁸⁾。喫煙と chronic obstructive pulmonary disease (COPD) とは強い関連性がみられることから、たばこ煙中のダイオキシン類による AHR 活性化と COPD の関連性を指摘する総説もみられる⁷⁹⁾。

3) 手足のしびれ・疼痛

手足のしびれや疼痛もいまだに多くの油症患者を悩ましている症状の一つであり、PCB 血中濃度や 2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度との関連も認められている⁶⁸⁾⁷¹⁾。ベンゾピレンを経口投与して 7 日後のモデルラットの後根神経付き後根神経節標本を用いた検討では、A γ 線維や C 線維の伝導速度には影響を与えなかったが、A β 線維の伝導速度を有意に低下させることが報告された⁸⁰⁾ (図 4)。A β 線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感と関係が有る可能性がある。A β 線維は A γ 線維や C 線維と比較して直径が太く、機械的な圧迫によって機能障害を容易に起こすことが知られている⁸¹⁾。末梢神経、特に太い感覚神経の伝導速度の低下は感覚鈍麻やしびれと密接に関連しており、正座時に太い線維から障害を受け、脚のしびれや感覚鈍麻を来す現象と類似する。これは油症患者が訴えるしびれ感や感覚鈍麻と良く一致しており、それらは主に末梢神経の機能異常によって発生している可能性が高いと考えられる⁸⁰⁾。また末梢神経の伝導異常には、A β 線維を包む髄鞘

における異常、例えば脱髄などの関与が考えられると推定されている⁸⁰⁾。興味深いことに、AHR は β -catenin の産生を制御することで間接的に髄鞘の構成蛋白である myelin 発現量に影響を与えることが報告されている⁸²⁾。また Neurofilament の発現は神経の分化や変性と関与しているとされるが、TCDD は AHR を介して神経線維による Neurofilament の発現を増加させる⁸³⁾。

4) 血中トリグリセリド上昇

油症では脂質の血中濃度異常が高頻度にみられた⁸⁴⁾⁸⁵⁾。特に血中トリグリセリド値上昇は、血中 PCBs 濃度と相関していることが明らかにされている⁸⁴⁾⁸⁵⁾。肝細胞も AHR を豊富に発現しており、TCDD によって AHR が活性化されると CYP1A1 を発現し、CYP1A1 の発現によって肝細胞内の lipid droplet の産生が有意に亢進することが報告されている⁸⁶⁾。逆に、AHR ノックアウトマウスでは、血中トリグリセリド値が有意に減少する (Biljes2015)⁸⁷⁾。どうして AHR の活性化が肝細胞内ひいては血中のトリグリセリドを増加させるのかの全容は明らかになっていないが、一つの可能性として肝細胞内の 17 β -estradiol (E2) の分解促進があげられる⁸⁸⁾ (図 5)。17 β -estradiol は sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) を抑えてトリグリセリドの新生を抑制し、脂肪酸の β 酸化を促進する peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) の産生を増加させる⁸⁸⁾⁸⁹⁾。ベンゾピレンが投与されると AHR が活性化され、肝細胞内で CYP1A1 が産生される。CYP1A1 は 17 β -estradiol を分解代謝するので、肝細胞内で 17 β -estradiol 値が減少し、トリグリセリド産生が亢進することになる⁸⁸⁾。非アルコール性脂肪肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、非アルコール性脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH)、あるいは肝硬変、肝細胞癌へと進展することから最近注目されている⁹⁰⁾。NAFLD の発症病態は AHR 活性化で引き起こされる脂肪代謝異常と類似性が高いのではないかと推測されている⁸⁸⁾⁹¹⁾。

5) 睡眠障害

24 時間体内リズム、いわゆる体内時計は睡眠と

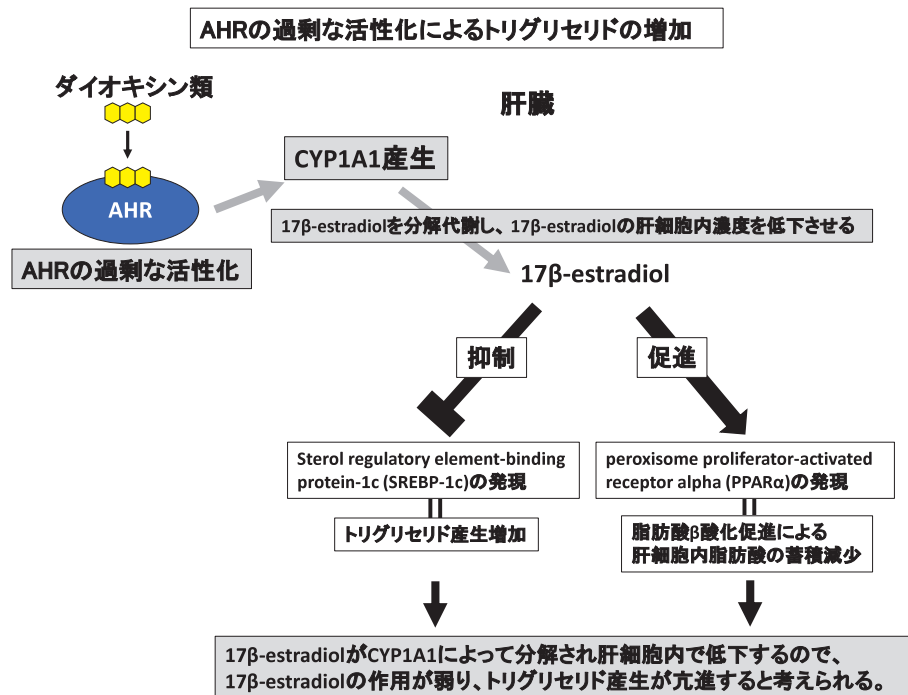


図5 ダイオキシシン類による高トリグリセリド血症の発生機序

肝細胞では Sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) がトリグリセリドの産生を増加させ、 peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) が脂肪酸 β 酸化を促進することによって肝細胞内脂肪酸の蓄積を減少させている。女性ホルモン 17 β -estradiol が SREBP-1c を抑制し、PPAR α の機能を亢進させることによって肝臓によるトリグリセリドの産生を低下させていると考えられる。肝細胞も AHR を豊富に発現している。AHR が活性化されると cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) などの化学物質代謝酵素が特異的に発現誘導される。CYP1A1 は 17 β -estradiol も分解するため、17 β -estradiol の肝細胞内濃度が低下し、トリグリセリドの産生が結果的に亢進すると思われる。

覚醒、体温変動、ホルモン分泌などさまざまな生体反応を調節している^{92)~94)}。約 24 時間周期のヒトの体内時計機構の分子調節機序は複雑であるが、基本的にはいくつかの蛋白質群が互いにその産生を制御しながら行われている^{92)~94)}。体内時計の調節中枢は視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) である。ごく単純化すると、SCN 神経細胞が発現している BMAL と CLOCK は 2 量体を形成し、PER と CRY を発現させる。PER と CRY は 2 量体を形成し、BMAL と CLOCK の発現を抑制する。この周期が基本的な体内時計を決定している^{92)~94)}。一方、SCN 神経細胞は AHR も普遍的に発現している⁹⁴⁾⁹⁵⁾。脂溶性の強いダイオキシシン類は脳血管バリアを通過し脳内にも到達しうる。興味深いことに AHR は BMAL 蛋白とも 2 量体を形成するため、BMAL/CLOCK 量を低下させ、BMAL/CLOCK と PER/CRY に

よる体内リズム形成を攪乱する⁹⁴⁾⁹⁵⁾。

このような基礎的研究報告を背景に、油症患者でも体内時計に変調が生じなんらかの睡眠障害が発生している可能性が疑われた。140 名の油症患者を対象に睡眠に関する対面アンケート調査が行われた結果、その 51.8% に中等度から重度の睡眠障害を認め、30.7% に restless leg syndrome を認めた⁹⁶⁾。また 2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度が高いと睡眠の質は有意に低下し、restless leg syndrome は有意に高頻度であった⁹⁶⁾。

6) 関節痛と関節包炎

油症や台湾 yucheng では関節炎、関節包炎が高頻度に見られた⁹⁾⁶⁹⁾⁷¹⁾⁹⁷⁾。AHR と関節炎との関連性は十分に解明されていないが、AHR を介した ROS 産生が軟骨細胞の apoptosis を誘導することがその一因ではないかと考えられる⁹⁸⁾⁹⁹⁾。

油症患者の特に男性で運動能力の低下がみられたが、骨粗鬆症の頻度への影響は見られていない¹⁰⁰⁾¹⁰¹⁾。

7) 免疫反応

AHR は T helper 17 (Th17) 細胞および T regulatory (Treg) 細胞の分化増殖に深く関与している²⁷⁾¹⁰²⁾。マウスでは AHR は Th1 細胞や Th2 細胞には発現されず、Th17 細胞に強く、Treg 細胞には弱く発現されている¹⁰³⁾。AHR ノックアウトマウスでは、Th1 や Th2 細胞の分化は影響されず、Th17 細胞における IL-22 の産生が特異的に抑制される¹⁰³⁾。AHR を一過性に活性化すると、確かに Th17 細胞への分化に傾き、そして IL-22 が産生される (Th22 への分化誘導) ようになる¹⁰⁴⁾。一方、TCDD で持続的に AHR が活性化されると、Treg 細胞数が AHR 依存的に増加したことから¹⁰⁵⁾、リガンドの種類によって AHR は異なる免疫反応を惹起しうる可能性がある。

最近の研究では、油症患者では Treg 細胞数には影響はみられないが、Natural killer (NK) 細胞数が増加し、活性化 NK 細胞が産生する cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) の血清中濃度も増加し血中 PCDF 濃度と正の相関を示すことが報告されている¹⁰⁶⁾。油症患者では血中の IL-17, IL-23, IL-1 β , TNF- α 濃度は高値であり、なんらかの炎症状態にあることが想定される¹⁰⁷⁾。一方、その生物学的意義は不明であるが、好酸球や好塩基球の遊走を司る Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) の血中濃度は油症患者で有意に低下している¹⁰⁸⁾。実際に表皮細胞にベンゾピレンを加えると AHR 依存性に CCL5 の産生が抑制されることから、CCL5 は明らかに AHR の標的分子の一つである¹⁰⁸⁾。

マウスの実験系では、ダイオキシン類などによって AHR が過度に活性化されるとアトピー性皮膚炎を増悪させる可能性が指摘されたが¹⁰⁹⁾¹¹⁰⁾、油症患者のアトピー性皮膚炎の生涯有病率は 8.8% (56/638 名) であり¹¹¹⁾、我が国の有病率¹¹²⁾よりはむしろ低値であった。また血清 IgE 値も油症認定者と健常者との間に差がなかった¹¹¹⁾。セバソコホートでは TCDD 暴露の母親から生まれた児の皮膚炎の頻度はむしろ低値であり、母親

の推定 TCDD 曝露量と逆相関していることを報告している¹¹³⁾。またこの研究では喘息、鼻炎の頻度も一般人と有意差を認めていないことから¹¹³⁾、ヒトでのダイオキシン類曝露はアレルギー疾患の発症頻度に影響を与えない可能性が高い。

8) 死因調査と発癌

ダイオキシン類の毒性は動物種によって異なっている。ヒトはマウスやラットに比べるとダイオキシン類に対して抵抗性で、ヒト AHR の活性化にはマウス AHR を活性化する 10 倍濃度の TCDD が必要とされる¹¹⁴⁾¹¹⁵⁾。マウスの系統によってもその感受性はかなり異なるし、抵抗性の低いモルモットに比べるとハムスターは約 1,000 倍ダイオキシン類抵抗性を示すといわれる¹¹⁴⁾¹¹⁵⁾。これは動物種ごとにダイオキシン類が AHR に結合する親和性が異なったり、AHR 活性化後の標的遺伝子群の発現パターンが大きく異なることが関連していると思われる¹¹⁵⁾¹¹⁶⁾。ダイオキシン類の長期的な人体影響を知るためには、動物モデルのみではなくヒトにおける疫学調査が重要となるゆえんである。

1961 年～1971 年のいわゆるベトナム戦争では、TCDD が混入した除草剤 (Agent orange) が大量に散布され広範囲高濃度の TCDD 汚染が発生した。当時軍役についた韓国軍人の 1992 年～2005 年の死因調査では、Agent orange の推定曝露量と全癌による死亡が相関していた。また個別の癌死亡率では、胃癌、小腸癌、肝癌、喉頭癌、肺癌、膀胱癌、甲状腺癌、慢性骨髄性白血病が Agent orange の推定曝露量と相関していた¹¹⁷⁾¹¹⁸⁾。また心筋梗塞、慢性閉塞性肺疾患、肝硬変などの肝疾患による死亡率も Agent orange の推定曝露量と相関していた¹¹⁸⁾。

1968 年に発生した油症では、2007 年 (発生 40 年後) 時点での詳細な死因調査が行われた。その結果、男性において全癌、肺癌、肝癌の死亡率が一般人よりも有意に高いことが明らかになった¹¹⁹⁾。一方、その他の疾患での死亡率には有意差はなかった¹¹⁹⁾。油症と類似の汚染物質によって 1979 年に発生した台湾 Yucheng の 2008 年 (発生 30 年後) 時点での死因調査では、全癌、循環器疾患、筋結合組織疾患による死亡率が一般人に

比べ有意に高かった¹²⁰⁾。油症と Yucheng のメタ解析では、男性で全癌、肺癌、心疾患、肝疾患による死亡率が有意に高く、女性では肝癌による死亡率が有意に高かった¹²¹⁾。油症患者の1968年のダイオキシン類汚染油曝露後からの生存率を調べた解析では、一般人と比較して有意差はみられていない¹²²⁾¹²³⁾。

AHR は発癌や癌進展を促進するあるいは抑制するといった膨大な報告が様々な癌細胞で報告されている^{124)~127)}。油症および Yucheng の死因調査の結果から、高濃度曝露者で数十年の経過をみると、特に男性で癌による死亡率を高める傾向が明らかである。後述するように油症では女性の方が男性よりも2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度が高いことを考えると¹⁰⁾¹²⁸⁾、男性は女性よりも発癌に関してはダイオキシン抵抗性が低いことが示唆される。

9) 周産期異常と継世代影響

母児間の重要なバリアとして機能する胎盤にも AHR は豊富に発現されている¹²⁹⁾。ダイオキシン類は胎盤を通過し胎児に移行する^{130)~132)}。各汚染物質の胎盤通過性はそれぞれ異なり、油症で問題となる毒性の高い2,3,4,7,8-PeCDF (TEF=0.3) の胎盤通過性はむしろ低く、毒性の低い1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD (TEF=0.01) のそれは高かったと推定されている¹³⁰⁾。また皮膚全体に色素沈着がみられた胎児(胎児油症と称される)では、そうではない胎児に比べると、母児ともに1,2,3,6,7,8-HexaCDD (TEF=0.1) が有意に高値を示した¹³¹⁾。母体血と胎児におけるダイオキシン類濃度を調べてみると、母体血のダイオキシン類 TEQs を100とすると、胎盤は81.5、臍帯血は37.2、胎脂は53.2、胎便は18.2、羊水は9.2であり、胎脂や胎便にかなり排泄されていることが明らかになっている¹³²⁾。

母児間のダイオキシン類の移行には経胎盤性に加え、経母乳性移行がある。実際に、1988年から1991年に健常者9人、油症患者2人の母乳中のダイオキシン類を計測した結果、健常人9人の母乳中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 8.5 ± 3.1 pg/g-lipids であったが、2人の油症患者のそれはそれぞれ 309.6 ± 71.2 , 745.9 ± 52.9 pg/g-lipids と極めて高値を示し、2,3,4,7,8-PeCDF が母乳中

に高濃度に排泄されていることが分かった¹³³⁾。

胎盤に AHR が豊富に発現されていることから、ダイオキシン類高濃度曝露である油症では妊娠および分娩への影響が懸念される。実際に、油症発生前(1968年)を念頭に、1958~1967年、1968~1977年、1978~1987年、1988~1997年にわけて妊娠分娩に関するイベントを解析してみると、油症発症前(1958~1967年)に比べ、油症発症後10年間(1968~1977年)では、人工中絶と早産が有意に高頻度であり、有意差は見られなかったものの自然流産や死産の頻度も高かった¹³⁴⁾。また人工中絶、早産、自然流産、死産の発生頻度は、母親の分娩時の PeCDF 血中濃度推定値と有意に相関していた¹³⁴⁾。また油症母親の分娩時の PeCDF 血中濃度推定値が高いと、児の出生時体重は有意に減少したことも明らかになっている¹³⁵⁾。セベソコホートでは母親の TCDD 推定曝露量と、児の出生時体重の減少、自然流産、胎児発育、妊娠期間との関連性は見出されていない¹³⁶⁾¹³⁷⁾。妊娠に対する影響は、Yucheng コホートで死産の増加、セベソコホートでは懐妊期間の延長がみられている^{138)~140)}。

高濃度の PCB やダイオキシン類に暴露した親から生まれた児(F1)あるいはその次世代(F2)では、男/女性比が低下する(女兒に比べて男児が少ない)ことが、マウスでもヒトでも報告されている¹⁴¹⁾¹⁴²⁾。セベソコホートでは F1 児の男/女性比の低下がみられたと報告されている¹⁴³⁾。台湾 Yucheng コホートでは男/女性比の低下はみられない¹⁴⁴⁾とされたが、その後の報告では20歳未満でダイオキシン類に暴露した父親から生まれた児の男/女性比は低下することが報告された¹⁴⁵⁾。動物実験の結果をまとめた報告では一定の結論を出すには至っていない¹⁴⁶⁾。最近のマウスでの研究報告では、TCDD に暴露した雄マウスがもうけた F1 仔の雄/雌性比は有意に低下し、この低下は AHR ノックアウトマウスではみられないことから、雄/雌性比の低下は AHR 依存性であるとしている¹⁴⁷⁾。精巢上体尾部の精子は AHR を発現しているが、X 染色体、Y 染色体の保有数には差がないことから、AHR 活性化が何らかの機能的な修飾を精子に与えることによって雄/雌性比の低下が引き起こされていると推察されている¹⁴⁷⁾。油症患者の調査では、ダイオキシ

ン類に暴露した母親および父親ごとの、F1 児と F2 児の男/女性比には有意差を認めなかったが、20 歳以下でダイオキシン類に暴露した母親から生まれた F1 児では男/女性比の低下傾向を認め ($P=0.06$)、F1 女から生まれた F2 児では男/女性比が有意に低下していた ($P=0.02$)¹⁴⁸。ダイオキシン類の継世代影響については Viluksela らの総説がある¹⁴⁹。

セベソコホートでは TCDD に暴露した母親の卵巣機能と推定 TCDD 曝露量の間に関連性をみだしていないが¹⁵⁰、TCDD に暴露した母親から生まれ母乳で育った男児の精子は、そうではない男児に比べて総数や運動能が有意に低下していた¹⁵¹。台湾 Yucheng コホートでは、ダイオキシン類に暴露した男性の精子の形態異常、精子数の低下、ハムスター卵への貫通能力の低下などが認められている¹⁵²⁾¹⁵³。妊娠ラットに TCDD (TEF=1) あるいは 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF, TEF=0.1) を投与した時の胎仔の精巣のコレステロール産生能やステロイド産生能は TCDF 投与群に比べ TCDD 投与群で明らかに低下している¹⁵⁴。これらの結果から、ダイオキシン類の高濃度暴露は精子になんらかの影響を与えることは確かなようである。

Seveso Women's Health Study によれば、セベソコホートにおける歩行速度、coin flipping、reach down test、握力、digit span や spatial span などの神経認知および運動能力と推定 TCDD 曝露量との間に有意な関連をみとめていない¹⁵⁵。また TCDD に曝露した母親から出生した児のコホートである Seveso Second Generation Health Study では、母親の推定 TCDD 曝露量と児の 2nd to 4th digit length ratio、reverse learning/set-shifting、memory、attention/impulsivity、あるいは non-verbal intelligence との有意な関連も認められていない¹⁵⁶⁾¹⁵⁷。一方、母親の推定 TCDD 曝露量と女兒の body mass index (BMI) は逆相関をしたが男児の BMI にはそのような傾向はなかったこと、男児では母親の推定 TCDD 曝露量が高いと metabolic syndrome が有意に発生しやすいという結果であった¹⁵⁸。また、母親の推定 TCDD 曝露量が高いと児の血中 free triiodothyronine (T3) 値が有意に低下していることから、胎児期の高濃度暴露が年月を経て甲状腺機能に影響

を与える可能性を指摘されている¹⁵⁹。台湾 Yucheng コホートでは、Yucheng 母親から出生した児の functional magnetic resonance imaging はコントロール児に比べ異なった脳所見を示すことを明らかにしている¹⁶⁰。また Yucheng 母親から出生した児は右耳の低周波域の聴覚障害が起こりやすく、それは母親の出産時の推定 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度に関連していた¹⁶¹。

10) 動物モデルによる周産期および継世代影響

継世代影響は油症患者でも懸念されているが、現時点では次世代コホートを形成することが困難でその詳細解析は容易ではない。油症班では動物実験モデルが有用と考え積極的に研究を推進している。ダイオキシン類は高用量では、発ガン性などの一般的毒性を示すが¹⁶²、これに比べてはるかに低い用量で次世代への影響を及ぼす¹⁶³。妊娠ラットをダイオキシンに比較的低用量で暴露することにより、出生児に生殖器官の萎縮¹⁶⁴ および交尾行動障害¹⁶⁴⁾¹⁶⁵ などの性未成熟が生じる。これは、成長後にまで障害形質が残るため問題が大きい¹⁶³。脳の雄型への性成熟は、周産期に胎児の脳が適切なレベルの女性ホルモンに暴露することにより引き起こされるが、女性ホルモン estradiol の合成には男性ホルモンの供給が必要である¹⁶⁶。実験動物の性分化の概要は古くより理解されていたものの、その詳細は未だ十分に明らかになっていないとは言えない。ダイオキシンを用いた研究は、そのメカニズム解明につながるものと期待される。動物モデルを用いた次世代影響に関する知見は、すでに山田英之ら¹⁶⁷ ならびに武田知起¹⁶⁸ の総説に詳述されている。本項では、その後の成果を含めて動物モデルによる周産期および継世代影響を概説する。

一般的な毒性を示すよりも比較的低用量のダイオキシン (TCDD 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 経口) を母体暴露された雄胎児では、男性ホルモンであるテストステロンの精巣での合成が低下し、その血中濃度が著しく低下する¹⁶⁹。これは胎児期の脳下垂体ホルモン黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, LH) の低下作用を介して引き起こされ、胎児期に LH 様ホルモンであるウマ絨毛性ゴナドトロピン (equine chorionic gonadotropin, eCG) を補充することで成長後の性未成熟が正常へと回復す

る¹⁷⁰⁾¹⁷¹⁾。すなわち、妊娠15日目 (Gestational day15; GD15) にダイオキシン暴露した母ラットより生まれた児は成長後、交尾行動障害を惹起するが、eCGを投与すると正常レベルに戻る。また雌児においては、甘味嗜好性がダイオキシン母体暴露により低下するが、eCGを投与すると正常レベルに戻る¹⁷¹⁾。この影響には用量依存性がある¹⁷²⁾。

ダイオキシン母体暴露による臨界期の雄児のLH低下作用には、脳下垂体における histone deacetylase (HDAC) の誘導によるエピジェネティックな影響が関わっており、HDAC1,5及び7がLH β 発現低下と同時期である出生前後において誘導される¹⁷³⁾。交尾行動障害には、出生後の gonadotropin releasing hormone (GnRH) の低下も重要であり、GnRHの補充により性行動障害も正常レベルに回復する¹⁷⁴⁾。また、ダイオキシン高感受性のC57BL6と低感受性のDBAマウスでは、周産期の児のLH低下作用は共通しているものの、DBAマウスでは同じ影響を観察するためにより高用量のダイオキシンが必要であった¹⁷⁵⁾。母体暴露による胎児のLH低下作用には用量依存性があるが、ラットにおける検討では、ダイオキシン類中最強毒性である、TCDD (TEF=1.0) と油症の主要な原因物質である2,3,4,7,8-PeCDF (TEF=0.3) を比較したところ、後者の relative potency は、約0.02であり、次世代毒性で捉えた場合、TCDDと同じ影響を及ぼすにはTEFで見積られるよりも遥かに高用量が必要であった¹⁷²⁾。このことは、TEFが主に、AHRを介したCYP1A1の誘導作用を基にして設定されていること⁵⁾によると考えられる。ダイオキシン類はCYP1A1およびCYP1A2を誘導するが、CYP1A2へ2,3,4,7,8-PeCDFが高親和性で結合することが本研究班の先行研究で分かっており¹⁷⁶⁾、肝のCYP1A2が2,3,4,7,8-PeCDFを留める働きをしていると推定されている。事実、2,3,4,7,8-PeCDFは、他のダイオキシン類より母獣の肝臓に蓄積しやすい¹⁷⁷⁾。このことは、Cyp1a2欠損マウスではダイオキシン類の肝臓への蓄積が起こらないことから支持される¹⁷⁸⁾。油症患者においても、PCDD類とPCDF類では、児への移行性が異なっており、PCDF類の移行はPCDD類に比べて低いことが示唆されている¹⁷⁹⁾。

ダイオキシンの毒性発現にAHRが重要な役割を示すことは既に述べたが、これらの後世代毒性へのAHRの寄与について、AHR欠損ラットを作製し¹⁸⁰⁾、検証に用いた、AHR欠損ラットの表現形には、ダイオキシン次世代毒性で見られるそれと幾つかの共通点がある。特に、胎児期のLHについては、ダイオキシン投与をしていないAHR欠損ラットにおいても有意に低下しており、AHR欠損ラットでは出生、成長後に性行動障害が観察され、AHR自身が性成熟に重要な働きを有することがわかった¹⁸¹⁾ (図6)。このことは、AHRがステロイドの合成調節など、恒常性維持に重要な役割をもっていることを示唆し、周産期において高親和性のリガンドであるダイオキシンの存在下にその働きが攪乱され、障害性がインプリントされると推定される。低用量ダイオキシン母体暴露によって起こる児のLH低下作用は、AHR依存的事であることも確認された¹⁸¹⁾。上述のように、ダイオキシン母体暴露による胎児期のLH低下作用は、LH様ホルモンeCGを胎児に直接補給することにより正常に回復するが¹⁷⁰⁾¹⁷¹⁾、この実験は侵襲的であり、油症患者にそのまま適用することは現実的には難しく、より安全な方法を考えることが課題である。一方、胎児期に視床下部においては、TCAサイクルの必須補酵素 α -リポ酸レベルが低下しており、ATP含量も低下している¹⁶⁹⁾。これに対し、 α -リポ酸の母体への投与により、ATPは正常レベルに戻り、LHレベルが回復し、テストステロンレベルも通常レベルに戻ることが出来る¹⁶⁹⁾。

妊娠ラットがダイオキシンの暴露を受けることにより、上述の性未成熟に加え、出生児に低身長・低体重¹⁸²⁾¹⁸³⁾、学習記憶能力障害¹⁸⁴⁾¹⁸⁵⁾ および社会行動の低下¹⁸⁶⁾などに代表される成長遅延が生じる。また、YushoおよびYuchengにおいて出生した子供において低体重¹³⁵⁾や認知発達の遅延¹⁸⁷⁾等が示唆されている。低用量ダイオキシン母体暴露 (GD15, TCDD 1 μ g/kg, 経口) では、児に発育障害が惹起される¹⁸⁸⁾。その機構には、児の成長ホルモンおよび甲状腺ホルモンの低下作用がある¹⁸⁸⁾¹⁸⁹⁾ (図6)。また、母体側要因として、プロラクチン低下による育児能力減退作用がある¹⁹⁰⁾ (図6)。成長ホルモンの低下作用は、胎児期に顕著である¹⁸⁸⁾。成長ホルモン低下作用は、

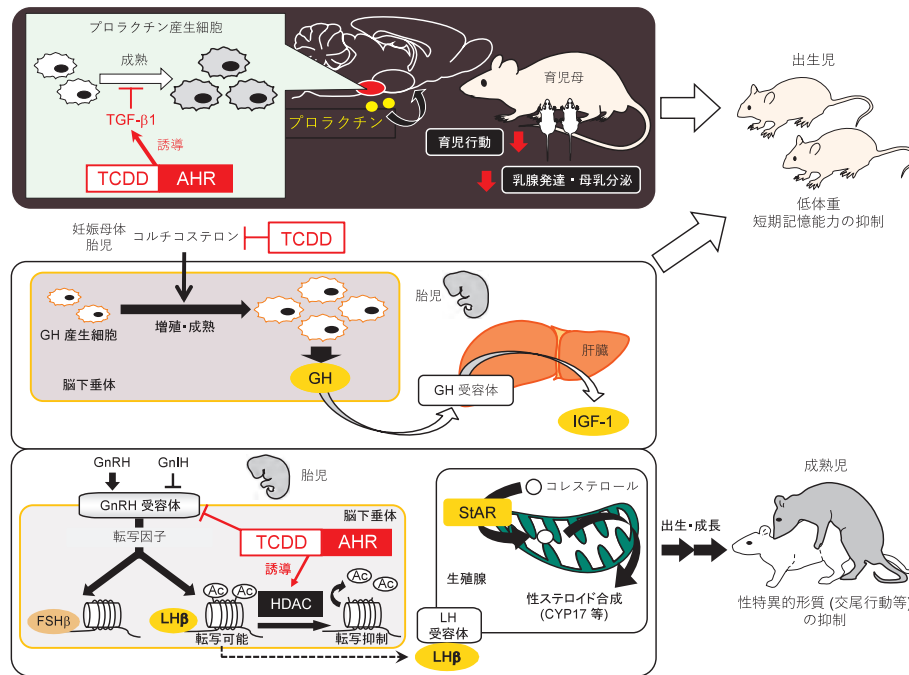


図6 ダイオキシンによる臨界期の次世代影響および周産期の母体への影響 (まとめ)
 プロラクチン (文献 190), 成長ホルモン (GH) (文献 188) および黄体形成ホルモン (LH) (文献 181) への影響. プロラクチンおよび LH は, 文献 190 および文献 181 のグラフィカルアブストラクトより改変して掲載.

特に雄児の場合は母体のコルチコステロンレベルの低下に起因し, これには, 母における代謝酵素の変動が関係すると推定される¹⁸⁸⁾. 母へのコルチコステロン供給により児は成長障害から回復する¹⁸⁸⁾. また児における甲状腺ホルモン thyroxine は, 出生直前 (GD21) および離乳時期 (Postnatal day21 ; PND21) に一過性の減少が惹起された¹⁸⁹⁾. この要因として, GD20 および GD21 において母体の thyroxine が低下していることが挙げられ, 同時に観察された下垂体の甲状腺刺激ホルモン (TSH) の上昇は, これによる正のフィードバックによると考えられる¹⁸⁹⁾. 母体では GD20 において複数の UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 分子種の誘導が認められることから¹⁸⁸⁾, 母体における thyroxine レベルの低下は, その抱合に関与する UGT の誘導によると推定される. また, 離乳児の thyroxine レベルの低下は, 児における UGT の誘導が関与すると思われる¹⁸⁸⁾.

母体側の要因としてのダイオキシンによる育児能力減退作用は, AHR 依存的であり, プロラクチンの母体への補給によって改善される¹⁹⁰⁾. また, これにより, 出生児の学習記憶能力の低下も

改善され, 正常レベルに戻すことができる. 里親実験から, この育児能力低下は児がダイオキシン母体暴露を受けたか否かには影響されず, 母体側に原因がある. 母体側のプロラクチンの低下には, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) の誘導作用の寄与が大きい¹⁹⁰⁾. 但し, ダイオキシン毒性発現に関わる AHR について考えると, ヒト AHR は, ダイオキシン高反応性の C57BL6 マウスよりも, むしろダイオキシン低反応性の DBA マウスのそれに類似していることが分かっている¹⁹¹⁾. また, Wistar 系ラットは C57BL6 マウスと遜色のないダイオキシン次世代毒性への感受性を示す¹⁷²⁾¹⁷⁵⁾. 従って, 基本的な毒性発現機構は共通するとしても, これらの結果をそのままヒトに適用することには, 慎重であるべきである. 一方, 近年の出生コホート調査からは, ダイオキシンがヒト次世代の性特異的機能に与える影響が無視出来ないとの指摘もある^{154)192)~194)}.

油症患者では, 高レベルのダイオキシン類に暴露していることから, 経胎盤および母乳から次世代に移行したダイオキシン類によって継世代影響が起こる可能性, および遺伝子の変異を伴わない

エピジェネティックな影響を及ぼす可能性を注視していく必要がある。台湾 Yucheng コホートでは、Yucheng 母親から生まれた児の DNA methylation を調べた結果、aryl hydrocarbon receptor repressor や CYP1A1 を含む 11 の遺伝子の DNA methylation が母親の妊娠時推定ダイオキシン類推定濃度と関連を示したことから、児の DNA に何らかの影響が生じる可能性を指摘している¹⁹⁵⁾。

3. ダイオキシン類血中濃度の推移

ダイオキシン類の耐容一日摂取量 (tolerable daily intake ; TDI) は現在 4 pg-TEQ/kg/day である¹⁴⁾。発生当時の油症患者の一日摂取量は 10 μ g-TEQ/Kg/day と推定されており、モルモット半数致死量が 1 μ g/Kg であることを考慮すると、桁違いに大量のダイオキシン類を摂取したことになる¹⁴⁾。当時の高濃度曝露油症患者の血中濃度は、60,000pg-TEQ/g-lipids にもものぼったと考えられる¹⁴⁾。また多くのダイオキシン類の血中半減期は、発生当初から 14~15 年後までの間では 2.4~4.1 年であった¹⁴⁾。台湾 Yucheng でも油症と同程度のダイオキシン類曝露がみられたが、油症に比べると 2,3,4,7,8-PeCDF の曝露量は少ない¹⁴⁾。2004 年ウクライナの元大統領 Victor Yushchenko 氏が純粋な TCDD を用いて毒殺されそうになった。塩素痤瘡をはじめ油症とまったく同様の症状が出現したが、彼の TCDD 血中濃度は 108,000 pg/g-lipids に達した¹⁹⁶⁾¹⁹⁷⁾。体内に摂取されたダイオキシン類は AHR を介して産生された CYP1A1, CYP1A2 やその他の経路により代謝され一部が体外に排泄される。たとえば PCBs はその種類によって CYP1A1 との親和性が異なることがわかっている¹⁹⁸⁾。

油症発生後、毎年油症検診が行われ、PCBs, PCQs そして 2004 年からは測定技術の進歩によって 2,3,4,7,8-PeCDF の血中濃度も測定している。しかし当初順調に低減すると想定されたダイオキシン類血中濃度は予想に反し下げ止まりを示したのである。油症の毒性の大半を占める 2,3,4,7,8-PeCDF の血中濃度を 2002 年の採血でみてみると、油症認定者 279 人の平均値；標準偏差；最大値；最小値は 192；252；1,890；3.1 pg/g lipids であり、一般人 127 人の 17；6.6；37；5 pg/g lipids に比べると、明らかに高濃度残留し

ている油症認定者が存在していることが分かった¹⁹⁹⁾。すなわち油症患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度の平均値はいまだに一般人の 10 倍以上であり、なかには異常な高値を維持している患者も存在していた¹⁹⁹⁾。同時に各汚染物質群の総 TEQ に占める割合を比較してみると、油症患者では PCDFs；64.8%，Dioxin-like PCBs；23.1%，Mono-ortho PCBs；15.5%，PCDDs；12.1%，Non-ortho PCBs；7.6%であったが、一般人では Dioxin-like PCBs；45.1%，PCDDs；33.3%，Non-ortho PCBs；25.7%，PCDFs；21.6%，Mono-ortho PCBs；19.4%であり、油症認定者では総 TEQ にしめる PCDF の割合が高い傾向が持続していた¹⁹⁹⁾。2004 年に測定した PCBs の血中濃度では、hexaCB-156, hexaCB-157, heptaCB-181, heptaCB-189 の血中濃度は一般人のそれに比べそれぞれ 3.4, 3.8, 3.9, 3.8 倍高値であることが報告されている²⁰⁰⁾。

2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度の半減期は発生当初から 14~15 年後までの間では 2.4 年であったが¹⁴⁾、2002 年 (発生から 34 年後) の測定で一般人平均値 (17 pg/g lipids) よりも最大で 100 倍以上 (1,890 pg/g lipids) も高い油症患者がいることから、半減期が長期化していることが疑われた。その後、半減期の測定が多くの油症患者で行われた^{201)~203)}。油症患者 327 例の 2001 年~2006 年の測定結果の解析では、男女ともに各人の半減期は大きくばらつき、半減期 7 年以下の群もあれば、半減期が 40 年以上に及ぶ群も存在した²⁰¹⁾。その後、2002~2010 年の 395 例の測定値解析結果では、半減期が 40 年以上に及ぶ群がさらに増数していた²⁰²⁾。環境中の 2,3,4,7,8-PeCDF 摂取の影響も考慮するために環境中に多い octachlorodibenzo-dioxin (OCDD) の減衰と比較しながら解析した結果、環境中の 2,3,4,7,8-PeCDF 摂取が油症患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度に与える影響は無視できる範囲内であり、油症患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度の低下速度は非常に遅くなっているかあるいはもう低下しない患者もいることがわかった²⁰³⁾。マイボーム腺からの粘調分泌物が多い患者や重症の黒色面皰を有する患者では、2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度の半減期の短い患者が多く、このような患者ではマイボーム腺や皮脂を通して体内の 2,3,4,7,8-PeCDF が積極的

に排泄されている可能性がある²⁰⁴⁾。

4. 油症の治療

油症発生後 50 年以上が経過した現在でも、多くの油症患者の体内に毒性の高い 2,3,4,7,8-PeCDF が高濃度に残留している。実際に現在でも全身倦怠感、呼吸器症状(咳・痰)、末梢神経症状(しびれ)、皮膚症状(塩素座瘡)の症状の強さと血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は正に相関する¹⁰⁾¹⁵⁾¹⁶⁾⁶⁸⁾⁶⁹⁾。そのためダイオキシン類の排泄を促進するあるいはダイオキシン類の毒性を緩和する対策はきわめて重要である。

1) ダイオキシン類の排泄を促進する対策

ラット、サルおよび油症患者剖検の解析から、経口投与された PCBs や 2,3,4,7,8-PeCDF は脂肪組織や肝臓に蓄積することがわかっている^{63)205)~208)}。さらに PCBs は肝臓よりも脂肪組織に、2,3,4,7,8-PeCDF は脂肪組織よりも肝臓に集積しやすい²⁰⁸⁾。しかもほとんど代謝分解されない²⁰⁹⁾。油症の主たる原因物質と考えられる 2,3,4,7,8-PeCDF の肝蓄積性は、血清トリグリセリド値上昇²¹⁰⁾ や肝臓による死因の増加¹¹⁹⁾ を引き起こした可能性が高い。

PCBs は胆汁中にも排泄されることが知られているが、肝内に蓄積された 2,3,4,7,8-PeCDF は胆汁中には排泄されず、血液中から微量ながら小腸壁を通して糞中に排泄されるがその多くは再吸収されてしまう²⁰⁹⁾²¹¹⁾²¹³⁾。腸管吸収されづらい脂肪性物質や薬剤を経口投与すれば、これらの物質に PCBs や 2,3,4,7,8-PeCDF は溶け込みしかも再吸収は少ないと考えられるので、PCBs や 2,3,4,7,8-PeCDF は糞中へより多く排泄され、体内蓄積量は減少すると考えられ、最も根本的な治療薬となる可能性がある。

ラットを用いたダイオキシン類排泄モデルでは、流動パラフィン²¹³⁾、スクワラン²¹²⁾²¹⁴⁾、活性炭²⁰⁹⁾、陰イオン交換樹脂であるコレステラミン²⁰⁹⁾の経口投与がダイオキシン類の排泄を促進することが報告された。ヒトにおいても陰イオン交換樹脂であるコレステラミドを投与すると PCBs 血中濃度が低下することが報告された²¹⁵⁾。また経腸非吸収性脂肪食品である olestra の経口投与によって TCDD や PCBs の血中濃度を低下させ

ることが報告されている^{216)~218)}。しかしながら、そのダイオキシン類血中濃度の低減効果は低く、個体差があり、実際にこのような物質の経口投与を年余にわたり長期的に継続できるかどうかという懸念が残る。

6 人の油症患者にコレステラミンを 6ヶ月間投与する臨床試験を行ったところ、6 人中 2 人のみで糞便中の PCDF の排泄が増加した²¹⁹⁾。その後、ラットにおいて食物繊維(米ぬかファイバー)がコレステラミンによるダイオキシン類排泄作用を増強することが分かったため²²⁰⁾²²¹⁾、油症患者 4 人および台湾 Yucheng 患者 8 人に米ぬか線維とコレステラミンを 2 週間投与する臨床試験が行われた。糞便中の PCBs と 2,3,4,7,8-PeCDF の排泄量は増加したが、臨床症状の改善はあきらかではなかった^{222)~224)}。その後行われたコレステラミド内服臨床試験では、観察期間 6ヶ月、投与期間 6ヶ月のクロスオーバー試験が行われた。同意の得られた 36 名中、9 例はコレステラミドによる便秘や腹部膨満感によって試験中止となり、1 例は最終採血日に来院せず採血が得られなかったため、26 名を解析した。その結果、コレステラミドによる 2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度の低減効果は確認できなかった²²⁵⁾。これらのダイオキシン排泄剤の投与は便秘や腹部膨満感を発生させやすく、すでに高齢となりつつある油症患者ではいずれにしても長期間の投与継続は困難である。

2) ダイオキシン類の毒性を緩和する対策

ダイオキシン類は AHR を持続的に活性化し CYP1A1 を過剰発現させ大量の ROS を産生させる¹⁹⁾²³⁾³¹⁾。この酸化ストレスがダイオキシン類の毒性の多くを担っている¹⁹⁾²³⁾³¹⁾。ROS による酸化ストレスを中和するには、NRF2 を活性化し抗酸化酵素群を誘導すればよい³⁸⁾³⁹⁾(図 7)。仮に、AHR の活性化を抑制し一方で NRF2 の活性化を誘導するような薬剤があれば油症に対する対症療法として有望と考えられる⁴⁷⁾。多様な植物性化学物質にはこのような特性を有する化合物が存在する²⁰⁾。漢方薬は植物性化学物質の宝庫なので、株式会社ツムラより漢方方剤の提供を受けその活性のスクリーニングを開始した。

その結果、桂枝(シナモン)およびその主活性物質である cinnamaldehyde に、AHR の活性化を

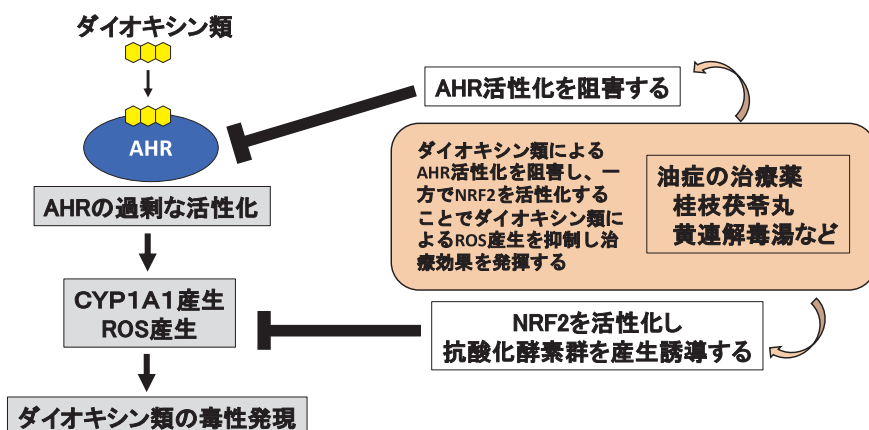


図7 油症に対する治療薬の開発

ダイオキシソ類は AHR を活性化し CYP1A1 産生させる。CYP1A1 はダイオキシソ類を分解しようとするがその過程で大量の reactive oxygen species (ROS) が産生される。ROS による酸化ストレスがダイオキシソ類による毒性発現の大きな要因となる。植物由来の漢方方剤の中には、ダイオキシソ類による AHR 活性化を阻害する一方で、抗酸化システムの代表的な転写因子である nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (NRF2) を活性化し抗酸化酵素群の発現を誘導し酸化ストレスを中和させる能力の方剤が存在する。そのような方剤のスクリーニングの結果、ツムラ桂枝茯苓丸とツムラ黄連解毒湯が「AHR 活性化は阻害し、NRF2 は活性化する」ことが明らかになった。油症患者で両剤の保険適応症状を有している方には、治療薬として積極的に推奨している。

阻害し、NRF2 の活性化を誘導する高い効果があることがわかった²²⁶⁾ (図7)。そこで桂枝を含む漢方薬を再度スクリーニングしたところ、ツムラ桂枝茯苓丸が最も AHR の活性化を抑制し一方で NRF2 の活性化を誘導した²²⁶⁾。油症患者では今でも多くの患者で全身倦怠感、しびれなどの神経症状、塩素瘡癩などの皮膚症状、咳・痰などの呼吸器症状がみられるため、桂枝茯苓丸の3ヶ月内服試験が行われた¹⁸⁾。2重盲検試験ではないというバイアスはあるものの、全身倦怠感、皮膚症状、呼吸器症状は有意に改善し、SF-36 を用いた quality of life (QOL) の評価でも身体的側面、精神的側面そして役割・社会的側面のすべての QOL スコアが有意に改善した¹⁸⁾。桂枝茯苓丸の効能効果は、月経不順、月経異常、月経痛、更年期障害、血の道症、肩こり、めまい、頭重、打ち身(打撲症)、しもやけ、しみ、湿疹・皮膚炎、にきびなどであり、このような症状を有する油症患者に桂枝茯苓丸の処方をも薦めている。

その後、さらなる漢方方剤のスクリーニングを行った。その結果、オウゴンそしてその主活性物質の一つである baicalein も AHR 活性化を抑制

し NRF2 活性化を誘導する高い効果があることがわかった²⁴⁾。Baicalein は Src のリン酸化を抑制することによって AHR が細胞質内から核内に移行するのを阻止することで AHR の活性化を抑制していることが分かった²⁴⁾。さらにオウゴンを含む漢方薬の中でツムラ黄連解毒湯がこの2重活性(AHR抑制 NRF2 亢進)を保持していることを明らかにした²⁴⁾。黄連解毒湯の効能効果は、鼻出血、不眠症、神経症、胃炎、二日酔、血の道症、めまい、動悸、更年期障害、湿疹・皮膚炎、皮膚のかゆみ、口内炎であり、このような症状を有している油症患者には黄連解毒湯を投与することが望ましいと考えられる。

また油症患者の全身倦怠感、しびれなどの神経症状、塩素瘡癩などの皮膚症状、咳・痰などの呼吸器症状に対して、補中益気湯、牛車腎気丸、荊芥連翹湯、麦門冬湯を用いた臨床試験も行った²²⁷⁾。その結果、油症に伴う咳・痰の呼吸器症状には麦門冬湯が有用であることがわかった²²⁷⁾。残念ながら、麦門冬湯に含まれるどのような化合物が有効成分であるのかの特定には未だ至っていない。

油症患者さんたちに配布している「カネミ油症の手引き—症状と治療について—」(<https://www.kyudai-derm.org/kanemi/index.html>)には、ダイオキシン類の毒性を抑制する（すなわち抗酸化作用を有する）可能性がある食物とその成分も記載されており、厚生労働省が健康増進のために掲げている成人1日あたり平均350g以上の野菜摂取を薦めている。野菜に含まれる抗酸化成分を油症の治療に少しでも応用しようという考えからである。我々の最近の研究では、大葉（シソ）の匂い成分である perillaldehyde も強い AHR 抑制化 NRF2 活性化作用を有していることから²²⁸⁾、生の大葉を積極的に食事に取り入れてもらうように広報している。

おわりに

1968年に発生したダイオキシン類中毒である油症の主たる原因汚染物質2,3,4,7,8-PeCDFは、経年的に排泄され50年後の現在は健常人のレベルまで低下すると想像されていた。しかし現在でも高濃度残留している患者は数多く、しかも一生涯高値を維持することが確実になってきた。そんななかで、全身倦怠感、塩素痤瘡とその癬痕、しびれ、咳・痰などの症状に難渋している患者も多い。化学兵器でもあるダイオキシンの体外排泄促進剤の開発は不可能と思われる。一方、ダイオキシン受容体であるAHRの研究は急速に進み、AHRの活性化を抑制することでダイオキシン類による酸化ストレスを緩和することは可能な時代となった。さらにこの研究分野は、他の疾患とくに免疫系疾患の病態解明と治療法の開発にも加速的に応用されつつある。油症の治療研究がますます深化発展することを期待したい。

謝辞

筆頭著者の古江は2001年4月～2020年3月まで油症班の班長を務めた。本総説は古江の定年退職に際しその研究総括として執筆された。共同著者の方々以外にこれまでさまざまなご協力ご厚情をいただいた数多くの班員・九州大病院油症ダイオキシン研究診療センター職員・油症相談員・油症相談支援員・行政担当者・厚生労働省担当官の方々に、深謝申し上げるとともに、そのご努力に心からの敬意を表したい。最後に、油症の被害

にあわれた患者さん方のさまざまな深い悲しみと痛みを心に寄せるとともに、そんな中でも臨床試験などにご協力をいただいたことに改めて心より感謝申し上げます。なお、執筆時の研究費として厚生労働省科学研究費（H30-食品指定-005）および文部科学省科学研究費（基盤C, FAG0K08692）の援助を受けている。

参考文献

- 1) Masuda Y and Yoshimura H: Chemical analysis and toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in relation to yusho. *J. Toxicol. Sci.* 7: 161-175, 1982.
- 2) Masuda Y and Yoshimura H: Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with yusho and their toxicological significance: a review. *Am. J. Ind. Med.* 5: 31-44, 1984.
- 3) Miyawaki T, Sugihara M, Hirakawa S, Hori T, Kajiwara J, Katsuki S, Mitoma C and Furue M: Compound-specific isotopic and congener-specific analyses of polychlorinated biphenyl in the heat medium and rice oil of the Yusho incident. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25: 16464-16471, 2018.
- 4) Safe S: Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* 21: 51-88, 1990.
- 5) Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, DeVito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N and Peterson RE: The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 93: 223-241, 2006.
- 6) Yao Y, Takasuga T, Masunaga S and Nakanishi J: Detailed study on the levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in Yusho rice oil. *Chemosphere.* 46: 1461-1469, 2002.
- 7) Iida T and Todaka T: Measurement of dioxins in human blood: improvement of analytical method. *Ind health.* 41: 197-204, 2003.
- 8) Kuratsune M, Yoshimura T, Matsuzaka J and Yamaguchi A: Yusho, a poisoning caused by

- rice oil contaminated with polychlorinated biphenyls. HSMHA Health Rep. 86 : 1083-1091, 1971.
- 9) Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T and Kuwabata M : Overview of Yusho. *J Dermatol. Sci.* 1 : S3-S10, 2005.
 - 10) Mitoma C, Mine Y, Utani A, Imafuku S, Muto M, Akimoto T, Kanekura T, Furue M and Uchi H : Current skin symptoms of Yusho patients exposed to high levels of 2,3,4,7,8-pentachlorinated dibenzofuran and polychlorinated biphenyls in 1968. *Chemosphere.* 137 : 45-51, 2015.
 - 11) Hirota Y, Kataoka K, Tokunaga S, Hirohata T, Shinohara S and Tokiwa H : Association between blood polychlorinated biphenyl concentration and serum triglyceride level in chronic "Yusho" (polychlorinated biphenyl poisoning) patients. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 65 : 221-225, 1993.
 - 12) Imamura T, Matsumoto S, Kanagawa Y, Tajima B, Matsuya S, Furue M and Oyama H : A technique for identifying three diagnostic findings using association analysis. *Med. Biol. Eng. Comput.* 45 : 51-59, 2007.
 - 13) Matsumoto S, Kanagawa Y, Koike S, Akahane M, Uchi H, Shibata S, Furue M and Imamura T : Twenty-year changes of penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) level and symptoms in Yusho patients, using association analysis. *BMC Res. Notes.* 3 : 129, 2010.
 - 14) 増田義人 : 油症などにみられる PCB, PCDF の人体に対する毒性影響, *福岡医誌* 100 : 141-155, 2009.
 - 15) 内博史 : 油症の現況と慢性ダイオキシン類中毒の治療. *西日皮膚* 76 : 535-539, 2014.
 - 16) 三苦千景, 内博史, 辻学, 古賀沙緒里, 古江増隆 : 油症の最新の知見と治療開発に向けて. *福岡医誌* 106 : 184-194, 2015.
 - 17) Mitoma C, Uchi H, Tsukimori K, Yamada H, Akahane M, Imamura T, Utani A and Furue M : Yusho and its latest findings-A review in studies conducted by the Yusho Group. *Environ. Int.* 82 : 41-48, 2015.
 - 18) Mitoma C, Uchi H, Tsukimori K, Todaka T, Kajiwara J, Shimose T, Akahane M, Imamura T and Furue M : Current state of yusho and prospects for therapeutic strategies. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25 : 16472-16480, 2018.
 - 19) Furue M, Takahara M, Nakahara T and Uchi H : Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch. Dermatol. Res.* 306 : 769-779, 2014.
 - 20) Furue M, Uchi H, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Chiba T, Ito T, Nakahara T and Tsuji G : Antioxidants for Healthy Skin : The emerging role of aryl hydrocarbon receptors and nuclear factor-erythroid 2-related factor-2. *Nutrients.* 9 : 223, 2017.
 - 21) Harada A, Sugihara K, Watanabe Y, Yamaji S, Kitamura S and Ohta S. Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of extracts from 62 herbal medicines and effect on cytochrome P450 activity. *Yakugaku Zasshi.* 135 : 1185-1196, 2015.
 - 22) Enan E and Matsumura F : Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem. Pharmacol.* 52 : 1599-1612, 1996.
 - 23) 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.
 - 24) Tanaka Y, Ito T, Tsuji G and Furue M : Baicalein inhibits benzo[a]pyrene-induced toxic response by downregulating Src phosphorylation and by upregulating NRF2-HMOX1 system. *Antioxidants (Basel).* 9 : E507, 2020.
 - 25) Gutiérrez-Vázquez C and Quintana FJ : Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. *Immunity.* 48 : 19-33, 2018.
 - 26) Kennedy LH, Sutter CH, Leon Carrion S, Tran QT, Bodreddigari S, Kensicki E, Mohny RP and Sutter TR : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated production of reactive oxygen species is an essential step in the mechanism of action to accelerate human keratinocyte differentiation. *Toxicol. Sci.* 132 : 235-249, 2013.
 - 27) Stockinger B, Di Meglio P, Gialitakis M and Duarte JH. The aryl hydrocarbon receptor : multitasking in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 32 : 403-432, 2014.
 - 28) Fritsche E, Schäfer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hübenthal U, Cline JE, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz LO, Rannug A, Fürst P, Hanenberg H, Abel J and Krutmann J : Lightning up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmic target for ultraviolet B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 : 8851-8856, 2007.
 - 29) Nagayoshi H, Murayama N, Kakimoto K, Tsujino M, Takenaka S, Katahira J, Lim YR, Kim D, Yamazaki H, Komori M, Guengerich FP

- and Shimada T : Oxidation of flavone, 5-hydroxyflavone, and 5,7-dihydroxyflavone to mono-, di-, and tri-hydroxyflavones by human cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 32 : 1268-1280, 2019.
- 30) Androutsopoulos VP, Papakyriakou A, Vourloumis D and Spandidos DA : Comparative CYP1A1 and CYP1B1 substrate and inhibitor profile of dietary flavonoids. *Bioorg. Med. Chem.* 19 : 2842-2849, 2011.
- 31) Esser C, Bargon I, Weighardt H, Haarmann-Stemmann T and Krutmann J : Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Semin. Immunopathol.* 35 : 677-691, 2013.
- 32) 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.
- 33) Shimizu K, Ogawa F, Thiele JJ, Bae S and Sato S : Lipid peroxidation is enhanced in Yusho victims 35 years after accidental poisoning with polychlorinated biphenyls in Nagasaki, Japan. *J. Appl. Toxicol.* 27 : 195-197, 2007.
- 34) Tsuji G, Takahara M, Uchi H, Takeuchi S, Mitoma C, Moroi Y and Furue M : An environmental contaminant, benzo (a) pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *J. Dermatol. Sci.* 62 : 42-49, 2011.
- 35) Tanaka Y, Uchi H, Hashimoto-Hachiya A and Furue M : Tryptophan photoproduct FICZ upregulates IL1A, IL1B, and IL6 expression via oxidative stress in keratinocytes. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018 : 9298052, 2018.
- 36) Kopf PG and Walker MK : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases reactive oxygen species production in human endothelial cells via induction of cytochrome P4501A1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245 : 91-99, 2010.
- 37) Li D, Takao T, Tsunematsu R, Morokuma S, Fukushima K, Kobayashi H, Saito T, Furue M, Wake N and Asanoma K : Inhibition of AHR transcription by NF1C is affected by a single-nucleotide polymorphism, and is involved in suppression of human uterine endometrial cancer. *Oncogene.* 32 : 4950-4959, 2013.
- 38) Wang L, He X, Szklarz GD, Bi Y, Rojanasakul Y and Ma Q : The aryl hydrocarbon receptor interacts with nuclear factor erythroid 2-related factor 2 to mediate induction of NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 537 : 31-38, 2013.
- 39) Lu H, Cui W and Klaassen CD : Nrf2 protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced oxidative injury and steatohepatitis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256 : 122-135, 2011.
- 40) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M and Fujii-Kuriyama Y : Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells.* 2 : 645-654, 1997.
- 41) Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y and Ishikawa T : Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 : 779-782, 2000.
- 42) Chen PH, Chang KT and Lu YD : Polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans in the toxic rice-bran oil that caused PCB poisoning in Taichung. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26 : 489-495, 1981.
- 43) Caramaschi F, del Corno G, Favaretti C, Giambelluca SE, Montesarchio E and Fara GM : Chloracne following environmental contamination by TCDD in Seveso, Italy. *Int. J. Epidemiol.* 10 : 135-143, 1981.
- 44) Eskenazi B, Warner M, Brambilla P, Signorini S, Ames J and Mocarelli P : The Seveso accident : A look at 40 years of health research and beyond. *Environ. Int.* 121 : 71-84, 2018.
- 45) Birnbaum LS : Dioxin and the AH Receptor : Synergy of Discovery. *Curr. Opin. Toxicol.* 2 : 120-123, 2017.
- 46) Suskind RR : Chloracne, "the hallmark of dioxin intoxication". *Scand J Work Environ Health.* 11 : 165-171, 1985.
- 47) Furue M, Fuyuno Y, Mitoma C, Uchi H and Tsuji G : Therapeutic agents with AHR inhibiting and NRF2 activating activity for managing chloracne. *Antioxidants (Basel).* 7 : 90, 2018.
- 48) Furue M and Tsuji G : Chloracne and hyperpigmentation caused by exposure to hazardous aryl hydrocarbon receptor ligands. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 16 : 4864, 2019.
- 49) Furue M, Tsuji G, Mitoma C, Nakahara T, Chiba T, Morino-Koga S and Uchi H : Gene regulation of filaggrin and other skin barrier proteins via aryl hydrocarbon receptor. *J. Dermatol. Sci.* 80 :

- 83-88, 2015.
- 50) Takei K, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Uchi H, Tahakara M, Tsuji G, Kido-Nakahara M, Nakahara T and Furue M : Antioxidant soybean tar Glyteer rescues T-helper-mediated downregulation of filaggrin expression via aryl hydrocarbon receptor. *J. Dermatol.* 42 : 171-180, 2015.
- 51) Doi K, Mitoma C, Nakahara T, Uchi H, Hashimoto-Hachiya A, Takahara M, Tsuji G, Nakahara M and Furue M : Antioxidant *Houttuynia cordata* extract upregulates filaggrin expression in an aryl hydrocarbon-dependent manner. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 105 : 205-213, 2014.
- 52) Takei K, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Takahara M, Tsuji G, Nakahara T and Furue M : *Galactomyces* fermentation filtrate prevents T helper 2-mediated reduction of filaggrin in an aryl hydrocarbon receptor-dependent manner. *Clin. Exp. Dermatol.* 40 : 786-793, 2015.
- 53) Nakahara T, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Takahara M, Tsuji G, Uchi H, Yan X, Hachisuka J, Chiba T, Esaki H, Kido-Nakahara M and Furue M : Antioxidant *Opuntia ficus-indica* extract activates AHR-NRF2 signaling and upregulates filaggrin and loricrin expression in human keratinocytes. *J. Med. Food.* 18 : 1143-1149, 2015.
- 54) Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Kiyomatsu-Oda M, Takemura M, Ohno F, Ito T, Morino-Koga S, Mitoma C, Nakahara T, Uchi H and Furue M : Aryl hydrocarbon receptor activation restores filaggrin expression via OVOL1 in atopic dermatitis. *Cell Death Dis.* 8 : e2931, 2017.
- 55) Hirano A, Goto M, Mitsui T, Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G and Furue M : Antioxidant *Artemisia princeps* extract enhances the expression of filaggrin and loricrin via the AHR/OVOL1 pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 18 : 1948, 2017.
- 56) Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G, Murai M, Yan X and Furue M : Upregulation of FLG, LOR, and IVL expression by *Rhodiola crenulata* root extract via aryl hydrocarbon receptor : Differential involvement of OVOL1. *Int. J. Mol. Sci.* 19 : 1654, 2018.
- 57) Furue M, Uchi H, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Tanaka Y, Ito T and Tsuji G : Implications of tryptophan photoproduct FICZ in oxidative stress and terminal differentiation of keratinocytes. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 154 : 37-41, 2019.
- 58) Loertscher JA, Sattler CA and Allen-Hoffmann BL : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters the differentiation pattern of human keratinocytes in organotypic culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 175 : 121-129, 2001.
- 59) Loertscher JA, Lin TM, Peterson RE and Allen-Hoffmann BL : In utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes accelerated terminal differentiation in fetal mouse skin. *Toxicol. Sci.* 68 : 465-472, 2002.
- 60) Muenyi CS, Carrion SL, Jones LA, Kennedy LH, Slominski AT, Sutter CH and Sutter TR : Effects of in utero exposure of C57BL/6J mice to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on epidermal permeability barrier development and function. *Environ. Health Perspect.* 122 : 1052-1058, 2014.
- 61) Ju Q, Fimmel S, Hinz N, Stahlmann R, Xia L and Zouboulis CC : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sebaceous gland cell differentiation in vitro. *Exp. Dermatol.* 20 : 320-325, 2011.
- 62) Forrester AR, Elias MS, Woodward EL, Graham M, Williams FM and Reynolds NJ : Induction of a chloracne phenotype in an epidermal equivalent model by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is dependent on aryl hydrocarbon receptor activation and is not reproduced by aryl hydrocarbon receptor knock down. *J. Dermatol. Sci.* 73 : 10-22, 2014.
- 63) 吉原新一, 小沢直記, 吉村英敏, 増田義人, 山領智子, 黒木広明, 村井宏一郎, 赤木公博, 山中正義, 尾前照雄, 奥村恂, 藤田守, 山元寅男, 大西晃生, 岩下宏, 向野利彦, 大西克尚, 石橋達朗, 菊池昌弘, 福山宏, 阿南ゆみ子, 赤峰昭文, 青野正男 : サルの PCB 中毒症に関する予備的研究, *福岡医誌* 70 : 135-171, 1979.
- 64) Mitamura Y, Nunomura S, Nanri Y, Ogawa M, Yoshihara T, Masuoka M, Tsuji G, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Conway SJ, Furue M and Izuohara K. The IL-13/periostin/IL-24 pathway causes epidermal barrier dysfunction in allergic skin inflammation. *Allergy.* 73 : 1881-1891, 2018.
- 65) Liu G, Asanoma K, Takao T, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Kato K and Wake N : Aryl hydrocarbon receptor SNP -130 C/T associates with dioxins susceptibility through regulating its receptor activity and downstream effectors including interleukin 24. *Toxicol. Lett.* 232 : 384-392, 2015.
- 66) Peng F, Tsuji G, Zhang JZ, Chen Z and Furue M : Potential role of PM_{2.5} in melanogenesis. *Environ Int.* 132 : 105063, 2019.
- 67) Schikowski T and Krutmann J : Air pollution (particulate matter and nitrogen dioxide) and

- skin aging. *Hautarzt*. 70 : 158-162, 2019.
- 68) Imamura T, Kanagawa Y, Matsumoto S, Tajima B, Uenotsuchi T, Shibata S and Furue M : Relationship between clinical features and blood levels of pentachlorodibenzofuran in patients with Yusho. *Environ. Toxicol.* 22 : 124-131, 2007.
- 69) Kanagawa Y, Matsumoto S, Koike S, Tajima B, Fukiwake N, Shibata S, Uchi H, Furue M and Imamura T : Association of clinical findings in Yusho patients with serum concentrations of polychlorinated biphenyls, polychlorinated quarterphenyls and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran more than 30 years after the poisoning event. *Environ Health*. 7 : 47, 2008.
- 70) Imamura T, Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Koike S, Tajima B, Matsuya S, Uchi H, Shibata S and Furue M : Cutaneous symptoms such as acneform eruption and pigmentation are closely associated with blood levels of 2,3,4,7,8-penta-chlorodibenzofurans in Yusho patients, using data mining analysis. *BMC Res. Notes*. 2 : 27, 2009.
- 71) Akahane M, Matsumoto S, Kanagawa Y, Mitoma C, Uchi H, Yoshimura T, Furue M and Imamura T : Long-term health effects of PCBs and related compounds : A comparative analysis of patients suffering from Yusho and the general population. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 74 : 203-217, 2018.
- 72) Nagayama J, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Kajiwara J, Yoshimura T and Furue M : Polychlorinated dibenzofurans as a causal agent of fetal Yusho. *Chemosphere*. 80 : 513-518, 2010.
- 73) Nakamura M, Ueda Y, Hayashi M, Kato H, Furuhashi T and Morita A : Tobacco smoke-induced skin pigmentation is mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Exp. Dermatol.* 22 : 556-558, 2013.
- 74) Peng F, Xue CH, Hwang SK, Li WH, Chen Z and Zhang JZ : Exposure to fine particulate matter associated with senile lentigo in Chinese women : a cross-sectional study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 31 : 355-360, 2017.
- 75) Chiba T, Uchi H, Tsuji G, Gondo H, Moroi Y and Furue M : Arylhydrocarbon receptor (AhR) activation in airway epithelial cells induces MUC5AC via reactive oxygen species (ROS) production. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 24 : 133-140, 2011.
- 76) Chiba T, Uchi H, Yasukawa F and Furue M : Role of the arylhydrocarbon receptor in lung disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 155 Suppl 1 : 129-134, 2011.
- 77) Chiba T, Chihara J and Furue M : Role of the Arylhydrocarbon Receptor (AhR) in the Pathology of Asthma and COPD. *J. Allergy (Cairo)*. 2012 : 372384, 2012.
- 78) Zhang Z, Zhou M, He J, Shi T, Zhang S, Tang N and Chen W : Polychlorinated dibenzo-dioxins and polychlorinated dibenzo-furans exposure and altered lung function : The mediating role of oxidative stress. *Environ Int.* 137 : 105521, 2020.
- 79) Guerrina N, Traboulsi H, Eidelman DH and Bagloli CJ : The aryl hydrocarbon receptor and the maintenance of lung health. *Int. J. Mol. Sci.* 19 : 3882, 2018.
- 80) 申敏哲, 吉村恵 : ベンゾピレンの末梢神経および脊髄感覚系シナプス伝達に及ぼす作用に関する研究, *福岡医誌* 108 : 75-82, 2017.
- 81) 金谷邦人, 山下敏彦, 川口哲, 竹林庸雄, 片平弦一郎 : 腰椎椎間板ヘルニアにおける current perception threshold. *臨床整形外科* 38 : 301-305, 2003.
- 82) Shackelford G, Sampathkumar NK, Hichor M, Weill L, Meffre D, Juricek L, Laurendeau I, Chevallier A, Ortonne N, Larousserie F, Herbin M, Bièche I, Coumoul X, Beranek M, Baulieu EE, Charbonnier F, Pasmant E and Massaad C : Involvement of aryl hydrocarbon receptor in myelination and in human nerve sheath tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 : E1319-E1328, 2018.
- 83) Chen Y, Xie HQ, Sha R, Xu T, Zhang S, Fu H, Xia Y, Liu Y, Xu L and Zhao B : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and up-regulation of neurofilament expression in neuronal cells : Evaluation of AhR and MAPK pathways. *Environ. Int.* 134 : 105193, 2020.
- 84) Okumura M : Past and current medical states of yusho patients. *Am. J. Ind. Med.* 5 : 13-18, 1984.
- 85) Tokunaga S and Kataoka K : A longitudinal analysis on the association of serum lipids and lipoproteins concentrations with blood polychlorinated biphenyls level in chronic "Yusho" patients. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 94 : 110-117, 2003.
- 86) Ohashi H, Nishioka K, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Sugawara F, Ohtani N, Muramatsu M, Wakita T and Watashi K. The aryl hydrocarbon receptor-cytochrome P450 1A1 pathway controls lipid accumulation and enhances the permissiveness for hepatitis C virus assembly. *J. Biol. Chem.* 293 : 19559-19571, 2018.
- 87) Biljes D, Hammerschmidt-Kemper C, Kadow S,

- Diel P, Weigt C, Burkart V and Esser C. Impaired glucose and lipid metabolism in ageing aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *EXCLI J.* 14 : 1153-1163, 2015.
- 88) Zhu XY, Xia HG, Wang ZH, Li B, Jiang HY, Li DL, Jin R and Jin Y : In vitro and in vivo approaches for identifying the role of aryl hydrocarbon receptor in the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol. Lett.* 319 : 85-94, 2020.
- 89) Abeles Ed, Cordeiro LM, Martins Ade S, Pesquero JL, Reis AM, Andrade SP and Botion LM : Estrogen therapy attenuates adiposity markers in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism.* 61 : 1100-1107, 2012.
- 90) Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M and Sanyal AJ : Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 24 : 908-922, 2018.
- 91) Shan Q, Huang F, Wang J and Du Y : Effects of co-exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polychlorinated biphenyls on nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Environ. Toxicol.* 30 : 1364-1374, 2015.
- 92) Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ and Reppert SM : A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell.* 96 : 57-68, 1999.
- 93) Albrecht U : Timing to perfection : the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron.* 74 : 246-260, 2012.
- 94) Jaeger C and Tischkau SA : Role of aryl hydrocarbon receptor in circadian clock disruption and metabolic dysfunction. *Environ. Health Insights.* 10 : 133-141, 2016.
- 95) Mukai M and Tischkau SA : Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system : searching for a physiological role for aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.* 95 : 172-181, 2007.
- 96) Kondo H, Tanio K, Nagaura Y, Nagayoshi M, Mitoma C, Furue M and Maeda T : Sleep disorders among Yusho patients highly intoxicated with dioxin-related compounds : A 140-case series. *Environ. Res.* 166 : 261-268, 2018.
- 97) Guo YL, Yu ML, Hsu CC and Rogan WJ : Chloracne, goiter, arthritis, and anemia after polychlorinated biphenyl poisoning : 14-year follow-Up of the Taiwan Yucheng cohort. *Environ. Health Perspect.* 107 : 715-719, 1999.
- 98) Lee HG and Yang JH : PKC- δ mediates TCDD-induced apoptosis of chondrocyte in ROS-dependent manner. *Chemosphere.* 81 : 1039-1044, 2010.
- 99) Yang JH and Lee HG : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis of articular chondrocytes in culture. *Chemosphere.* 79 : 278-284, 2010.
- 100) Fukushi JI, Tsushima H, Matsumoto Y, Mitoma C, Furue M, Miyahara H and Nakashima Y : Influence of dioxin-related compounds on physical function in Yusho incident victims. *Heliyon.* 5 : e02702, 2019.
- 101) Fukushi J, Tokunaga S, Nakashima Y, Motomura G, Mitoma C, Uchi H, Furue M and Iwamoto Y : Effects of dioxin-related compounds on bone mineral density in patients affected by the Yusho incident. *Chemosphere.* 145 : 25-33, 2016.
- 102) Furue M, Hashimoto-Hachiya A and Tsuji G : Aryl hydrocarbon receptor in atopic dermatitis and psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* 20 : 5424, 2019.
- 103) Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC and Stockinger B : The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature.* 453 : 106-109, 2008.
- 104) Schiering C, Vonk A, Das S, Stockinger B and Wincent E : Cytochrome P4501-inhibiting chemicals amplify aryl hydrocarbon receptor activation and IL-22 production in T helper 17 cells. *Biochem. Pharmacol.* 151 : 47-58, 2018.
- 105) Funatake CJ, Marshall NB, Steppan LB, Mourich DV and Kerkvliet NI : Cutting edge : activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4 + CD25 + cells with characteristics of regulatory T cells. *J. Immunol.* 175 : 4184-4188, 2005.
- 106) Kamio Y, Gunge Y, Koike Y, Kuwatsuka Y, Tsuruta K, Yanagihara K, Furue M and Murota H : Insight into innate immune response in "Yusho" : The impact of natural killer cell and regulatory T cell on inflammatory prone diathesis of Yusho patients. *Environ. Res.* 185 : 109415, 2020.
- 107) Kuwatsuka Y, Shimizu K, Akiyama Y, Koike Y, Ogawa F, Furue M and Utani A : Yusho patients show increased serum IL-17, IL-23, IL-1 β , and TNF α levels more than 40 years after accidental polychlorinated biphenyl poisoning. *J. Immunotoxicol.* 11 : 246-249, 2014.
- 108) Morino-Koga S, Uchi H, Tsuji G, Takahara M, Kajiwara J, Hirata T and Furue M : Reduction

- of CC-chemokine ligand 5 by aryl hydrocarbon receptor ligands. *J. Dermatol. Sci.* 72 : 9-15, 2013.
- 109) Ito T, Inouye K, Nohara K, Tohyama C and Fujimaki H : TCDD exposure exacerbates atopic dermatitis-related inflammation in NC/Nga mice. *Toxicol. Lett.* 177 : 31-37, 2008.
- 110) Hidaka T, Ogawa E, Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Fujimura T, Aiba S, Nakayama K, Okuyama R and Yamamoto M : The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nat. Immunol.* 18 : 64-73, 2017.
- 111) 内博史, 古江増隆 : 油症認定患者におけるアトピー性皮膚炎有病率と血清 IgE 値に関する研究, 福岡医誌 100 : 127-130, 2009.
- 112) Takeuchi S, Esaki H and Furue M : Epidemiology of atopic dermatitis in Japan. *J. Dermatol.* 41 : 200-204, 2014.
- 113) Ye M, Warner M, Mocarelli P, Brambilla P and Eskenazi B : Prenatal exposure to TCDD and atopic conditions in the Seveso second generation : a prospective cohort study. *Environ. Health.* 17 : 22, 2018.
- 114) 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.
- 115) Flaveny CA and Perdew GH : Transgenic Humanized AHR Mouse Reveals Differences between Human and Mouse AHR Ligand Selectivity. *Mol. Cell Pharmacol.* 1 : 119-123, 2009.
- 116) Sun YV, Boverhof DR, Burgoon LD, Fielden MR and Zacharewski TR : Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 32 : 4512-4523, 2004.
- 117) Yi SW and Ohrr H : Agent Orange exposure and cancer incidence in Korean Vietnam veterans : a prospective cohort study. *Cancer.* 120 : 3699-3706, 2014.
- 118) Yi SW, Ryu SY, Ohrr H and Hong JS : Agent Orange exposure and risk of death in Korean Vietnam veterans : Korean Veterans Health Study. *Int. J. Epidemiol.* 43 : 1825-1834, 2014.
- 119) Onozuka D, Yoshimura T, Kaneko S and Furue M : Mortality after exposure to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans : a 40-year follow-up study of Yusho patients. *Am. J. Epidemiol.* 169 : 86-95, 2009.
- 120) Li MC, Tsai PC, Chen PC, Hsieh CJ, Leon Guo YL and Rogan WJ : Mortality after exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans : 30 years after the "Yucheng accident". *Environ. Res.* 120 : 71-75, 2013.
- 121) Li MC, Chen PC, Tsai PC, Furue M, Onozuka D, Hagihara A, Uchi H, Yoshimura T and Guo YL : Mortality after exposure to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans : a meta-analysis of two highly exposed cohorts. *Int. J. Cancer* 137 : 1427-1432, 2015.
- 122) Onozuka D, Hirata T and Furue M : Relative survival after exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins : a follow-up of Japanese patients affected in the Yusho incident. *Sci. Total Environ.* 409 : 2361-2365, 2011.
- 123) Onozuka D, Hirata T and Furue M : Net survival after exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins : the Yusho study. *Environ. Int.* 73 : 28-32, 2014.
- 124) Tsay JJ, Tchou-Wong KM, Greenberg AK, Pass H and Rom WN : Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer. *Anticancer Res.* 33 : 1247-1256, 2013.
- 125) Lu P, Cai X, Guo Y, Xu M, Tian J, Locker J and Xie W : Constitutive activation of the human aryl hydrocarbon receptor in mice promotes hepatocarcinogenesis independent of its coactivator Gadd45b. *Toxicol. Sci.* 167 : 581-592, 2019.
- 126) Yamaguchi M and Hankinson O : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses the growth of human colorectal cancer cells in vitro : Implication of the aryl hydrocarbon receptor signaling. *Int. J. Oncol.* 54 : 1422-1432, 2019.
- 127) Huerta-Yepez S, Tirado-Rodriguez A, Montecillo-Aguado MR, Yang J, Hammock BD and Hankinson O : Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent inductions of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid metabolism act inversely on tumor progression. *Sci. Rep.* 10 : 7843, 2020.
- 128) 梶原淳睦, 戸高尊, 平川博仙, 堀就英, 小野塚大介, 高尾佳子, 平田輝昭, 飯田隆雄, 内博史, 古江増隆 : 油症認定患者の男女間の血液中ダイオキシン類濃度差, 福岡医誌 102 : 140-144, 2011.
- 129) Wakx A, Nedder M, Tomkiewicz-Raulet C, Dalmaso J, Chissey A, Boland S, Vibert F, Degrelle SA, Fournier T, Coumoul X, Gil S and Ferecatu I : Expression, localization, and activity of the aryl hydrocarbon receptor in the

- human placenta. *Int. J. Mol. Sci.* 19 : 3762, 2018.
- 130) Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Fukushima K, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Wake N and Furue M : Comparison of the concentrations of polychlorinated biphenyls and dioxins in mothers affected by the Yusho incident and their children. *Chemosphere.* 84 : 928-935, 2011.
- 131) Tsukimori K, Uchi H, Tokunaga S, Yasukawa F, Chiba T, Kajiwara J, Hirata T and Furue M : Blood levels of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in Yusho mothers and their descendants : association with fetal Yusho disease. *Chemosphere.* 90 : 1581-1588, 2013.
- 132) Morokuma S, Tsukimori K, Hori T, Kato K and Furue M : The Vernix caseosa is the main site of dioxin excretion in the human foetus. *Sci. Rep.* 7 : 739, 2017.
- 133) 松枝隆彦, 飯田隆雄, 平川博仙, 深町和美, 常盤寛, 長山淳哉 : 油症患者及び対象者の母乳中の PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs 濃度の比較, *福岡医誌* 84 : 263-272, 1993.
- 134) Tsukimori K, Tokunaga S, Shibata S, Uchi H, Nakayama D, Ishimaru T, Nakano H, Wake N, Yoshimura T and Furue M : Long-term effects of polychlorinated biphenyls and dioxins on pregnancy outcomes in women affected by the Yusho incident. *Environ. Health Perspect.* 116 : 626-630, 2008.
- 135) Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Chiba T, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Fukushima K, Wake N and Furue M : Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease. *Environ. Int.* 38 : 79-86, 2012.
- 136) Wesselink A, Warner M, Samuels S, Parigi A, Brambilla P, Mocarelli P and Eskenazi B : Maternal dioxin exposure and pregnancy outcomes over 30 years of follow-up in Seveso. *Environ. Int.* 63 : 143-148, 2014.
- 137) Ames J, Warner M, Mocarelli P, Brambilla P, Signorini S, Siracusa C, Huen K, Holland N and Eskenazi B : AHR gene-dioxin interactions and birthweight in the Seveso Second Generation Health Study. *Int J Epidemiol.* 47 : 1992-2004, 2018.
- 138) Yu ML, Guo YL, Hsu CC and Rogan WJ : Menstruation and reproduction in women with polychlorinated biphenyl (PCB) poisoning : long-term follow-up interviews of the women from the Taiwan Yucheng cohort. *Int. J. Epidemiol.* 29 : 672-677, 2000.
- 139) Eskenazi B, Warner M, Marks AR, Samuels S, Needham L, Brambilla P and Mocarelli P : Serum dioxin concentrations and time to pregnancy. *Epidemiology.* 21 : 224-231, 2010.
- 140) Eskenazi B, Warner M, Brambilla P, Signorini S, Ames J and Mocarelli P : The Seveso accident : A look at 40years of health research and beyond. *Environ. Int.* 121 : 71-84, 2018.
- 141) Ikeda M, Tamura M, Yamashita J, Suzuki C and Tomita T : Repeated in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure affects male gonads in offspring, leading to sex ratio changes in F2 progeny. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206 : 351-355, 2005.
- 142) Hertz-Picciotto I, Jusko TA, Willman EJ, Baker RJ, Keller JA, Teplin SW and Charles MJ : A cohort study of in utero polychlorinated biphenyl (PCB) exposures in relation to secondary sex ratio. *Environ. Health.* 7 : 37, 2008.
- 143) Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG Jr and Needham LL : Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet.* 348 : 409, 1996.
- 144) Rogan WJ, Gladen BC, Guo YL and Hsu CC : Sex ratio after exposure to dioxin-like chemicals in Taiwan. *Lancet.* 353 : 206-207, 1999.
- 145) Del Rio Gomez I, Marshall T, Tsai P, Shao YS and Guo YL : Number of boys born to men exposed to polychlorinated byphenyls. *Lancet.* 360 : 143-144, 2002.
- 146) Rowlands JC, Budinsky RA, Aylward LL, Faqi AS and Carney EW. Sex ratio of the offspring of Sprague-Dawley rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in utero and lactationally in a three-generation study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216 : 29-33, 2006.
- 147) Bircsak KM, Copes LT, King S, Prantner AM, Hwang WT and Gerton GL : The aryl hydrocarbon receptor mediates sex ratio distortion in the embryos sired by TCDD-exposed male mice. *Reprod. Toxicol.* 94 : 75-83, 2020.
- 148) Tsukimori K, Yasukawa F, Uchi H, Furue M and Morokuma S : Sex ratio in two generations of the Yusho cohort. *Epidemiology.* 23 : 349-350, 2012.
- 149) Viluksela M and Pohjanvirta R. Multigenerational and transgenerational effects of dioxins. *Int. J. Mol. Sci.* 20 : 2947, 2019.
- 150) Warner M, Eskenazi B, Olive DL, Samuels S, Quick-Miles S, Vercellini P, Gerthoux PM, Needham L, Patterson DG and Mocarelli P : Serum dioxin concentrations and quality of ovarian function in women of Seveso. *Environ Health Perspect.* 115 : 336-340, 2007.

- 151) Mocarelli P, Gerthoux PM, Needham LL, Patterson DG Jr, Limonta G, Falbo R, Signorini S, Bertona M, Crespi C, Sarto C, Scott PK, Turner WE and Brambilla P : Perinatal exposure to low doses of dioxin can permanently impair human semen quality. *Environ. Health Perspect.* 119 : 713-718, 2011.
- 152) Hsu PC, Huang W, Yao WJ, Wu MH, Guo YL and Lambert GH : Sperm changes in men exposed to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *JAMA.* 289 : 2943-2944, 2003.
- 153) Hsu PC, Li MC, Lee YC, Kuo PL and Guo YL : Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans increased abnormal sperm morphology without alterations in aneuploidy : The Yucheng study. *Chemosphere.* 165 : 294-297, 2016.
- 154) Johnson KJ, Passage J, Lin H, Sriram S and Budinsky RA : Dioxin male rat reproductive toxicity mode of action and relative potency of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran characterized by fetal pituitary and testis transcriptome profiling. *Reprod. Toxicol.* 93 : 146-162, 2020.
- 155) Ames J, Warner M, Brambilla P, Mocarelli P, Satariano WA and Eskenazi B : Neurocognitive and physical functioning in the Seveso Women's Health Study. *Environ. Res.* 162 : 55-62, 2018.
- 156) Slama N, Warner M, Mocarelli P, Brambilla P and Eskenazi B : The 2nd to 4th digit length ratio (2D : 4D) among children of Seveso women exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Early Hum. Dev.* 131 : 45-50, 2019.
- 157) Ames J, Warner M, Siracusa C, Signorini S, Brambilla P, Mocarelli P and Eskenazi B : Prenatal dioxin exposure and neuropsychological functioning in the Seveso Second Generation Health Study. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 222 : 425-433, 2019.
- 158) Warner M, Rauch S, Ames J, Mocarelli P, Brambilla P, Signorini S and Eskenazi B : In utero dioxin exposure and cardiometabolic risk in the Seveso Second Generation Study. *Int. J. Obes. (Lond).* 43 : 2233-2243, 2019.
- 159) Warner M, Rauch S, Ames J, Mocarelli P, Brambilla P, Signorini S and Eskenazi B : Prenatal dioxin exposure and thyroid hormone levels in the Seveso second generation study. *Environ. Res.* 183 : 109280, 2020.
- 160) Chu CP, Wu SW, Huang YJ, Chiang MC, Hsieh ST and Guo YL : Neuroimaging signatures of brain plasticity in adults with prenatal exposure to polychlorinated biphenyls : Altered functional connectivity on functional MRI. *Environ. Pollut.* 250 : 960-968, 2019.
- 161) Li MC, Wu HP, Yang CY, Chen PC, Lambert GH and Leon Guo Y : Gestational exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans induced asymmetric hearing loss : Yucheng children study. *Environ. Res.* 137 : 65-71, 2015.
- 162) 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.
- 163) 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.
- 164) Gray LE Jr and Ostby JS : In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133 : 285-294, 1995.
- 165) Bjerke DL and Peterson RE : Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male rats : different effects of in utero versus lactational exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127 : 241-249, 1994.
- 166) McCarthy MM : How it's made : organisational effects of hormones on the developing brain. *J. Neuroendocrinol.* 22 : 736-742, 2010.
- 167) 山田英之, 武田知起, 古賀貴之, 石井祐次 : 性分化と脳分化における臨界期の役割 : ダイオキシン次世代影響解析を通じたアプローチ. *薬学雑誌* 134 : 529-535, 2014.
- 168) 武田知起 : ダイオキシンによる出生児の性未成熟の分子機構. *薬学雑誌* 137 : 1373-1379, 2017.
- 169) Koga T, Ishida T, Takeda T, Ishii Y, Uchi H, Tsukimori K, Yamamoto M, Himeno M, Furue M and Yamada H : Restoration of dioxin-induced damage to fetal steroidogenesis and gonadotropin formation by maternal co-treatment with α -lipoic acid. *PLoS ONE*, 7 : e40322, 2012.
- 170) 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.
- 171) 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.
- 172) Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M and Yamada H : 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran is far less potent than 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in disrupting the pituitary-gonad axis of the rat fetus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 281 : 48-57, 2014.
- 173) 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.
- 174) Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Yamamoto M, Shimazoe T, Ishii Y, Himeno M and Yamada H : Maternal exposure to dioxin imprints sexual immaturity of the pups through fixing the status of the reduced expression of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Pharmacol.* 85 : 74-82, 2014.
- 175) Takeda T, Taura J, Hattori Y, Ishii Y and Yamada H : Dioxin-induced retardation of development through a reduction in the expression of pituitary hormones and possible involvement of an aryl hydrocarbon receptor in this defect : a comparative study using two strains of mice with different sensitivities to dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278 : 220-229, 2014.
- 176) Kuroki J, Koga N and Yoshimura H : High affinity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran to cytochrome P-450 in the hepatic microsome of rats. *Chemosphere* 15 : 731-738, 1986.
- 177) Chen C, Hamm JT, Hass JR and Birnbaum LS : Disposition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and non-ortho polychlorinated biphenyls in pregnant Long Evans rats and the transfer to offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 173 : 65-88, 2001.
- 178) Diliberto JJ, Burgin D and Birnbaum LS : Role of CYP1A2 in hepatic sequestration of dioxin : studies using CYP1A2 knock-out mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 : 431-433, 1997.
- 179) Tsukimori K, Morokuma S, Hori T, Takahashi K, Hirata T, Otera Y, Fukushima K, Kawamoto T and Wake N : Characterization of placental transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in normal pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 39 : 83-90, 2013.
- 180) Takeda T, Komiya Y, Koga T, Ishida T, Ishii Y, Kikuta Y, Nakaya M, Kurose H, Yokomizo T, Shimizu T, Uchi H, Furue M and Yamada H : Dioxin-induced increase in leukotriene B4 biosynthesis through the aryl hydrocarbon receptor and its relevance to hepatotoxicity owing to neutrophil infiltration. *J. Biol. Chem.* 292 : 10586-10599, 2017.
- 181) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H and Ishii Y : The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. *Biochem. Pharmacol.* 154 : 213-221, 2018.
- 182) Thiel R, Koch E, Ulbrich B and Chahoud I : Peri and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin : effects on physiological development, reflexes, locomotor activity and learning behaviour in Wistar rats. *Arch. Toxicol.* 69 : 79-86, 1994.
- 183) Myllymäki SA, Haavisto TE, Brokken LJ, Viluksela M, Toppari J and Paranko J : In utero and lactational exposure to TCDD ; steroidogenic outcomes differ in male and female rat pups. *Toxicol. Sci.* 88 : 534-544, 2005.
- 184) Nishijo M, Kuriwaki J, Hori E, Tawara K, Nakagawa H and Nishijo H : Effects of maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on fetal brain growth and motor and behavioral development in offspring rats. *Toxicol. Lett.* 30 : 41-47, 2007.
- 185) Hojo R, Kakeyama M, Kurokawa Y, Aoki Y, Yonemoto J and Tohyama C : Learning behavior in rat offspring after in utero and lactational exposure to either TCDD or PCB126. *Environ. Health Prev. Med.* 13 : 169-180, 2008.
- 186) Negishi T, Shimomura H, Koyama T, Kawasaki K, Ishii Y, Kyuwa S, Yasuda M, Kuroda Y and Yoshikawa Y : Gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects social behaviors between developing rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Toxicol. Lett.* 160 : 233-244, 2006.
- 187) Chen YC, Guo YL, Hsu CC and Rogan WJ : Cognitive development of Yu-Cheng ("oil disease") children prenatally exposed to heat-

- degraded PCBs. *JAMA*. 268 : 3213-3218, 1992.
- 188) Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y and Yamada H : Dioxin-induced fetal growth retardation : the role of a preceding attenuation in the circulating level of glucocorticoid. *Endocrine* 47 : 572-580, 2014.
- 189) 服部友紀子, 武田知起, 田浦順樹, 黒木広明, 石井祐次, 山田英之 : ダイオキシン母体曝露による発達児の甲状腺ホルモンへの影響. *福岡医誌* 106 : 127-134, 2015.
- 190) Takeda T, Fujii M, Izumoto W, Hattori Y, Matsushita T, Yamada H and Ishii Y : Gestational dioxin exposure suppresses prolactin-stimulated nursing in lactating dam rats to impair development of postnatal offspring. *Biochem. Pharmacol.* 178 : 114106, 2020.
- 191) Ema M, Ohe N, Suzuki M, Mmimura J, Sogawa K, Ikawa S and Fujii-Kuriyama Y : Dioxin binding activities of polymorphic form of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J. Biol. Chem.* 269 : 27337-27343, 1994.
- 192) Grandjean P, Grønlund C, Kjær IM, Jensen TK, Sørensen N, Andersson AM, Juul A, Skakkebaek NE, Budtz-Jørgensen E and Weihe P : Reproductive hormone profile and pubertal development in 14-year-old boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls. *Reprod. Toxicol.* 34 : 498-503, 2012.
- 193) Winneke G, Ranft U, Wittsiepe J, Kasper-Sonnenberg M, Fürst P, Krämer U, Seitner G and Wilhelm M : Behavioral sexual dimorphism in school-age children and early developmental exposure to dioxins and PCBs : a follow-up study of the Duisburg Cohort. *Environ. Health Perspect.* 122 : 292-298, 2014.
- 194) Nowack N, Wittsiepe J, Kasper-Sonnenberg M, Wilhelm M and Schölmerich A : Influence of Low-Level Prenatal Exposure to PCDD/Fs and PCBs on Empathizing, Systemizing and Autistic Traits : Results from the Duisburg Birth Cohort Study. *PLoS One*, 10 : e0129906, 2015.
- 195) Su KY, Li MC, Lee NW, Ho BC, Cheng CL, Chuang YC, Yu SL and Guo YL : Perinatal polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans exposure are associated with DNA methylation changes lasting to early adulthood : Findings from Yucheng second generation. *Environ. Res.* 170 : 481-486, 2019.
- 196) Sorg O, Zennegg M, Schmid P, Fedosyuk R, Valikhnovskiy R, Gaide O, Kniazevych V and Saurat JH : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) poisoning in Victor Yushchenko : identification and measurement of TCDD metabolites. *Lancet*. 374 : 1179-1185, 2009.
- 197) Saurat JH, Kaya G, Saxer-Sekulic N, Pardo B, Becker M, Fontao L, Mottu F, Carraux P, Pham XC, Barde C, Fontao F, Zennegg M, Schmid P, Schaad O, Descombes P and Sorg O : The cutaneous lesions of dioxin exposure : lessons from the poisoning of Victor Yushchenko. *Toxicol Sci.* 125 : 310-317, 2012.
- 198) Hirakawa S, Miyawaki T, Hori T, Kajiwara J, Katsuki S, Hirano M, Yoshinouchi Y, Iwata H, Mitoma C and Furue M : Accumulation properties of polychlorinated biphenyl congeners in Yusho patients and prediction of their cytochrome P450-dependent metabolism by in silico analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25 : 16455-16463, 2018.
- 199) 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.
- 200) 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.
- 201) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Koike S, Yoshimura T, Mitoma C, Shibata S, Uchi H, Furue M and Imamura T : Variation in half-life of penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) blood level among Yusho patients. *Chemosphere*. 77 : 658-662, 2009.
- 202) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Kajiwara J, Mitoma C, Uchi H, Furue M and Imamura T : Unexpectedly long half-lives of blood 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) levels in Yusho patients. *Environ. Health*. 14 : 76, 2015.
- 203) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Kajiwara J, Mitoma C, Uchi H, Furue M and Imamura T : Change in decay rates of dioxin-like compounds in Yusho patients. *Environ. Health*. 15 : 95, 2016.
- 204) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Kajiwara J, Todaka T, Yasukawa F, Uchi H, Furue M and Imamura T : Individuals' half-lives for 2,3,4,7,8-penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) in blood : correlation with clinical manifestations and laboratory results in subjects with Yusho. *Chemosphere*. 92 : 772-777, 2013.

- 205) 黒木広明, 増田義人, 古賀信幸, 吉村英敏 : PCB中毒サルの肝臓におけるPCDF蓄積及び酵素誘導作用, 福岡医誌 74 : 234-239, 1983.
- 206) Kuroki H, Masuda Y, Yoshihara S and Yoshimura H : Accumulation of polychlorinated dibenzofurans in the livers of monkeys and rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 18 : 387-392, 1980.
- 207) Yoshimura H, Kuroki J, Koga N, Kuroki H, Masuda Y, Fukasaku N and Hasegawa M : High accumulation of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran to hepatic microsomes of rats. *J Pharmacobiodyn.* 7 : 414-419, 1984.
- 208) Masuda Y, Kuroki H, Haraguchi K and Nagayama J : PCB and PCDF congeners in the blood and tissues of yusho and yu-cheng patients. *Environ Health Perspect.* 59 : 53-58, 1985.
- 209) 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.
- 210) 奥村恂, 山中正義, 中牟田澄子 : 油症 (PCB中毒) 患者における血清トリグリセライド値の10年間の推移, 福岡医誌 70 : 208-210, 1979.
- 211) Yoshimura H and Yamamoto H : A novel route of excretion of 2,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 13 : 681-688, 1975.
- 212) 吉村英敏, 神村英利, 小栗一太, 佐伯清太郎 : 高毒性 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) のラット糞中排泄に及ぼすスクアランの効果, 福岡医誌 76 : 184-189, 1985.
- 213) Richter E, Lay JP, Klein W and Korte F : Paraffin-stimulated excretion of 2,4,6,2',4'-pentachlorobi [14C] phenyl by rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50 : 17-23, 1979.
- 214) Richter E, Schäfer SG and Fichtl B : Stimulation of the faecal excretion of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl in rats by squalane. *Xenobiotica.* 13 : 337-343, 1983.
- 215) Sakurai K, Fukata H, Todaka E, Saito Y, Bujo H and Mori C : Colestimide reduces blood polychlorinated biphenyl (PCB) levels. *Intern. Med.* 45 : 327-328, 2006.
- 216) Geusau A, Tschachler E, Meixner M, Sandermann S, Pöpke O, Wolf C, Valic E, Stingl G and McLachlan M : Olestra increases faecal excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Lancet.* 354 : 1266-1267, 1999.
- 217) Geusau A, Schmaldienst S, Derfler K, Pöpke O and Abraham K : Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication : kinetics and trials to enhance elimination in two patients. *Arch. Toxicol.* 76 : 316-325, 2002.
- 218) Jandacek RJ, Heubi JE, Buckley DD, Khoury JC, Turner WE, Sjödin A, Olson JR, Shelton C, Helms K, Bailey TD, Carter S, Tso P and Pavuk M : Reduction of the body burden of PCBs and DDE by dietary intervention in a randomized trial. *J Nutr Biochem.* 25 : 483-488, 2014.
- 219) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 竹中重幸, 森田邦正, 橋崎幸範, 深町和美, 常盤寛, 高橋克巳, 吉村英敏 : コレスチラミン投与による油症原因物質の糞便中への排泄促進の試み, 福岡医誌 82 : 317-325, 1991.
- 220) 竹中重幸, 森田邦正, 高橋克巳 : 米ぬかファイバーおよびコレスチラミンを用いたラット糞便中へのPCB排泄促進, 福岡医誌 82 : 310-316, 1991.
- 221) 森田邦正, 平川博仙, 松枝隆彦, 飯田隆雄, 常盤寛 : ラットにおける食物繊維のPCDFおよびPCDD排泄促進効果, 福岡医誌 84 : 273-281, 1993.
- 222) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 森田邦正, 常盤寛, 辻博, 中山樹一郎, 堀嘉昭 : 油症患者における米ぬか繊維とコレスチラミンの併用投与によるpPolychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) の糞便中への排泄促進の試み, 福岡医誌 84 : 257-262, 1993.
- 223) 辻博, 池田耕一, 野見山賢介, 藤島正敏 : 油症に対する米ぬかファイバー・コレスチラミン併用投与の臨床的検討, 福岡医誌 84 : 282-286, 1993.
- 224) Iida T, Nakagawa R, Hirakawa H, Matsueda T, Morita K, Hamamura K, Nakayama J, Hori Y, Guo YL, Chang FM, Hsiao PW, Lin KC, Yu ML, Lai TJ, Chen SJ and Hsu CC : Clinical trial of a combination of rice bran fiber and cholestyramine for promotion of fecal excretion of retained polychlorinated dibenzofuran and polychlorinated biphenyl in Yu-Cheng patients. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 86 : 226-233, 1995.
- 225) Todaka T, Honda A, Imaji M, Takao Y, Mitoma C and Furue M : Effect of colestimide on the concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. *Environ. Health.* 15 : 63, 2016.
- 226) Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, Mitoma C and Furue M : Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 85 : 36-43, 2017.
- 227) Uchi H, Tokunaga S, Mitoma C, Shibata S, Hamada N, Nakanishi Y, Kajiwara J, Yoshimura T and Furue M : A clinical trial of kampo

- formulae for the treatment of symptoms of yusho, a poisoning caused by dioxins and related organochlorine compounds. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011 : 589724, 2011.
- 228) Fuyuno Y, Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, Tanaka Y, Mitoma C and Furue M : Perillaldehyde inhibits AHR signaling and activates NRF2 antioxidant pathway in human keratinocytes. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018 : 9524657, 2018.
- (Received for publication December 28, 2020)

Polychlorinated Quaterphenyl Concentrations in the Blood and Their Patterns in Subjects Examined for a Possible Diagnosis of Yusho from FY 2009 to 2019

Tamaki SATO¹⁾, Toshitaka KOGISO¹⁾, Nami KAMIHARAGUCHI²⁾, Takashi TODAKA²⁾, Hironori HIRAKAWA¹⁾, Tsuguhide HORI¹⁾, Jumboku KAJIWARA²⁾, Susumu KATSUKI¹⁾, Masutaka FURUE³⁾ and Gaku TSUJI⁴⁾

¹⁾*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences*

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

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

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

Abstract

Since 1985, blood concentrations of polychlorinated quaterphenyls (PCQs), which are congeners that accumulate in the bodies of typical Yusho patients in the same way as PCBs, have been monitored by the Study Group for Yusho. We present here the tendencies and characteristics of blood PCQ concentrations in subjects examined for a possible diagnosis of Yusho from FY 2009 to 2019. The peak patterns of PCBs in the blood tended to be close to those of a typical Yusho patient as the blood PCQ concentration increased. The result of the secular change of PCQ concentration in a typical Yusho patient, suggested that lipophilic PCQ congeners were hardly excreted even in high-exposure cases. Almost all of the blood PCQ concentrations in subjects born after the rice oil poisoning incident were as with those of healthy individuals. Therefore we concluded that PCQ congeners had hardly transferred from Yusho patients to the next generation. The usefulness of blood PCQ concentration as a diagnostic criterion for Yusho is still unchanged, and a continuous follow-up survey will be important in the future.

Key words : Polychlorinated Quaterphenyl (PCQ), Blood, Yusho

Introduction

A mass food poisoning occurred in western Japan in 1968. The incident is called Yusho, or oil disease, as it was caused by the ingestion of rice oil contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs). Polychlorinated quaterphenyls (PCQs) are among the typical chemical substances contained in high concentrations in the patients poisoned in the incident, and these are believed to have been unintentionally generated when PCBs were used as a heating medium¹⁾. PCQs are rarely detected at trace level in the blood of healthy individuals²⁾. On the other hand, PCQs were specifically detected in the blood of Yusho patients in 1981³⁾.

For this reason, a Yusho Study group, created by The Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, added PCQ concentrations in the blood to the diagnostic criteria for Yusho in 1981, and the concentrations have served as characteristic and useful information on Yusho. The criteria for blood PCQ concentrations in Yusho diagnoses are an “Abnormally high concentration” of 0.1 ng/g or more and a “Normal concentration” of 0.02 ng/g or less ; 0.03 to 0.09 ng/g between the two is regarded as the “Boundary region concentration”.

According to previous reports⁴⁾⁻⁶⁾ that analyzed the tendencies and characteristics of blood PCQ concentrations in subjects examined for a

Corresponding author : Tamaki SATO
Fukuoka Institute of Health Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan
E-mail : t-satou@fihes.pref.fukuoka.jp

possible diagnosis of Yusho in Fukuoka Prefecture from FY 1999 to 2008, the blood PCQ concentrations of the typical Yusho patient decreased more gradually from the start of measurement. Therefore, it was obvious that PCQ congeners were gradually excreted from the body, but the degree of excretion decreased year by year. Moreover, it was considered a future task to verify whether or not PCQs were transferred to the generation born after 1989 from the viewpoint of the health effect on children, while PCQs were detected in the blood of subjects born before the 1968 incident⁶⁾.

The PCQ analytical method in blood was first developed by Maeda et al.⁷⁾. This method consists of both the chemical derivatization of PCQs to octadecachloro quaterphenyls (ODCQs), which are completely chlorinated forms, and the determination of ODCQs using gas chromatography with an electron capture detector (GC-ECD). After that, the PCQ analytical method in the blood was improved, achieving higher sensitivity⁸⁾, higher speed⁴⁾, and greater efficiency⁹⁾. Currently, each institution conducts PCQ inspections according to the improved analytical method. In addition, the quality control of analytical methods has been required recently to ensure the reliability of inspection results.

In this study, we attempted to investigate the tendencies and characteristics of blood PCQ concentrations in subjects examined for a possible diagnosis of Yusho from FY 2009 to 2019. First, to control the quality of the analytical method, the method's accuracy was confirmed using a positive control sample of PCQs. We then analyzed the relationship between the blood PCQ concentrations of the subjects and their peak patterns of PCBs (PCB patterns), which were closely related to the severity of clinical symptoms of Yusho patients¹⁰⁾, as well as the secular change of the blood PCQ concentrations in a typical Yusho patient. Finally, we reported the results of our investigation of the blood PCQ concentrations of subjects born after 1968.

Materials and Methods

1. Materials

The following were obtained from Wako Pure Chemical Industries : potassium hydroxide for a guaranteed reagent, 30% fuming sulfuric acid for Wako 1st grade, sulfuric acid for analysis of poisonous metals, 20% hydrochloric acid for a super special grade, (+) -sodium tartrate dihydrate for a guaranteed reagent, sodium hydrogen carbonate for a guaranteed reagent, chloroform for residual pesticide/PCB analysis, and n-nonane for analysis of dioxins. Ethanol and n-hexane were used for analysis of dioxins (Kanto Chemical). Distilled water with a n-hexane wash was residual pesticide analysis grade (Kanto Chemical). Anhydrous sodium sulfate, diethyl ether, and dichloromethane, manufactured by Kanto Chemical, were used for the residual pesticide/PCB analysis. Antimony (V) chloride was PCB analysis grade (Sigma-Aldrich).

Florisil (particle size : 150-250 μm) for column chromatography (made by Kanto Chemical) was previously activated at 130°C for 3 hours and used. Alumina 90, Activated, Neutral (70-230 mesh) for column chromatography (made by Merck Millipore) was previously added to distilled water to 2% after activation at 130°C for 3 hours and used.

2. Equipment

Electric analytical scale : AG285 (Mettler Toledo)

Oil bath : EO-200RD (AS ONE)

Electric drying oven : DRN420DB (ADVANTEC)

Centrifuge : 2410 (Kubota)

GC-ECD : 7890B (⁶³Ni-ECD)(Agilent Technologies)

3. Samples

PCQs were analyzed in a total of 1838 blood samples collected from subjects examined for a possible diagnosis of Yusho across Japan by the Study Group of Yusho from FY 2009 to 2019. In

2011 we prepared the positive control sample used for quality control, and the stocked sample was distributed to the other institution before the start of annual PCQ inspections. Since the positive control was reprepared in 2018, the new lot was used in from 2018 on.

4. Preparation of test solution

The test solution was prepared according to a previous report⁴⁾⁹⁾. Approximately 2 g of a well-mixed blood sample was accurately weighed in a 10 mL round-bottom test tube. After adding 3.5 mL of 1.5 N potassium hydroxide/ethanol and mixing well, the mixture was heated in a water bath at 80°C for 1 hour. After cooling to room temperature, 2 mL of n-hexane was added and extracted by shaking. The extract was centrifuged (3,000 rpm, 1 min) and the n-hexane layer was collected in another test tube. This extraction was performed a total of three times. The recovered n-hexane layer was washed with 2 mL of distilled water and centrifuged (3,000 rpm, 1 min). The n-hexane layer was dehydrated by passing it through a Pasteur pipette filled with anhydrous sodium sulfate (1.5 g), eluted with 2 mL of n-hexane, and combined with the above solution. This solution was dried under a nitrogen stream and redissolved in 1 mL of n-hexane, loaded onto a Pasteur pipette filled with anhydrous sodium sulfate (0.2 g)/florisil (0.5 g), and eluted with 7 mL of 5 % diethyl ether/n-hexane. The eluate was dried under a nitrogen stream and dissolved in 2 mL of n-hexane. This solution was added to 1 mL of 10% fuming sulfuric acid, and the mixture was stirred well and centrifuged (3,000 rpm, 1 min), after which the sulfuric acid layer was discarded. This operation was repeated until the sulfuric acid layer became transparent. The n-hexane layer was recovered and concentrated to dryness, and then the solvent was completely distilled off with a vacuum desiccator. After 0.5 mL of antimony(V) chloride was added and the tube was sealed, it was heated at 200°C for 3 hours to completely chlorinate. While the tube cooled in

an ice bath, 2 mL of chloroform was added and stirred well, and then 0.5 mL of 20% hydrochloric acid was added and mixed. Further, 2 mL of 20% hydrochloric acid was added, the mixture was stirred and centrifuged (3,000 rpm, 1 min), and then the hydrochloric acid layer was discarded. This operation was performed a total of three times. Subsequently, the chloroform layer was washed in the order of 2 mL of distilled water, 2 mL of a 5% aqueous (+)-tartaric acid solution, 2 mL of 5% aqueous sodium hydrogen carbonate, and 2 mL of distilled water. The chloroform layer was passed through a Pasteur pipette filled with anhydrous sodium sulfate (1.5 g), eluted with 6 mL of n-hexane, and combined with the above solution. This solution was dried under a nitrogen stream, redissolved in 1 mL of n-hexane, loaded onto a Pasteur pipette filled with anhydrous sodium sulfate (0.2 g)/alumina (0.25 g), and eluted with 6 mL of 2% dichloromethane/n-hexane. Finally, the eluate was dried under a nitrogen stream and then dissolved in an appropriate amount of n-nonane (usually 0.2 mL) to prepare a test solution.

5. GC-ECD conditions

Capillary column : Quadrex 007-65HT (0.25 mm I.D. × 25 m, film thickness 0.1 μm) ; temperature program : 80°C, hold for 1 min and 30°C/min to 320°C, hold for 30 min ; inlet temperature : 300°C ; injection method : Pulsed splitless ; injection volume : 4 μL ; Carrier gas : Helium ; Detector temperature : 350°C ; Makeup gas : nitrogen.

6. Quantification of PCQ by absolute calibration curve method

Five nanograms of PCQ standard was taken and the operations were performed after complete chlorination, as described in section 4. A standard solution for the calibration curve of ODCQs corresponding to a PCQ concentration of 2 ng/mL was prepared by dissolving in 2.5 mL of n-nonane. The ODCQ standard solution (corresponding to 2 ng/mL as PCQs) was appropriately

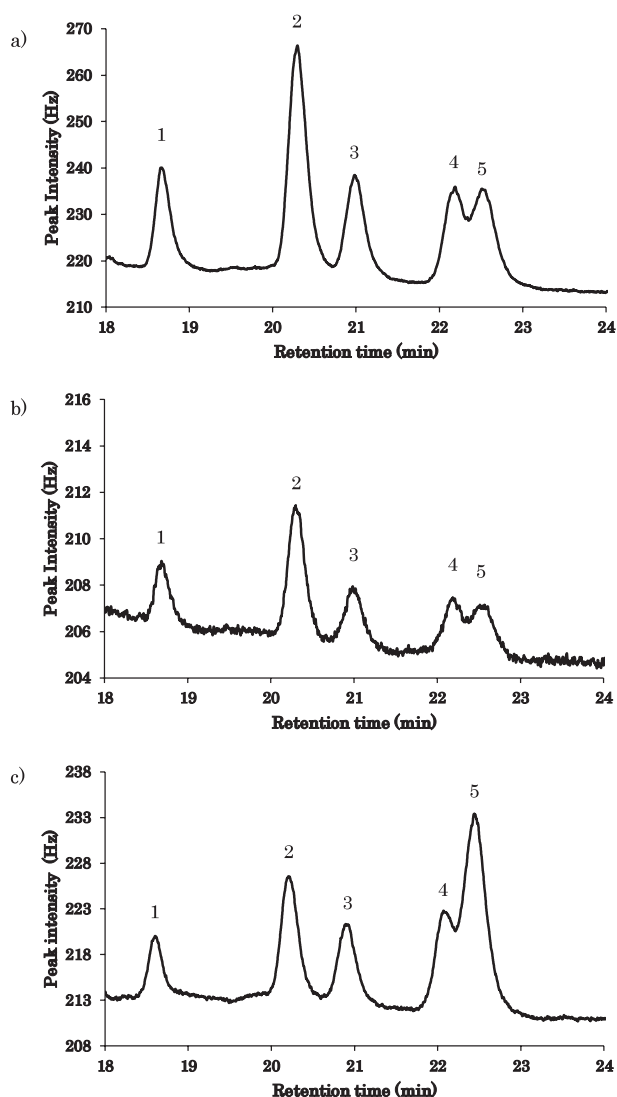


Fig. 1 The gas chromatograms of six skeletal types of perchlorinated PCQs (ODCQs)
 Peak 1 : 2,2'-ODCQ, Peak 2 : 2,3'-ODCQ, Peak 3 : 2,4'-ODCQ, Peak 4 : 4,4'-ODCQ + 3,3'-ODCQ, Peak 5 : 3,4'-ODCQ
 a) ODCQ standard (2 ng/mL as PCQs)
 b) ODCQ standard (0.2 ng/mL as PCQs)
 c) Sample blood of a typical Yusho patient

diluted with n-nonane to prepare ODCQ standard solutions (0.1, 0.2, 0.5, and 1 ng/mL as PCQs) for the calibration curve. Each standard solution was measured under the analysis conditions detailed in section 5, and a calibration curve was created using the total area of the five peaks obtained from each standard solution. The concentration of PCQs was calculated by interpolating the total of the peak areas obtained by measuring the test

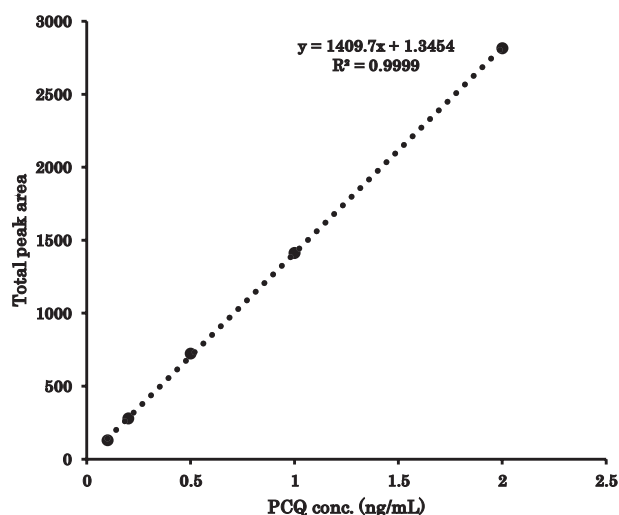


Fig. 2 PCQ calibration curve
 The concentration range was 0.1-2.0 ng/mL (five points). The correlation coefficient (R^2) was 0.9999 in this range, and good linearity was obtained.

solution prepared according to section 4 into the created calibration curve.

7. Quality control

The positive control was analyzed in parallel with the PCQ inspection by two institutions (A and B) from FY 2011 to 2019.

Results and discussion

1. Standard curve

Typical gas chromatograms of ODCQ isomers obtained by completely chlorinating the PCQ standard are shown in Fig. 1 : (a) maximum concentration on the calibration curve (2 ng/mL as PCQs) and (b) concentration corresponding to the lower limit of quantification (0.02 ng/g) (0.2 ng/mL as PCQs). As shown in Fig. 1, five peaks were obtained from six ODCQ isomers. The created calibration curve is shown in Fig. 2. The correlation coefficient (R^2) of this calibration curve was 0.9999 in the range of 0.1-2.0 ng/mL as PCQs, and good linearity was obtained.

2. Quality control

To confirm the accuracy of the PCQ analytical method, the positive control was analyzed in

Table 1 Analytical values of positive control in FY 2011 to 2019 inspections at each institution

Lot 1

Institution	PCQ conc. (ng/g)							Average (ng/g)	SD ^{*1} (ng/g)	%RSD ^{*2}
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017			
A	1.6	1.5	1.3	1.8	1.7	1.8	1.8	1.6	0.19	11.6
B	1.6	1.7	1.5	1.5	1.9	1.6	1.5	1.6	0.15	9.1

Lot 2

Institution	PCQ conc. (ng/g)		Average (ng/g)
	2018	2019	
A	1.6	1.3	1.5
B	1.4	1.4	1.4

The positive control was newly prepared in 2018 (Lot 2).

*¹: Standard deviation

*²: Relative standard deviation ; SD/Average × 100

parallel with the samples from FY 2011 to 2019. As mentioned above, the reprepared positive control was used in FY 2018 and 2019. Table 1 shows the PCQ concentrations in the positive control for each year. The average concentrations in the positive control from FY 2011 to 2017 were as follows : institution A, 1.6 ± 0.19 ng/g (relative standard deviation (RSD), 11.6%) and institution B, 1.6 ± 0.15 ng/g (RSD, 9.1%), which were almost the same. This accuracy reached the target value (RSD < 15%)¹¹⁾. The average PCQ concentrations of positive control in FY 2018 and 2019 were in good agreement between the two institutions. On the basis of these results, this analytical method was considered to be robust and to have excellent reproducibility.

3. PCQ measurement results

The blood PCQ concentrations of a total of 1838 subjects were measured from FY 2009 to 2019. Fig. 1 (c) shows an example of a gas chromatogram of a Yusho patient with a high blood PCQ concentration. Five peaks were obtained as in the standard solution.

A total of 323 blood samples from subjects had PCQ above the lower limit of quantification (0.02 ng/g). Table 2 shows the total number of subjects by blood PCQ concentration levels and PCB patterns. Chromatogram patterns of blood PCBs

were classified into four types : Type A, typical Yusho pattern ; Type C, pattern commonly observed in healthy individuals ; Types B and BC : intermediate patterns between Types A and C¹⁰⁾. A total of 20 subjects had a blood PCQ concentration of 1 ng/g or higher (concentration level 4), and all of their PCB patterns were Type A or B. At each PCQ concentration, the ratio of combined, Type A and B patterns to the total were 65% at PCQ concentration level 3, 29% at level 2, and 27% at level 1. The higher the PCQ concentration, the higher the ratio tended to be. When the blood PCQ concentration was below the lower limit of quantification (PCQ concentration level 1), many cases (67%) had the Type C pattern. On the other hand, in some cases PCQs were not detected even when the PCB pattern was Type A or B.

The boxplot in Fig. 3 shows the distribution of blood PCQ concentrations by PCB pattern (Types A, B, BC, and C) for a total of 323 subjects with PCQs above the lower limit of quantification. The average concentrations of PCQs by PCB patterns were as follows : Type A, 1.2 ng/g ; B, 0.33 ng/g ; BC, 0.17 ng/g ; C, 0.08 ng/g. It was found that the higher the average PCQ concentration, the closer to the pattern of a typical Yusho patient. This result was similar to the distribution of PCQ concentrations in Yusho diagnoses in Fukuoka Prefecture in FY 2004 and 2005 reported by

Table 2 Total numbers of subjects classified by PCQ concentration level and PCB pattern in the FY 2009 to 2019 inspection

Conc.Level	PCQ conc. (ng/g)	PCB pattern				No Pattern*	Total
		A	B	BC	C		
1	ND (< 0.02)	153	256	85	1,015	6	1,515
2	0.02 ≤, < 0.1	27	29	27	107	0	190
3	0.1 ≤, < 1	19	55	15	24	0	113
4	1 ≤	15	5	0	0	0	20

*PCB was not detected above the lower limit of quantification, so PCB patterns could not be analyzed.

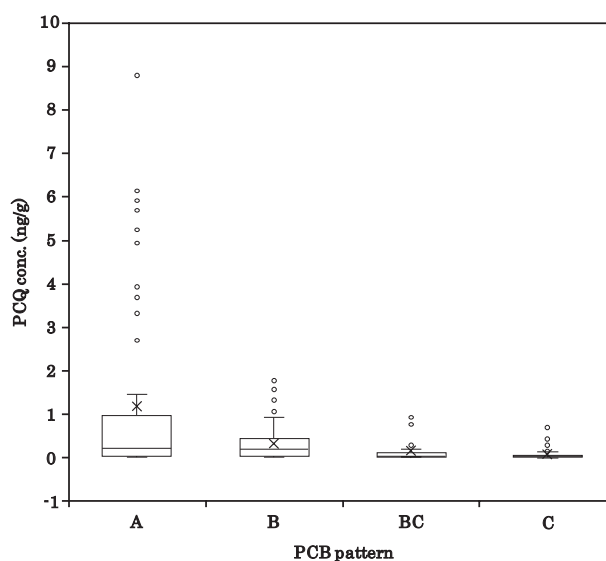


Fig. 3 Boxplot of PCQ concentrations of subjects according to PCB patterns in the FY 2009 to 2019 inspection. The mark “×” means the average value of each pattern. The bar in the box indicates the median of each pattern.

Ashizuka et al.⁴⁾⁵⁾. The medians of PCQ concentration by PCB patterns were as follows: Type A, 0.22 ng/g; B, 0.22 ng/g; BC, 0.06 ng/g; C, 0.04 ng/g. The concentrations of Types A and B were about four times that of Type BC and six times that of Type C. On the basis of these results, it was considered that the blood PCQ concentrations were related to the PCB patterns and still a characteristic information on Yusho patients.

4. The secular change of PCQ concentrations in a typical Yusho patient

To understand the secular change in the blood

PCQ concentrations of Yusho patients, we observed the time trend of PCQ concentrations in the blood of a typical Yusho patient (PCB pattern: Type A), from FY 1986 to 2019 (Fig. 4). The blood PCQ concentrations tended to decrease between FY 1986 and 2004, but did not decrease after FY 2004 and instead fluctuated between 3.9 and 8.8 ng/g. This fluctuation might not be the result of new exposure from the outside or biosynthesis in the body, but rather of PCQs accumulated in the body being transferred to the blood due to weight loss or changes in physical condition resulting from medical issues unrelated to Yusho, causing

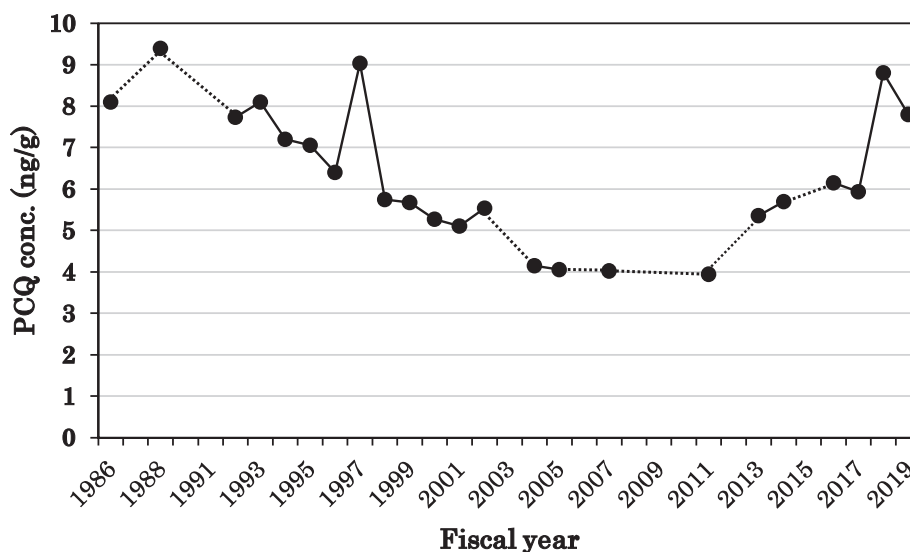


Fig. 4 The secular change of PCQ concentration in a typical Yusho patient (PCB pattern : Type A)
Fiscal years without dots are years when no inspection was conducted.

Table 3 The analytical results of sample bloods obtained from subjects born after 1968 and who showed PCQ concentrations above the lower limit of quantification.

Subject	Year of inspection	Year of birth	PCQ conc. (ng/g)
A	2009	1970	0.04
B	2015	1972	0.02
C	2015	1975	0.02
D	2016	1970	0.02

the apparent blood PCQ concentration to change. Even now, about 50 years after this food poisoning incident, it is presumed that PCQs absorbed in the body due to the large amount of exposure at that time are still present in the blood and remain without being excreted. These results also suggested that lipophilic PCQ congeners were hardly excreted even in high-exposure cases, the same as with a previously reported congener in blood, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF)¹²⁾.

5. PCQ concentrations in subjects born after 1968

To verify the presence or absence of the transition of PCQs to the next generation, we investigated the blood PCQ concentrations from FY 2009 to 2019 in subjects born after 1968. A

total of 455 blood samples were obtained from subjects born after 1968. Of these, 359 were taken from subjects born between 1969 and 1989, and 96 blood samples were taken from subjects born between 1990 and 2009. Table 3 shows the inspection results of 4 cases in which the blood PCQ concentrations were detected above the lower limit of quantification. The years of birth ranged from 1970 to 1975, and the PCQ concentrations ranged from 0.02 to 0.04 ng/g, which were almost the same as those of healthy individuals. From these results, we concluded that PCQ congeners had hardly transferred from the Yusho patients to the next generation born after 1968.

Finally, the usefulness of blood PCQ concentration as a diagnostic criterion for Yusho is still unchanged, and a continuous follow-up survey will be important in the future.

Acknowledgments

This study was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare (Japan). We would like to express our deep gratitude to the members of the Yusho Research Group of the Ministry of Health, Labor and Welfare nationwide for their cooperation.

References

- 1) Iida T, Fukamachi K, Takahashi K and Masuda Y : PCB, PCQ and PCT in the Rice Oil Which Caused "Yusho" and in the Blood of Patients with Yusho, *Fukuoka Acta Medica*. 76 : 126-131, 1985.
- 2) Iida T, Takenaka S, Nakagawa R, Fukamachi K, Takahashi K and Asahi M : Polychlorinated Quaterphenyls Concentration in the Blood of Normal Persons, *Fukuoka Acta Medica*. 78 : 305-308, 1987.
- 3) Kashimoto T, Miyata H and Kunita N : The presence of polychlorinated quaterphenyls on the tissues of Yusho victims. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19 : 335-340, 1981.
- 4) Ashizuka Y, Nakagawa R, Hirakawa H, Hori T and Iida T : Analysis of Polychlorinated Quaterphenyls in Yusho Diagnosis, *Fukuoka Acta Medica*. 96(5) : 227-231, 2005.
- 5) Ashizuka Y, Nakagawa R, Hirakawa H, Hori T, Kajiwara J, Iida T and Yoshimura T : Analysis of Polychlorinated Quaterphenyls in Yusho Diagnosis in 2005, *Fukuoka Acta Medica*. 98 (5) : 232-235, 2007.
- 6) Nakagawa R : Chapter 3, Analysis of Polychlorinated Quaterphenyls in the Blood in *Yusho Diagnosis*, Masutaka Furue, Akihumi Akamine, Shinichi Sato, Hideyuki Yamada, Takesumi Yoshimura : YUSHO II, 1st ed, pp. 29-33, Kyushu University Press, Fukuoka, 2010.
- 7) Maeda K and Kashimoto T : Annual Report of the Osaka Institute of Public Health, *Food Hygiene*. 9 : 89, 1978.
- 8) Iida T, Fukamachi K, Takenaka S, Nakagawa R and Takahashi K : Determination of polychlorinated quaterphenyls by capillary GC, *Bunsekikagaku*. 37 : 230-235, 1988.
- 9) Kogiso T, Yasutake D, Sato T, Takahashi K, Hori T, Kajiwara J, Katsuki S, Mitoma C and Furue M : Analysis of Polychlorinated Quaterphenyl in Yusho Diagnosis from 2014 to 2016, *Fukuoka Acta Medica*. 108(3) : 94-101, 2017.
- 10) Hori T : Chapter 2, Analysis of Polychlorinated Biphenyls in the Blood in *Yusho Diagnosis*, Masutaka Furue, Akihumi Akamine, Shinichi Sato, Hideyuki Yamada, Takesumi Yoshimura : YUSHO II, 1st ed, pp. 14-28, Kyushu University Press, Fukuoka, 2010.
- 11) Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine : *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*, Food and Drug Administration, U.S.A., 2018.
- 12) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Kajiwara J, Mitoma C, Uchi H, Furue M and Imamura T : Half-Lives of Dioxin-Like-Compounds in Blood Are Prolonged in Yusho Patients, *Fukuoka Acta Medica*. 110 : 67-72, 2019.

(Received for publication March 25, 2021)

(和文抄録)

2009–2019 年度の油症検診における血中の ポリ塩化クアテルフェニルの濃度と傾向

佐藤 環¹⁾, 小木曾俊孝¹⁾, 上原口奈美²⁾, 戸高 尊²⁾, 平川博仙¹⁾,
堀 就英¹⁾, 梶原淳睦²⁾, 香月 進¹⁾, 古江増隆³⁾, 辻 学⁴⁾

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 皮膚科学講座

⁴⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

本研究では、厚生労働省油症研究班が実施した2009年から2019年度の油症検診における受診者の血中ポリ塩化クアテルフェニル(PCQ)濃度の傾向及び特徴を把握することを目的とした。検査に用いたPCQ分析法の精度は良好な結果であり、本分析法は再現性に優れた頑健な方法であることを確認した。2009年から2019年度の油症検診で採取したのべ1838名の血液試料中のPCQ濃度を解析した結果、血中PCQ濃度レベルが高いほど、PCBパターンは油症患者のパターンに近いことが示された。また、1986年から2019年度にかけて、典型的な油症患者の血中PCQ濃度の経年傾向を観察した。測定開始から約14年間見られた減少傾向は、2004年度以降見られず、血中PCQ濃度は3.9~8.8 ng/gの間で変動していた。事件発生から約50年経過した現在でも、大量の暴露によって体内に吸収されたPCQは血中に存在し、排泄されずに残留していることがわかった。ライスオイルによる食中毒事件発生後(1969年以降)に出生した検診受診者のPCQ濃度は、検出しないまたは健常者と変わらない濃度レベルであり、次世代へのPCQの移行はほとんどないと考えられた。血中PCQ濃度の油症診断基準としての有用性はいまだに不変であり、今後も継続的な追跡調査が重要である。

キーワード：ポリ塩化クアテルフェニル(PCQ), 血液, 油症

血液中ダイオキシン類および PCB 濃度測定 のクロスチェック (2016 - 2019 年度)

- ¹⁾福岡県保健環境研究所
²⁾福岡県リサイクル総合研究事業化センター
³⁾公益財団法人北九州生活科学センター
⁴⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野
⁵⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

新谷 依子¹⁾, 堀 就英¹⁾, 飛石 和大¹⁾, 平川 博仙¹⁾, 佐藤 環¹⁾,
 安武 大輔²⁾, 戸高 尊³⁾, 梶原 淳睦³⁾, 香月 進¹⁾,
 辻 学⁴⁾⁵⁾, 古江 増隆⁴⁾⁵⁾

Inter-Laboratory Cross-Comparison Study of Dioxins and PCBs Analyses in Human Blood Samples (From FY 2016 to 2019)

Yoriko SHINTANI¹⁾, Tsuguhide HORI¹⁾, Kazuhiro TOBIISHI¹⁾, Hironori HIRAKAWA¹⁾,
 Tamaki SATO¹⁾, Daisuke YASUTAKE²⁾, Takashi TODAKA³⁾, Jumboku KAJIWARA³⁾,
 Susumu KATSUKI¹⁾, Gaku TSUJI⁴⁾⁵⁾ and Masutaka FURUE⁴⁾⁵⁾

¹⁾*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences*

²⁾*Fukuoka Research Commercialization Center for Recycling Systems*

³⁾*Kitakyushu Life Science Center, Public Interest Incorporated Foundation*

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

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

Abstract

We established an analytical method for accurately determining the concentrations of dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs) in a blood volume of 5 g. Inter-laboratory cross-comparison is available for maintaining the quality of dioxins and PCBs analyses. We carried out the cross-comparison of dioxin and PCBs analyses in the blood with domestic analysis organizations. Two cross-comparison studies each of dioxins and PCBs analyses were carried out from FY 2016 to 2019. As a result, the findings of our analysis accorded well with the analyses of the other organizations. It was found that our analytical method is sufficiently reliable.

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

はじめに

血液中のダイオキシン類およびポリ塩化ビフェニル (PCB) は、土壌や大気などの環境試料や焼却灰等と比べて低濃度であるため、高い微量分析技術が求められる。厚生省 (当時) が 2000 年に公

表した測定マニュアル¹⁾では、50 g 以上の血液を必要とするため被験者への負担が大きいことや、試験操作が煩雑である等の課題があった。そのため筆者らの福岡県保健環境研究所 (以下、当所) では血液 5 g を用いたダイオキシン類および PCB 一斉分析法を開発し^{2)~4)}、2002 年以降の日

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

常分析に用いてきた。一方、血液を対象に分析を実施する機関は限られており、精度管理を実施する機会がないのが現状であった。これらのことから、血液中ダイオキシン類およびPCB分析法の妥当性を検証するため、2007年より国内の分析機関と同一の血液試料を用いたクロスチェックを実施してきた⁵⁾⁶⁾。今回、前報に引き続き2016年から2019年までの4年間に実施したクロスチェックの結果について機関間の比較を行い、当所における血液中ダイオキシン類およびPCBの分析法の信頼性を検証したので報告する。

実験方法

1. 分析試料

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

2. ダイオキシン類分析方法

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

変動係数

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

Zスコア

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

x ：各機関の分析結果

\bar{x} ：各機関の分析結果（ x ）の平均値

s ：各機関の報告値（ x ）の標準偏差（SD）

3. PCB分析方法

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

（倫理面への配慮）

ダイオキシン類およびPCBの測定にはプールされた血液を使用しており、個人を特定できるような情報は存在しない。また、本研究は福岡県保健環境研究所倫理委員会による審査を受け承認されたものである（受付番号第30-7号平成30年11月5日承認）。

実験結果と考察

1. 血液中ダイオキシン類濃度分析

血液中ダイオキシン類濃度測定のカロスチェックは、2016年および2018年に6機関がそれぞれ2種類の試料を測定した結果を比較した。

2016年の血液中ダイオキシン類濃度の測定結果を表4に示す。血液中脂肪濃度（重量%）の6機関の平均値はSample 1が0.43%（範囲：0.32~0.53%）、Sample 2が0.48%（範囲：0.40~0.58%）であり、脂肪抽出法としてASEを採用した機関（AおよびF）は暫定法を採用した機関（B、CおよびD）よりも脂肪濃度がやや低い傾向にあった。Sample 1の血液中ダイオキシン類濃度の6機関の平均値は、Total PCDDs：6.5, PCDFs：8.8, non-ortho PCBs：5.5, mono-ortho PCBs：0.64, Total dioxins：21 pg-TEQ/g lipidであった。Sample 2の平均値は、Total PCDDs：3.8, PCDFs：1.7, non-ortho PCBs：2.7,

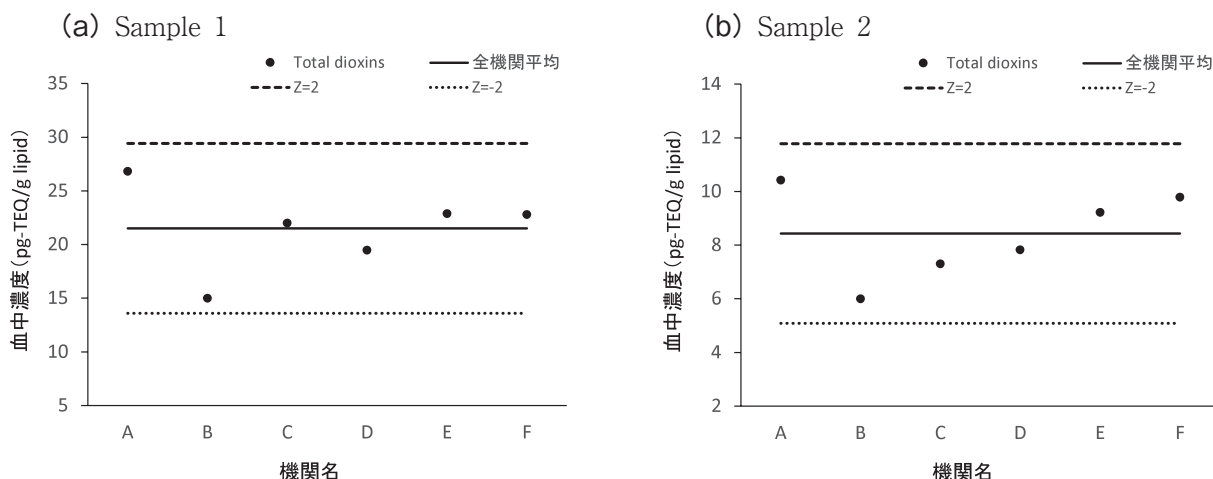


図1 機関別血液中ダイオキシン類濃度の \bar{X} 管理図 (2016年)

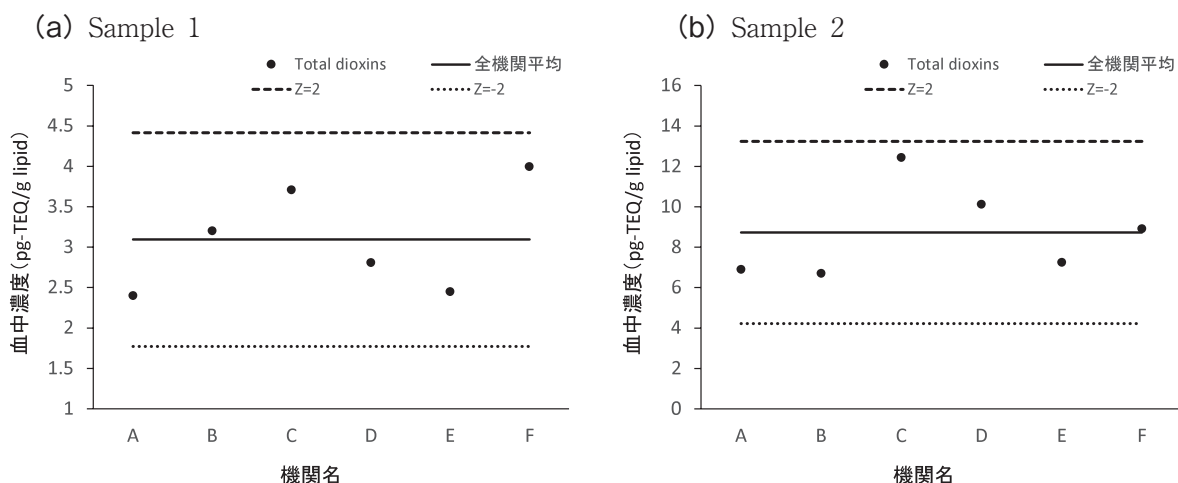


図2 機関別血液中ダイオキシン類濃度の \bar{X} 管理図 (2018年)

mono-ortho PCBs : 0.25, Total dioxins : 8.4 pg-TEQ/g lipid であった。Sample 1 および 2 の Total dioxins の CV は 18% と 19% であった。Sample 1 および 2 の Total dioxins の \bar{X} 管理図を図 1 に示す。管理限界線を Z スコア = ± 2 とした場合、Sample 1, 2 ともに管理限界線の範囲を超える機関はなかった。

2018 年の血液中ダイオキシン類濃度の測定結果を表 5 に示す。血液中脂肪濃度の 6 機関の平均値は Sample 1 が 0.32% (範囲 : 0.28~0.37%), Sample 2 が 0.33% (範囲 : 0.27~0.40%) であり、機関間の CV はそれぞれ 10% および 17% であった。脂肪抽出に ASE 法を採用した 2 機関 (C, F) における脂肪濃度は平均値を下回っていたが、全

体のばらつきの範囲内にあり、顕著な差は認められなかった。Sample 1 の血液中ダイオキシン類濃度の 6 機関の平均値は、Total PCDDs : 1.5, PCDFs : 0.75, non-ortho PCBs : 0.59, mono-ortho PCBs : 0.071, Total dioxins : 2.9 pg-TEQ/g lipid であった。Sample 2 の血液中ダイオキシン類濃度の平均値は、Total PCDDs : 2.3, PCDFs : 4.8, non-ortho PCBs : 1.4, mono-ortho PCBs : 0.25, Total dioxins : 8.7 pg-TEQ/g lipid であった。Sample 1 および 2 の Total dioxins の CV は 19% と 26% であった。Sample 1 および 2 の Total dioxins の \bar{X} 管理図を図 2 に示す。管理限界線を Z スコア = ± 2 とした場合、Sample 1, 2 ともに管理限界線を超えた機関はなかった。

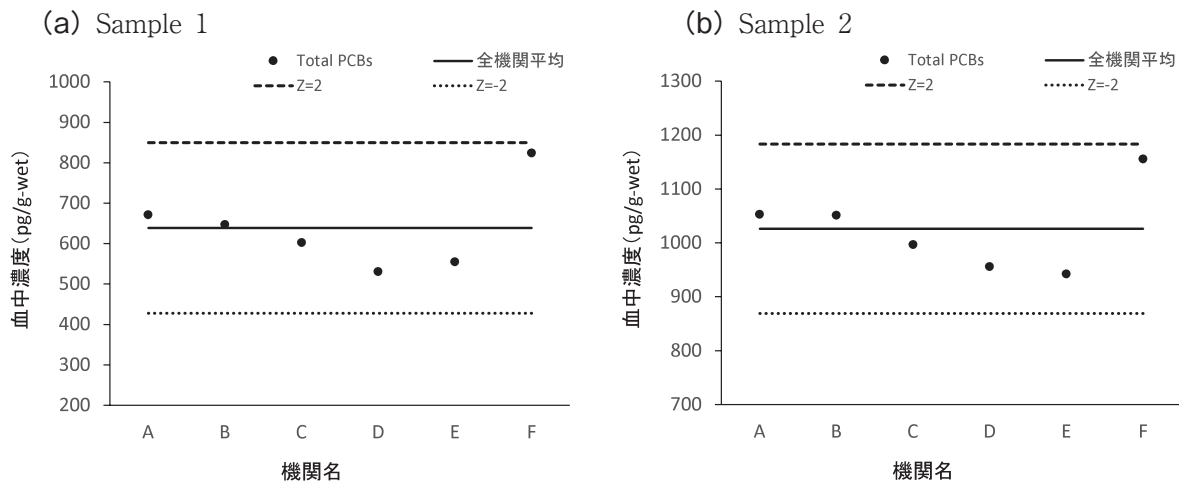


図3 機関別血液中 PCB 濃度の \bar{X} 管理図 (2017 年)

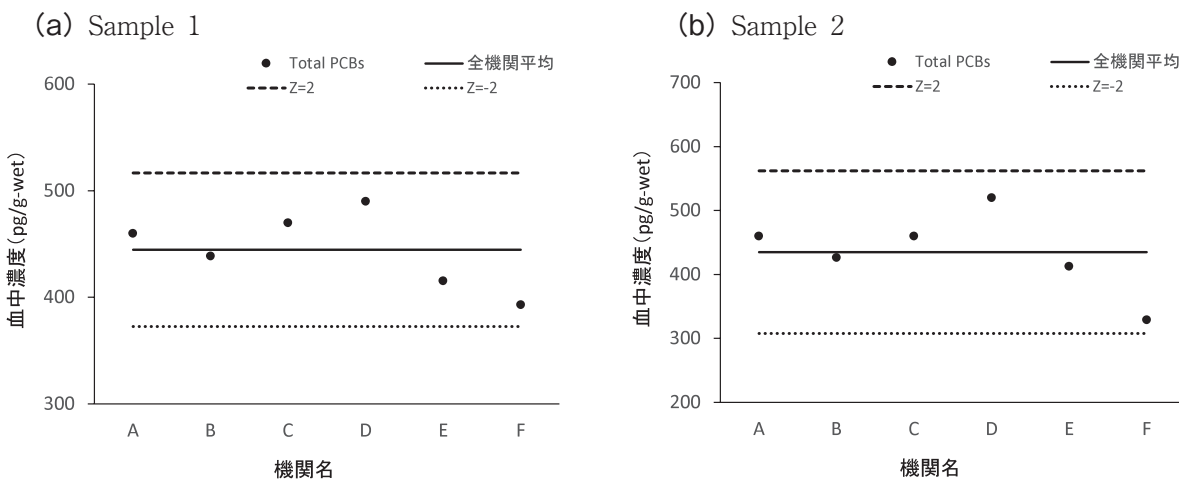


図4 機関別血液中 PCB 濃度の \bar{X} 管理図 (2019 年)

油症診断基準の一つである 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 (脂肪重量あたり) について、当所の測定結果の妥当性を確認するために Z スコアを算出した。各年の Sample 1 および 2 の Z スコアは 2016 年が 0.085 および 0.082, 2018 年が 1.5 および 0.15 と、いずれも $|Z| \leq 2$ の範囲内であり良好な結果であった。

2016 年および 2018 年に実施した血液中ダイオキシン類濃度測定のカロスチェックでは、ASE による脂肪抽出を行った機関で脂肪濃度がやや低い傾向がみられたが、脂肪重量あたりの血液中ダイオキシン類の測定に与える影響は小さく、測定値は概ね一致していた。

2. 血液中 PCB 濃度

血液中 PCB 濃度測定のカロスチェックは、2017 年および 2019 年に 6 機関がそれぞれ 2 種類の試料を測定した結果を比較した。

2017 年の血液中 PCB 濃度の測定結果を表 6 および表 7 に示した。参加 6 機関の Total PCBs 濃度の平均値は Sample 1 が 640 pg/g-wet, Sample 2 が 1,000 pg/g-wet であり、分析機関間の CV はそれぞれ 17% と 7.7% であった (表 6)。Sample 1 および 2 の Total PCBs 濃度の \bar{X} 管理図を図 3 に示す。管理限界線を Z スコア = ± 2 とした場合、Sample 1, 2 ともに管理限界線を超えた機関はなかった。各分析機関の PCB 同族体ごとの濃度についても比較した (表 6)。主要な同

族体 (TeCBs - OcCBs) 濃度の CV は TeCBs, PeCBs および OcCBs で大きくなる傾向が認められた。今回の配付試料では HxCBs および HpCBs が Total PCBs 濃度に占める割合が大きく、これらの同族体濃度の変動が Total PCB 濃度の変動に大きく影響していると考えられる。また、2 機関は MoCBs および DiCBs の定量を行っていなかったが、これら同族体を合計しても Total PCBs 濃度に占める割合は低く、Total PCBs 濃度の測定にはほとんど影響しないと考えられる。各機関の主要異性体の濃度についても比較を行った (表 7)。濃度が高かった上位 10 異性体で Total PCBs 濃度の 69~82% を占めていた。主要異性体の濃度および CV は表 7 に示した通りであり、Sample 1, 2 ともに CV が 20% を超えた異性体は PCB146 および PCB198/199/201 であった。同様に 15% を超えた異性体は PCB138 および PCB170 であった。

油症診断および検診において PCB パターン判定に使用される 3 異性体 (PCB118, 153 および 156) 濃度について、当所の測定結果の Z スコアを算出した。Sample 1 および 2 の PCB118, 153 および 156 の Z スコアはいずれも $|Z| \leq 2$ の範囲内であった。しかし Sample 1 における PCB118, 153 および 156 の Z スコアはそれぞれ 1.9, 0.092 および 1.6, Sample 2 が 1.8, -1.2 および 0.81 と、PCB118 の Z スコアが大きい傾向が認められた。

2019 年の血液中 PCB 濃度の測定結果を表 8 および表 9 に示した。参加 6 機関の Total PCBs 濃度の平均値は Sample 1 が 440 pg/g-wet, Sample 2 が 430 pg/g-wet であり、分析機関間の CV はそれぞれ 8.1% および 15% であった。Sample 1 および 2 の Total PCBs 濃度の \bar{X} 管理図を図 4 に示す。管理限界線を Z スコア = ± 2 とした場合、Sample 1, 2 ともに管理限界線を超えた機関はなく、おおむね良好な結果であった。主要な PCB 同族体 (TeCBs - OcCBs) の濃度を比較すると、Sample 1 の TeCBs, PeCBs および HpCBs で 10% を超えたが、HxCBs と OcCBs は 10% 未満で良好な結果であった。Sample 2 では Total PCBs と同様に主要な PCB 同族体もややばらつきが大きく、TeCBs, HxCBs, HpCBs および OcCBs の CV が 10% を超えていた。分析機関ごとに高濃度

の上位 10 種異性体を選んで濃度を総和した値は、Total PCB 濃度の 74~85% を占めていた。主要異性体の濃度についても比較を行った (表 9)。一部の異性体では CV が 20% を超える結果となった (Sample 1 の PCB194, Sample 2 の PCB180/193, PCB138, PCB170, PCB157)。

油症診断基準において使用される 3 異性体 (PCB118, 153 および 156) 濃度について、当所の測定結果の Z スコアを算出した。2019 年に当所で測定した Sample 1 の PCB118, 153 および 156 の Z スコアはそれぞれ -1.4, -1.4 および -1.7, Sample 2 が -1.4, -1.5 および -1.6 と、いずれも $|Z| \leq 2$ の範囲内ではあったが他機関と比較して測定値が低めに出る傾向が認められた。

総 括

2016 年~2019 年に血液中ダイオキシン類および PCB 濃度測定のカロスチェックを 2 回ずつ実施したところ、分析機関間の測定値は概ね一致する良好な結果が得られた。また分析機関間の分析方法の違いによる血液中ダイオキシン類および PCB 濃度の差はほとんど認められず、当所における分析法の妥当性が確認された。ダイオキシン類濃度測定では、脂肪重量のばらつきによる定量値への影響は少なかったが、脂肪重量は定量値の主たる変動要因であるため、測定操作には細心の注意が必要である。

謝 辞

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

参 考 文 献

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

- による血中 PCB 異性体別分析, 福岡医誌 96 : 220-226, 2005.
- 5) 梶原淳睦, 戸高尊, 平川博仙, 堀就英, 安武大輔, 宮脇崇, 飛石和夫, 高尾佳子, 平田輝昭, 内博史, 古江増隆: 血液中ダイオキシン, PCB 類濃度測定のカロスチェック, 福岡医誌 104 : 104-109, 2013.
- 6) 新谷依子, 堀就英, 安武大輔, 平川博仙, 小木曾俊孝, 宮脇崇, 飛石和夫, 戸高尊, 梶原淳睦, 香月進, 岸玲子, 三苦千景, 古江増隆: 血液中ダイオキシン類および PCB 濃度測定のカロスチェック (第2報), 福岡医誌 108 : 83-93, 2017.

(Received for publication March 25, 2021)

表1 各年のクロスチェック実施概要

実施年	分析対象化学物質	参加機関数
2016	ダイオキシン類	6
2017	PCB	6
2018	ダイオキシン類	6
2019	PCB	6

表2 各機関の血液中ダイオキシン類分析法

No.	分析フロー概要	2016年		2018年	
		A, F	B, C, D	E	D
1	高速溶媒抽出 (ASE) → 硫酸処理 → 硝酸銀シリカゲルカラム精製 → 活性炭カラム精製 → GC/MS 測定	A, F	B, C, D	E	D
2	エタノール/ヘキサン溶媒抽出 (飽和硫酸アンモニウム添加) → 多層シリカゲルカラム精製 → 活性炭シリカゲルカラム精製 → GC/MS 測定	A, F	B, C, D	E	D
3	溶媒振とう抽出/アルカリ分解 → 硝酸銀シリカゲルカラム精製 → DMSO 処理 → 活性炭シリカゲル/アルミナカラム精製 → GC/MS 測定	A, F	B, C, D	E	D

表3 各機関の血液中PCB分析法

No.	分析フロー概要	2017年		2019年	
		A, B	C	D	E, F
1	エタノール/ヘキサン溶媒抽出 (飽和硫酸アンモニウム添加) → 多層シリカゲルカラム精製 → GC/MS 測定	A, B	C	D	E, F
2	アルカリ分解/ヘキサン溶媒振とう抽出 → 多層シリカゲルカラム精製 → GC/MS 測定	A, B	C	D	E, F
3	アルカリ分解/溶媒振とう抽出 → シリカゲルカラム精製 → DMSO 処理 → GPC 精製 → GC/MS 測定	A, B	C	D	E, F
4	高速溶媒抽出 (ASE) → 硫酸処理 → カラムクロマト精製 → GC/MS 測定	A, B	C	D	E, F

表4 血液中ダイオキシン類濃度測定結果 (2016年)

	分析機関ごとの測定値 (pg-TEQ/g lipid)											6機関の集計		
	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Min	Max	CV (%)			
Total PCDDs	8.0	4.0	6.5	5.7	6.5	8.1	6.5	1.5	4.0	8.1	24			
Total PCDFs	11	5.8	9.2	8.6	9.5	8.4	8.8	1.8	5.8	11	20			
Total non-ortho PCBs	6.7	4.8	5.4	4.6	6.1	5.6	5.5	0.79	4.6	6.7	14			
Total mono-ortho PCBs	0.73	0.49	0.63	0.56	0.75	0.68	0.64	0.10	0.49	0.75	16			
Total dioxins	27	15	22	19	23	22	21	3.9	15	27	18			
脂肪濃度 (%)	0.38	0.53	0.47	0.50	0.38	0.32	0.43	0.082	0.32	0.53	19			
試料採取量 (g)	5.5	9.6	11	30	51	5.6								
Total PCDDs	5.0	2.5	3.4	3.6	3.7	4.7	3.8	0.93	2.5	5.0	24			
Total PCDFs	2.0	1.2	1.5	1.8	2.1	1.8	1.7	0.33	1.2	2.1	19			
Total non-ortho PCBs	3.2	2.2	2.3	2.2	3.2	3.0	2.7	0.49	2.2	3.2	19			
Total mono-ortho PCBs	0.27	0.19	0.22	0.22	0.30	0.28	0.25	0.042	0.19	0.30	17			
Total dioxins	10	6.0	7.3	7.8	9.2	9.5	8.4	1.6	6.0	10	19			
脂肪濃度 (%)	0.41	0.58	0.55	0.53	0.40	0.43	0.48	0.079	0.40	0.58	16			
試料採取量 (g)	5.6	9.4	11	30	50	6.1								

表5 血液中ダイオキシン類濃度測定結果 (2018年)

	分析機関ごとの測定値 (pg-TEQ/g lipid)						6機関の集計					
	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Min	Max	CV (%)	
Total PCDDs	1.2	1.8	2.1	1.3	1.1	1.6	1.5	0.43	1.1	2.1	29	
Total PCDFs	0.57	0.72	0.77	0.85	0.82	1.4	0.75	0.11	0.57	0.85	15	
Total non-ortho PCBs	0.55	0.58	0.76	0.57	0.48	0.89	0.59	0.1	0.48	0.76	17	
Total mono-ortho PCBs	0.072	0.079	0.079	0.065	0.058	0.08	0.071	0.0089	0.058	0.079	13	
Total dioxins	2.4	3.2	3.7	2.8	2.4	4.0	2.9	0.55	2.4	3.7	19	
脂肪濃度 (%)	0.31	0.33	0.29	0.33	0.37	0.28	0.32	0.033	0.28	0.37	10	
試料採取量 (g)	10	6.9	6.0	51	9.6	5.7						
Total PCDDs	1.7	1.5	3.5	2.9	2.1	2.0	2.3	0.76	1.5	3.5	34	
Total PCDFs	3.7	3.7	6.7	5.4	3.9	5.3	4.8	1.2	3.7	6.7	26	
Total non-ortho PCBs	1.2	1.2	1.9	1.5	1.1	1.4	1.4	0.31	1.1	1.9	22	
Total mono-ortho PCBs	0.23	0.25	0.3	0.3	0.2	0.23	0.25	0.039	0.20	0.30	15	
Total dioxins	6.9	6.7	12	10	7.2	8.9	8.7	2.3	6.7	12	26	
脂肪濃度 (%)	0.34	0.40	0.27	0.27	0.37	0.31	0.33	0.055	0.27	0.40	17	
試料採取量 (g)	10	6.9	6.0	51	9.5	5.6						

表6 血液中 PCB 濃度測定結果 (同族体別, 2017年)

	分析機関ごとの測定値 (pg/g-wet)						6機関の集計					
	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Min	Max	CV (%)	
Total MoCBs	0	0	0.098	0	N/A	N/A	0.024	0.049	0	0.098		
Total DiCBs	0	0.4	0.54	0	N/A	N/A	0.23	0.28	0	0.54		
Total TriCBs	1.9	1.4	1.7	0	1.8	8.6	2.6	3.1	0	8.6	120	
Total TeCBs	18	14	16	10	17	46	20	13	10	46	65	
Total PeCBs	50	52	47	33	50	84	53	17	33	84	32	
Total HxCBs	300	280	270	230	240	320	270	37	230	320	14	
Total HpCBs	240	230	220	210	190	260	230	24	190	260	11	
Total OcCBs	54	59	37	51	49	83	56	15	37	83	28	
Total NoCBs	5.1	5.8	5.4	0	4.8	9.4	5.1	3.0	0	9.4	59	
DeCB	3.4	3.3	3.1	3.0	3.1	5.2	3.5	0.86	3.0	5.2	24	
Total PCBs	670	650	600	530	560	820	640	110	530	820	17	
Total MoCBs	0	0	0.094	0	N/A	N/A	0.023	0.047	0	0.094		
Total DiCBs	0	0.30	0.39	0	N/A	N/A	0.17	0.20	0	0.39		
Total TriCBs	1.7	1.3	1.6	0	1.7	16	3.6	5.9	0	16	160	
Total TeCBs	22	19	22	15	23	42	24	9.3	0	42	39	
Total PeCBs	64	68	63	43	67	90	66	15	43	90	23	
Total HxCBs	500	480	500	450	430	500	480	32	430	500	6.6	
Total HpCBs	380	390	340	370	330	390	360	24	330	390	6.6	
Total OcCBs	78	87	59	85	79	100	82	14	59	100	17	
Total NoCBs	7.3	8.6	7.8	0	7.7	11	7.0	3.7	0	11	52	
DeCB	3.9	3.5	4.2	0	3.6	5.2	3.4	1.8	0	5.2	52	
Total PCBs	1,100	1,100	1,000	960	940	1,200	1,000	79	940	1,200	7.7	

N/A : not available.

表7 血液中PCB濃度測定結果（主要異性体別，2017年）

	分析機関ごとの測定値 (pg/g-wet)						6機関の集計					
	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Min	Max	CV (%)	
PCB-153	150	140	130	120	120	130	130	13	120	150	9.7	
PCB-180/193	110	100	99	96	85	110	100	9.1	85	110	9.1	
PCB-138	52	54	46	52	47	74	54	10	46	74	19	
PCB-182/187	50	51	54	44	43	58	50	5.9	43	58	12	
PCB-170	34	30	21	34	29	44	32	7.3	21	44	23	
PCB-163/164	35	30	34	25	21	35	30	5.6	21	35	19	
PCB-118	25	24	22	21	23	31	24	3.5	21	31	14	
PCB-146	24	20	17	18	21	37	23	7.1	17	37	31	
PCB-198/199/201	18	19	11	14	16	25	17	4.9	11	25	28	
PCB-194	15	17	9.3	14	16	28	17	6.1	9.3	28	37	
PCB-153	230	220	230	200	190	190	210	18	190	230	8.8	
PCB-180/193	170	170	150	170	150	160	160	11	150	170	7.0	
PCB-138	87	92	85	95	86	120	95	15	85	120	16	
PCB-182/187	70	80	80	69	66	80	74	6.5	66	80	8.8	
PCB-170	61	55	36	60	55	66	56	10	36	66	18	
PCB-163/164	58	52	62	48	42	52	52	7.1	42	62	14	
PCB-156	44	42	43	40	38	44	42	2.5	38	44	6.0	
PCB-146	36	30	32	30	35	51	36	7.9	30	51	22	
PCB-118	27	28	27	24	25	32	27	2.7	24	32	9.9	
PCB-198/199/201	24	28	15	25	26	33	25	5.7	15	33	23	

表8 血液中 PCB 濃度測定結果 (同族体別, 2019年)

	分析機関ごとの測定値 (pg/g-wet)						6 機関の集計					
	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Min	Max	CV (%)	
Total MoCBs	0.85	1.0	0	0	N/A	N/A	0.47	0.55	0	1.0		
Total DiCBs	1.5	2.0	0	0	N/A	N/A	0.87	1.0	0	2.0		
Total TriCBs	1.0	2.1	0	0	0.84	6.2	1.7	2.3	0	6.2	140	
Total TeCBs	5.8	6.6	3.9	4.0	5.0	12	6.2	3.1	3.9	12	49	
Total PeCBs	15	19	16	14	17	19	17	2.0	14	19	12	
Sample 1 Total HxCBs	200	190	200	220	180	170	190	19	170	220	9.9	
Total HpCBs	190	160	190	200	160	140	170	22	140	200	13	
Total OcCBs	41	43	50	48	46	41	45	3.8	41	50	8.4	
Total NoCBs	4.2	5.2	5.3	4.0	4.9	4.3	4.7	0.56	4.0	5.3	12	
DeCB	2.8	3.2	2.6	3.0	2.5	2.7	2.8	0.27	2.5	3.2	9.7	
Total PCBs	460	440	470	490	420	390	440	36	390	490	8.1	
Total MoCBs	1.1	1.1	0	0	N/A	N/A	0.55	0.63	0	1.1		
Total DiCBs	1.6	1.6	0	0	N/A	N/A	0.80	0.93	0	1.6		
Total TriCBs	1.1	1.3	0	0	0.87	3.5	1.1	1.3	0	3.5	110	
Total TeCBs	5.4	5.7	3.7	4.0	5.8	9.2	5.6	1.9	3.7	9.2	35	
Total PeCBs	26	26	25	28	27	22	26	2.1	22	28	8.3	
Sample 2 Total HxCBs	230	220	240	280	210	170	220	37	170	280	17	
Total HpCBs	160	140	160	170	140	100	140	25	100	170	17	
Total OcCBs	29	26	34	32	31	24	29	3.8	24	34	13	
Total NoCBs	2.8	3.2	3.6	3.0	3.5	2.3	3.1	0.47	2.3	3.6	15	
DeCB	1.3	1.2	1.3	0	0.98	0.85	0.93	0.49	0	1.3	53	
Total PCBs	460	430	460	520	410	330	430	64	330	520	15	

N/A: not available.

表9 血液中PCB濃度測定結果（主要異性体別，2019年）

	分析機関ごとの測定値 (pg/g-wet)										6機関の集計			
	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Min	Max	CV (%)			
PCB-153	98	90	97	110	83	76	92	12	76	110	13			
PCB-180/193	100	84	92	110	83	68	90	15	68	110	16			
PCB-138	30	30	36	45	35	31	35	5.7	30	45	16			
PCB-170	33	22	30	37	27	24	29	5.5	22	37	19			
PCB-182/187	29	27	31	24	25	25	27	2.8	24	31	10			
PCB-156	21	20	20	23	19	16	20	2.4	16	23	12			
PCB-163/164	21	21	21	24	16	16	20	3.2	16	24	16			
PCB-194	12	15	16	21	16	13	16	3.1	12	21	20			
PCB-198/199/201	13	12	15	13	14	13	13	1.2	12	15	9.3			
PCB-132/146	12	12	12	11	12	13	12	0.66	11	13	5.5			
PCB-153	81	78	86	99	72	59	79	13	59	99	17			
PCB-180/193	75	61	69	82	64	43	66	13	43	82	21			
PCB-138	45	42	50	68	50	36	49	11	36	68	22			
PCB-156	39	35	35	44	32	25	35	6.5	25	44	19			
PCB-170	31	22	30	38	28	21	28	6.3	21	38	22			
PCB-163/164	27	25	26	28	18	17	24	4.7	17	28	20			
PCB-182/187	20	21	22	20	19	15	20	2.2	15	22	11			
PCB-132/146	12	14	14	15	14	13	14	1.0	12	15	7.7			
PCB-99	13	13	14	16	13	9.4	13	2.2	9.4	16	16			
PCB-157	9.4	10	11	15	9.0	6.5	10	2.8	6.5	15	28			

油症患者における体脂肪率推定式の作成と半減期の再検証

¹⁾ 奈良県立医科大学 公衆衛生学講座

²⁾ 国立保健医療科学院 医療・福祉サービス研究部

³⁾ 九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

⁴⁾ 九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

松本伸哉¹⁾, 赤羽 学²⁾, 神奈川芳行¹⁾, 古江増隆³⁾, 辻 学⁴⁾, 今村知明¹⁾

Estimation Formula of Body Fat Ratio and Revalidation of the Half-Lives of Dioxin-Like-Compounds in the Blood of Yusho Patients

Shinya MATSUMOTO¹⁾, Manabu AKAHANE²⁾, Yoshiyuki KANAGAWA¹⁾,
Masutaka FURUE³⁾, Gaku TSUJI⁴⁾ and Tomoaki IMAMURA¹⁾

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

²⁾ *Department of Health and Welfare Services, National Institute of Public Health, Japan*

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

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

Abstract :

Since dioxins are fat-soluble, the total amount of dioxins in the body is estimated by multiplying the concentration per lipid by the amount of body fat. The formula commonly used to estimate body fat mass was created nearly 30 years ago. Late-stage elderly patients, such as patients with oil disease, were not included in the development of this formula. In this study, we created a formula to estimate body fat percentage based on the measured value of body fat percentage in the Yusho annual check-ups. Body fat percentage increased in women until their late 60s and in men until their mid-70s, but then tended to decrease. Using this formula for estimating body fat percentage, we verified two studies with half-lives published so far. The first study reported the existence of a group of approximately 10 years reported so far and a group of infinite half-lives with almost no emission. The second study was conducted in the same way as the first study, at a different time, but the number of people in the group of about 10 years decreased and the number of people in the group with infinite half-life increased. When that was done in the study using the new formula for estimating the body fat percentage, the same conclusion was obtained, although there were some differences.

Key words : Yusho, Dioxins, Half-life, body fat

はじめに

1968年に、北部九州を中心に食用油の製造過程で混入したダイオキシン類による健康被害（食中

毒)が発生した¹⁾²⁾。当初はPCBが原因と考えられていたが、研究の結果、2,3,4,7,8-PeCDFが原因であると考えられている¹⁾⁻⁵⁾。原因物質であるダイオキシン類は、いったん体内に取り込ま

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

れると排出されにくく、長期に亘り健康被害が発生する。ダイオキシン類の排出速度は、体内負荷量（体内の総量）に比例して排出されることを想定して、半分になるまでの期間を半減期として評価している。ダイオキシン類の半減期は非常に長く、年単位で評価される。ダイオキシン類は体内から排出されるだけでなく、環境中に存在するダイオキシン類が食物とともに新たに摂取され、半減期に影響するため簡単には評価できない。体外への排出による減少速度を「排出半減期」と呼ぶのに対し、血液検査等の測定結果から計算される半減期を「見かけの半減期」と呼ばれる。見かけの半減期は、排出とともに摂取の影響を受けるだけでなく、測定時点における体重変動などの影響も受ける。

当初の研究では、半減期は7~10年程度と推定されていた⁶⁾⁻⁹⁾。我々のグループも油症患者の半減期について研究を行い、油症患者においてはダイオキシン類がほとんど排出されない、つまり半減期が無限大の患者が多くいることを示した¹⁰⁾¹¹⁾。

ダイオキシン類は体内の総量（体内負荷量）を直接測定することができないため、血液中の脂質濃度を測定することで代用している。ダイオキシン類が全身の脂質に万遍なく分布していると仮定し、血中の脂質当たり濃度と脂質の量の積により体内負荷量を推定可能である。体脂肪率を推定する式は、Deurenbergらによって提案されているが¹²⁾、ある程度の年齢幅をもった人々を元にして推定式を作成したものである。しかし、その推定式の算出には油症患者に多い75歳以上の高齢者のデータは含まれていない。

最近の油症一斉検診では、体脂肪率を計測している。本研究では、油症検診の体脂肪率計測結果をもとに油症患者にあった体脂肪率推定式を作成し、これを用いた場合に我々がこれまでに報告した研究結果がどのように変化するか検証した。

研究 方 法

1. 体脂肪率推定式の作成

(1) 対象患者

2016年度の油症一斉検診において、体脂肪率を測定した患者570名（男性271名、女性299名）を対象とした。年齢別の分布を図1に示す。

(2) 解析方法

Deurenbergらが作成した推定式と同じ変数を用いた推定式と同じ変数を出発点として、年齢による変化の複雑度を増やして、4パターンの推定式を作成した。

・推定式①

Deurenbergらと同様に、性・年齢・BMIによる体脂肪率推定式を作成する。Deurenbergらと同じ変数を用いることで、差を把握する。

・推定式②

年齢の変動に対してどのように影響するか検討するため、最も単純な二次の項目を加えて推定式を作成した。

・推定式③

男女別に年齢の影響を把握するため、男女別に年齢を区分し線形の推定式を作成した。

・推定式④

二次式では急激な変化を表現できないので、二次式の次に上に凸な形状を示す四次式を用いて推定式を作成した。

2. 個人の半減期の分布

(1) 対象患者

2001年から2006年までの間に3回以上ダイオキシン類測定を行った患者を対象とした。濃度別の人数の分布を表1に示す。

(2) 解析方法

①濃度、②四次推定式による推定体内負荷量、③Deurenbergらによる推定体内負荷量に対して対数を取り線形回帰を行い各患者の半減期を求め、分布を確認した。また、男女別、年齢別で分布も確認した。

3. 半減期の変化

(1) 対象患者

油症発生からの経過年数における半減期の変化を観察するために、上記2の「個人の半減期の分布」で対象とした患者を前期とし、2002年から2010年までの間に3回以上ダイオキシン類測定を行い、最初の測定から最後の測定まで3年以上の患者を後期として、分析した。濃度別の分布を表2に示す。

(2) 解析方法

上記2の「個人の半減期の分布」と同様に、①

濃度, ②四次推定式による推定体内負荷量, ③ Deurenberg らによる推定体内負荷量に対して対数を取り線形回帰を行い各患者の半減期を求めた。前期と後期の分布形状の比較を行った。

結 果

1. 体脂肪率推定式の作成

(1) 推定式①

Deurenberg らと同じ変数を用いると, 次の体脂肪率 (BF%) の推定式が作成された。

$$BF\% = 1.45 \times BMI + 0.0223 \times \text{年齢} - 7.82 \times \text{性} - 3.37$$

結果の統計量を表3に示す。

年齢の P 値が 0.11 を超えており変数として使用すべきではないという結果であった。また, 今回作成した推定式は, Deurenberg らの作成した式と異なる結果となった。

(2) 推定式②

年齢による影響が線形でない可能性を考慮し, 年齢の二次の項を含めて体脂肪率の推定式を作成したところ, 次のようになった。

$$BF\% = 1.42 \times BMI + 0.497 \times \text{年齢} - 0.00382 \times \text{年齢}^2 - 7.79 \times \text{性} - 16.9$$

結果の統計量を表4に示す。すべての変数で P 値が 0.001 未満となっており, 影響があると判定された。年齢の二乗の係数が負であり, 上に凸な形状, つまり, 年齢とともに体脂肪は上昇するがある年齢から減少することを示している。

(3) 推定式③

年齢を「60歳未満」「60歳～75歳未満」「75歳以上」の3区分に分割した。各区分における患者の分布を図1に示す。年齢別・性別で作成された推定式の係数を表5に示す。BMIを22に固定し, それぞれの回帰直線を描いたグラフを図2に示す。男性が青系統, 女性が赤系統で, 年齢が若い区分を明るい色で描いている。推定の基準となった年齢範囲では直線で, 対象範囲から逸脱した年齢範囲は破線で描いている。

男女で傾きや傾きが変化する年齢が異なるので, 男女別に推定式を作成したほうがよいと考えられる。若い年齢での増加速度とその後の減少速度が異なるため, 二次式での推定では難しく, 二次式の次に凸な形状を示す四次式にしたほうがよいと判断できる。

(4) 推定式④

高次式で回帰を行う場合には, 独立変数の平均が0からずれていることで, 各係数の評価に影響を与えることがある。今回は, いったん四次までの項をすべて投入し, 三次の項がキャンセルされるように年齢をスライドすることにした。

男性患者の体脂肪率の推定式は次のようになった。

$$BF\% = 1.41 \times BMI + 0.127 \times (\text{年齢} - 50.68) - 2.29 \times 10^{-6} \times (\text{年齢} - 50.68)^4 - 10.0$$

年齢二次の項は P 値が大きくなったため除外した。各係数の統計量を表6に示す。

女性患者の体脂肪率の推定式は次のようになった。

$$BF\% = 1.47 \times BMI + 0.113 \times (\text{年齢} - 42.36) - 2.1 \times 10^{-6} \times (\text{年齢} - 42.36)^4 - 3.27$$

年齢二次の項は P 値が大きくなったため除外した。各係数の統計量を表7に示す。

作成された推定式を用いて, BMIを22に固定して, 体脂肪率の年齢での推移を図3にグラフ化した。

2. 個人の半減期の分布

図4に個人の半減期の分布を示す。1段目に濃度, 2段目に四次の体脂肪率推定式を用いた体内負荷量, 3段目に Deurenberg らの体脂肪率推定式を用いた体内負荷量を用いて半減期を計算した。左から 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度が 500 pg/g 以上, 200 以上 500 pg/g 未満, 100 以上 200 pg/g 未満, 50 以上 100 pg/g 未満の患者グループの半減期の結果を示す。

濃度の半減期では, 100～200 pg/g の患者で, 半減期 10 年程度のグループと半減期無限大のグループが存在した。今回作成した体脂肪率推定式による体内負荷量の半減期では, 200～500 pg/g の範囲の患者で, 半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。Deurenberg らの体脂肪率推定式を用いた体内負荷量の半減期の推定では, 200～500 pg/g の範囲で, 半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。

図5に男女別の半減期の分布を示す。濃度の半減期では, 半減期無限大は女性が主体であった。

100~200 pg/g で、男性で半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。今回作成した体脂肪率推定式による体内負荷量の半減期では、半減期無限大は女性が主体であった。200~500 pg/g の範囲では女性で半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。

図 6 に年齢別の半減期の分布を示す。青色棒が高齢患者で、朱色棒は非高齢患者を示す。濃度の半減期では、100~200pg/g の範囲で、若年群で、半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。今回の体脂肪率推定式による体内負荷量の半減期では、高齢、非高齢のグループともに、200~500pg/g の範囲で半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。Deurenberg らの体脂肪率推定式による体内負荷量の半減期では、高齢・非高齢のグループともに、200~500pg/g の範囲で半減期 10 年のグループと半減期無限大のグループが存在した。

3. 半減期の変化

図 7 に後期における個人の半減期を示す。1 段目に濃度、2 段目に四次の体脂肪率推定式を用いた体内負荷量、3 段目に Deurenberg らの体脂肪率推定式を用いた体内負荷量を用いて半減期を計算した結果を示す。左から 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度が 500pg/g 以上、200 以上 500pg/g 未満、100 以上 200pg/g 未満、50 以上 100pg/g 未満の患者グループの半減期の結果を示す。

濃度の半減期、今回の体脂肪率推定式による体内負荷量の半減期、Deurenberg らの推定式による体内負荷量の半減期、それぞれで、半減期無限大に近い患者が多く、半減期 10 年という患者のグループは存在しなかった。

図 8 に前期と後期の比較を示す。前期では、二つのグループが存在した。しかし、後期における半減期は、濃度、今回の体脂肪率推定式、Deurenberg らの推定式のすべてにおいて、半減期の 10 年の患者のグループが消えていた。

考 察

Deurenberg らと同様の変数を用いた体脂肪率の推定式①では、年齢の P 値が 10% を超えており、年齢と体脂肪率と関係がない（線形の関係がない）という結果が得られた。年齢の二次の変数

を投入すると、上に凸な形状であることが得られた。さらに、推定式④のように年齢の四次の変数を投入したところ非常に良好なモデルが得られた。これを用いて BMI を 22 に固定した体脂肪率の推定値をグラフ化すると（図 3）、60 歳程度まで、男女が並行してほぼ直線的に上昇している。つまり、60 歳以下の対象者で体脂肪率の推定式を作成した場合には、Deurenberg らが報告する変数に到達することになると考えられ、Deurenberg らの推定式と矛盾するものではないと考えられる。

前期の患者・期間では、「濃度」「今回の体脂肪率推定式による体内負荷量」「Deurenberg らの推定式による体内負荷量」における半減期推定の結果、半減期 10 年程度のグループが存在した。体脂肪率の推定式によらず、同様の結果が得られた。後期の患者・期間では、「濃度」「今回の体脂肪率推定式による体内負荷量」「Deurenberg らの推定式による体内負荷量」における半減期推定の結果、半減期 10 年程度のグループは存在しなかった。体脂肪率の推定式によらず、同様の結果が得られた。つまり、体脂肪率推定の方法によらず、後期の患者では半減期 10 年程度の群が存在せず、半減期は伸びていることを示唆すると考えられる。

ま と め

油症患者の体脂肪率推定式は Deurenberg らの体脂肪率推定式とは異なった式が得られたが、本研究における推定式作成では、高年齢も対象としていることにより、差異が現れたと考えられる。また、このような差異があったとしても、これまでに我々が報告してきた半減期の長さについては大きな変化はみられなかった。

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) Yoshimura T : Yusho in Japan. Ind. Health 41 : 139-148, 2003.
- 2) Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T and Kuwabara M : Overview of Yusho. J. Dermatol. Sci. 1 : S3-S10, 2005.
- 3) 今村基雄, 増田義人, 平山千里 : 絶食による血液 PCB 濃度の変化. 医学のあゆみ 101 : 78-79,

- 1977.
- 4) 豊田正武, 内部博泰, 柳俊彦, 河野洋一, 堀就英, 飯田隆雄: 日本における食事経由の PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs の摂取量. 食品衛生学雑誌, 40: 98-110, 1999.
 - 5) 飯田隆雄, 戸高尊, 平川博仙, 飛石和夫, 松枝孝彦, 堀就英, 中川礼子, 古江増隆: 油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査 (2001). 福岡医学雑誌 94: 126-135, 2003.
 - 6) Leung HW, Kerger BD, Paustenbach DJ, Ryan JJ and Masuda Y: Concentration and age-dependent elimination kinetics of polychlorinated dibenzofurans in Yucheng and Yusho patients. *Toxicol Ind Health*. 23: 493-501, 2007.
 - 7) 増田義人, 原口浩一, 黒木広明, John Jake Ryan: 台湾及び福岡油症患者の血液 PCDF および PCB の 25 年間の濃度推移 福岡医学雑誌 86: 178-183, 1995.
 - 8) Ryan JJ, Levesque D, Panopio LG, Sun WF, Masuda Y and Kuroki H: Elimination of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from human blood in the Yusho and Yu-Cheng rice oil poisonings. *Arch Environ Contam Toxicol*. 24: 504-512, 1993.
 - 9) 飯田隆雄, 中川礼子, 平川博仙, 松枝隆彦, 森田邦正, 濱村研吾, 中山樹一郎, 堀喜昭, 郭育良, 張峰鳴, 斎博文, 林克昭, 余梅琳, 頼徳仁, 陳信昭, 徐澄清: 台湾 Yu-Cheng 患者における PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs の血中濃度および糞便中排泄量. 福岡医学雑誌 86: 234-240, 1995.
 - 10) Matsumoto S, Kanagawa Y, Koike S, Akahane M, Uchi H, Shibata S, Furue M and Imamura T: Variation in half-life of penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) blood level among Yusho patients. *Chemosphere*. 77: 658-662, 2009.
 - 11) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Kajiwara J, Mitoma C, Uchi H, Furue M and Imamura T: Unexpectedly long half-lives of blood 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) levels in Yusho patients. *Environmental Health*. 14: 76, 2015.
 - 12) Deurenberg P, Weststrate JA and Seidell JC: Body mass index as a measure of body fatness: age- and sex-specific prediction formulas. *British journal of nutrition* 65: 105-114, 1991.

(Received for publication March 3, 2021)

表 1 分析 2 半減期の分布：濃度別対象患者の分布

	濃度範囲	患者数
1	500 pg/g 以上	22
2	200 ≤ x < 500	63
3	100 ≤ x < 200	40
4	50 ≤ x < 100	36
5	20 ≤ x < 50	65
6	20 pg/g 未満	98
	総 計	324

表 2 分析 3 半減期の変化：対象患者濃度別の分布

	濃度範囲	前期	後期
1	500 pg/g 以上	22	18
2	200 ≤ x < 500	63	61
3	100 ≤ x < 200	40	44
4	50 ≤ x < 100	36	42
5	20 ≤ x < 50	65	83
6	20 pg/g 未満	98	151
	総 計	324	399

表 3 推定式①の統計量

	係数	標準誤差	t	P - 値
切片	- 3.37	1.4934	- 2.2595	0.024
BMI	1.45	0.0492	29.4556	< 0.001
性	- 7.82	0.3645	- 21.4543	< 0.001
年齢	0.0223	0.0142	1.5691	0.117

表 4 推定式②の統計量

	係数	標準誤差	t	P - 値
切片	- 16.9	2.9430	- 5.7360	< 0.001
BMI	1.42	0.0483	29.4686	< 0.001
性別	- 7.79	0.3563	- 21.857	< 0.001
年齢	0.497	0.0908	5.4682	< 0.001
年齢 ²	- 0.00382	0.0007	- 5.2847	< 0.001

表 5 推定式③年齢別・性別の BMI と年齢による推定式

		60 歳未満	60~75 歳未満	75 歳以上
切片	女性	- 10.8	- 1.2	31.7
	男性	- 21.8	- 17.5	6.3
BMI	女性	1.60	1.39	1.44
	男性	1.50	1.32	1.49
年齢	女性	0.108	0.025	- 0.428
	男性	0.192	0.169	- 0.202

表 6 推定式④男性患者の四次回帰式の統計量

	係 数	t	P - 値
切片	- 10.0	- 4.5161	< 0.001
BMI	1.41	15.6567	< 0.001
年齢 - 50.68	0.127	4.3105	< 0.001
(年齢 - 50.68) ⁴	- 2.29 × 10 ⁻⁶	- 2.8983	0.004

表 7 推定式④女性患者の四次回帰式の統計量

	係 数	t	P - 値
切片	- 3.27	- 2.8101	< 0.001
BMI	1.47	31.1651	< 0.001
年齢 - 42.36	0.113	4.7226	< 0.001
(年齢 - 42.36) ⁴	- 2.1 × 10 ⁻⁶	- 7.4959	< 0.001

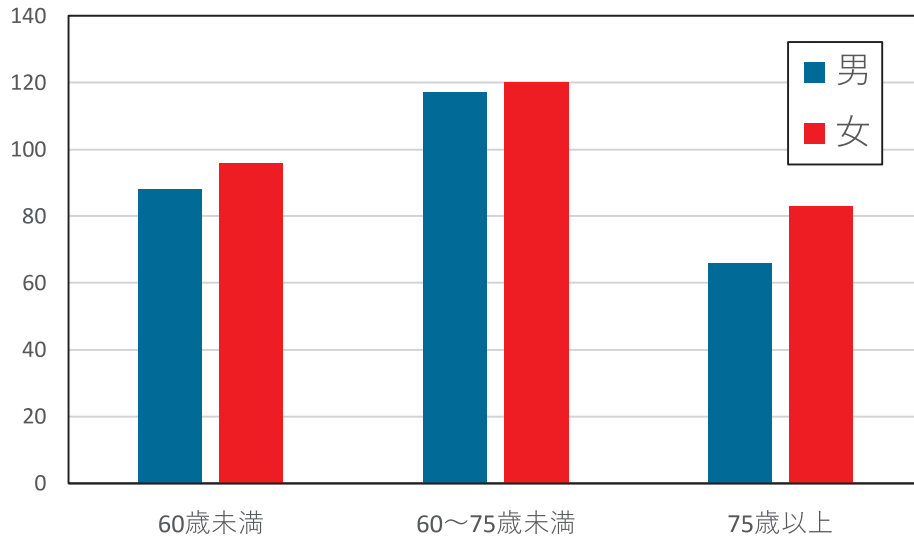


図1 体脂肪推定式作成用患者の年齢区分ごとの患者の分布

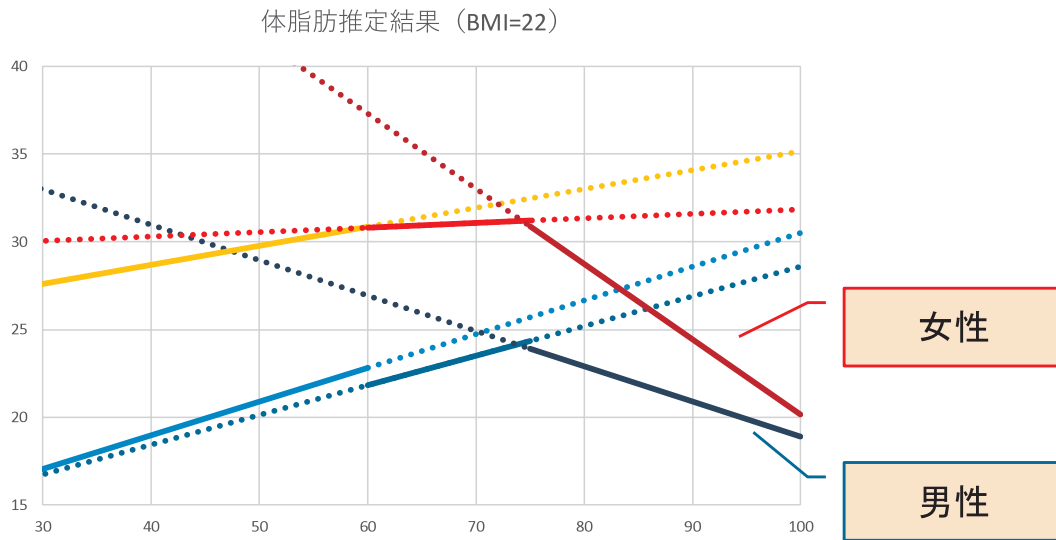


図2 年齢別・性別の推定結果 (BMI=22 に固定)

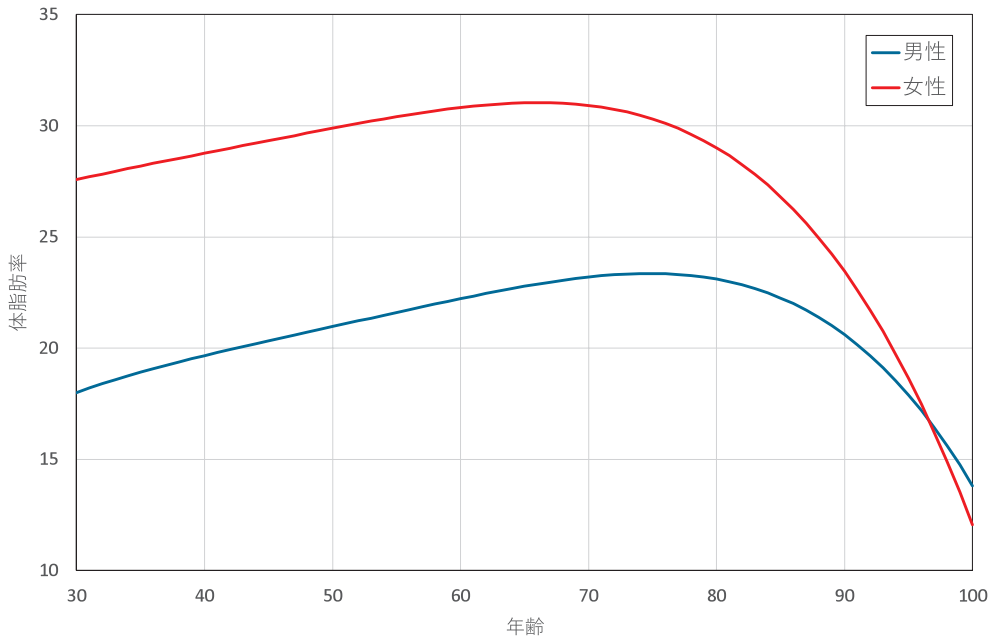


図3 四次の体脂肪率推定式 (BMI = 22) に固定

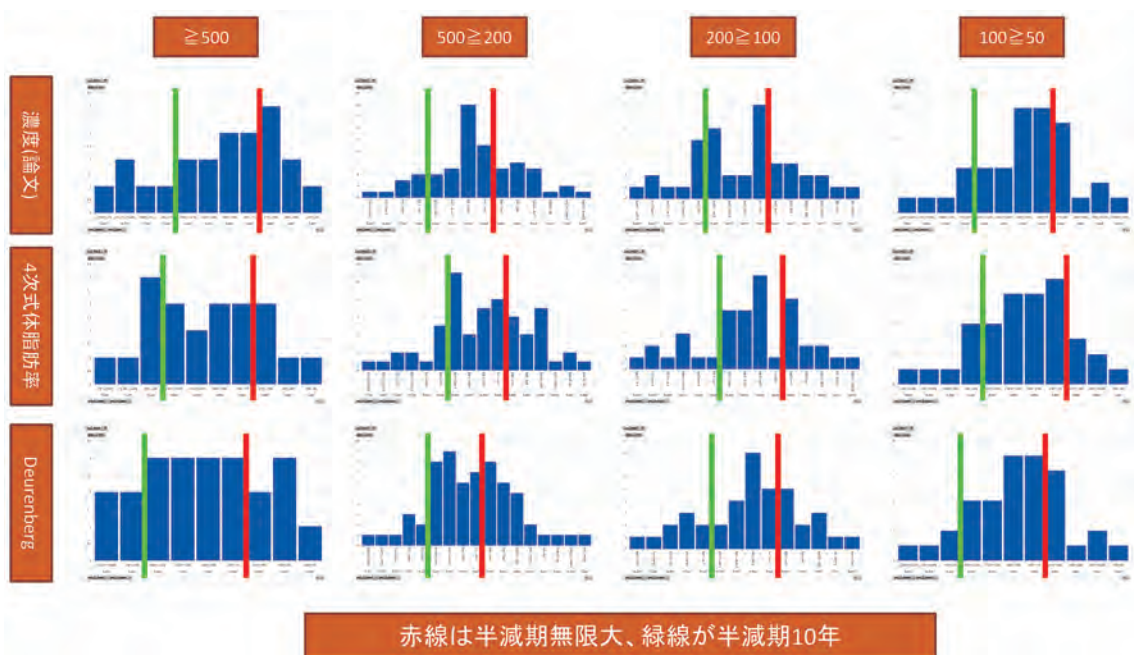


図4 半減期の分布

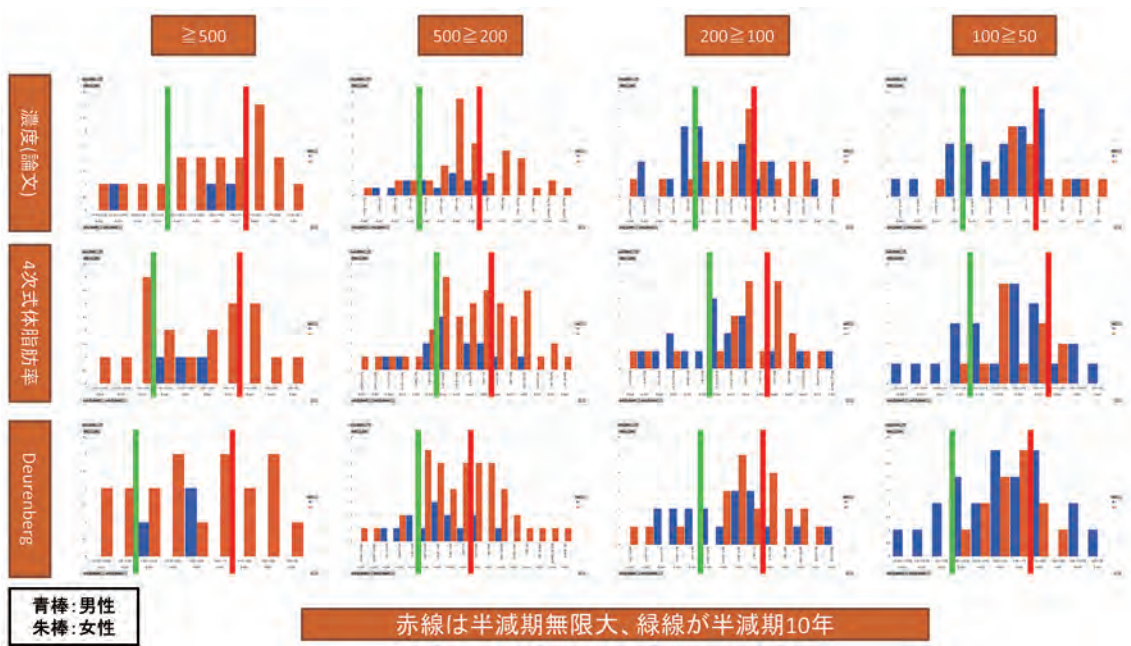


図5 男女別半減期の分布

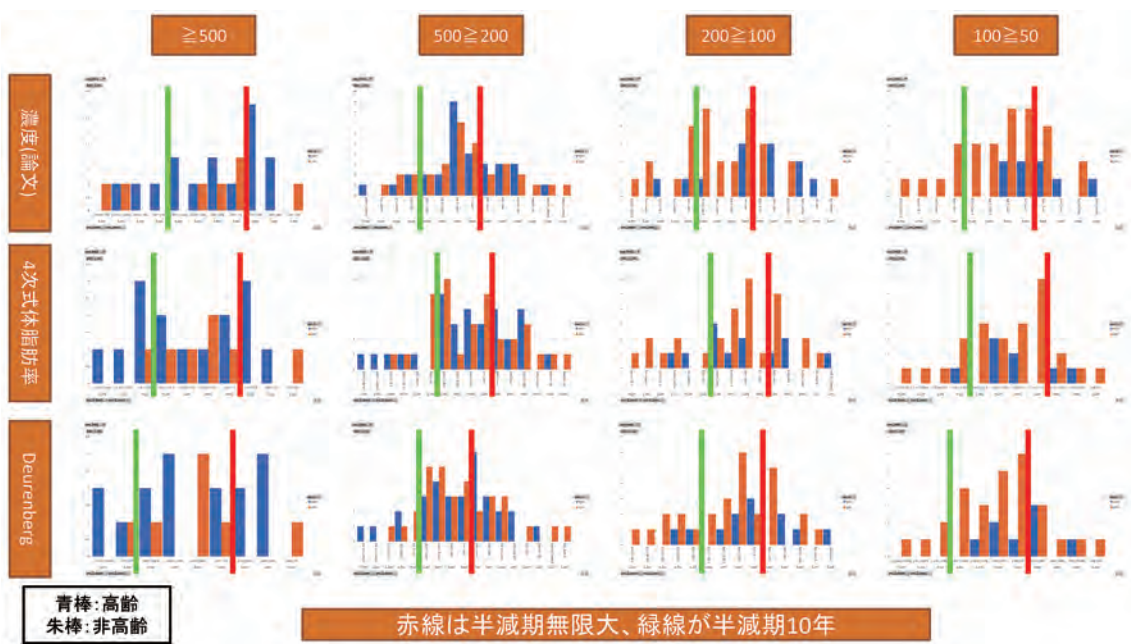


図6 年齢別半減期の分布

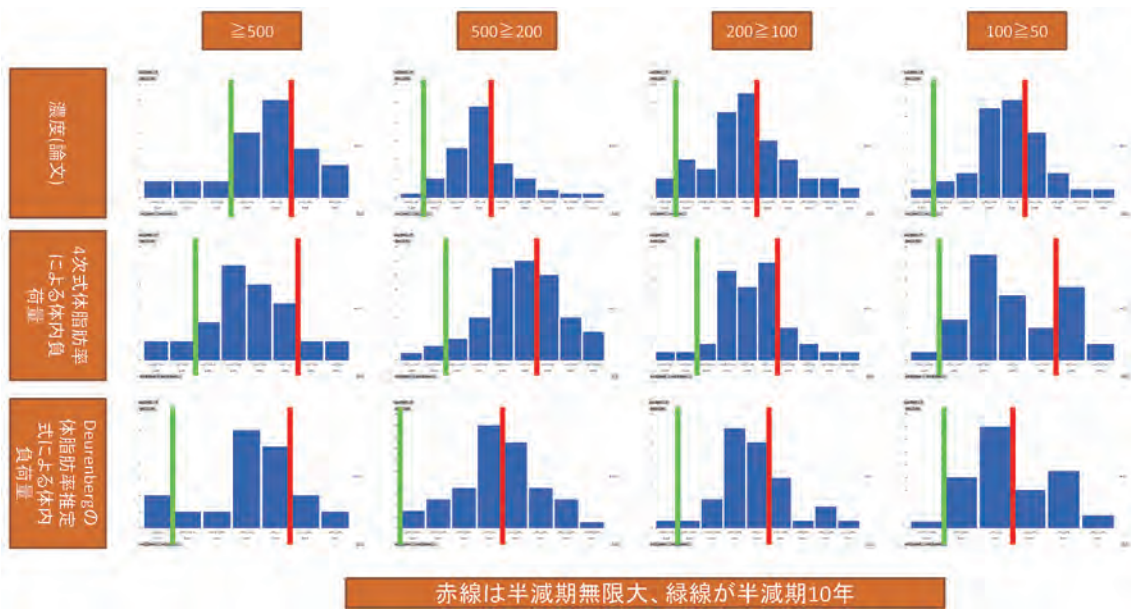


図7 個人の半減期の分布

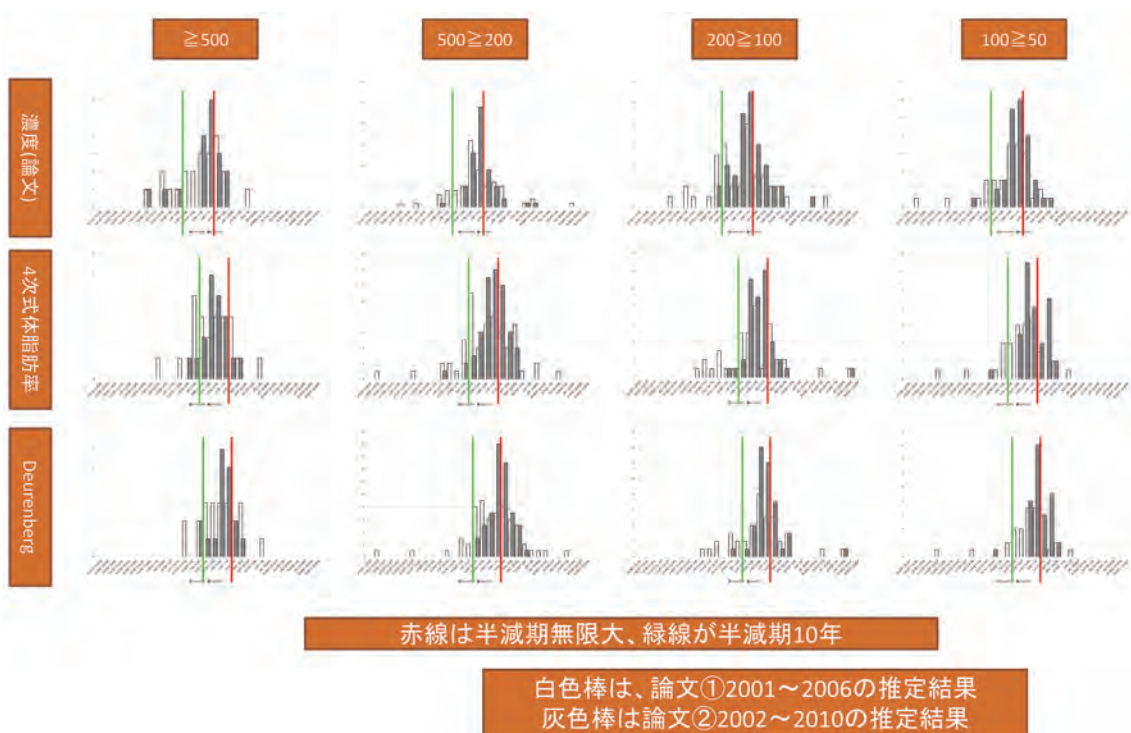


図8 半減期の変化（前期と後期の比較）

油症患者の健康実態に関するアンケート調査自由記載のテキスト分析

- ¹⁾国立保健医療科学院 医療・福祉サービス研究部
²⁾奈良県立医科大学 公衆衛生学講座
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

赤羽 学¹⁾²⁾, 松本伸哉²⁾, 神奈川芳行²⁾,
 古江増隆³⁾, 辻 学⁴⁾, 今村知明²⁾

Text Mining Analysis for Yusho Patients' Survey

Manabu AKAHANE¹⁾²⁾, Shinya MATSUMOTO²⁾, Yoshiyuki KANAGAWA²⁾,
 Masutaka FURUE³⁾, Gaku TSUJI⁴⁾ and Tomoaki IMAMURA²⁾

¹⁾Department of Health and Welfare Services, National Institute of Public Health, Japan

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

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

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

Abstract

Yusho, a mass food poisoning incident that occurred in western Japan in 1968, was caused by ingestion of rice bran oil contaminated with various dioxins and dioxin-like compounds such as polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans. Annual medical examinations by the Yusho group revealed that Yusho patients had been suffering from various symptoms over the years after the Yusho outbreak. Although most of the previous surveys focused on physical symptoms, medical history (symptoms and patient-reported diseases), and laboratory tests such as blood tests, the Yusho Group surveyed the subjective health status and concerns of Yusho patients as free descriptions, with the cooperation of the Ministry of Health, Labor and Welfare. In the present study, we conducted a text analysis using the free descriptions focusing on the health conditions and concerns of Yusho patients' children. The results of the text analysis showed that black, oil, atopy, and rhinitis were typical words for Yusho patients. Black and atopy were words related to baby/gum and skin, respectively.

Key words : Yusho, text mining, free text answer

はじめに

油症は、1968年に九州北部を中心として西日本で広く発生したダイオキシン類による食品中毒事件である¹⁾²⁾。発生当初、polychlorinated biphenyl (PCB) が原因と考えられていたが、後に主た

る原因はダイオキシン類の一つである2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (PeCDF) であることが明らかとなった^{3)~5)}。

毎年、油症検診として血液検査を含めた油症患者の健康状態の調査が行われ、様々な症状や疾患とダイオキシン濃度との関連が報告されてい

Correspondence author : Manabu AKAHANE
 Department of Health and Welfare Services, National Institute of Public Health, Wako-shi, Saitama 351-0197, Japan
 Tel : +81-48-458-6111 Fax : +81-48-469-1573
 E-mail : akahane.m.aa@niph.go.jp

る⁶⁾⁷⁾。2008年にはカネミ油症患者の健康実態に関するアンケート調査⁸⁾（以下、「患者実態調査」とする）が実施され、自覚症状や健康状態に関する心配事等の調査も実施されている。我々の研究チームは、患者実態調査の結果を分析し一般成人を対象とした調査結果と比較し、油症患者の健康状態（症状）の特性を報告した⁹⁾¹⁰⁾。しかしながら、患者実態調査に含まれていた健康状態に関する心配事等の自由記載回答に関しては詳細な分析は行われてこなかった。本研究では、患者実態調査における自由記載項目を対象として、油症患者と一般成人の健康意識に関するアンケート調査と比較し、油症患者の特性を解析することを目的とした。

対象および方法

2008年に、患者実態調査⁸⁾が実施されているが、自由記載欄の分析は十分には行われておらず、比較対象となる調査もない。そこで本研究では、患者実態調査における油症患者の回答内容（自由記載）を分析するとともに、一般成人を対象としたアンケート調査を実施し、分析結果を比較した。

1. 対象および倫理面への配慮

2008年度に実施された患者実態調査における自由記載回答と2019年度に実施した一般成人を対象としたウェブアンケート調査における自由記載回答を本研究の分析対象とした。本研究は奈良県立医科大学倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号335-3）。

2. 患者実態調査

2007年4月24日時点で生存している認定患者および2008年度に新たに認定された計1,420名のうち、所在不明者等を除いた1,331名の油症患者を調査対象として、2008年度に実施された郵送アンケート調査「患者実態調査」の結果を用いた。調査への回答者は1,131名（回収率85.0%）であるが、調査員等が返送された調査票の内容を確認し、必要に応じて回答者あるいはかかりつけ医等に照会して回答内容を補足している。

調査項目「あなたのお子さんについて、出生時から現在までの健康上の問題があれば教えてください」に対する自由記載内容が確認できたものを

本研究における分析対象データとした。分析対象となる子の認定状況によって認定患者群と未認定患者群に区分して、それぞれの回答をテキスト分析した。

3. 一般成人に対する調査

比較対象として、一般成人を対象としたウェブアンケート調査を実施した。調査対象は、ネットリサーチ等を実施している(株)マクロミルのモニターに登録されている25歳から65歳未満の一般成人男女とした。各年齢階級（10歳毎）で男女均等に割り付けた1,648名を抽出し、2019年12月にウェブ上でアンケート調査を実施した。調査項目は患者実態調査の設問項目をベースとして、自由記載形式での回答を求めた。患者実態調査と同様にテキスト分析を行った。

4. テキスト分析

患者実態調査における「お子さんについて、出生時から現在までの健康上の問題」に関する自由記載内容に関して、テキスト分析を行った。一般成人を対象として実施したウェブアンケート調査では、同様に「お子さん」の健康上の問題に関する自由記載内容のテキスト分析を行った。分析はフリーソフトであるKH Coder³⁾¹¹⁾を用いて実施し、それぞれの調査における頻出語、共起ネットワークを用いた分析を行い、健康上の問題や心配事に関する両調査の違いを比較した。

共起ネットワークの対象となる単語の最小出現数は10とし、描画する共起関係を強いものに絞り込むためにJaccard係数を用いた¹²⁾。なお、共起ネットワークは「出現パターンの似通った語、すなわち共起の程度が強い語を線で結んだネットワーク」であり、単に語が近くに布置されているということではなく、線で結ばれていることが強い共起関係を示す¹²⁾。さらに、KWICコンコーダンス機能を用いて特徴的な単語がどのような文脈の中で使用されているか確認した。

結 果

1. 患者実態調査におけるテキスト分析結果

患者実態調査における「お子さん」に関する回答数は2,248人であった。生年月日の記載に不備があった4名を除外した2,244人を対象に、子の

認定状況を確認したところ認定状況記載欄の記入が無いものが200人分あったためこれらを除外した。自由記載欄への記入が確認できた1,076人を本研究での分析対象とした。対象者を認定患者群と未認定患者群に区分したところ、認定患者群が351人、未認定患者群が725人であった。

対象者全体（認定患者群と未認定患者群）での上位にランクされた頻出語として、「元気」：131、「皮膚」：124、「アトピー」：97、「弱い」：94、「病院」：88、「油」：84、「黒い」：71、「鼻炎」：69回記載されていた。認定患者群と未認定患者群別に品詞ごとの頻出語を表1と2にそれぞれ示す。認定患者群において頻出語の上位として、「元気」、「油」、「病院」、「黒い」、「歯（歯茎）」の順であった。一方、未認定患者群においては、「皮膚」、「出る」、「アトピー」、「元気」、「弱い」であった。

共起ネットワークでみると、認定患者群においては、「黒い」は「赤ちゃん」や「歯茎」、「続く」と関連が高く、「体」は「弱い」と関連が高かった（図1）。未認定患者群においては、「皮膚」は「アトピー」、「弱い」は「体」と関連が大きかった（図2）。主となる単語のネットワークは認定患者群で14個、未認定患者群で8個であった。

認定患者群に特徴的な単語として、「黒い」が使用されている文脈をKWICコンコーダンス機能を用いて確認した代表例を表3（認定患者群）と表4（未認定患者群）に示す。

2. 一般成人を対象とした調査におけるテキスト分析結果

一般成人を対象に実施したウェブ調査において子ども有の割合は61.8%（1,019名）であった。この1,019名を対象に、「お子さんの健康上の問題や心配事」に関する自由記載内容をテキスト分析したところ、頻出語として「健康」、「心配」、「病気」、「自分」、「子ども」が上位にランクされていた。油症患者実態調査の未認定患者群において頻度が高かった「アトピー」や「アレルギー」、「喘息」の出現数はそれぞれ2回、10回、9回であった。

共起ネットワークでみると認定患者群、未認定患者群とは異なり、特徴的な単語の出現は見られなかった（図3）。油症認定患者群では「油」や「黒い」等が特徴的に上位にランクされていたが、

一般成人に対する調査ではいずれの単語も上位にはランクされず、これらの単語は油症認定患者群の回答に特徴的なものであった。

考 察

本研究において、油症患者実態調査における「お子さんについて、出生時から現在までの健康上の問題」に関する自由記載内容のテキスト分析を行ったところ、「黒い」や「油」等の油症患者群で特徴的な単語の頻出が見られた。また、共起ネットワークからも、油症認定患者群および未認定患者群でそれぞれの健康状態や心配事に対する内容が描き出されており、具体的で特徴的な単語の関連が読み取れる。

油症患者が子世代に対して感じてきた健康状態に対する心配事等の傾向が表されており、一般成人を対象とした調査結果の傾向とは明らかに異なっていた。「黒い」や「油」は一般成人を対象とした調査では見られておらず、油症患者の健康状態や感じている不安・心配事が反映されていると考えられる。なお、「黒い」に関しては、認定患者と未認定患者間で出現順位に差がみられていた。

図1から3に示す共起ネットワークでは、強い共起関係の単語が太い実線で示されており、点線で結ばれるものは実線で結ばれるものに比べ弱い関係を示している。また、出現数の多い単語の円は大きく表されており、円の大きさがその単語の出現数を示している。これまでの油症研究で指摘されてきた症状や疾患等に関連する単語（「腹痛」、「腰痛」、「便秘」、「吹き出物」等）の関係が描き出されているだけでなく、日常生活に関連した単語、例えば「仕事」、「学校」、「生活」、「病院」等も出現頻度が比較的高く、いくつかのネットワークを形成している。さらに「結婚」や「離婚」等の単語もみられている点では、心配事や不安が健康面だけでなく、社会生活面にも及んでいることも考えられる。一方、一般成人を対象とした調査では特定の症状や疾患に対する心配事ではなく、食生活や事故などの日常に関するものがみられている。

油症研究班での研究が進むにつれて、ダイオキシン類による生体への影響や頻度の高い疾患や症状が明らかとなってきた⁷⁾¹³⁾。また、ダイオキシン類の生体内半減期の変化¹⁴⁾¹⁵⁾や母子間でのダイオキシン類濃度の研究¹⁶⁾、さらには次世代への

表1 認定患者群における上位頻出語（度数）

順位	名詞	動詞	形容詞	形容動詞
1	油	51 出る	29 黒い	45 元気 61
2	病院	45 思う	28 やすい	31 健康 20
3	歯（歯茎）	39 生まれる	28 弱い	27 大変 10
4	入院	33 言う	25 痛い	26 困難 8
5	体	33 行く	20 悪い	25 不安 8

表2 未認定患者群における上位頻出語（度数）

順位	名詞	動詞	形容詞	形容動詞
1	皮膚	100 出る	95 弱い	67 元気 70
2	アトピー	87 生まれる	45 悪い	40 異常 24
3	鼻炎	61 言う	39 小さい	30 不明 23
4	アレルギー	59 受ける	31 多い	29 健康 13
5	喘息	52 引く	28 黒い	26 普通 11

表3 KWIC コンコーダンス 認定患者群における「黒」の例

分泌物・結膜炎・歯茎が	黒い	・永久歯が生えるのが
喘息、嘔吐、腹痛、肌が	黒い	、下痢症状多し。15
術⇨発症当時爪が変形し	黒く	なった 元気に過ごし
疲れやすい。◇爪は少し	黒かつ	た。体や顔にも吹き出
脂血症がある。◇歯茎が	黒く	、全身にでこぼこ黒二
となってきた。◇歯茎が	黒く	、虫歯になりやすかつ
脂血症がある。◇歯茎が	黒く	、黒ニキビがでこぼこ
になってきた。◇歯茎が	黒く	、虫歯になりやすかつ
油を食べてから、鼻上	黒く	なりました。それから
離婚◇皮膚が	黒い	⇨爪、歯茎が黒かった
皮膚が黒い⇨爪、歯茎が	黒かつ	た⇨眼が二重に見える
できやすい◇爪、歯茎が	黒かつ	た⇨眼が二重に見える
を食べてから、鼻の上	黒く	なりました。それから
ミの油を食べてから鼻上	黒く	なりました。それから
子～生まれた時、爪が	黒かつ	た。⇨孫～生まれてす
したが、油症発生時に	黒い	ニキビや手足の爪が又
や手足の爪が又歯茎等	黒く	なりどうしたのか心配
び顔がたくさん出来て、	黒い	しみも出来、子供なが

表4 KWIC コンコーダンス 未認定患者群における「黒」の例

ていない。◇当時爪が	黒く	なっていた⇨料理の
支に腺を引いたように	黒く	なっていた。
下が線を引いたように	黒く	なっていた。（母親
があった。当時歯茎が	黒く	、爪が黒くなってい
当時歯茎が黒く、爪が	黒く	なっていた
皮膚が	黒く	なる。発症前・・・
生まれたときから肌が	黒かつ	た。保育器に入るこ
かに比べてはだが少し	黒い	⇨貧血、歯並びが悪
なってから歯茎の色	黒く	なってきた。◇偏頭
色が	黒かつ	た。◇小さい頃は小
こつれて心配◇背中に	黒い	あせものような吹き
～ター症候群◇背中に	黒い	あせものような吹き
黒・皮膚の色が異常に	黒い	。熱が出やすい。・
・偏頭痛 ・皮膚が	黒い	・子供の頃、鼻血が
54年の出産時、	黒い	子で生まれた。⇨結
知的障害児	黒い	赤ちゃん。母乳。生
生まれた時白かったが	黒い	子供になった。母乳
で頸膿胞の疑い。肌が	黒い	ので気になっていま

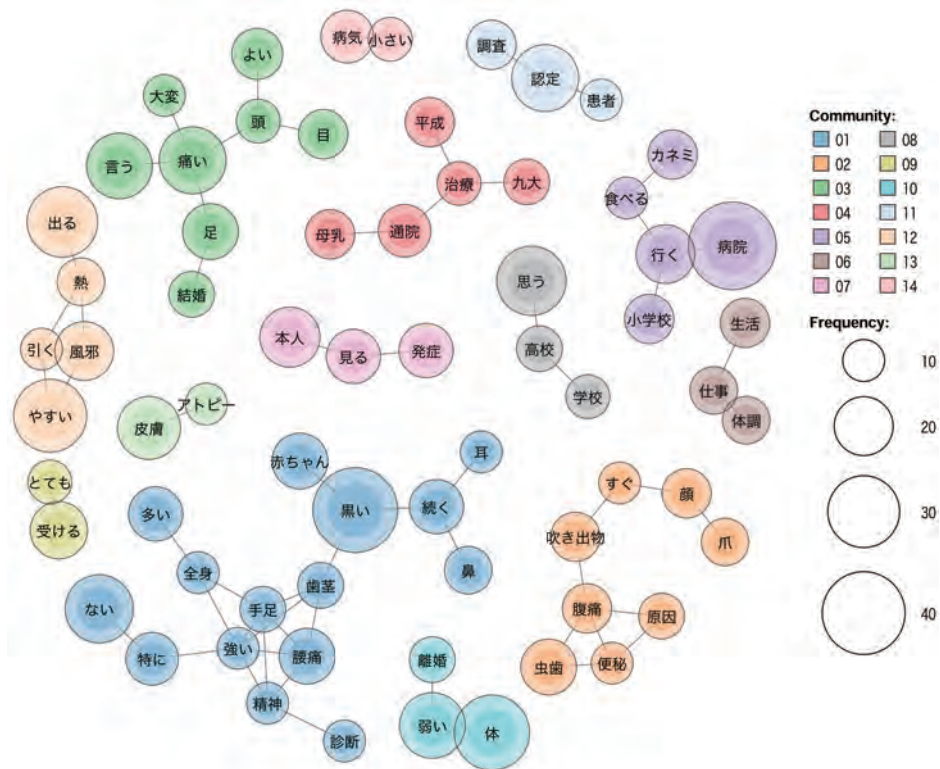


図1 認定患者群における共起ネットワーク

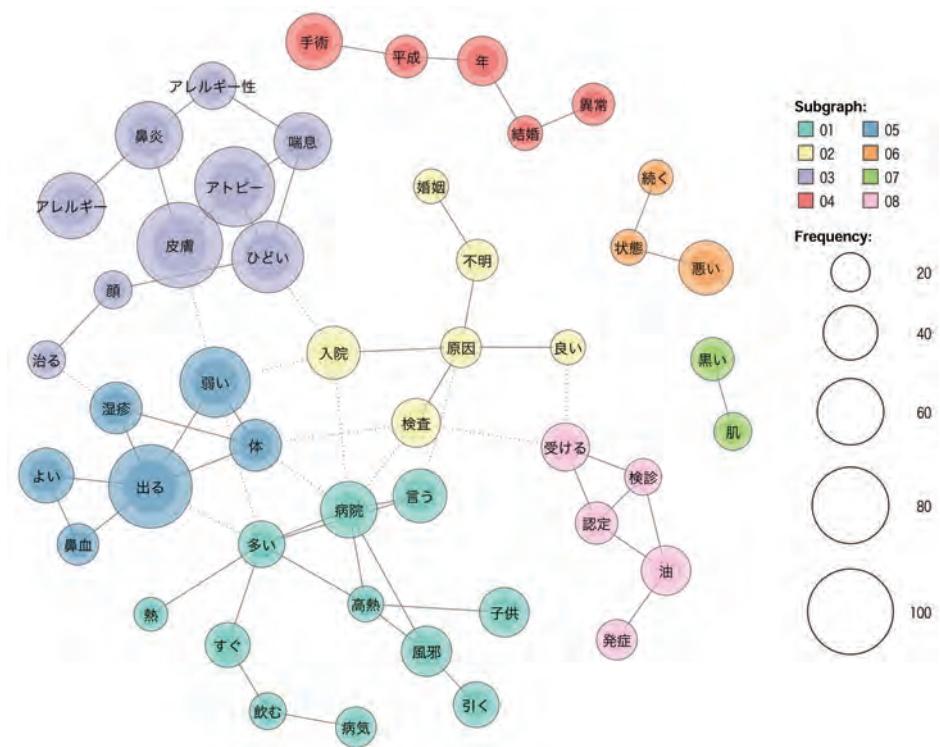


図2 未認定患者群における共起ネットワーク

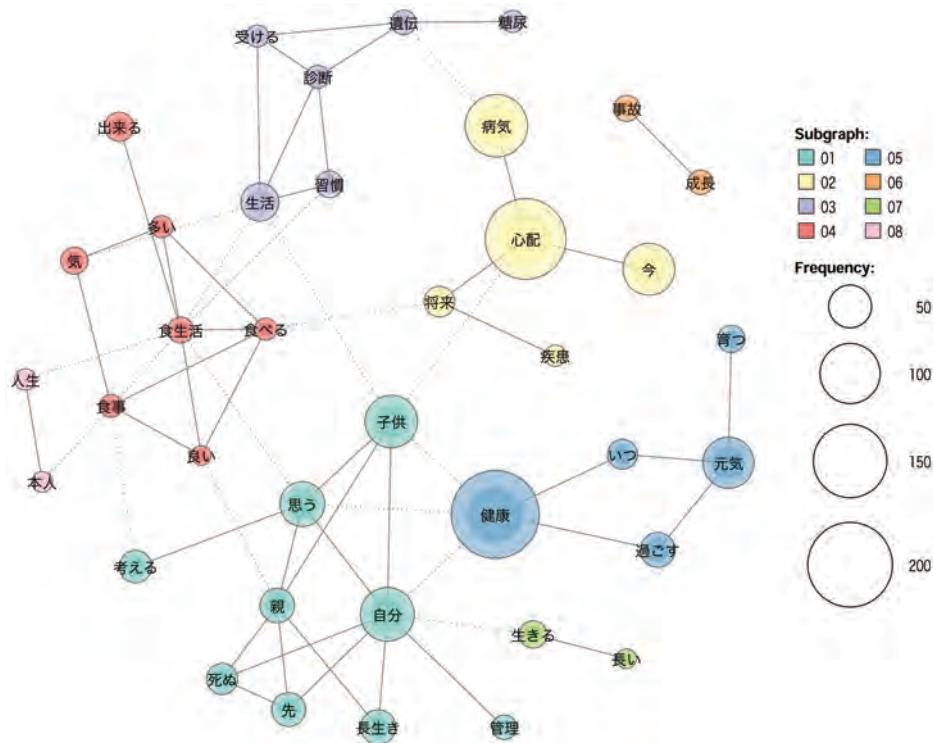


図3 一般対照群における共起ネットワーク

影響に関する基礎的な研究成果も報告されている¹⁷⁾。これらの成果に加えて、これまで十分な分析が行われてこなかった患者実態調査における自由記載回答を分析しその傾向を明らかにした点で、本研究は意義のある研究であると考えられる。

本研究にはいくつかの研究の限界が含まれる。一つ目として、患者実態調査結果の分析においては、同一回答者が複数の子に対して同じ記載を行うケースも存在しており、出現頻度の順位に対して多少影響していると考えられる。二つ目として、生年月日を加味した組み合わせでの分析は行っていない。油症発生年である1968年を基準に発生前後での子の誕生日で追加区分して分析を行うと本研究結果とは異なる傾向が出ることも考えられる。三つ目として、本研究では一般成人を対象としたウェブ調査を実施し患者実態調査結果と比較したが、両調査の実施時期と実施方法に違いがある。ウェブ調査の対象となった一般成人は、調査会社へのモニター登録者であり、全国から抽出された回答者がインターネットを介してアンケート調査票に回答している。抽出を九州地区あるいは西日本地区とすれば多少は傾向が変わったかもしれない。しかしながら本研究で実施した一般成人

から西日本地区の居住者だけに絞って分析した場合でも患者実態調査の結果とは明らかな傾向の違いがみられたため、影響は少ないと考えられる。

結 語

油症患者の健康実態に関するアンケート調査における自由記載回答を分析したところ、「黒い」や「油」等が頻出語として上位に位置していた。認定患者群では「黒い」が「赤ちゃん」、「歯茎」と関連が大きく、未認定患者群では「肌」と関連が見られた。一般成人を対象とした調査結果と比較したところ、これらの頻出語は油症実態調査に特徴的であった。

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) 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.
- 2) Yoshimura T: Yusho in Japan. Ind. Health. 41: 139-148, 2003.

- 3) Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T and Kuwabara M : Overview of Yusho. *J. Dermatol. Sci Suppl. (Suppl 1)* : S3-S10, 2005.
- 4) Yoshimura T : Yusho : 43 years later. *Kaohsiung J Med Sci.* 28 : S49-S52, 2012.
- 5) 飯田隆雄, 戸高尊, 平川博士, 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), *福岡医学雑誌* 94 : 126-135, 2003.
- 6) Mitoma C, Uchi H, Tsukimori K, Todaka T, Kajiwara J, Shimose T, Akahane M, Imamura T and Furue M : Current state of yusho and prospects for therapeutic strategies. *Environ Sci Pollut Res Int.* 25 : 16472-16480, 2018.
- 7) Furue M, Ishii Y, Tsukimori K and Tsuji G : Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin-Related Health Hazards—Lessons from Yusho *Int J Mol Sci.* 22 : 708, 2021.
- 8) 油症患者に係る健康実態調査結果の報告
<https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000005hks-img/2r985200000005hp7>.
- 9) 赤羽学, 松本伸哉, 神奈川芳行, 三苦千景, 内博史, 吉村健清, 古江増隆, 今村知明 : 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の比較, *福岡医誌* 106 : 85-118, 2015.
- 10) Akahane M, Matsumoto S, Kanagawa Y, Mitoma C, Uchi H, Yoshimura T, Furue M and Imamura T : Long-Term Health Effects of PCBs and Related Compounds: A Comparative Analysis of Patients Suffering from Yusho and the General Population. *Arch Environ Contam Toxicol.* 74 : 203-217, 2018.
- 11) KH Coder <https://khcoder.net/>
- 12) 樋口耕一 : 社会調査のための計量テキスト分析—内容分析の継承と発展を目指して, ナカニシヤ出版, 2014.
- 13) Matsumoto S, Kanagawa Y, Koike S, Akahane M, Uchi H, Shibata S, Furue M and Imamura T : Twenty-year changes of penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) level and symptoms in Yusho patients, using association analysis. *BMC Res Notes.* 3 : 129, 2010.
- 14) Matsumoto S, Kanagawa Y, Koike S, Akahane M, Uchi H, Shibata S, Furue M and Imamura T : Variation in half-life of penta-chlorodibenzofuran (PeCDF) blood level among Yusho patients. *Chemosphere.* 77 : 658-662, 2009.
- 15) Matsumoto S, Akahane M, Kanagawa Y, Kajiwara J, Mitoma C, Uchi H, Furue M and Imamura T : Unexpectedly long half-lives of blood 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) levels in Yusho patients. *Environmental Health.* 14 : 76, 2015.
- 16) Tsukimori K, Uchi H, Tokunaga S, Yasukawa F, Chiba T, Kajiwara J, Hirata T and Furue M : Blood levels of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in Yusho mothers and their descendants: association with fetal Yusho disease. *Chemosphere.* 90 : 1581-1588, 2013.
- 17) Takeda T, Fujii M, Izumoto W, Hattori Y, Matsushita T, Yamada H and Ishii Y : Gestational dioxin exposure suppresses prolactin-stimulated nursing in lactating dam rats to impair development of postnatal offspring. *Biochem Pharmacol.* 178 : 114106, 2020.

(Received for publication March 3, 2021)

2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル (PCB155) のラット, モルモット およびヒト肝ミクロソーム, およびヒトチトクロム P450 による代謝

¹⁾中村学園大学栄養科学部食品学研究室

²⁾徳島文理大学香川薬学部薬物動態学講座

³⁾第一薬科大学分析化学教室

⁴⁾北海道医療大学薬学部実務薬学講座

⁵⁾中村学園大学栄養科学部食品衛生学研究室

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

Metabolism of 2,2',4,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl (PCB155) by Rat, Guinea Pig and Human Liver Microsomes and Human Cytochrome P450s

Chiho OHTA¹⁾, Yoshihisa KATO²⁾, Yukiko FUJII³⁾, Koichi HARAGUCHI³⁾,
Osamu KIMURA⁴⁾ and Nobuyuki KOGA⁵⁾

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

²⁾*Kagawa School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 1314-1 Shido,
Sanuki, Kagawa 769-2193*

³⁾*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku,
Fukuoka, 815-8511*

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

Abstract

The *in vitro* metabolism of a 2,4,6-trichloro-substituted PCB, 2,2',4,4',6,6'-hexachlorobiphenyl (PCB155), was studied using rat, guinea pig and human liver microsomes, and human cytochrome P450 (CYP) isoforms. Three kinds of liver microsomes from untreated, phenobarbital (PB)-treated and 3-methylcholanthrene (MC)-treated rats and guinea pigs were also used. In rats, PCB155 was metabolized to M1 by PB-microsomes with a remarkable high rate of 4.554 nmol/hr/mg protein, but not by both untreated microsomes and MC-microsomes. In guinea pigs, both untreated microsomes and MC-microsomes showed the M1-producing activity with rates of 0.056 and 0.060 nmol/hr/mg protein, respectively, and the activity was increased to 3.5-fold of untreated microsomes by PB treatment. GC-MS analysis demonstrated that the methylated M1 had the molecular weight of 388 and almost completely agreed with a synthesized authentic 3-methoxy-PCB155 with regard to the retention times and mass fragmentation. Of four human CYP isoforms, only CYP2B6 showed high activity to form M1 at a rate of 0.702 nmol/hr/nmol CYP. These results suggest that the major metabolite formed by PB-inducible CYP2B enzymes in rats, guinea pigs and human is 3-hydroxy-PCB155, and that CYP2B6 plays the most important role in PCB155 metabolism in human liver.

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

Key words : PCB155, metabolism, human, cytochrome P450

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs) は、周知の通り、代表的な世界的環境汚染物質で高残留性有機汚染物質 (POPs, persistent organic pollutants) として有名である。PCB 異性体は理論的に 209 種類あるが、このうち、塩素数が 5 個以下の多くのものは、肝臓で比較的容易に水酸化され、胆汁を介して糞中へと排出される¹⁾²⁾。一方、塩素数が 6 個以上になると水酸化されにくくなり、結果として長期にわたり体内に残留することになる。これらのうち、特に、2,4,5-三塩素置換あるいは 2,3,4,5-四塩素置換の PCB 異性体は、ヒトの血液、脂肪組織および肝臓において、高濃度で検出されている^{3)~5)}。また、Todaka らは、ヒト健常者と油症患者の血液中 PCB 異性体の濃度を調べ、いずれにおいても 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (hexaCB) (PCB153) が最も多く、次いで 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (heptaCB) (PCB180) および 2,2',3,4,4',5'-hexaCB (PCB138) が多いこと、また、これらの PCB 異性体は、油症患者では健常者の 1.6~2.2 倍多いこと、さらに、2,2',3,4',5,5',6'-heptaCB (PCB187)、2,2',3,3',4,4',5'-heptaCB (PCB170) および 2,3,3',4,4',5'-hexaCB (PCB156) については、健常者の 2.2~3.9 倍多いことを報告した⁶⁾⁷⁾。

最近、当研究室では、2,4,6-三塩素置換の PCB 異性体である 2,2',3,4,4',5,6'-heptaCB (PCB182) の代謝について、ラットおよびモルモット肝ミクロゾーム (Ms) を用いて調べたところ、いずれの動物肝 Ms も主代謝物として 3'-水酸化 (OH) 体を生成すること、また、ラット肝 Ms に

よる 3'-OH 体の生成活性は、phenobarbital (PB) 前処理により顕著に増加すること、さらに、この活性は、前述の 2,4,5-三塩素置換の heptaCB (PCB187, PCB180, 2,2',3,4,4',5',6'-heptaCB (PCB183)) の場合に比べ、10~50 倍高いことを明らかにした⁸⁾。その後、2,4,6-三塩素置換 PCB 異性体の 2,2',3,4',5,6,6'-heptaCB (PCB188) についても検討し、その結果、PCB182 と同様に、比較的容易に 3'-OH 体へと代謝されること、この生成が PB 前処理により著しく促進されることを明らかにした⁹⁾。ところで、これらの 2,4,6-三塩素置換の PCB 異性体は、ヒト組織中からほとんど検出されていない。恐らく、PB 誘導性のヒト肝 cytochrome P450 (CYP) により高い活性で水酸化され、胆汁中へと排泄されたため、体内に残留していないものと考えられる。

そこで本研究では、この点をさらに確認するため、左右対称で 2 つの 2,4,6-三塩素置換ベンゼンから成る 2,2',4,4',6,6'-hexaCB (PCB155) について、*in vitro* 代謝を調べた。PCB155 の代謝については、これまでに、数報報告されているにすぎない。1975 年 Goto らは、PCB155 投与ラット糞中から主代謝物として、初めて 3-OH 体を同定した¹⁰⁾。1980 年、Matthews らは、PCB155 を含む 4 種類の対称的な PCB 異性体をラットに静注し、血液中および糞中における PCB とその代謝物の動態を比較した。このうち、Fig. 1 に示した PCB153 と PCB155 について見ると、① PCB155 は、高残留性の PCB153 より血中半減期が 3 分の 1 と短いこと、② PCB155 の糞中への排泄量は PCB153 より数倍多いこと、さらに、③ PCB155 および PCB153 はともに 3-OH 体が主代謝物で

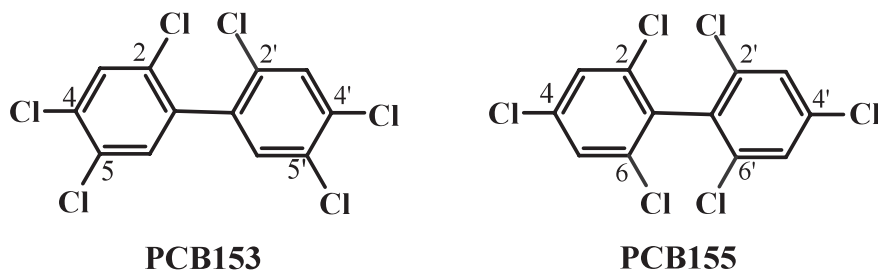


Fig. 1 Chemical structures of PCB153 and PCB155

あるが、その量はそれぞれ投与量の12%および0.3%を占めること、を報告した¹¹⁾¹²⁾。このような背景で、本研究では、ラット、モルモットおよびヒト肝 Ms による *in vitro* 代謝の動物種差を調べるとともに、ヒト CYP 分子種による代謝も検討した。

実験方法

1. 実験材料

(1) 試薬

2,4,6-trichloroiodobenzene, 2,4,6-trichloroaniline, 2,4,6-trichloroanisole, *N,N*-dimethylformamide, tetrachloroethylene および isopentyl nitrite は、東京化成工業（東京）より購入した。また、NADP, glucose-6-phosphate (G-6-P), PB-Na 塩, 3-methylcholanthrene (MC), G-6-P 脱水素酵素 (G-6-PD) および 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine] ethanesulfonic acid (HEPES) は富士フィルム和光純薬（大阪）より購入した。さらに、ウシ血清アルブミンは Sigma-Aldrich 社 (USA) から購入した。

(2) ヒト肝 Ms およびヒト CYP 分子種

ヒト肝 Ms (10 名の男性肝 Ms を混合したもの) およびヒトリンパ芽球様細胞由来の4種類のヒト CYP 分子種 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP3A4) は、Corning 社 (USA) より購入した。

(3) PCB155 の合成

Ariyoshi らの方法¹³⁾で行った。すなわち、*N,N*-dimethylformamide 50 mL に 2,4,6-trichloroiodobenzene (0.6 g) を溶解し、活性化銅 14 g を入れて 185°C で加熱還流を4時間行った。さらに活性化銅を同量追加し、さらに4時間加熱を続けた。放冷後、反応液に蒸留水を加え chloroform で抽出し、シリカゲル 60 カラム (70 g, Merck 製) および分取用 HPLC で精製した。HPLC の分析条件は以下の通りである。分析機器、高速液体クロマトグラフ LC-10AT (島津製)；カラム、Inertsil ODS-HL カラム (250 × 10 mm i.d., 5 μm, GL Sciences 製)；ガードカラム、Inertsil ODS-HL プレップガードカートリッジ (30 × 7.6 mm i.d., GL-Sciences 製)；移動相, acetonitrile；流速, 4 mL/min；検出波長, 254 nm。GC-MS の結果、分子量 358 であり、同位体ピークから6つの塩素が置換されていることを確認した。収量は 23 mg

で、純度はほぼ100%であった(データ未掲載)。GC-MS の分析条件は次の通りである。分析機器, GCMS2010 (島津製)；カラム, DB-1 フェーズドシリカキャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm 膜厚, J&W Scientific 製)；オープン温度, 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)。

PCB155 : MS (EI) *m/z* (relative intensity, %) : 358 (100) [M⁺], 360 (179) [M⁺+2], 362 (147) [M⁺+4], 364 (62) [M⁺+6], 366 (15) [M⁺+8], 288(70) [M⁺-Cl₂].

(4) 代謝物の合成

PCB155 代謝物として、3-OH 体を想定し、そのメチル誘導体 3-methoxy (MeO)-PCB155 の合成を、Cadogan の方法¹⁴⁾で行った。すなわち、2,4,6-trichloroaniline 1.0 g および 2,4,6-trichloroanisole 1.3 g を tetrachloroethylene 10 mL で溶解し、さらに isopentyl nitrite 0.5 mL を加えて、110°C で24時間反応させた。反応液は蒸発乾固後、*n*-hexane で溶解し、アルミナカラム (50 g, Merck 製) およびシリカゲル 60 カラムで部分精製し、HPLC にて精製した。得られた予想化合物の分析は、GC-MS にて行った。

3-MeO-PCB155 : MS (EI) *m/z* (relative intensity, %) : 388 (100) [M⁺], 390 (198) [M⁺+2], 392 (153) [M⁺+4], 394 (65) [M⁺+6], 396 (19) [M⁺+8], 373 (59) [M⁺-CH₃], 345 (92) [M⁺-COCH₃], 275 (56) [M⁺-COCH₃Cl₂].

(5) 実験動物と薬物処理

Wistar 系雄性ラット (体重約 200 g) 12 匹、および Hartley 系雄性モルモット (体重約 280 g) を 12 匹用い、1 群 4 匹として、未処理群、PB 前処理群および MC 前処理群の3群に分けた。PB-Na 塩は生理食塩水に溶解し 80 mg/kg 体重/day の用量で、また、MC はコーン油に溶解し 20 mg/kg 体重/day の用量で、いずれも3日間腹腔内に投与した。最終投与日の翌日に動物を屠殺して、肝を摘出し、常法により肝 Ms を調製した。なお、これらの動物実験は中村学園大学動物実験委員会による審査承認を得た上で、「中村学園大学(含む短期大学部)動物実験に関する規定」を遵守し実施した。ラットの屠殺に際しては、「中村学園大学における動物実験のための指針」に従い、苦痛

をできるだけ軽減するため、セボフルランで麻酔後、頸動脈からの脱血により死亡させた。

2. 肝 Ms による代謝

40 μ M PCB155 (Dimethylsulfoxide に溶解) を、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-PD 1 unit), 6 mM MgCl₂, 動物肝 Ms (1 mg protein) および 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計 1.0 mL として、37°C で 60 min インキュベート後、反応液に chloroform-methanol (2:1) 1 mL と n-hexane 3 mL を加えボルテックスで振とう抽出した。ヒト肝 Ms の場合、0.5 mg protein を用いて、その他すべてを 1/2 のスケールで行った。抽出は 2 回行い、有機層を合わせて濃縮後、diazomethane でメチル化し、GC-ECD および GC-MS に供した。GC-ECD の分析条件は次の通りである。分析機器、GC-ECD (Agilent 製): カラム, DB-1 フューズド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, 210°C; 注入口温度, 270°C; キャリアーガス, N₂ (4.6 mL/min)。なお、代謝物の定量は、PCB155 の検量線を用いて行った。

3. ヒト CYP 分子種による代謝

40 μ M PCB155 を、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-PD 1 unit), 6 mM MgCl₂ および 100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) とともに合計 0.5 mL になるように、1.5 mL プラスチックチューブの中に入れて 37°C の恒温槽に固定した後、ヒト CYP 分子種 (0.19~0.45 mg protein) の添加により反応を開始した。60 min 後、chloroform-methanol (2:1) 0.5 mL 添加により反応停止後、n-hexane 1.5 ml で抽出した。これを 3 回繰り返した後、有機層 3 回分を減圧濃縮し、diazomethane でメチル化後、GC-ECD に供した。

4. その他

動物肝 Ms のタンパク質の定量は、Lowry らの方法¹⁵⁾ に従い行った。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。

実験結果

1. PCB155 代謝物の化学構造

まず、PB 前処理ラット肝 Ms により生成された代謝物 M1 (メチル化) の分子量を GC-MS により調べた。Fig. 2 に、分析結果を示した。PCB155 は、保持時間 11.87 min に検出されたが、これ以外に、代謝物と思われる M1 (メチル化) が保持時間 13.38 min に検出された。このピークの分子量は 388 であり、PCB155 の分子量より 30 大きかった。この結果から、M1 (メチル化) は 3-OH 体のメチル誘導体であることが推定された (Fig. 2)。次に、予想代謝物として、別途合成した 3-MeO-PCB155 と比較したところ、両者は GC-MS における保持時間およびマスフラグメントパターンが、いずれもほとんど完全に一致した (Table 1)。

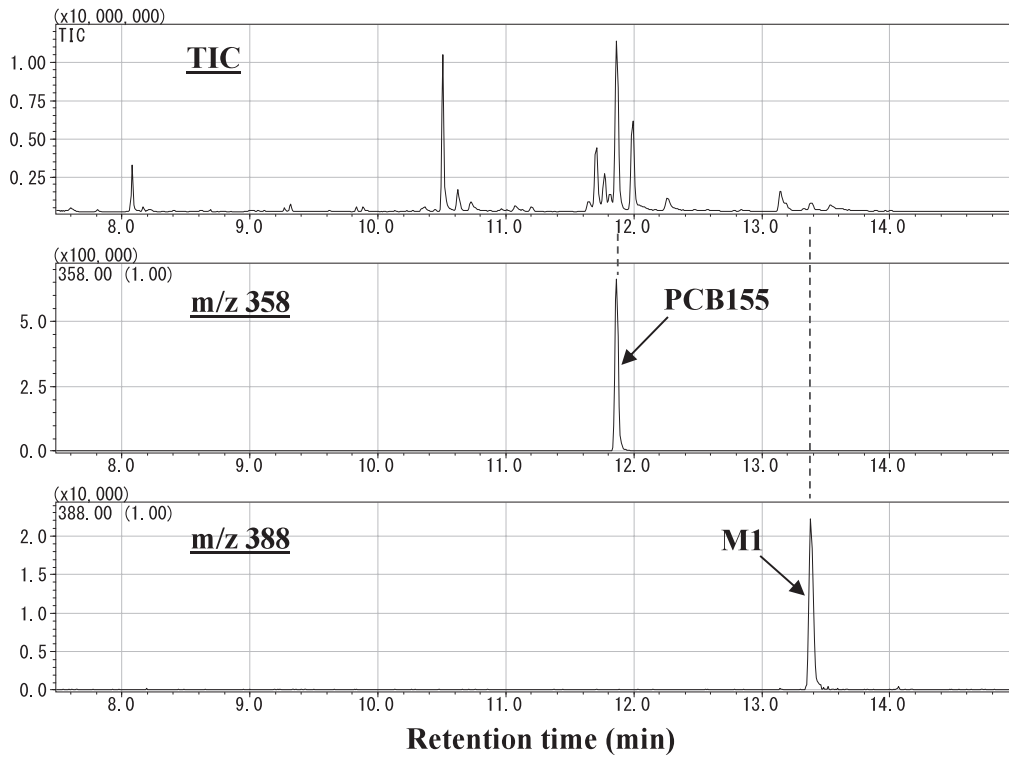
2. ラット、モルモットおよびヒト肝 Ms による PCB155 代謝

PCB155 を、NADPH 存在下、好氣的にラット、モルモットおよびヒト肝 Ms とともに、37°C、60 min 反応させ、代謝物の生成を比較した。なお、ラットとモルモットの場合、未処理動物肝 Ms とともに、CYP 誘導剤を前処理した動物肝 Ms を用いて比較した。M1 の定量は、分析機器として GC-ECD を使用し、PCB155 の検量線から行った (Table 2)。

まず、ラット肝では、PB 前処理 Ms でのみ、保持時間 5.58 min に M1 が検出され、その生成活性は、4.662 nmol/hr/mg protein と非常に高かった。なお、未処理および MC 前処理 Ms では代謝物は全く生成されなかった。次に、モルモット肝では、M1 の生成活性は未処理および MC 前処理 Ms においても検出され、それぞれ 0.056 および 0.060 nmol/hr/mg protein であった。また、ラットと同様に、PB 前処理 Ms で増加したが、未処理 Ms の約 3 倍と低いものであった (0.193 nmol/hr/mg protein)。

一方、ヒト肝 Ms でも、ラットおよびモルモットと全く同じ保持時間に M1 が検出された (Fig. 3)。その生成活性は 0.292 nmol/hr/mg protein であった。この値を、ラットおよびモルモットの未処理 Ms と比較すると、ヒト > モルモット >

(A) Mass chromatograms



(B) Mass spectra of PCB155 and M1

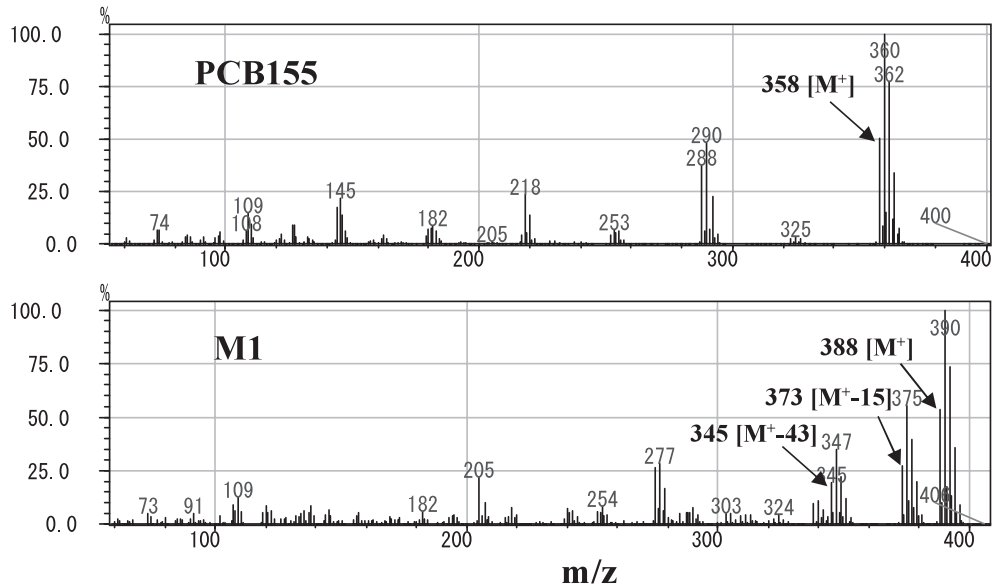


Fig. 2 GC-MS analysis of the methylated derivative of a PCB155 metabolite formed by liver microsomes of PB-treated rats

(A) Mass chromatograms (B) Mass spectra of PCB155 and M1

Table 1 Mass spectral data and retention times of PCB155 and the methylated M1

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min) in GC-MS
		[M ⁺]	[M ⁺ -15]	[M ⁺ -35]	[M ⁺ -43]	[M ⁺ -50]	[M ⁺ -70]	
PCB155	358	100	-	5	-	-	74	11.87
M1	388	100	54	-	35	10	-	13.37
3-MeO-PCB155	388	100	53	-	34	9	-	13.37

-, not detected.

Table 2 Metabolism of PCB155 by liver microsomes of rats and guinea pigs, and human, and the effect of CYP inducers on its metabolism

Animal	M1 formed (nmol/hr/mg protein)		
	Untreated	PB-treated	MC-treated
Rat	N.D.	4.662 ± 0.201	N.D.
Guinea pig	0.056 ± 0.013 (100)	0.193 ± 0.011 (345)	0.060 ± 0.010 (107)
Human *	0.292 ± 0.017		

N.D., not detected.

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

*The value represents the mean ± S.D. of three determinations.

ラットの順であり、ヒト肝が最も高かった。

3. ヒト CYP 分子種による PCB155 代謝

ヒト CYP 分子種のうち、CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6 および CYP3A4 を用いて、PCB155 代謝を調べた。その結果、CYP1A2, CYP2A6 および CYP3A4 では全く代謝物は見られなかったが、CYP2B6 でのみ、ヒト肝 Ms と全く同じ保持時間に、代謝物 M1 が検出された (Fig. 3)。また、M1 は GC-MS により、3-OH 体であることが確認された。次に、PCB155 の検量線を用いて定量したところ、CYP2B6 は 0.702 nmol/hr/nmol CYP とかなり高い生成活性を示した (Table 3)。

考 察

本研究では、2,4,6-三塩素置換 PCB である PCB155 の *in vitro* 代謝を調べた。その結果、ラット肝 Ms だけではなく、モルモット肝 Ms およびヒト肝 Ms でも、3-OH 体のみが生成された (Table 1, Fig. 4)。しかしながら、各動物間で 3-OH 体の生成パターンは大きく異なっていた。すなわち、ラットでは PB 前処理 Ms でのみ著しく

高い活性を示したが、一方、モルモットでは未処理 Ms でも低いながら活性が見られ、さらに PB 前処理により約 3 倍に増加した。次に、ヒト肝 Ms を未処理と仮定して、ラットおよびモルモットと比較すると、3-OH 体の生成活性は、ヒト > モルモット > ラットの順であった。この事実から、ヒト肝は PCB155 代謝に関して、動物肝より 5 倍以上の高い活性を有していることが示唆された。

PCB の水酸化機構として、2つの経路が考えられている。1つは、PCB 芳香環の C-H 結合に、直接酸素が挿入される経路である。本研究では、ラット、モルモットおよびヒト肝ともに、3-OH 体しか生成されなかったことから、PCB182⁸⁾ や PCB188⁹⁾ と同様に、直接水酸化で進行しているものと考えられる。もう1つは、エポキシド中間体を經由し、塩素原子の NIH 転位を伴い進行する経路である。これまでも、PCB153¹⁶⁾、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (pentaCB) (PCB126)¹⁷⁾、PCB187¹⁸⁾ など主要な PCB 異性体でも報告されている。例えば、PCB126 投与ラットの糞中から、4'-OH-3,3',4,5,5'-pentaCB が、また、PCB187 代謝では、4'-OH-2,2',3,3',5,5',

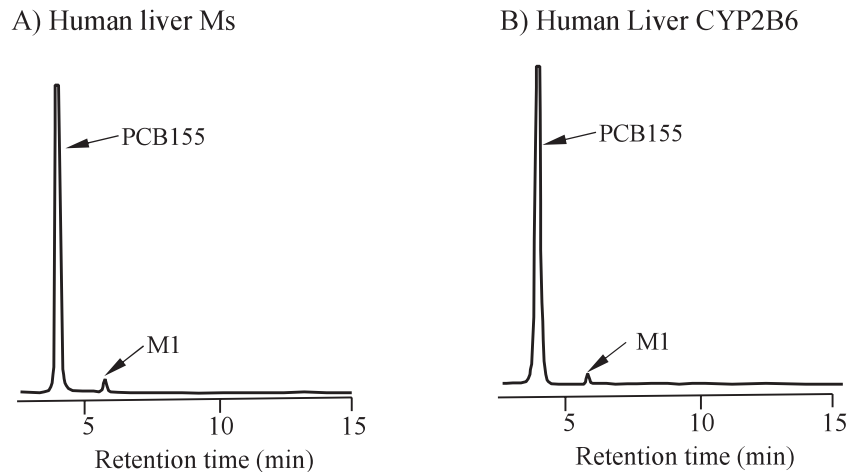


Fig. 3 GC-ECD chromatograms of the methylated derivative of M1 formed by human liver microsomes and by human CYP2B6

Table 3 Metabolism of PCB155 by human CYP isoforms

CYP isoform	M1 formed (nmol/hr/nmol CYP)
CYP1A2	N.D.
CYP2A6	N.D.
CYP2B6	0.702 ± 0.024
CYP3A4	N.D.

N.D., not detected.

Each value represents the mean ± S.D. of three determinations.

6-heptaCB や脱塩素化体の4'-OH-2,2',3,5,5',6-hexaCB が見つかっている。さらに, AriyoshiらはPB前処理イヌ肝MsによるPCB155代謝を調べ, 主代謝物の3-OH体以外に, NIH転位の産物と思われる4-OH-2,2',3,4',6,6'-hexaCBや4-OH-2,2',4',6,6'-pentaCBを報告した¹³⁾。この結果は, PB前処理イヌ肝Msにおいて, 直接水酸化およびepoxide中間体を經由した水酸化を触媒する複数のCYPが存在することを示唆している。

これまでに, PB誘導性CYPとして, CYP2B酵素が知られているが, 今回の結果から, ラットCYP2B1¹⁹⁾ およびモルモットCYP2B18¹⁹⁾²⁰⁾ がPCB155の3-水酸化に強く関与していることが示唆された。また, 4種類の代表的なヒトCYP分子種(CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP3A4)を用いた検討から, CYP2B6だけが低いPCB155代謝活性を有していた。ヒト肝のCYP2B6含量

は, 総CYP含量のうち, ほんの1%以下であるが²¹⁾, 全CYPが関与する薬物代謝のうち, 約5%に寄与しているといわれる²²⁾。今回の結果から, CYP2B6は多くの薬物代謝反応のうち, PCB異性体のメタ位(3, 3', 5あるいは5'位)水酸化を触媒しており, 結果としてPCB155の体外への排泄促進に大きく寄与していると思われる。一方, CYP3A4およびCYP1A2は, ヒト肝総CYP含量のうち, それぞれ約20%および10%を占めており²¹⁾, 薬物代謝への寄与率の点では, 非常に重要なCYPとして知られている²²⁾。しかし, 両CYPともにPCB155代謝には全く関与していなかった。また, CYP2A6はヒト肝の総CYP含量のうち, 約5%を占めており²¹⁾, PCB異性体の4位水酸化に寄与していることが報告されているが²³⁾²⁴⁾, 今回PCB155代謝では, 代謝活性を示さなかった。

最近, ヒトにおけるPCB代謝研究の1つとし

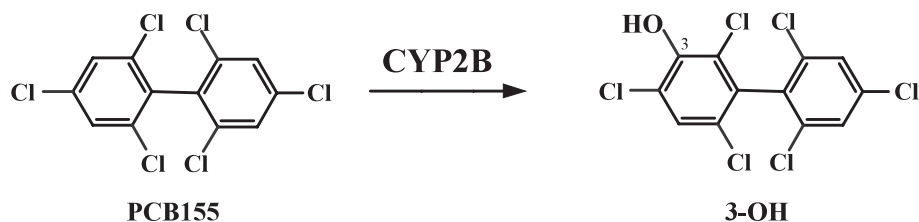


Fig. 4 Postulated metabolic pathway of PCB155 in the liver of rats, guinea pigs and human

て、*in silico* 分析におけるドッキングシミュレーションがヒトの各 CYP 分子種で試みられている²⁴⁾²⁵⁾。その結果、CYP 分子種の活性中心と PCB 水酸化の標的部位との距離が 5Å 以内である場合、その CYP 分子種は、その PCB に対する水酸化活性を示す可能性が高いとされる。現在、5 種類のヒト CYP 分子種 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6) が、PCB 代謝に関与すると推定されている。ただし、今回検討した PCB155 をはじめとする 2,4,6-三塩素置換 PCB 異性体はいずれも残留性が低いことから、*in silico* 解析はなされていない。今後、*in silico* 法により、2,4,6-三塩素置換 PCB 異性体が、なぜ代謝されやすいかという点が明らかになることを期待している。

総 括

1. 2,4,6-三塩素置換 PCB 異性体の PCB155 について、ラット、モルモットおよびヒト肝 Ms による代謝を調べた。また、4 種類のヒト CYP 分子種による代謝も調べた。
2. ラットでは、未処理および MC 前処理 Ms で代謝物は全く生成されなかったが、PB 前処理 Ms でのみ、代謝物 M1 の顕著な生成が見られた (4.662 nmol/hr/mg protein)。一方、モルモットでは、未処理および MC 前処理 Ms でも M1 が生成されたが、いずれも 0.06 nmol/hr/mg protein と低かった。また、PB 前処理 Ms では未処理 Ms の 3.4 倍に増加した。
3. ヒト肝 Ms でも、M1 のみが生成され、その生成活性はモルモット未処理 Ms の 5.2 倍であった。4 種類のヒト CYP 分子種のうち、CYP2B6 のみが高い M1 生成活性 (0.702 nmol/hr/nmol CYP) を有していた。
4. 主代謝物 M1 は、GC-MS の結果、別途合成し

た標品との比較により、3-OH-PCB155 であることが明らかになった。

以上の結果から、PCB155 は、PB 誘導性の CYP 分子種 (ヒト CYP2B6, モルモット CYP2B18, ラット CYP2B1) により、容易に 3-OH 体へと代謝されることが示唆された。

謝 辞

本研究は厚生労働行政推進調査事業費 (食品の安全確保推進研究事業, H30-食品-指定-005 古賀信幸) の助成を受けたものである。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 古賀信幸, 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.
- 2) 古賀信幸, 太田千穂: 高残留性 PCB の代謝と代謝物の毒性. 古江増隆, 赤峰昭文, 山田英之, 吉村健清編: 油症研究 II—治療と研究の最前線—, pp. 200-218, 九州大学出版会, 2010.
- 3) Sjödin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Björk J and Bergman Å: Influence of the consumption of fatty Baltic Sea fish on plasma levels of halogenated environmental contaminants in Latvian and Swedish men. *Environ. Health Perspect.* 108: 1035-1041, 2000.
- 4) 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) Park JS, Linderholm L, Charles MJ, Athanasiadou M, Petrik J, Kocan A, Drobná B, Trnovec T, Bergman Å and Hertz-Picciotto I: Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) in pregnant women from eastern Slovakia. *Environ. Health Perspect.*

- pect. 115 : 20-27, 2007.
- 6) 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.
 - 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) 太田千穂, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 木村治, 遠藤哲也, 古賀信幸 : 2,2',3,4,4',5,6'-七塩素化ビフェニル (CB182) のラット, モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝. *福岡医誌* 108 : 51-57, 2017.
 - 9) 太田千穂, 山本健太, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村治, 遠藤哲也, 古賀信幸 : 2,2',3,4,5,6,6'-七塩素化ビフェニル (CB188) のラットおよびモルモット肝ミクロゾームによる代謝. *福岡医誌* 110 : 83-90, 2019.
 - 10) Goto M, Hattori M and Sugiura K : Metabolism of pentachloro- and hexachlorobiphenyls in the rat. *Chemosphere* 3 : 177-180, 1975.
 - 11) Kato S, McKinney JD and Matthews HB : Metabolism of symmetrical hexachlorobiphenyl isomers in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53 : 389-398, 1980.
 - 12) Matthews HB and Tuey DB : The effect of chlorine position on the distribution and excretion of four hexachlorobiphenyl isomers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53 : 377-388, 1980.
 - 13) Ariyoshi N, Yoshimura H and Oguri K : Identification of *in vitro* metabolites of 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl from phenobarbital-treated dog liver microsomes. *Biol. Pharm. Bull.* 16 : 852-857, 1993.
 - 14) Cadogan JIG : A convenient new method of aromatic arylation. *J. Chem. Soc.* : 4257-4258, 1962.
 - 15) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
 - 16) Ariyoshi N, Oguri K, Koga N, Yoshimura H and Funae Y : Metabolism of highly persistent PCB congener, 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212 : 455-460, 1995.
 - 17) Koga N, Beppu M and Yoshimura H : Metabolism *in vivo* of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolite in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 13 : 497-506, 1990.
 - 18) 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.
 - 19) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H : Metabolism of 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. *Chemosphere* 37 : 1895-1904, 1998.
 - 20) Koga N, Kanamaru T, Kikuichi N, Oishi N, Kato S and Yoshimura H : Guinea pig liver cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60 : 898-903, 1998.
 - 21) Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP : Interindividual 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. Therap.* 270 : 414-423, 1994.
 - 22) Rendic, S and Guengerich FP : Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. *Chem. Res. Toxicol.* 28 : 38-42, 2015.
 - 23) McGraw SrJE and Waller DP : Specific human CYP450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC#101). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344 : 129-133, 2006.
 - 24) Shimada T, Kakimoto K, Takenaka S, Koga N, Uehara S, Murayama N, Yamazaki H, Kim D, Guengerich FP and Komori M : Roles of human CYP2A6 and monkey CYP2A24 and 2A26 cytochrome P450 enzymes in the oxidation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Drug Metab. Dispos.* 44 : 1899-1909, 2016.
 - 25) Hirakawa S, Miyawaki T, Hori T, Kajiwara J, Katsuki S, Hirano M, Yoshinouchi Y, Iwata H, Mitoma C and Furue M : Accumulation properties of polychlorinated biphenyl congeners in Yusho patients and prediction of their cytochrome P450-dependent metabolism by *in silico* analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25 : 16455-16463, 2018.

(Received for publication March 9, 2021)

ダイオキシン低用量曝露母体の肝薬物代謝酵素活性に対する
シークワーサー由来ポリメトキシフラボノイド：
ノビレチンの *in vitro* 阻害効果

¹⁾九州大学大学院薬学研究院 細胞生物薬学分野

²⁾九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

³⁾崇城大学薬学部

⁴⁾中村学園大学栄養科学部

池田佳乃子¹⁾²⁾, 佐野宏江¹⁾²⁾, 宮内 優¹⁾³⁾, 太田千穂⁴⁾,
古賀信幸⁴⁾, 田中嘉孝¹⁾, 石井祐次¹⁾²⁾

***The in Vitro* Inhibitory Effects of Nobiletin, a Polymethoxyflavonoid
from *Citrus Depressa*, on the Hepatic Enzyme Activity of
Dams Maternally Exposed to Low-Dose
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin**

Kanoko IKEDA¹⁾²⁾, Hiroe SANO¹⁾²⁾, YUU MIYAUCHI¹⁾³⁾, Chiho OHTA⁴⁾,
Nobuyuki KOGA⁴⁾, Yoshitaka TANAKA¹⁾ and Yuji ISHII¹⁾²⁾

¹⁾*Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University*

²⁾*Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University*

³⁾*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University*

⁴⁾*Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University*

Abstract

In this study, we examined the effects of nobiletin, a polymethoxyflavonoid derived from *Citrus depressa*, on cytochrome P450 (CYP, P450) activity in the livers of dams maternally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Pregnant Wistar rats received TCDD (1 μg/kg, p.o.) on gestational day 15 (GD15), and at GD20, we examined hepatic P450 activity and its inducibility by TCDD. Ethoxyresorfin-*O*-deethylase (EROD) activity, a marker activity of CYP1A1, was found to be significantly induced in TCDD-treated rats, whereas although CYP1A2 activity also increased by TCDD, the effect was less pronounced than that observed for CYP1A1. In contrast, CYP3A and CYP2C6 activities were significantly higher in the TCDD group than in the control group. These results suggest that maternal exposure to TCDD elicits changes in the levels of drug-metabolizing enzyme activities, including those of CYP1A1, CYP3A, and CYP2C6. To examine the effect of nobiletin, P450-dependent activity was assayed *in vitro* in the presence or absence of this flavonoid. Although the effects differed depending on P450 isoform, nobiletin exhibited inhibitory effects on CYP1A1, CYP1A2, CYP2C6, and CYP3A. We accordingly anticipate that nobiletin will reduce the adverse effects of maternal exposure to TCDD via its modulation of P450 activity.

Corresponding author : Yuji ISHII

Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

Tel : + 81-92-642-6586 E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

Key words : Nobiletin, TCDD, CYP, mother, liver

はじめに

1968年、西日本一帯に発生した奇病、油症では、皮膚症状や脂質代謝異常を始めとする多岐にわたる障害が発生し、発生後53年以上経過した現在もなお、多くの患者が苦しんでいる。油症原因物質は、ライスオイルの加熱脱臭時の熱媒体として用いられた polychlorinated biphenyl (PCB) およびその加熱により生じた非意図的生成物であるダイオキシン類であると考えられている¹⁾²⁾。

ダイオキシン類は多様な毒性を有する環境汚染物質でもあり、現在の我が国ではその80~90%が一般ごみ焼却施設での燃焼によって非意図的に発生している。それらダイオキシン類の中でも2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (Fig. 1) は最強毒性を有し、極めて微量で皮膚障害、生殖障害、肝障害、がん、奇形などの原因となることが知られている。ダイオキシン類の多様な毒性の多くは、転写因子である芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR)³⁾ に結合して核内因子 AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成し⁴⁾、cytochrome P450 (P450, CYP) 1ファミリーなどの標的遺伝子の転写を活性化することによって生じる。現在、ダイオキシン類対策特別措置法によってダイオキシン類対策が進められており、排出削減目標は達成されたことが評価され、1日摂取量は年々減少傾向にある。しかし、ダイオキシン類は化学的安定性、脂溶性が高く、難分解性であるため、いったん排出されたダイオキシン類の環境からの除去は困難であり、生物学的半減期は極めて長い。そのため、ダイオキシン類の慢性的な低用量曝露による影響と対策を構築することは、現在もなお重要であると考えられる。

当研究室では、TCDD 次世代毒性の解析のため、妊娠母ラットへの TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, gestational day (GD) 15) 投与による検討を行っている^{5)~8)}。妊娠母体への TCDD 低用量曝露によっては、その胎児に対して成長障害や性成熟障害^{9)~12)} といった次世代毒性を生じさせることが広く知られている。ダイオキシン類の多様な毒性のなかには

代謝酵素の誘導に起因するものがある²⁾。TCDD による CYP1A1 の誘導による心血管疾患の発症¹³⁾、酸化ストレスの増加¹⁴⁾ は TCDD による毒性の一端を担っていると考えられている。生体内での薬物代謝には P450 による酸化をはじめとした第 I 相反応、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) によるグルクロン酸抱合をはじめとした第 II 相反応が関与しており、TCDD は AhR を介した誘導により、その中でも第 I 相薬物代謝酵素として CYP1A1, 1B1, 2A8 等、第 II 相薬物代謝酵素として NAD(P)H:キノンオキシドレダクターゼ (Nqo1), UGT1A6/7, グルタチオン S-トランスフェラーゼ a1 (Gsta1) などの多数の代謝酵素を誘導する¹⁵⁾¹⁶⁾。また、妊娠母体への TCDD 低用量曝露 (妊娠 15 日目, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 経口投与) の場合での代謝酵素活性の変動については、妊娠 20 日目における母体肝臓でマーカーとなる CYP1A1 活性の誘導が確認されている¹⁷⁾。しかしその他の代謝酵素については、児の発育障害に母体側での代謝酵素の変動も一因と推測されているにもかかわらず¹⁸⁾、mRNA レベルでの検討にとどまり、これまで詳しい研究がなされていない。よって、妊娠 15 日目の母ラットへの TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与の母体肝臓での代謝酵素への影響を解析し、基礎的検討を行うことは、TCDD による次世代毒性発現に対する改善策の構築につながると考えられる。そのため、本研究ではラット妊娠母体に TCDD 低用量曝露させた際の肝臓での薬物代謝酵素の活性の変動とそれら変動に対する防御策の検討を行った。

先行研究により、GD15 妊娠母体への TCDD 低用量曝露 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) によって GD18 において母体でのコルチコステロンレベル低下が生じることが確認されている¹⁸⁾。コルチコステロンはラットやマウスなどにおいて副腎皮質束状層から分泌される糖質 (グルコ) コルチコイドのひとつであり、妊娠中は胎盤を介して母体-胎児間を循環している。また、コルチコステロンは胎児の成長に不可欠なホルモンである growth hormone (GH) 細胞の成熟¹⁹⁾²⁰⁾ や GH 産生の開始の誘発に関与する²¹⁾²²⁾。よって、一般に知られている妊娠母体

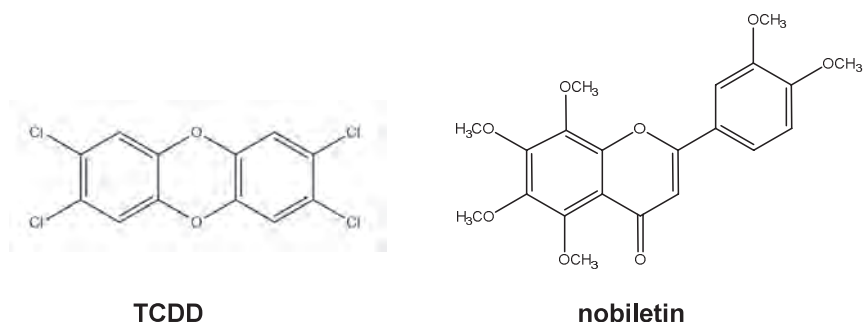


Fig. 1 Structures of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and nobiletin.

への TCDD 曝露による胎児での成長障害の発生は、その原因として胎児での GH レベルの低下が考えられ、当研究室ではその胎児での GH レベル低下に母体でのコルチコステロンレベル低下が関係しているという仮説に基づいた検討を行っている。コルチコステロンレベル低下の原因のひとつとしてコルチコステロン代謝の亢進が考えられる。コルチコステロンは 11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β -HSD) または 20 -hydroxysteroid dehydrogenase (20 -HSD) によってそれぞれ 11β -デヒドロコルチコステロン、 20 -デヒドロコルチコステロンに代謝されることが広く認められている²³⁾²⁴⁾。さらに、CYP3A²⁵⁾²⁶⁾、CYP2A²⁷⁾ がコルチコステロン代謝に関与しているという報告もある。しかし、CYP3A 及び CYP2A 以外の P450 アイソフォームにおいてコルチコステロンに対する代謝の有無は未だ不明である。

ダイオキシン毒性に対しては多数のフラボノイドがその防御策として検討されている。例えば、柑橘系に含まれるヘスペリジン²⁸⁾²⁹⁾、ホップ系植物由来のキサントフモール³⁰⁾、甘草由来のグラブリジン³¹⁾などがその例である。本研究では TCDD 毒性に対する防御策として期待されるノビレチン (NBL, 5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone) (Fig. 1) を *in vitro* での検討に用いた。ノビレチンは柑橘系植物、特にシークワーサーに多く含まれるポリメトキシフラボノイドの一種であり、抗炎症作用³²⁾³³⁾、抗認知症作用³⁴⁾、抗がん作用³⁵⁾³⁶⁾ 及び抗肥満作用³⁷⁾³⁸⁾ などの多様な作用が報告されている。また、ノビレチンはラットにおいて複数の P450 分子種 (CYP1A1, 1A2, 2A1, 2B1, 2C11, 2C12, 2D1, 2E1, 3A1, 3A2) によって代謝されることがわかっている¹⁷⁾。しかし、

TCDD 毒性に関する分野に限れば、MCF7 ヒト乳がん細胞において自身が CYP1A の基質となることで TCDD によって誘導された CYP1A を阻害すること³⁹⁾、U937 ヒトマクロファージにおいて TCDD によって誘導された CYP1A1 mRNA 発現を抑制すること⁴⁰⁾ が認められている一方で、その他の代謝酵素への影響や TCDD の妊娠曝露母体での代謝酵素にもたらす影響については情報が皆無である。よって本研究では、まず *in vitro* でのノビレチンの影響を検討した。即ち、妊娠母体への TCDD 低用量曝露による代謝酵素活性変動への *in vitro* でのノビレチン添加効果を解析することで、ノビレチンの TCDD 毒性に対する有用性について検討した。

実験方法

1. 試薬

ノビレチンは、INDOFINE Chemical Company のものをフナコシ(株)より購入して使用した。

2. 動物実験

本研究における動物実験は、九州大学動物実験委員会による実験計画の承認を受けた上で実施した。雌雄の Wistar 系ラットを一晩交配し、翌朝臍内に精子が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。妊娠 15 日目に、TCDD ($1 \mu\text{g}/\text{kg}/2 \text{ mL}$ コーン油) を単回経口投与した。対照群には、コーン油のみを投与した。胎生 20 日 (GD20) の胎児は母体から摘出し、次世代毒性の解析に供した⁴¹⁾。また、母体の肝臓を摘出し、液体窒素にて凍結したのち、使用まで -80°C にて凍結保存した。

Table 1 The kinetics parameters for cytochrome P450 activity toward 7-ethoxyresorufin, luciferin-ME, luciferin-H and luciferin-PFBE in hepatic S9

Substrate	Km	Vmax (nmol/min/mg protein)
7-Ethoxyresorufin	41.1 ± 9.3 ^a	1.25 ± 0.19
Luciferin-ME	29.8 ± 5.0 ^b	223 ± 11
Luciferin-H	311 ± 192 ^b	6.67 ± 2.90
Luciferin-PFBE	112 ± 22 ^b	25.7 ± 3.2

^anM ; ^bμM. S9 samples were prepared from the liver homogenate of pregnant rats (GD20) orally treated with TCDD (1 μg/kg). S9 samples of 5 rats were pooled and subjected to the assay. Each value represents the mean ± S.E.M. of triplicate assay.

3. S9 サンプル調製

GD20 母体 1 匹分当たり肝臓 1 g を 0.25 M sucrose 3 mL でホモジナイズした。そのうち、9,000 × g, 4°C で 20 分間遠心分離した。得られた上清 (S9) を分注し、使用するまで -80°C にて保存した。タンパク質定量は、Lowry らの方法に基づいて行った⁴²⁾。なお、標準タンパク質として bovine serum albumin (BSA) を用い、吸光度測定には HITACHI U-1800 Spectrophotometer を用いた。

4. P450 活性測定

1) Ethoxyresorfin-*O*-deethylase (EROD) assay
Burke らの方法に従って⁴³⁾、7-ethoxyresorufin の *O*-脱アルキル化反応により生じる resorufin の蛍光を測定した (励起光, 544 nm ; 測定光, 590 nm)。

2) CYP1A2, 2C6 and 3A assay

それぞれの活性は P450-Glo™ CYP1A2 Assay, P450-Glo™ CYP2C9 Assay, P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Promega 社) を用いて測定した。NADPH (終濃度 0.1 mM) の存在下、CYP1A2 測定では luciferin-ME, CYP2C6 測定では luciferin-H, CYP3A 測定では luciferin-PFBE を基質として使用した。発光測定及びインキュベーション、攪拌にはフルオロスキャンアセント FL (Thermo Labsystems 社) を使用し、付属のコンピュータソフトウェア (Ascent software) にてデータ解析を行った。なお、標準物質としては luciferin を用いた。

5. 統計処理

すべての 2 群間の比較については、Student's *t* test を用いて解析した。また、他群間の比較については、1-way ANOVA 及び Turkey の多重比較検定を用いて解析した。なお、有意水準は $p < 0.05$ とした。また、kinetics の結果は Michaelis-Menten 式に非線形回帰を行い、各パラメーターを算出した。

実験結果

1. TCDD 低用量曝露母体肝での薬物代謝酵素活性の基礎的研究

CYP1A1 の指標となる EROD 活性、及び CYP1A2, 2C6 及び 3A の活性測定を実施した。S9 のタンパク量を EROD 活性では 500 μg/100 μL, その他の assay では 40 μg/well として解析を行った。その結果、算出されたキネティックパラメーター (Km, Vmax) は Table 1 に示す通りである。速度論的解析の実施後、EROD 活性を TCDD 低用量曝露妊娠母体及び非曝露妊娠母体の間で比較することで、CYP1A1 活性の変動を解析した。7-Ethoxyresorufin 濃度は Table 1 の Km 値を基に、40 nM で使用した。その結果、Control 群と比較して、TCDD 曝露群では有意な EROD 活性の誘導が確認された (Fig. 2)。さらに、TCDD 低用量曝露妊娠母体及び非曝露妊娠母体の間で比較することで、CYP1A2, 2C6 及び 3A 活性の変動を解析した。基質の終濃度は luciferin-ME, luciferin-H 及び luciferin-PFBE それぞれ 30 μM, 300 μM 及び 100 μM として使用した。基質濃度は実施した速度論的解析によって明らかにされた Km 値を基に決定した (Table 1)。

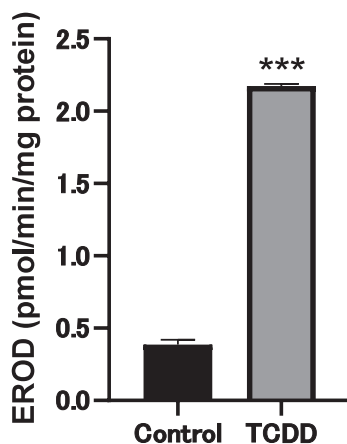


Fig. 2 Effect of maternal exposure to TCDD ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$ at GD15) on hepatic EROD activity of dams at GD20.

EROD activity in the S9 is used as index of the induction of CYP1A1. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 5 rats, respectively. Significantly different from Control : *** $p < 0.001$.

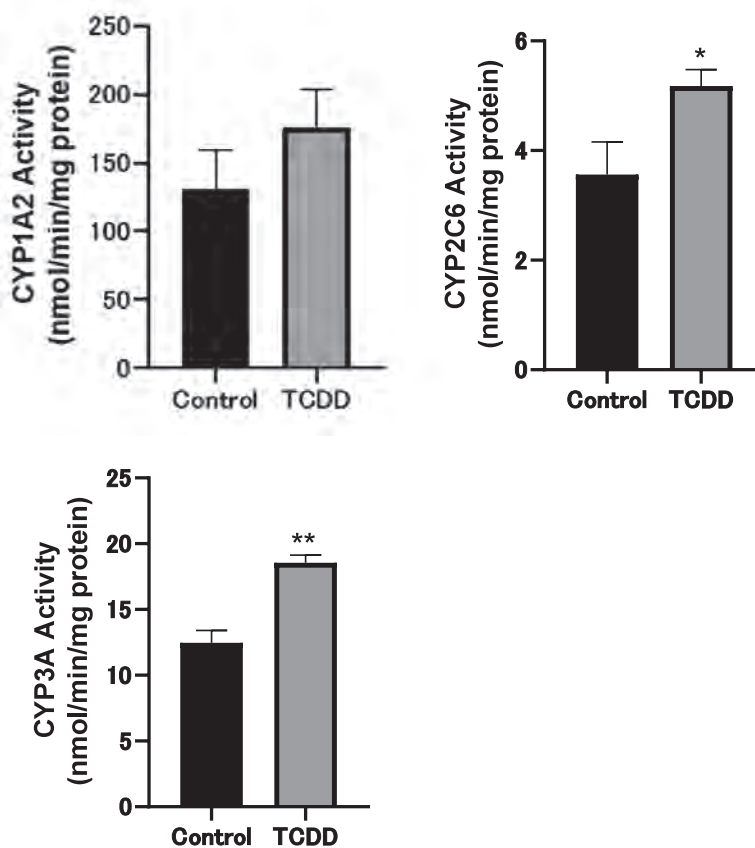


Fig. 3 Effect of maternal exposure to TCDD ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$ at GD15) on hepatic CYP1A2, 2C6 and 3A activity of dams at GD20.

Control group was treated with corn oil at GD15. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 5 rats. Significantly different from Control : * , $p < 0.05$; ** , $p < 0.01$.

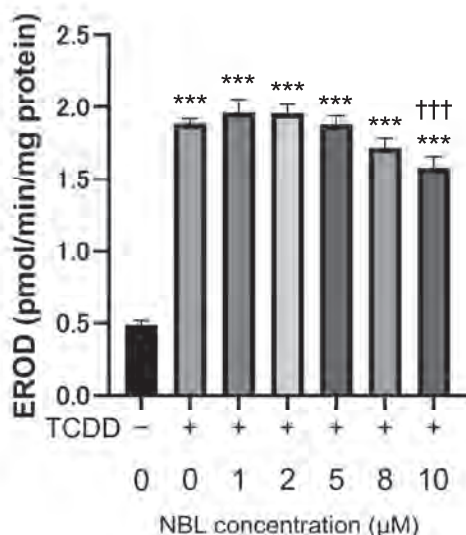


Fig. 4 Effect of nobiletin (NBL) *in vitro* on hepatic EROD activity of pregnant rats (GD20) exposed to TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at GD15). EROD activity in the S9 is used as index of the induction of CYP1A1. S9 samples of 5 rats of control and TCDD-treated group were pooled and subjected to the assay, respectively. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate assays. Significantly different from TCDD (-) group : ***, $p < 0.001$. Significantly different from {TCDD (+), NOB concentration 0 μM } group : † † †, $p < 0.001$.

その結果, CYP2C6 及び 3A において TCDD 曝露群での有意な活性の増加が確認された (Fig. 3). CYP1A2 については活性の上昇傾向があったものの有意ではなかった.

2. ノビレチンによる *in vitro* での薬物代謝酵素活性への阻害効果

次に, EROD 活性を用いてノビレチンの CYP1A1 に対する阻害効果を検討した. 7-Ethoxyresorufin 濃度は Fig. 2 の EROD 活性解析と同じ 40 nM で用いた. ノビレチンは 7-ethoxyresorufin と同じ DMSO に溶解し, 7-ethoxyresorufin と同時に終濃度 1, 2, 5, 8 及び 10 μM となるようにサンプルに添加することで反応を開始させた. なお, ここでは酵素源として, 5 匹の母ラット肝臓のサンプルを等量混和したプールド S9 サンプルを用いている. 上述 (Fig.2) と同じく, EROD 活性は TCDD 曝露により対照と比較して有意に高く, ノビレチンの終濃度 10 μM で有意に活性を抑制することが示された (Fig. 4). これは基質濃度 40 nM の 250 倍の濃度である. 次に, CYP1A2, 2C6 及び 3A の活性について, ノビレ

チンの阻害効果を解析した (Fig. 5). それぞれの基質濃度は終濃度 30 μM , 300 μM 及び 100 μM で用いた. その結果, CYP1A2 活性は TCDD 曝露により対照と比較して有意に高く, ノビレチンの終濃度 80 μM 以上で有意に活性を抑制することが示された. これは基質濃度 30 μM の約 2.7 倍の濃度である. また, CYP2C6 活性は TCDD 曝露により対照と比較して有意に高く, 最低でもノビレチンの終濃度 10 μM 以上で有意に活性を抑制することが示された. これは基質濃度 300 μM の 1/30 の濃度である. さらに, CYP3A 活性は TCDD 曝露により対照と比較して有意に高く, ノビレチンの終濃度 50 μM 以上で有意に活性を抑制することが示された. これは基質濃度 100 μM の 1/2 の濃度である. このように, ラット肝臓 S9 分画を用いた *in vitro* での検討では, ノビレチンは, CYP1A1, 1A2, 2C6 及び 3A を *in vitro* で阻害するものの, 阻害の強さは分子種ごとに異なることが示唆された. 今回検討した条件では, CYP2C6 に対する阻害効果が最も高かった (Fig. 5).

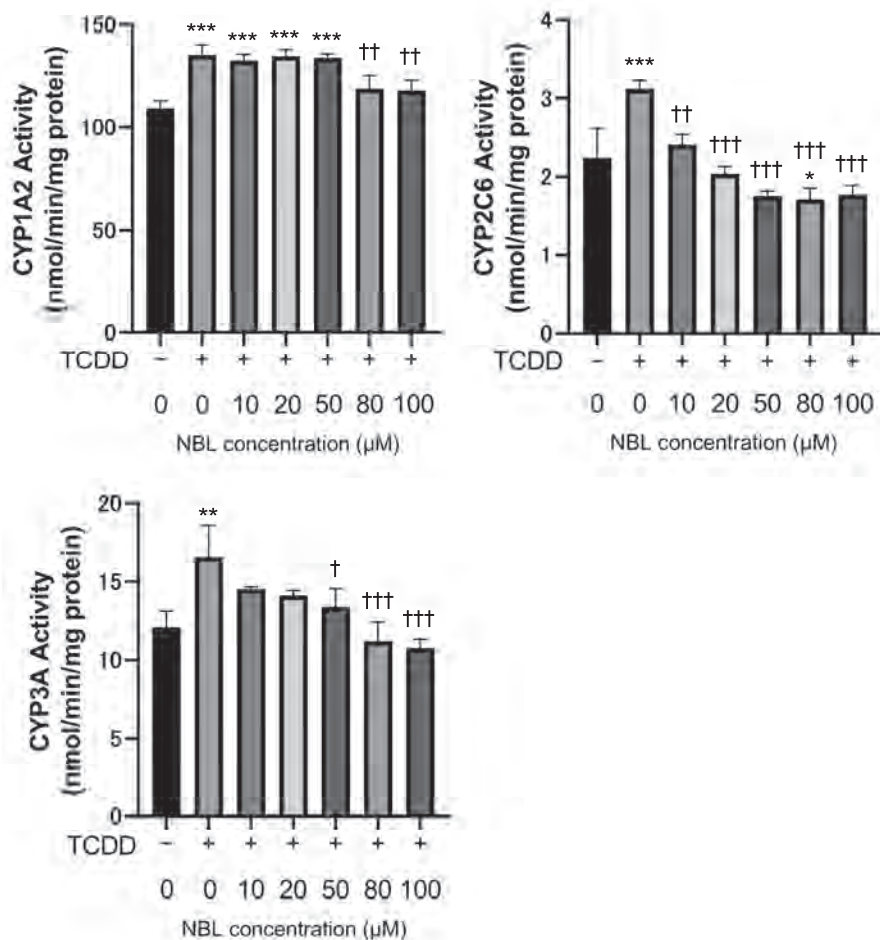


Fig. 5 Effect of nobiletin (NBL) *in vitro* on hepatic CYP1A2, 2C6 and 3A activity of pregnant rats (GD20) exposed to TCDD (1 μg/kg at GD15). TCDD (-) group was treated with corn oil at GD15. S9 samples of 5 rats were pooled and subjected to the assay. Each value represents the mean ± S.D. of triplicate assays. Significantly different from TCDD (-) group : *, p < 0.05 ; **, p < 0.01 ; ***, p < 0.001. Significantly different from {TCDD (+), NOB concentration 0 μM} group : †, p < 0.05 ; ††, p < 0.01 ; †††, p < 0.001.

考 察

本研究では、TCDD 妊娠期低用量暴露した母ラットの肝臓の P450 活性を比較し、それへのノビレチンの影響について検討した。P450 分子種の中なかでも CYP1A1 の活性が TCDD 曝露によって著しく誘導されることが示された (Fig. 2)。TCDD による CYP1A の誘導については広く知られており、AhR 活性化を介したそのメカニズムについても考察されている³⁾⁴⁴⁾。また、ラット肝において TCDD による誘導は CYP1A2 に比べて CYP1A1 がより強く誘導されることがわかっ

ている⁴⁵⁾。TCDD と同じダイオキシン類であり、油症原因物質である 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran がラット CYP1A2 に対して高親和性で結合していることが当研究室の先行研究によって示されており⁴⁶⁾、TCDD についても CYP1A2 と結合することでその活性を抑制する作用を持つことが認められている⁴⁷⁾。本研究では、western blotting によるタンパク質レベルの変動を確認していないが、TCDD 低用量曝露によっても、CYP1A2 が誘導されている可能性は否めない。しかし、誘導されると同時に TCDD との結合による活性阻害も起こっているとすれば、

本研究の結果と矛盾しない。これらの要因により、TCDD 低用量曝露によって CYP1A2 活性は増加傾向にとどまったと推定される (Fig. 3)。

さらに、TCDD 低用量曝露によって CYP3A 活性の有意な誘導が確認された (Fig. 3)。当研究室の先行研究において妊娠 15 日目母体への TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与により CYP3A1 mRNA レベルの GD17, GD18 の母親では増加傾向、GD19 の胎児では有意な増加が認められている¹⁸⁾。そのため、本研究の結果は先行研究の結果と矛盾しない。

次いで、TCDD によって CYP2C6 活性の有意な上昇が示された (Fig. 3)。CYP2C サブファミリーについては、これまでに TCDD を含む aromatic hydrocarbons による抑制は分かっていたが⁴⁸⁾⁴⁹⁾、誘導については、筆者が知る限り報告されておらず、本研究によってはじめて CYP2C6 の TCDD による誘導の可能性が示唆された。なお、本研究では、CYP1A2 特異的な luciferin-ME と CYP2C6 特異的な luciferin-H を用いた結果を基に、それぞれを CYP1A2 および CYP2C6 活性として取り扱った。TCDD 母体曝露による luciferin-ME 代謝活性への影響が上昇傾向にとどまり、luciferin-H 代謝活性の上昇が有意であることから CYP1A2 による活性上昇と CYP2C6 の誘導が示唆されたとの観点で考察を加えている。但し、luciferin-H は CYP2C6 に次いで CYP1A2 により代謝を受けることから、CYP1A2 および CYP2C6 の誘導については今後 mRNA レベルやタンパク質レベルで精査する必要がある。

前述の通り、当研究室での先行研究により、母体への TCDD 低用量曝露によって母体でのコルチコステロンレベル、胎児での GH 産生が低下することが明らかにされている¹⁸⁾。ラット CYP3A1/2 mRNA レベルの下垂体切除による増加、GH 添加による減少は報告されており⁵⁰⁾、CYP2C6 は GH によって mRNA とタンパク質レベルで抑制されることがわかっている⁵¹⁾。よって、妊娠母体への TCDD 低用量曝露によって母体でのコルチコステロンレベルの低下が生じているとすれば、胎児のみならず母体での GH 産生についても低下していると推定される。それにより CYP3A 及び 2C6 がアップレギュレーションされた可能性が考察できる。ただし、ラットのグルココルチコイドであるコルチコステロンレベルは

GD15 に TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 母体曝露後 GD18 では母体で低下が認められているが、GD19 では有意な変動はない¹⁸⁾。本研究では、P450 分子種のマーカー活性を調べたが、今後、P450 のタンパク質発現レベルについても検討することが望まれる。また、妊娠母体への TCDD 低用量曝露による母体での GH への影響の研究は、現時点では不十分であるため、今後、母体における GH レベルの変動についても検討が望まれる。よって、母体肝での CYP3A 及び 2C6 活性上昇の機構に関する考察は、仮説にとどまる。

次に、Fig. 4 及び 5 より、TCDD 低用量曝露した妊娠母体肝において誘導された CYP1A1, 1A2, 2C6 及び 3A はノビレチンによって有意に阻害されることが示された。また、活性を有意に阻害できるノビレチン濃度はそれぞれ異なるが、基質濃度を K_m を基に設定していることを考慮すると基質濃度の 1/30 の濃度でも有意な阻害が確認された CYP2C6 がノビレチンによる阻害効果が最も高いことが示唆された。ノビレチンは P450 による酸化によって、4'-OH, 7-OH, 6-OH, 3', 4'-diOH 及び 6, 7-diOH に代謝される¹⁷⁾。ラットでは、4'-OH 代謝には CYP2C11 の寄与が最も大きく、次いで CYP1A1 が主として関与している¹⁷⁾。また、7-OH 生成に対しても CYP2C11 の寄与が特出して大きく、次いで CYP3A1 及び 3A2 が関与している¹⁷⁾。さらに、6-OH 生成には CYP2C11, 2D1, 3A1 及び 3A2 がほぼ同程度の寄与で関与している¹⁷⁾。ラットでは 4'-OH が主要代謝物であることを考慮しても、ラットにおいてノビレチン代謝への寄与が大きい P450 分子種は CYP2C11 であると推察される¹⁷⁾。ラット CYP2C 分子種のうち、CYP2C11 は雄に特異的、CYP2C12 が雌に特異的である一方で、本研究において検討を行った CYP2C6 については性差がない⁵²⁾。CYP2C6 については先に示したノビレチンの代謝寄与について検討されていないが、雌に特異的である CYP2C12 はほとんどノビレチン代謝に関与していないことから¹⁷⁾、本検討で用いたラットの雌においては CYP2C6 が CYP2C11 に代わりノビレチンの酸化的代謝に関与している可能性が考えられる。このことから、本研究で検討した CYP1A1, 1A2, 2C6 及び 3A の分子種のうち、CYP2C6 が最もノビレチンによる阻害作用

が高かったことは過去の研究を考慮しても矛盾しない。

また、CYP1A1 はベンゾ[a]ピレンや 7,12-ジメチルベンズアントラセン, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) などの発がん物質への代謝に関与している⁵³⁾⁵⁴⁾。よって、TCDD により誘導された CYP1A1 活性に対するノビレチンの阻害 (Fig. 4) は発がんリスクの抑制に有効であることが示唆される。さらに、現段階では仮説にとどまるが、先に述べた通りコルチコステロン代謝に CYP1A2 が関与している可能性を考慮すると、ノビレチンによる CYP1A2 活性の抑制は胎児における成長障害の改善につながることを期待される。

さらに CYP2C6 はラットに特異的に発現する酵素であり、ヒトアイソフォームでは CYP2C9 に対応する。CYP2C6 の役割の一つにはアラキドン酸代謝がある。アラキドン酸は ω -6 多価不飽和脂肪酸であり、シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ、P450 によって代謝される。ラットでの P450 による代謝には主に CYP2C11, 2C6, 1A1 及び 1A2 が関係しており、エポキシ化またはヒドロキシ化によってエポキシエイコサトリエン酸 (EET) またはヒドロキシエイコサテトラエン酸 (HETE) に代謝される⁵⁵⁾。CYP2C6 は mid-chain (m) HETE を 48.3%, EET を 29.4% 生成する⁵⁵⁾。mHETE の中でも特に 12 位が水酸化された 12-HETE の産生が一番多く、12-HETE は炎症促進作用、アテローム性動脈硬化症の発生、腫瘍細胞のアポトーシスの抑制、血管新生、増殖の促進などに関わっている^{56)~59)}。このことから、CYP2C6 活性の増加は細胞へ悪影響をもたらす mHETE の産生につながり、ノビレチンはその毒性に対する改善効果を示すことが予想される。これまでに TCDD による HETE 量変動への影響は HETE 種全体、18, 19, 20-HETE の増加については検討されているが^{60)~62)}、TCDD による 12-HETE の変動については未だ情報が不十分である。そのため、CYP2C6 によるアラキドン酸代謝を介した毒性発現については、今後検討の余地があると考えられる。

結 論

TCDD 低用量曝露母体肝臓では多種の P450 に

よる薬物代謝活性の増加が確認されたため、それによる内因性の生理活性物質の変動や発がん物質の代謝活性化等が起り得ると推察された。ノビレチンには、*in vitro* で CYP1A1, 1A2, 2C6 及び 3A 活性の阻害効果が確認された。これにより、ノビレチンが TCDD により誘導された P450 活性を抑制することで、代謝酵素活性上昇に起因する種々の毒性に対する防御策になり得ると期待され、今後 *in vivo* でのダイオキシン次世代毒性への効果検証が望まれる。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業) (課題番号: H30-食品-指定-005) および科学研究費補助金基盤研究 A (17H00788) によった。

参 考 文 献

- 1) Masuda Y : Behavior and toxic effects of PCBs and PCDFs in Yusho patients for 35 years. *J. Dermatological Sci.* 1 : S11-S20, 2005.
- 2) Furue M, Ishii Y, Tsukimori K and Tsuji G : Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin-Related Health Hazards-Lessons from Yusho. *Int. J. Mol. Sci.* 22 : 708, 2021.
- 3) Poland A and Knutson JC : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26 : 517-554, 1982.
- 4) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 : 307-340, 1995.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H and Ishii Y : The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. *Biochem. Pharmacol.* 154 : 213-221, 2018.
- 9) Mably TA, Moore RW and Peterson RE : In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114 : 97-107, 1992.
- 10) Gray LE Jr and Ostby JS : In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133 : 285-294, 1995.
- 11) Gray LE Jr, Ostby JS and Kelce WR : A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146 : 11-20, 1997.
- 12) Hurst CH, DeVito MJ, Setzer RW and Birnbaum LS : Acute administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in pregnant Long Evans rats : association of measured tissue concentrations with developmental effects. *Toxicol. Sci.* 53 : 411-420, 2000.
- 13) Kopf PG, Scott JA, Agbor LN, Boberg JR, Elased KM, Huwe JK and Walker MK : Cytochrome P4501A1 is required for vascular dysfunction and hypertension induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Sci.* 117 : 537-546, 2010.
- 14) Denison MS, Soshilov AA, He G, DeGroot DE and Zhao B : Exactly the same but different : promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol. Sci.* 124 : 1-22, 2011.
- 15) Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y and Dalton TP : Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59 : 65-85, 2000.
- 16) Emi Y, Ikushiro S and Kato Y : Thyroxine-metabolizing rat uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A7 is regulated by thyroid hormone receptor. *Endocrinology.* 148 : 6124-6133, 2007.
- 17) Koga N, Matsuo M, Ohta C, Haraguchi K, Matsuoka M, Kato Y, Ishii T, Yano M and Ohta H : Comparative study on nobiletin metabolism with liver microsomes from rats, Guinea pigs and hamsters and rat cytochrome p450. *Biol. Pharm. Bull.* 30 : 2317-2323, 2007.
- 18) Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y and Yamada H : Dioxin-induced fetal growth retardation : the role of a preceding attenuation in the circulating level of glucocorticoid. *Endocrine.* 47 : 572-580, 2014.
- 19) Lacroix MC, Guibourdenche J, Frenco JL, Pidoux G and Evain-Brion D : Placental growth hormones. *Endocrine.* 19 : 73-79, 2002.
- 20) Jesus KD, Wang X and Liu JL : A general IGF-I overexpression effectively rescued somatic growth and bone deficiency in mice caused by growth hormone receptor knockout. *Growth. Factors.* 27 : 438-447, 2009.
- 21) Porter TE : Regulation of pituitary somatotroph differentiation by hormones of peripheral endocrine glands. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29 : 52-62, 2005.
- 22) Nogami H and Hisano S : Functional maturation of growth hormone cells in the anterior pituitary gland of the fetus. *Growth. Horm. IGF. Res.* 18 : 379-388, 2008.
- 23) Vylitová M, Miksik I and Pácha J : Metabolism of corticosterone in mammalian and avian intestine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109 : 315-324, 1998.
- 24) Kucka M, Vagnerová K, Klusonová P, Miksik I and Pácha J : Corticosterone metabolism in chicken tissues : evidence for tissue-specific distribution of steroid dehydrogenases. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147 : 377-383, 2006.
- 25) Watlington CO, Atkins JL, McNeil JS, Grogan WM and Johnson JP : Corticosterone is converted to 6 beta-hydroxycorticosterone in rat : effects of the metabolite on urinary electrolyte excretion. *J. Steroid. Biochem.* 31 : 947-954, 1988.
- 26) Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP and Lapenson DP : Human liver microsomal steroid metabolism : identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 263 : 424-436, 1988.
- 27) Negishi M, Uno T, Honkakoski P, Sueyoshi T, Darden TA and Pedersen LP : The roles of individual amino acids in altering substrate specificity of the P450 2a4/2a5 enzymes. *Biochimie.* 78 : 685-694, 1996.

- 28) Bentli R, Ciftci O, Cetin A, Unlu M, Basak N and Cay M : Oral administration of hesperidin, a citrus flavonone, in rats counteracts the oxidative stress, the inflammatory cytokine production, and the hepatotoxicity induced by the ingestion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Eur. Cytokine. Netw.* 24 : 91-96, 2013.
- 29) Tan YQ, Chiu-Leung LC, Lin SM and Leung LK : The citrus flavonone hesperetin attenuates the nuclear translocation of aryl hydrocarbon receptor. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 210 : 57-64, 2018.
- 30) Suh KS, Choi EM, Kim HS, Park SY, Chin SO, Rhee SY, Pak YK, Choe W, Ha J and Chon S : Xanthohumol ameliorates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced cellular toxicity in cultured MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J. Appl. Toxicol.* 38 : 1036-1046, 2018.
- 31) Choi EM, Suh KS, Jung WW, Park SY, Chin SO, Rhee SY, Pak YK and Chon S : Glabridin attenuates antiadipogenic activity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in murine 3T3-L1 adipocytes. *J. Appl. Toxicol.* 38 : 1426-1436, 2018.
- 32) Guo S, Qiu P, Xu G, Wu X, Dong P, Yang G, Zheng J, McClements DJ and Xiao H : Synergistic anti-inflammatory effects of nobiletin and sulforaphane in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Agric. Food. Chem.* 60 : 2157-2164, 2012.
- 33) Wu X, Song M, Rakariyatham K, Zheng J, Guo S, Tang Z, Zhou S and Xiao H : Anti-inflammatory effects of 4'-demethylnobiletin, a major metabolite of nobiletin. *J. Funct. Foods.* 19 : 278-287, 2015.
- 34) Nakajima A, Ohizumi Y and Yamada K : Anti-dementia Activity of Nobiletin, a Citrus Flavonoid : A Review of Animal Studies. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 12 : 75-82, 2014.
- 35) Liu J, Wang S, Tian S, He Y, Lou H, Yang Z, Kong Y and Cao X : Nobiletin inhibits breast cancer via p38 mitogen-activated protein kinase, nuclear transcription factor-kappaB, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathways in MCF-7 cells. *Food. Nutr. Res.* 21 : 62, 2018.
- 36) Sp N, Kang DY, Kim DH, Park JH, Lee HG, Kim HJ, Darvin P, Park YM and Yang YM : Nobiletin inhibits CD36-dependent tumor angiogenesis, migration, invasion, and sphere formation through the Cd36/Stat3/Nf-K b signaling axis. *Nutrients.* 10 : 772, 2018.
- 37) He B, Nohara K, Park N, Park YS, Guillory B, Zhao Z, Garcia JM, Koike N, Lee CC, Takahashi JS, Yoo SH and Chen Z : The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome. *Cell. Metab.* 23 : 610-621, 2016.
- 38) Lone J, Parray HA and Yun JW : Nobiletin induces brown adipocyte-like phenotype and ameliorates stress in 3T3-L1 adipocytes. *Biochimie.* 146 : 97-104, 2018.
- 39) Surichan S, Androutsopoulos VP, Sifakis S, Koutala E, Tsatsakis A, Arroo RR and Boarder MR : Bioactivation of the citrus flavonoid nobiletin by CYP1 enzymes in MCF7 breast adenocarcinoma cells. *Food. Chem. Toxicol.* 50 : 3320-3328, 2012.
- 40) Sciallo EM, Vogel CF, Wu D, Murakami A, Ohigashi H and Matsumura F : Effects of selected food phytochemicals in reducing the toxic actions of TCDD and p, p'-DDT in U937 macrophages. *Arch. Toxicol.* 84 (12) : 957-966, 2010.
- 41) 佐野宏江, 李任時, 陳宏斌, 古賀貴之, 松下武志, 松尾友樹, 武田知起, 田中嘉孝, 石井祐次 : ダイオキシン母体曝露による胎児ゴナドトロピン低下機構 : 胎児視床下部の葉酸代謝系の亢進と α -リポ酸補給による回復. フォーラム2019 : 衛生薬学・環境トキシコロジー, 京都. 8月31日, 2019.
- 42) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 43) Burke MD and Mayer RT : Inherent specificities of purified cytochromes P-450 and P-448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. *Drug. Metab. Dispos.* 3 : 245-253, 1975.
- 44) Fujii-Kuriyama Y and Mimura J : Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 : 311-337, 2005.
- 45) Xu L, Li AP, Kaminski DL and Ruh MF : 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction of cytochrome P4501A in cultured rat and human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 124 : 173-189, 2000.
- 46) Kuroki J, Koga N and Yoshimura H : High affinity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran to cytochrome P-450 in the hepatic microsomes of rats. *Chemosphere.* 15 : 731-738, 1986.
- 47) Staskal DF, Diliberto JJ, Devito MJ and Birn-

- baum LS : Inhibition of Human and Rat CYP1A2 by TCDD and Dioxin-like Chemicals. *Toxicol. Sci.* 84 : 225-231, 2005.
- 48) Yeowell HN, Waxman DJ, Wadhwa A and Goldstein JA : Suppression of the constitutive, male-specific rat hepatic cytochrome P-450 2c and its mRNA by 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl and 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.* 32 : 340-347, 1987.
- 49) Bhatena A, Lee C and Riddick DS : Suppression of Cytochrome P450 2C11 by Aromatic Hydrocarbons : Mechanistic Insights from Studies of the 5-Flanking Region of the CYP2C11 Gene. *Drug. Metab. Dispos.* 30 : 1385-1392, 2002.
- 50) Oinonen T and Lindros KO : Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem. J.* 329 : 17-35, 1998.
- 51) Banerjee S, Das RK and Shapiro BH : Feminization imprinted by developmental growth hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 479 : 27-38, 2019.
- 52) Kato R and Yamazoe Y : Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex-and species-related differences in drug toxicity. *Toxicol. Lett.* 64-65 : 661-667, 1992.
- 53) Crofts FG, Sutter TR and Strickland PT : Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis.* 19 : 1969-1973, 1998.
- 54) Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM and Spandidos DA : Cytochrome P450 CYP1A1 : wider roles in cancer progression and prevention. *BMC. Cancer.* 9 : 187, 2009.
- 55) El-Sherbeni AA and El-Kadi AO : Characterization of Arachidonic Acid Metabolism by Rat Cytochrome P450 Enzymes : The Involvement of CYP1As. *Drug. Metab. Dispos.* 42 : 1498-1507, 2014.
- 56) Manega CM, Fiorelli S, Porro B, Turnu L, Cavalca V, Bonomi A, Cosentino N, Di Minno A, Marenzi G, Tremoli E and Eligini S : 12(S)-Hydroxyeicosatetraenoic acid downregulates monocyte-derived macrophage efferocytosis : New insights in atherosclerosis. *Pharmacol. Res.* 144 : 336-342, 2019.
- 57) Zhang XJ, Cheng X, Yan ZZ, Fang J, Wang X, Wang W, Liu ZY, Shen LJ, Zhang P, Wang PX, Liao R, Ji YX, Wang JY, Tian S, Zhu XY, Zhang Y, Tian RF, Wang L, Ma XL, Huang Z, She ZG and Li H : An ALOX12-12-HETE-GPR31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Nat. Med.* 24 : 73-83, 2018.
- 58) Liu Q, Tan W, Che J, Yuan D, Zhang L, Sun Y, Yue X, Xiao L and Jin Y : 12-HETE facilitates cell survival by activating the integrin-linked kinase/NF- κ B pathway in ovarian cancer. *Cancer. Manag. Res.* 10 : 5825-5838, 2018.
- 59) Honn KV, Tang DG, Gao X, Butovich IA, Liu B, Timar J and Hagmann W : 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE : role in cancer metastasis. *Cancer. Metastasis. Rev.* 13 : 365-396, 1994.
- 60) Diani-Moore S, Ma Y, Gross SS and Rifkind AB : Increases in levels of epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids (EETs and DHETs) in liver and heart *in vivo* by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and in hepatic EET : DHET ratios by cotreatment with TCDD and the soluble epoxide hydrolase inhibitor AUDA. *Drug. Metab. Dispos.* 42 : 294-300, 2014.
- 61) Wiest EF, Walsh-Wilcox MT, Rothe M, Schunck WH and Walker MK : Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Vascular Dysfunction and Attenuate Cytochrome P4501A1 Expression by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin. *Toxicol. Sci.* 154 : 43-54, 2016.
- 62) Labitzke EM, Diani-Moore S and Rifkind AB : Mitochondrial P450-dependent arachidonic acid metabolism by TCDD-induced hepatic CYP1A5; conversion of EETs to DHETs by mitochondrial soluble epoxide hydrolase. *Arch. Biochem. Biophys.* 468 : 70-81, 2007.

(Received for publication March 9, 2021)

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による 出生児の性未成熟の機構解析： ゴナドトロピン放出ホルモン神経への影響

¹⁾九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

²⁾九州大学大学院薬学研究院 細胞生物薬学分野

西田 恭子¹⁾, 武田 知起¹⁾, 山田 英之¹⁾, 石井 祐次¹⁾²⁾

Mechanism Whereby Maternal Exposure to Dioxin Causes Sexual Immaturity of the Offspring : Effects on Neurons Secreting Gonadotropin-Releasing Hormone

Kyoko NISHIDA¹⁾, Tomoki TAKEDA¹⁾, Hideyuki YAMADA¹⁾ and Yuji ISHII¹⁾²⁾

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

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

Abstract

Our previous studies have revealed that maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) attenuates the hypothalamic biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in male offspring, thereby imprinting sexual immaturity. To clarify the mechanisms underlying such reductions in GnRH, we examined the effects of TCDD on the number and/or form of GnRH neurons. Maternal exposure to TCDD was found to have little effect on the number or location of GnRH neurons in male offspring at gestational day 20 (GD20), postnatal day 4 (PND4), PND7, PND14, or PND28. However, maternal exposure to TCDD was observed to attenuate the number of bipolar GnRH neurons in the male offspring at PND14 and PND28, although no similar effect was observed for unipolar neurons. Furthermore, we detected no obvious effect of TCDD on the axonal length of GnRH neurons. These findings indicate that TCDD reduces the number of bipolar GnRH neurons beginning at PND14 when it causes GnRH attenuation. TCDD may thus elicit the attenuation of GnRH neurons in a bipolar neuron-selective manner.

Key words : Dioxin, GnRH neuron, LHRH, next generation, hypothalamus

はじめに

妊娠期母体が、比較的低用量のダイオキシンに曝露することによって、出生児に成長遅延や性特異的行動障害などの様々な発育障害を惹起する¹⁾。カネミ油症の被害者追跡調査や出生コホート研究からも、ダイオキシンがヒトこどもの発達に及ぼ

す影響が懸念され²⁾³⁾、早期の治療・予防法の確立が待たれている。そのためにも、この毒性発現機構の解明が必要である。

一般に、ダイオキシン毒性には、受容体型転写因子である芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AHR) が重要な役割を演じることが明らかにされている^{4)~6)}。すなわち、AHR

Corresponding author : Yuji ISHII

Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

Tel : + 81-92-642-6586 E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

はダイオキシンとの結合により核内に移行し、cytochrome P450 (CYP) 1A1 等の標的遺伝子の転写調節領域に存在する xenobiotic responsive element への結合を介して、これらの発現を変動させる。変動遺伝子は数百種類も存在し^{7)~9)}、これらが複合的に毒性に寄与すると考えられている。妊娠期のダイオキシン曝露は、出生児に交尾行動障害などの性未成熟を惹起する¹⁾。これらは低用量で発現し、一生涯にわたって影響が定着するため問題である。筆者らはこれまでの一連の研究によって、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD; 1 µg/kg, 経口) の妊娠ラットへの曝露が、出生前後の児の luteinizing hormone (LH) の合成を低下させ、これを起点として成長後に交尾行動が障害されること実証している¹⁰⁾¹¹⁾。これらの影響は、AHR を介して引き起こされること、また、AHR が性的二型性に必要不可欠なものであることも報告している¹²⁾。さらに、上記の障害は視床下部より分泌される神経ペプチドホルモンである gonadotropin-releasing hormone (GnRH) の合成抑制が成長後にまで定着するためであることも見出した¹³⁾。しかし、GnRH 発現低下が固定化する原因は不明である。

GnRH ニューロンは、鼻板で発生し脳内を遊走することで、胎生後期には視床下部に到達する¹⁴⁾。また、出生後より軸索成長やシナプス増加などの形態学的な変化が始まるが、GnRH が生体で明確な役割を担うと考えられているのは思春期 (4~6 週齢) 以降である¹⁵⁾¹⁶⁾。TCDD 依存的な GnRH 発現低下は、出生後早期より出現することから、胎生後期から新生児期の GnRH ニューロンの発生、遊走および軸索成長などの初期成熟過程に及ぼす影響が想定される。そこで本研究では、組織免疫染色法を用いた細胞レベルでの解析を行うことで、TCDD が胎児期から思春離乳期にかけての雄児の GnRH ニューロンに与える影響を検討した。

実験方法

1. 動物実験

本研究における動物実験は、九州大学動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会による実験計画の承認を受けた上で実施した。雌雄の Wistar 系ラットを一晩交配し、翌朝臍内に精子

が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。妊娠 15 日目に、TCDD (1 µg/kg/2 mL コーン油) を単回経口投与した。対照群には、コーン油のみを投与した。胎生 20 日 (GD20) の雄児は母体から摘出したのち、頭部を切除してパラホルムアルデヒドに浸し、固定を行った。10~30% のスクロース溶液 (in 0.1 M PBS) で置換したのち、脳を OCT compound で包埋し、-80℃ にて凍結保存した。生後 4 日 (PND4), PND7, PND14 および PND28 の雄児はパラホルムアルデヒド (4% in 0.1 M PBS) にて灌流固定した。4℃ のパラホルムアルデヒド (4% in 0.1 M PBS) 中で 1~2 日浸したのち、同様にスクロース置換ならび包埋を行った。

2. 免疫染色

(1) 脳切片の作製

脳の凍結ブロックを背側から腹側に向かって冠状面を削り出したのち、連続して薄切した。脳切片は適切な大きさのプレート内に一枚ずつ入れ、各穴に 50 mM PBS を 1 mL 入れたのち、室温に出し不要な OCT compound を溶かした。

(2) GnRH 単染色

(1) によって得られた脳切片は、50 mM PBS で 15 分間 × 3 回洗浄したのち、10% normal goat serum (NGS) 中で 37℃ 30 分間静置した。次に、50 mM PBS で 5 分間 × 3 回洗浄し、一次抗体液中で 4℃ 60 時間静置した。その後、50 mM PBS で 10 分間 × 3 回洗浄し、二次抗体液中で 25℃ 2 時間静置した。再度、50 mM PBS で 10 分間 × 3 回洗浄したのち、脳切片をスライドガラスに貼りつけた。作製したスライドガラスを共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いて観察した。画像取得のためのソフトウェアは ZEN 2011 Black edition (Carl Zeiss) を用いた。使用した抗体の希釈倍率は以下の通りである。

一次抗体: Anti-LHRH antibody (1 I.U./1 L) を 1% NGS にて 400 倍希釈。

二次抗体: Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 647 conjugate を 1% NGS にて 200 倍希釈。

(3) 多重染色

GnRH 単染色の二次抗体液の組成に、さらに anti-neuronal nuclei (NeuN) Alexa Fluor 488 (100 倍希釈) および 4',6-diamidino-2-phenylin-

dole (DAPI) solution (1,000 倍希釈) を加えたものを二次抗体液として用いた。二次抗体液以外は、(2)に記載した操作および条件と同様に行った。

実験結果

検討に先立ち、幼若ラットの脳において GnRH ニューロンが検出できることを確認するため、GnRH 抗体に加えてニューロンマーカーである NeuN 抗体および細胞核マーカーである DAPI の多重染色を行った。PND7 雄児での検討の結果、GnRH と NeuN の陽性領域が完全にマージし、これが GnRH ニューロンであることが確認できた (Fig. 1A)。さらに、本手法では、細胞体から出る主な突起が2本の双極性ニューロンと (Fig. 1B)、1本のみの単極性ニューロン (Fig. 1C) というそれぞれ形態の異なる GnRH ニューロンが明確に分離可能であることも確認した。そこで、TCDD 母体曝露が胎児ならびに出生雄児の GnRH ニューロンの発達 (= 発生, 遊走, 形態および軸索長) に影響を及ぼすか否かを検討した。GnRH ニューロンが比較的高密度で分布する organum vasculosum lamina terminalis (OVLT) を中心に 1.28 mm 四方の領域で検討を行った。GD 20 から PND 28 にかけて切片ごとの GnRH 陽性細胞数を計測した結果を Fig. 2 に示す。グラフの縦軸が測定領域に含まれる細胞数、横軸が OVLT からの距離について吻側を負、尾側を正として示す。GnRH ニューロンは吻側にある嗅球から視床下部がある尾側方向に遊走するため、遊走不良が起きた場合は分布が吻側にずれる。検討の結果、PND28 の OVLT + 200 μm では総細胞数が減少する傾向が見られたが、いずれの日齢においても両群のグラフの形がよく一致していることが確認された (Fig. 2)。従って、少なくとも TCDD は発達児における GnRH ニューロンの発生や遊走には影響は小さいことが明らかになった。

一方、PND7 から PND28 にかけて単極性および双極性それぞれのニューロン数を計測した。その結果、PND14 では OVLT + 200 μm 付近のニューロン局在領域で TCDD 依存的な双極性ニューロンの減少ないし減少傾向が認められた (Fig. 3)。単極性ニューロンには有意な影響は観察されなかった (Fig. 3)。さらに、これらの傾向はニューロン成熟が完了する PND28 でも継続し

た (Fig. 3)。なお、TCDD は GnRH ニューロンの軸索長には影響を及ぼさなかった (Fig. 4)。これらの結果から、TCDD 母体曝露は雄児における GnRH ニューロンの遊走や軸索伸張には影響を及ぼさないが、出生後に双極性ニューロン数を減少させることが明らかになった。

考 察

本研究では、GD15 の母ラットへの 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD 単回投与が、発達期の GnRH 神経成熟に及ぼす影響を検討した。雄児の GnRH ニューロンの数や形態に及ぼす影響を解析した結果、PND14 ならびに PND28 では双極性 GnRH ニューロンが有意に減少することが明らかになった。胎児期から新生児期の性ステロイド刺激は、軸索成長やシナプス形成などの形態的な成熟化にも重要であるため¹⁷⁾¹⁸⁾、本研究の知見と成熟期に見られる形態異常は共に性ステロイド合成低下によって生起する可能性がある。今後、性ステロイド刺激との関連性を追求し、GnRH ニューロンの成熟過程への影響を明確にすることが重要である。

GnRH プロモーターに enhanced green fluorescent protein (EGFP) を連結した遺伝子を導入した GnRH-EGFP ラットでは、思春期前の EGFP 発現が低い時期は単極性ニューロンの比率が高いが、GnRH 発現が高まる思春期には EGFP 陽性の双極性ニューロンが高比率で検出される¹⁹⁾。従って、双極性ニューロンの方が恒常的に GnRH プロモーター活性が高いために、この減少が GnRH 発現低下に関与する可能性が考えられる。双極性 GnRH ニューロンの有意な減少が認められたのは、OVLT から尾側に 200 μm のニューロン局在領域に限定された。OVLT には血液脳関門が存在しないため、OVLT 近辺の GnRH ニューロンは末梢からの刺激を受けやすく、他領域のニューロンよりもスパインの分枝構造が複雑であると言う²⁰⁾。また、GnRH ニューロンは、 γ -aminobutylic acid (GABA) およびセロトニンなどの神経伝達物質の制御を受けることが知られている²¹⁾²²⁾。ダイオキシンは GABA ニューロンを標的として性分化を障害する可能性²³⁾、ならびに母マウスへの TCDD 曝露によって児のセロトニン陽性細胞数が減少することが報告されている²⁴⁾。これらを総合すると、TCDD による発達

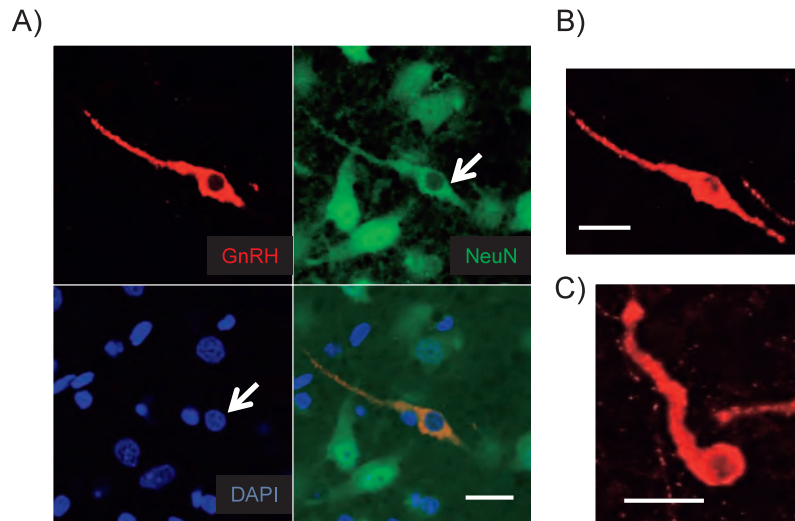


Fig. 1 Detection of GnRH neurons in the male offspring at PND 7 using an immunofluorescence
 (A) Each confocal image ($\times 40$) is as follows : GnRH (red), NeuN (green) and DAPI (blue). Panels (B) and (C) represent the bipolar and unipolar neuron, respectively. Scale bar : $20 \mu\text{m}$.

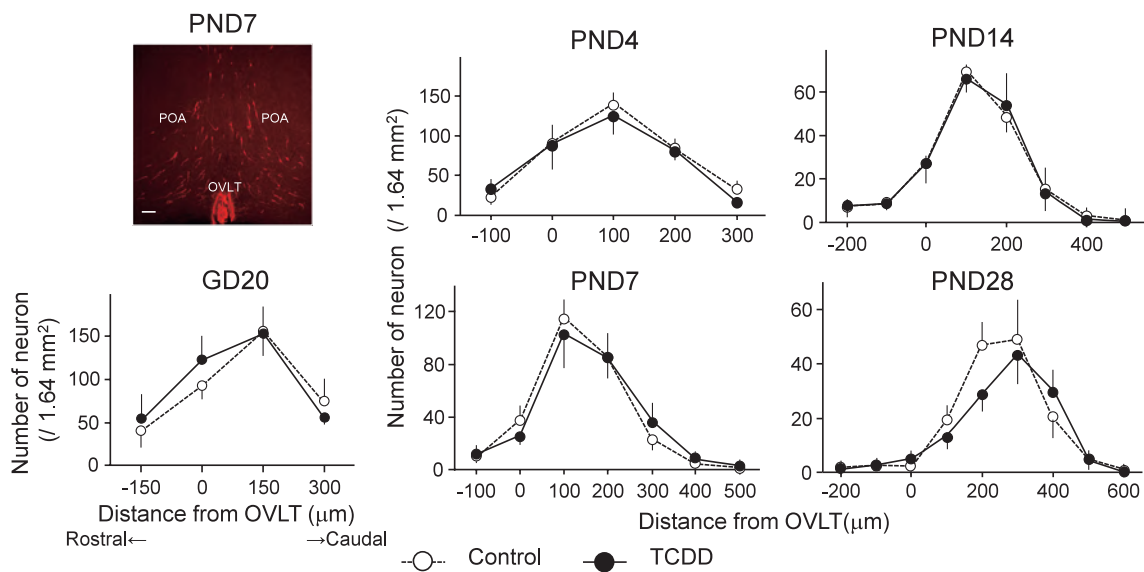


Fig. 2 Little effect of maternal exposure to TCDD on the number and location of GnRH neurons in the male offspring at GD20, PND4, PND7, PND14 and PND28. Pregnant dams were exposed to TCDD ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$, orally) at GD15, and brain sections of the male offspring were immunostained for detection of GnRH neurons. Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 3-6 male offspring which were removed (born) from different dams. Scale bar : $100 \mu\text{m}$. Abbreviations used : OVLT, organum vasculosum lamina terminalis ; POA, preoptic area.

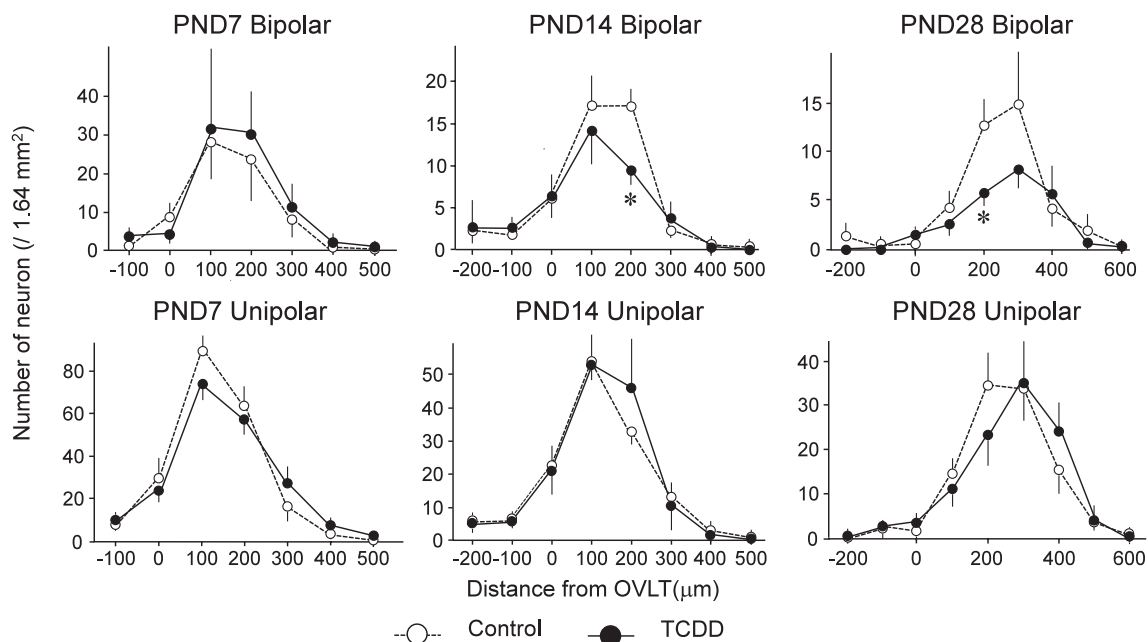


Fig. 3 Effect of maternal exposure to TCDD on the number of bipolar and unipolar GnRH neurons in the male offspring at PND7, PND14 and PND28. The number of bipolar and unipolar neurons was counted per section. Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 3-6 male offspring which were born from different dams. Significantly different from the control: * $p < 0.05$.

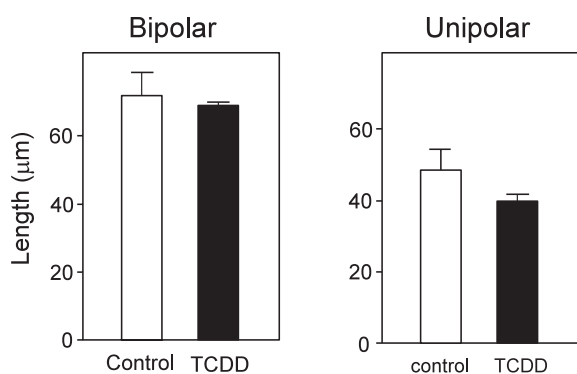


Fig. 4 Failure of the effect of TCDD on the axonal length of GnRH neurons. The length of GnRH neuronal axon of the male offspring at PND14 were measured using 3D images of immunofluorescence. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 3 male offspring which were born from different dams.

期の性ステロイドや GABA およびセロトニンなどの GnRH 神経成熟に関わる因子の発現を抑制し、双極性ニューロンへの成熟化を障害する可能性が想定される。GnRH ニューロンの発達障害の実態を明らかにするため、引き続き性ステロイドや神経伝達物質との相互作用とこれに対する

TCDD の影響を検証することが重要であろう。

結 論

胎生期から離乳期にかけての雄児脳を対象として、GnRH 抗体を用いて組織免疫染色を行った結果、TCDD 母体曝露によって生後 14 日目および 28 日目の雄児において双極性 GnRH ニューロン数が有意に減少することが明らかになった。一方、胎生期においては目立った影響は観察されず、GnRH ニューロンの分布や軸索長についても TCDD による変化は認められなかった。これらの結果から、TCDD 胎児期曝露によって出生後に起こる GnRH 発現低下には、双極性 GnRH ニューロンの選択的な減少が寄与する可能性が見出された。

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, H27-食品-指定-017), (食品の安全確保推進研究事業)(課題番号:H30-食品-指定-005), 科学研究費補助金基盤研究 A (17H00788) および(財)日本科学協会平成 29 年

度笹川科学研究助成学術研究部門研究番号29-603
(西田恭子) によった。

参 考 文 献

- 1) 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.
- 2) Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Chiba T, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Fukushima K, Wake N and Furue M : Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease. *Environ. Int.* 38 : 79-86, 2012.
- 3) Nishijo M, Tawara K, Nakagawa H, Honda R, Kido T, Nishijo H and Saito S : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 18 : 246-251, 2008.
- 4) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ : Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140 : 173-179, 1996.
- 5) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M and Fujii-Kuriyama Y : Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2 : 645-654, 1997.
- 6) Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y and Ishikawa T : Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 : 779-782, 2000.
- 7) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 : 307-340, 1995.
- 8) Mimura J and Fujii-Kuriyama Y : Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* 1619 : 263-268, 2003.
- 9) Whitlock JP Jr : Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 : 103-125, 1999.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H and Ishii Y : The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. *Biochem. Pharmacol.* 154 : 213-221, 2018.
- 13) Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Yamamoto M, Shimazoe T, Ishii Y, Himeno M and Yamada H : Maternal exposure to dioxin imprints sexual immaturity of the pups through fixing the status of the reduced expression of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Pharmacol.* 85 : 74-82, 2014.
- 14) Daikoku S and Koide I : Spatiotemporal appearance of developing LHRH neurons in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 393 : 34-47, 1998.
- 15) Clarkson J and Herbison AE : Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.* 254-255 : 32-38, 2006.
- 16) Clarkson J, Han SK, Liu X, Lee K and Herbison AE : Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.* 324 : 45-50, 2010.
- 17) Mong JA, Roberts RC, Kelly JJ and McCarthy MM : Gonadal steroids reduce the density of axospinous synapses in the developing rat arcuate nucleus : An electron microscopy analysis. *J. Comp. Neurol.* 432 : 259-267, 2001.
- 18) Wilson CA and Davies DC : The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction.* 133 : 331-359, 2007.
- 19) Xue H, Gai X, Sun W, Li C and Liu Q : Morphological changes of gonadotropin-releasing hormone neurons in the rat preoptic area across puberty. *Neural. Regen. Res.* 9 : 1303-1312, 2014.
- 20) Herde MK, Geist K, Campbell RE and Herbison AE : Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. *Endocrinology.*

- 152 : 3832-3841, 2011.
- 21) Watanabe M, Fukuda A and Nabekura J : The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Front Neurosci.* 8 : 387, 2014.
- 22) Kim HS, Yumkham S, Choi JH, Son GH, Kim K, Ryu SH and Suh PG : Serotonin stimulates GnRH secretion through the c-Src-PLC γ pathway in GT1-7 hypothalamic cells. *J. Endocrinol.* 190 : 581-591, 2006.
- 23) Petersen SL, Krishnan S and Hudgens ED : The aryl hydrocarbon receptor pathway and sexual differentiation of neuroendocrine functions. *Endocrinology.* 147 : 33-42, 2006.
- 24) Kuchiiwa S, Chenga SB, Nagatomo I, Akasaki Y, Uchida M, Tominaga M, Hashiguchi W and Kuchiiwa T : *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin decreases serotonin-immunoreactive neurons in raphe nuclei of male mouse offspring. *Neurosci Lett.* 317 : 73-76, 2002.

(Received for publication March 9, 2021)

感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討

¹⁾熊本保健科学大学 保健科学部 リハビリテーション学科

²⁾帝京大学福岡医療技術学部 理学療法学科

³⁾リハビリテーションセンター 熊本回生会病院

⁴⁾くまもと南部広域病院

⁵⁾医療法人社団温故会 直方中村病院

申 敏 哲¹⁾, 行 平 崇¹⁾²⁾, 小 牧 龍 二¹⁾³⁾, 福 永 貴 之¹⁾⁴⁾,
田 中 哲 子¹⁾, 土 井 篤¹⁾, 吉 村 恵⁵⁾

Effect of Cinnamon on Benzo[a]pyrene-Treated Rats using Quantitative Threshold Evaluation

Min-Chul SHIN¹⁾, Takashi YUKIHIRA¹⁾²⁾, Ryuji KOMAKI¹⁾³⁾, Takayuki FUKUNAGA¹⁾⁴⁾,
Tetsuko TANAKA¹⁾, Atsushi DOI¹⁾ and Megumu YOSHIMURA⁵⁾

¹⁾*Department of Rehabilitation, Faculty of Health Sciences, Kumamoto Health Science University, Kumamoto, Japan*

²⁾*Department of Physical Therapy, Teikyo University Faculty of Fukuoka Medical Technology, Fukuoka, Japan*

³⁾*Rehabilitation Center Kumamoto Kaiseikai Hospital, Kumamoto, Japan*

⁴⁾*Kumamoto Southern Regional Hospital, Kumamoto, Japan*

⁵⁾*Nogata Nakamura Hospital, Fukuoka, Japan*

Abstract

In this study, we investigated the effect of cinnamon on rats treated with benzo[a]pyrene. The investigations were performed using quantitative threshold evaluations with three different sensory stimuli at 5 Hz, 250 Hz, and 2,000 Hz, by measuring oxidative stress/antioxidants, and using Western blotting for components of the associated pathways. We found that no significant threshold change could be observed after a single dose of electrical stimulation frequencies of 5 Hz and 250 Hz during benzo[a]pyrene acute poisoning in rats. The electrical stimulation frequency of 2,000 Hz resulted in an increase in the sensory threshold of benzo[a]pyrene-treated rats. However, this increase in the threshold tended to be suppressed by the administration of cinnamon. A significant improvement in the oxidative stress state was observed among the cinnamon-treated rats compared with the benzo[a]pyrene-treated rats. The western blot analysis revealed that the decreased expression of myelin-associated glycoprotein (MAG) and the increased expression of cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1) in the benzo[a]pyrene-treated rats were inhibited and increased upon cinnamon administration, respectively. However, there was no significant difference between the groups in terms of the expression of myelin basic protein (MBP). Administration of 3 mg/kg cinnamon, which was effective in benzo[a]pyrene single dose rats, slightly improved the sensory threshold, oxidative stress state, CYP1A1, MBP, and MAG protein expression in the rats exposed to benzo[a]pyrene for 2 weeks, but with no significant difference. These results indicate that the administration of benzo[a]pyrene may lead to paresthesia by causing demyelination due to its toxicity on A β fibers that transmit

Corresponding author : Min-Chul SHIN

Laboratory of Neuroscience, Kumamoto Health Science University, Izumimachi 325 Kumamoto, Japan 861-5533

Tel : +81-96-275-2111 Fax : +81-96-245-2175

E-mail : karosu94@kumamoto-hsu.ac.jp

tactile and pressure sensations. In addition, the administration of cinnamon may also improve paresthesia by suppressing AHR activation and oxidative stress. However, it has been suggested that the effective intake concentration and duration of exposure to cinnamon may differ depending on the duration of exposure to benzo[a]pyrene.

Key words : benzo[a]pyrene, sensory threshold, cinnamon, arylhydrocarbon receptor

はじめに

ダイオキシン類化合物による複合中毒であるカネミ油症患者は、現在でも様々な後遺症で苦しんでいる¹⁾。特に、一部の患者では末梢の感覚鈍麻やしびれ感、自律神経失調症等の末梢神経障害および中枢神経障害等が報告されている^{2)~4)}。近年、ベンゾピレン（ダイオキシン類似化合物）を用いた動物実験の結果、ベンゾピレン投与ラットで末梢のしびれ感等に関連する A β 神経線維の伝導速度が低下していることが確認された。A β 線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感と関係が有ると報告されている⁵⁾。ベンゾピレンの様なダイオキシン類の毒性の大半は、芳香族炭化水素受容体（arylhydrocarbon receptor, 以下 AHR）を介して発揮されることが報告されている。また、Uchi ら⁶⁾はその AHR の活性を様々な植物成分や生薬で抑制させることが出来ると報告している。特に、ケイヒの主成分であるシンナムアルデヒドが AHR 活性を阻害するとともに、抗酸化ストレス作用を発揮することが明らかになっている。近年我々は、ベンゾピレン投与ラットにケイヒを投与してその効果を検討した結果、ケイヒの投与がベンゾピレン投与ラットの感覚異常を改善させる可能性を確認した。しかし、そのケイヒの効果やメカニズムはまだ明らかではない。そこで本実験では、ベンゾピレン単回投与によるベンゾピレン急性中毒ラットとベンゾピレンを2週間連続暴露させたラットにケイヒを投与し、5 Hz, 250 Hz, 2,000 Hz の正弦波感覚刺激による定量的閾値評価法、酸化ストレス・抗酸化力測定法、Western blot 法を用いて、ベンゾピレン投与ラットの感覚異常に対するケイヒの効果を、より明確にすることを目的とした。

実験方法

1. 実験動物

実験動物には、ホルモンの影響を排除するため、Wistar 系雄性ラット（5週齢）を用いて①コーンオイル単回投与後蒸留水投与（CD）群、②ベンゾピレン単回投与後蒸留水投与（Benz1）群、③ベンゾピレン単回投与後 1 mg/kg ケイヒ投与（Benz11CNM）群、④ベンゾピレン単回投与後 3 mg/kg ケイヒ投与（Benz13CNM）群、⑤ベンゾピレン2週間連続投与後蒸留水投与（Benz2）群、⑥ベンゾピレン2週間連続投与後 3 mg/kg ケイヒ投与（Benz23CNM）群に分け、ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を調べた。ラットは市販の飼料（CE-2, 日本クレア）および水を自由に摂取させ、動物舎の照明は12時間ごとに明暗のコントロールをし、室温 25.0°C、湿度 55 ± 5% の条件下で飼育した。

（倫理面への配慮）

動物の飼育および実験に関しては、熊本保健科学大学動物倫理委員会の許可（登録番号、動18-10）を得て行った。3種混合麻酔薬の全身麻酔下で心臓から採血後、左右の坐骨神経を採集し、その後、過量の3種混合麻酔薬を腹腔内に追加投与後、心臓・大血管を切開して失血死させたため痛みなどの侵襲は殆ど無い。

2. 試薬の投与

ベンゾピレン（Benzo[a]pyrene）は富士フィルム和光純薬㈱から購入した。ケイヒはスリランカ産のオーガニックシナモンを使用した。コーンオイルとベンゾピレン単回投与群には、経口投与器を用いて、コーンオイルと 30mg/kg ベンゾピレンを1回 500 μ l ずつ胃に直接投与した。ベンゾピレン2週間連続投与群に対しては、500 μ l ずつ2週間連続して胃に直接投与した。コーンオイルとベンゾピレン投与1日後又は2週間後から、

コーンオイルとベンゾピレン投与群には蒸留水を、ケイヒ投与群には1 mgと3 mg/kgのケイヒを、それぞれ経口投与器を用いて500 μ lずつ、2週間胃に直接投与した。

3. 感覚閾値の測定

時間的経過による感覚の変化は小動物用電気刺激装置 (STG2000 バイオリサーチセンター) を用いて電気刺激による感覚閾値を測定した。ラットは拘束装置に入れ、一定時間放置し、ラットが環境に慣れた頃合いをみて開始した。周波数5 Hz, 250 Hz, 2,000 Hzの正弦波電機刺激を覚醒下のラット右後肢足底部に与え、刺激を与えてからラットの逃避反応が観察された時点までの時間を計測し、p-clamp ソフトウェア (Axon Instrument 社製) で、刺激時間から刺激強度 (μ A) を換算した。

4. 酸化ストレス・抗酸化力測定と CYP1A1, MBP, MAG タンパク質の測定

最終日の行動実験実施後、直ちに3種混合麻酔薬を用いてラットを麻酔し、心臓からは採血、左右足からは坐骨神経を採集し、血液は4°C、坐骨神経は-80°Cに凍結した。血液試料は遠心分離し、取り出した血清を用いて、採血後72時間以内に酸化ストレスと抗酸化力の測定を行った。測定機器はフリーラジカル解析装置 FREE CARRIO DUO (WISMERLL 社) を用いた。測定キットは、酸化ストレスの測定に d-ROMs テスト (正常範囲: 200 から 300 U.CARR) (Diacron 社製)、抗酸化力の測定に BAP テスト (最適値: 2,200 μ M/L 以上) (Diacron 社製) を使用した。d-ROMs テストでは、pH4.8の酢酸緩衝液キュベットを37°Cまで加温し、保温したキュベットに血清20 μ lを入れた後、呈色液クロモゲン (N, N ジエチルパラフェニレンジアミン) を20 μ l入れ混合し、光度計に入れて活性酸素・フリーラジカルによる代謝物であるヒドロペルオキシドの量を測定した。単位は U.CARR が用いられ、1 U.CARR = 0.08 mg/100 mlH₂O₂になる。BAP テストは、チオシアン酸塩誘導体を含む試薬入りのキュベットを37°Cまで加温する。次に三価鉄塩を含む試薬を50 μ l滴下、混合し赤く呈色させる。その後光度計で三価鉄イオン濃度を測定後、三価鉄イオンが

呈色している試薬に血清を10 μ l入れて混合すると血清中の抗酸化物質の作用で二価鉄イオンに還元され、脱色される。その色の変化を光度計で計測し、血清の還元力を評価した。

凍結したラットの坐骨神経は解凍後、T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液は cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1, Santa Cruz Biotechnology), myelin basic protein (MBP, Cosmo Bio), myelin-associated glycoprotein (MAG, Cosmo Bio), 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase, GENETEX), β -Actin (Cell Signaling Technology) の抗体を用いてタンパク質自動分析装置, WES (Protein simple) により分離し分析を実施した。

5. 統計処理

感覚閾値の結果は、標準偏差 (S.D.) で、酸化ストレス・抗酸化力と CYP1A1, MBP, MAG タンパク質測定結果は平均 \pm 標準誤差 (S.E.) でそれぞれ算出した。各群間差は、一元配置分散分析し事後検定として Scheffe 検定を用いた多重比較を行った。なお有意水準は5% ($p < 0.05$) とした。

結 果

1. ベンゾピレン単回投与によるベンゾピレン急性中毒ラットに対するケイヒの効果

1) 感覚閾値の経時的変化

ベンゾピレン単回投与によるベンゾピレン急性中毒ラットに対するケイヒの効果を、小動物用電気刺激装置を用いた感覚閾値評価で測定した。その結果、5 Hzの電気刺激周波数による感覚閾値では、コーンオイル単回経口投与後蒸留水投与 (CD) 群に対し、ベンゾピレン単回経口投与後蒸留水投与 (Benz1) 群で2週間後わずかな感覚閾値の変化がみられたが、有意差は認められなかった。また、ベンゾピレン単回経口投与後1 mg/kg, 3 mg/kg ケイヒ投与 (Benz11CNM, Benz13CNM) 群でも Benz1 群と比較し有意な差は見られなかった (Fig. 1A)。250 Hzの電気刺激周波数による感覚閾値に関しても、CD群, Benz1群, Benz11CNM, Benz13CNM群共に投与2週間後でも群間の有意な感覚閾値の変化は見られなかつ

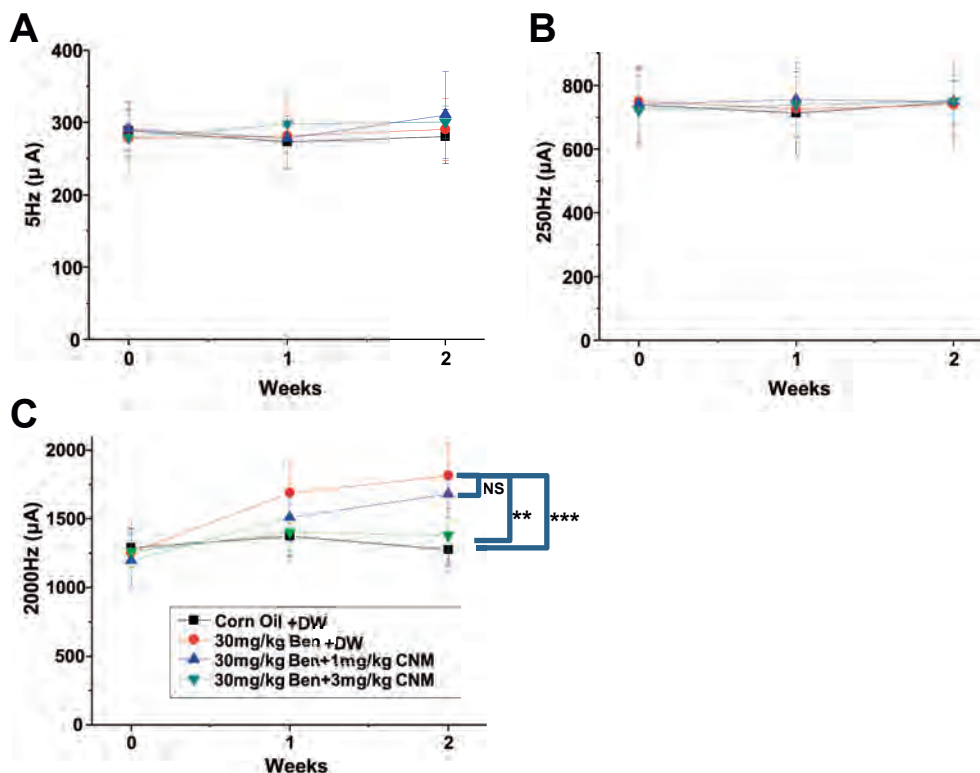


Fig. 1 Effect of cinnamon in benzo[a]pyrene single dose rats by using quantitative threshold evaluation

Sensory thresholds were measured with 5 Hz (A), 250 Hz (B), and 2,000 Hz (C) sine electrostimulation. The four different electrostimulation frequencies that we used in this study can stimulate A β fibers (2,000 Hz), A δ fibers (250 Hz), and C fibers (5 Hz). DW, Distilled water. Ben, benzo[a]pyrene. CNM, cinnamon. NS, no significant. **, $P < 0.01$. ***, $P < 0.001$. Mean \pm S.D. n=6.

た (Fig. 1B). 2000Hz の電気刺激周波数による感覚閾値においては、CD 群に対し、Benz1 群で投与 2 週間後有意な感覚閾値の上昇が見られたが、ケイヒ投与群ではその感覚閾値上昇の抑制が見られた (Fig. 1C).

2) 酸化ストレス・抗酸化力に対する影響

ベンゾピレン単回投与とケイヒの投与が酸化ストレス度に及ぼす影響について検討した。その結果、酸化ストレスに関しては、CD 群に対し、Benz1 群で酸化ストレスの増加傾向、ケイヒ投与群ではその酸化ストレス増加の抑制がみられたが、有意差は認められなかった (Fig. 2A)。抗酸化力に関しては、CD 群に対し、Benz1 群で抗酸化力の抑制傾向がみられたが、有意差は認められなかった。しかし、ケイヒ投与群については、ベンゾピレンによる抗酸化力抑制が改善する傾向に

あったものの、有意差はなかった (Fig. 2B)。これらの結果から酸化ストレス度を計算した結果が Fig. 2C である。BAP/d-ROMs ≤ 12.5 の場合を酸化ストレス状態とみなす。酸化ストレス度では、Benz1 群に対し、ケイヒ投与群で有意な酸化ストレス状態の改善が見られた。

3) CYP1A1, MBP, MAG タンパク質の変化に及ぼす影響

ベンゾピレン急性中毒ラットに対するケイヒの効果のメカニズムを調べる為に取り出した坐骨神経から CYP1A1 (Fig. 3A), MBP (Fig. 3B), MAG (Fig. 3C) タンパク質の変化を測定した。AHR の標的遺伝子である CYP1A1 に関しては、Benz1 群において、CD 群に比べ、CYP1A1 タンパク質の有意な発現増加が見られたが、ケイヒ投与群においては、その発現増加の抑制傾向が見ら

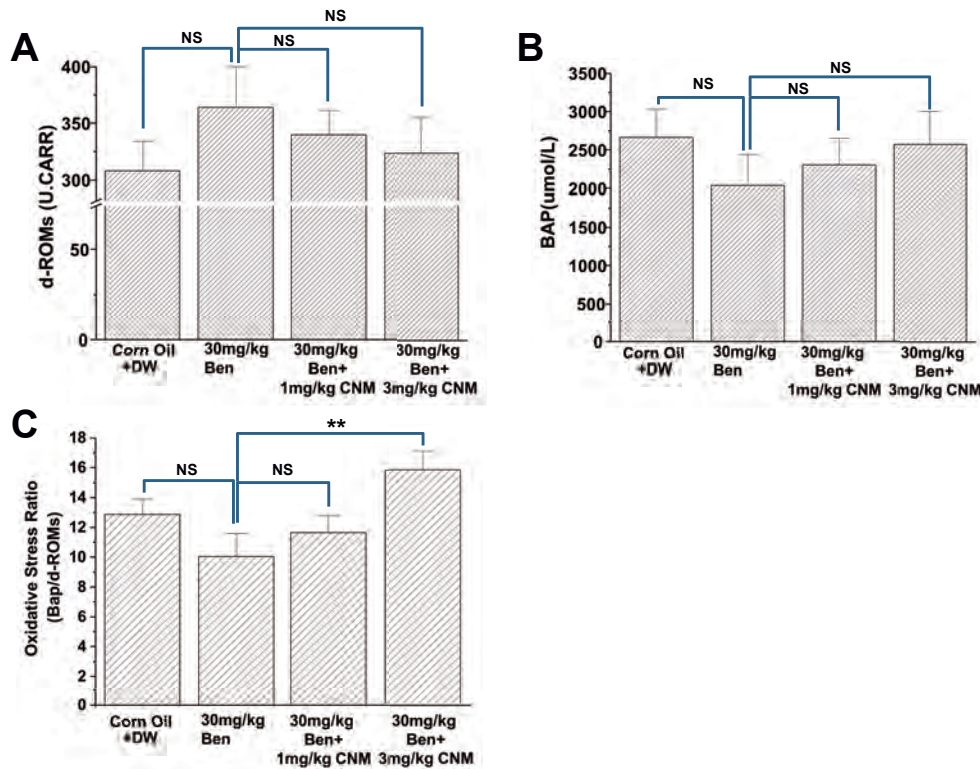


Fig. 2 Effects of cinnamon on antioxidants and oxidative stress in benzo[a]pyrene single dose rats. The mean levels of serum d-ROMs (A), BAP (B), and Oxidant/antioxidant balance (C). DW, Distilled water. Ben, benzo[a]pyrene. CNM, cinnamon. d-ROMs, Diacron reactive oxygen metabolites. BAP, Biological antioxidant potential. NS, no significant. **, $P < 0.01$. Mean \pm S.E. $n=6$.

れた。また MBP, MAG タンパク質に関して, MBP では群間有意な差は見られなかったが, MAG タンパク質においては, Benz1 群で CD 群より発現の低下がみられ, ケイヒ投与群においてその低下の抑制がみられた。

2. ベンゾピレン 2 週間連続投与ラットに対するケイヒの効果

継続的なベンゾピレン暴露により発生する感覚異常に対するケイヒの効果, 感覚刺激による定量的閾値評価法, 酸化ストレス・抗酸化力の測定法, Western blot 法で検討した。感覚閾値の経時的变化の検討 (Fig. 4A) では, ベンゾピレン単回投与時と同様な結果が得られ, 5 Hz, 250 Hz の電気刺激周波数では, 各群有意な閾値の変化はみられなかった。また, 2,000 Hz の電気刺激周波数ではベンゾピレン 2 週間投与群 (Benz2) で単回投与時より 1.2 倍程度の感覚閾値の有意な上昇がみられた。しかし, ベンゾピレン単回投与時に有効

であった 3 mg/kg ケイヒの投与によって若干の閾値上昇の抑制がみられたものの, 有意差は認められなかった。酸化ストレス度 (Fig. 4B), CYP1A1, MBP, MAG タンパク質の発現 (Fig. 4C) に対するケイヒの効果検討でも, 若干の改善傾向がみられたものの, 有意な効果は認められなかった。

考 察

本実験では, ベンゾピレン単回投与によるベンゾピレン急性中毒ラットに対するケイヒの効果, 電気刺激による感覚閾値の評価法を用いて検討した。その結果, 5 Hz と 250 Hz の電気刺激を用いた感覚閾値評価ではベンゾピレン単回投与後蒸留水投与ラット群及びベンゾピレン単回投与後ケイヒ投与ラット群共に有意な変化はみられなかった。しかし, 2,000 Hz の電気刺激では, ベンゾピレン単回投与後蒸留水投与ラット群で感覚閾値の上昇がみられ, ベンゾピレン単回投与後ケイヒ投与

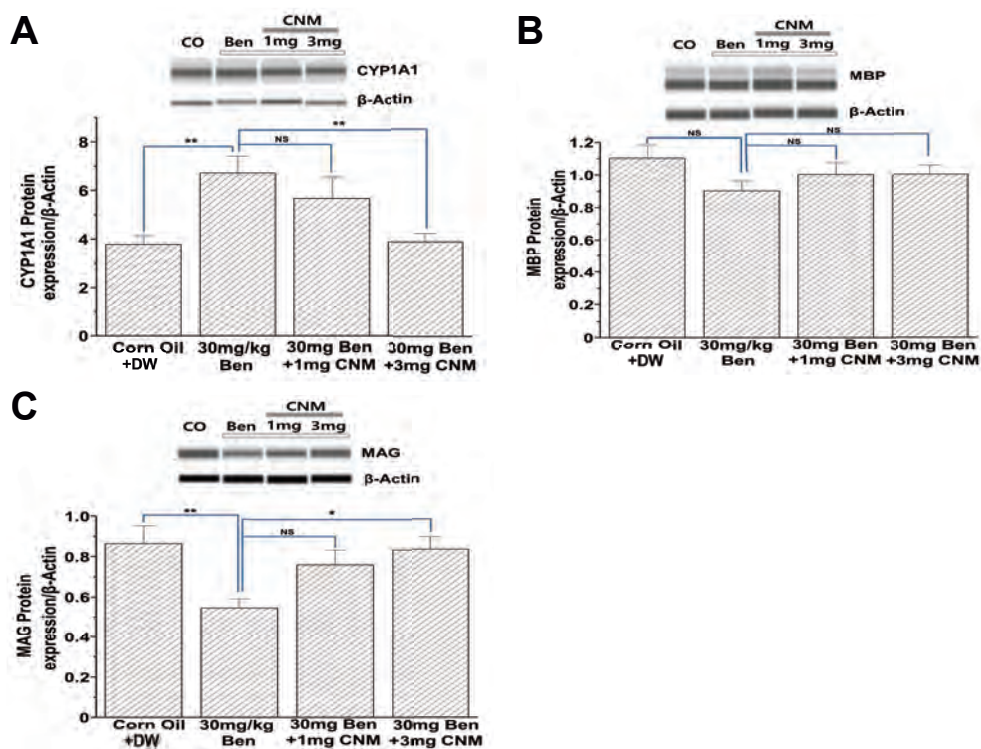


Fig. 3 Effects of cinnamon on the expression of CYP1A1, MBP, and MAG protein in benzo[a]pyrene single dose rats. The mean levels of CYP1A1 (A), MBP (B), and MAG (C) protein expression. The white bar indicates application of benzo[a]pyrene. The gray bar indicates application of cinnamon. CO, corn oil. DW, Distilled water. Ben, benzo[a]pyrene. CNM, cinnamon. CYP1A1, cytochrome P450 (P450) 1A1. MBP, myelin basic protein. MAG, myelin-associated glycoprotein. NS, no significant. *, $P < 0.05$. **, $P < 0.01$. Mean \pm S.E. $n=6$.

ラット群ではその感覚閾値上昇の抑制がみられた。PCB, PCDF, dioxin 等のダイオキシン類化合物の複合中毒であるカネミ油症事件は、末梢神経障害由来と考えられる感覚神経障害等が多く報告されている。発症時には 39.1%であった自覚的感覚異常をもつ患者が、約 30 年経過した近年では患者の 59.4%に及ぶと報告されている⁷⁾。また、古谷ら⁴⁾によるとカネミ油症患者には、感覚鈍麻や神経のしびれ感などの末梢および中枢神経障害が多く認められると報告している。末梢のしびれ感は、 $A\beta$ 線維の伝導速度の緩徐化が関係していると考えられ、近年我々はベンゾピレンが $A\beta$ 神経線維の伝導速度を低下させることを明らかにした⁵⁾。 $A\beta$ 神経線維は、2,000 Hz の電気刺激によって選択的に刺激することが出来ると植田ら⁸⁾は報告しており、Koga ら⁹⁾はラットの DRG を用いた実験で、2,000 Hz での刺激では $A\beta$ 線維を、5 Hz の刺激では主に C 線維を選択的に刺激する

ことが出来ると報告している。これらの結果から、本研究における 2,000 Hz の電気刺激による閾値の上昇はベンゾピレンの毒性による $A\beta$ 線維の異常で発生した感覚異常である可能性が考えられる。また、末梢神経の障害による感覚異常では、感覚神経の伝導速度の遅延を認めることが多いとの報告がある^{10)~12)}。伝導速度遅延の原因の一つとして脱髄(脱ミエリン)が考えられる。一般に脱髄とは神経細胞の軸索を取り巻く髓鞘には障害が生じるが、中の軸索は保たれる現象である。脱髄性病変による感覚障害の電気生理学的検討では、感覚神経の伝導速度遅延が報告されている¹²⁾¹³⁾。脱髄疾患は、神経を覆っているミエリンが消失し(脱ミエリン化)、神経信号がうまく伝達できなくなるために四肢のしびれなど様々の神経症状が出る原因不明の難病である。本研究では伝導速度の遅延と脱ミエリンの関係を検討するために MBP, MAG タンパク質の発現を比較した結果、ベンゾ

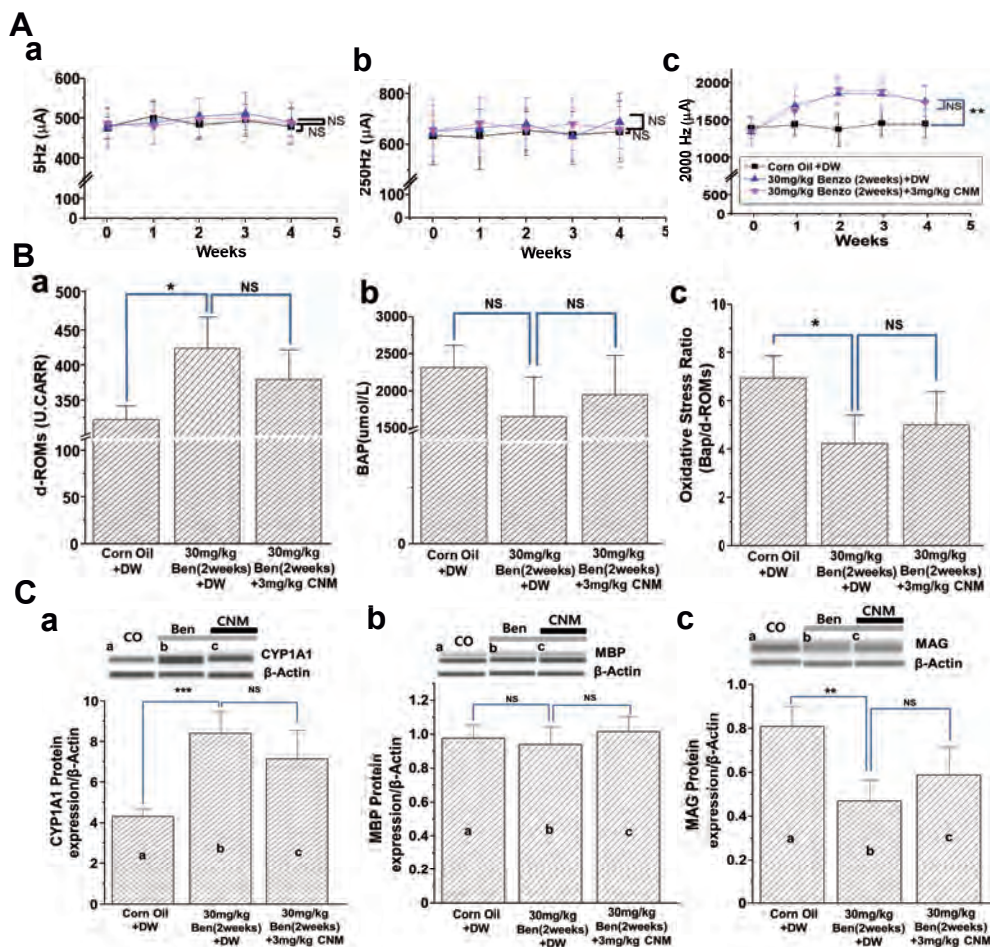


Fig. 4 Effects of cinnamon on sensory thresholds (A), oxidative stress level(B), and CYP1A1, MBP, and MAG protein expression (C) in the rats exposed to benzo[a]pyrene for 2 weeks (A), Sensory threshold. (B), Antioxidants and oxidative stress state. (C), CYP1A1, MBP, and MAG protein expression. The gray bar indicates application of benzo[a]pyrene. The black bar indicates application of cinnamon. CO, corn oil. DW, Distilled water. Ben, benzo [a]pyrene. CNM, cinnamon. NS, no significant. *, P < 0.05. **, P < 0.01. ***, P < 0.001. Mean ± S.D. n=5.

ピレン投与群で MAG タンパク質の有意な発現低下がみられたが、ケイヒ投与群では発現低下の抑制がみられた。Pronker ら¹⁴⁾によると MAG は、ミエリン鞘の形成と維持に重要なタンパク質であり、MAG 遺伝子の変異は、脱髄疾患に関係すると報告している。これらの結果から、ベンゾピレン投与群における感覚閾値の上昇はベンゾピレンの毒性により脱髄が起こることで、神経の伝導速度が低下し、感覚閾値が上昇した可能性が考えられる。

本研究の結果、ケイヒの投与はベンゾピレン単回投与後蒸留水投与群に対し、感覚閾値上昇の抑制、酸化ストレス度の改善、CYP1A1 の発現増加

の抑制、MAG の発現低下を抑制させた。ダイオキシン類の毒性は、AHR を介して起こることと、様々な植物成分や生薬がこの AHR 活性を抑制することが報告されている。特に、桂枝茯苓丸の生薬の一つであるケイヒ、さらにその主成分であるシナムアルデヒドが AHR の標的遺伝子である CYP1A1 タンパク質の発現を阻害するとともに、抗酸化ストレス作用も持つことが明らかになっている⁶⁾。これらの結果は、AHR の活性化抑制と抗酸化ストレス作用を持つケイヒはベンゾピレンの毒性により発生される AHR の活性化や酸化ストレスを抑制させることを示唆している。

ダイオキシン類化合物の複合中毒で発生したカ

ネミ油症患者の感覚異常は30年経過した近年でも多く報告されているが、おそらくダイオキシン類の長期暴露による慢性中毒の症状と考えられる。本研究では生薬の一つであるケイヒがベンゾピレン単回投与により発生した急性中毒には効果的であることを確認したが、ベンゾピレン慢性中毒に対する効果は不明であった為、ベンゾピレンを2週間連続暴露させたラットに対するケイヒの効果も検討した。その結果、ベンゾピレン単回投与により発生した急性中毒に有効であった3 mg/kg ケイヒは、ベンゾピレン2週間連続して投与(Benz2)することにより上昇した感覚閾値に対し、若干の抑制効果が見られたものの、有意差は認められなかった。また、酸化ストレス度とCYP1A1, MBP, MAGタンパク質の発現に対しても同様に、若干の改善傾向がみられたものの有意な効果は認められなかった。これらの結果から、AHRの活性化抑制と抗酸化ストレス作用を持つケイヒは、ベンゾピレン単回投与後の急性中毒により発生するAHRの活性化や酸化ストレスを抑制させることで、ベンゾピレンの毒性による脱髄を抑制させ、神経異常を改善させるが、2週間連続して投与したことにより蓄積されたベンゾピレンの毒性によって発生する神経症状についてはその改善効果が十分では無いことが示唆された。ケイヒなどの生薬は、その効果が出るまで服用期間が長いことが多く、症状の程度に合わせて服用量を定めることが一般的である。従って、ベンゾピレンの暴露期間、症状の程度に合わせてケイヒの投与濃度や期間を検討する必要があると考えられる。

本研究の結果から、ベンゾピレン投与はその毒性がAHRを介し、触・圧覚を伝える $\alpha\beta$ 線維に作用することで脱髄(脱ミエリン)を起こし、感覚異常等を発生させた可能性が示唆された。また、抗酸化作用とAHR活性化の阻害作用があるケイヒはベンゾピレンによる急性中毒の感覚異常の症状改善に有効である可能性が示唆された。しかし、ベンゾピレンの継続な暴露による中毒ではケイヒの投与濃度や期間を検討する必要があると考えられる。

結 論

本研究の結果から、抗酸化作用とAHR活性阻害作用を持つケイヒ等の植物成分や生薬はダイオ

キシン類化合物による急性中毒で見られる感覚異常等の症状改善に有効である可能性が示唆された。しかし、ダイオキシン類の暴露期間により、同様な摂取濃度や期間では有効ではない可能性が示唆された。今後、更なる研究を通して、ダイオキシン類の慢性中毒に対するケイヒの効果的な濃度や服用期間を検討する必要がある。

謝 辞

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金(食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発, 課題番号:H30-食品-指定-005)の助成を受けたものである。ここに記して謝辞を表します。

参 考 文 献

- 1) Aoki Y: Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disruptors—what we have learned from Yusho disease. *Environ Res.* 86: 2-11, 2001.
- 2) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司: 油症患者における神経学的所見. *福岡医誌* 60: 462-463, 1969.
- 3) 岩下宏, 志田堅四郎, 増田義人: 慢性油症患者における頭痛, 四肢異常感と血中PCB. *福岡医誌* 68: 139-144, 1977.
- 4) 古谷博和, 大八木保政, 山田猛, 三好甫, 藤井直樹, 吉良潤一: 36年以上経過した油症患者における神経症候. *福岡医誌* 96: 152-156, 2005.
- 5) 申敏哲, 吉村恵: ベンゾピレンの末梢神経および脊髄感覚系シナプス伝達に及ぼす作用に関する研究. *Fukuoka Acta Med.* 108: 27-34, 2017.
- 6) Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, Mitoma C and Furue M: Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 85: 36-43, 2017.
- 7) 林信太郎, 吉良潤一, 大八木保政: 大脳認知機能の客観的評価法の開発. 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究. 平成24年度総括・分担研究報告書 130-134, 2012.
- 8) 植田弘師, 松本みさき: ニューロメーターを用いた新しい知覚線維選択的侵害受容評価法. *日本薬理学雑誌* 131, 367-371, 2008.
- 9) Koga K, Furue H, Rashid H, Takaki A, Katafuchi T and Yoshimura M: Selective Activation of Primary Afferent Fibers Evaluated by

- Sine-Wave Electrical Stimulation. *Mol. Pain* 1 : 13, 2005.
- 10) Michalek JE, Akhtar FZ, Arezzo JC, Garabrant DH and Albers JW : Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation Ranch Hand. *Neurotoxicol.* 22 : 479-490, 2001.
 - 11) Thömke F, Jung D, Besser R, Röder R, Konietzko J and Hopf HC : Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans. *Acta Neurol Scand.* 106 : 155-158, 2002.
 - 12) 三井良之, 楠進 : 末梢神経の障害. *日本内科学* 会雑誌 97 : 1771-1777, 2008.
 - 13) 荒記俊一, 村田勝敬 : 鉛による末梢神経障害の診断. *産業医学* 26 : 3-8, 1984.
 - 14) Pronker MF, Lemstra S, Snijder J, Heck AJR, Thies-Weesie DME, Pasterkamp RJ and Jansen BJC : Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling. *Nature Communications.* 7 : 13584, 2016.

(Received for publication March 3, 2021)

油症における末梢血 CD4 陽性 T 細胞亜集団に関する検討

¹⁾北九州若杉病院西日本総合医学研究所

²⁾北九州若杉病院内科

辻 博¹⁾, 松村 潔²⁾

CD4 Positive T Lymphocyte Subpopulations in Patients with Yusho

Hiroshi TSUJI¹⁾ and Kiyoshi MATSUMURA²⁾

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

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

Abstract

To investigate chronic immune effects of polychlorinated biphenyl (PCB) and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF), CD4 positive T helper 0 (Th0), Th1 and Th2 cells in peripheral blood were studied in 186 patients with Yusho and 31 control subjects in 2019. Significant relationships between the concentrations of PCB in blood and the percentages of Th0 and Th2 cell subpopulation were observed. However, there was no correlation between the blood 2,3,4,7,8-PeCDF levels and the percentages of Th0, Th1 or Th2 cell subpopulation. The percentages of Th0 and Th2 cell subpopulation were significantly increased in the Yusho patients with high PCB levels compared with those in the subjects with low PCB levels. The percentages of Th2 cell subpopulation were significantly increased in the Yusho patients with high 2,3,4,7,8-PeCDF levels compared with those in the subjects with low 2,3,4,7,8-PeCDF levels. We conclude that the percentages of Th0 and Th2 cell subpopulation increase in the Yusho patients with high PCB levels, and it may be associated with PCB levels in blood.

Key words : Yusho, Helper T lymphocyte subpopulation, PCB, 2,3,4,7,8-PeCDF

はじめに

1968年4月頃よりポリ塩化ビフェニル(PCB)混入ライスオイル摂取により北部九州を中心に発生した油症では、原因油の分析から油症の原因物質としてポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)の毒性影響が大きいと考えられる¹⁾²⁾。PCDFは、狭義のダイオキシンであるポリ塩化ジベンゾ-パラジオキシン(PCDD)およびコプラナーPCBとともにダイオキシン類と総称され、これらの物質の毒性は細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体(Ah受容体)を介すると考えられているが、その機構の詳細は未だ不明である³⁾。油症発生以来50年以上が経過し種々の症状は軽快しているが、重

症例においては体内のPCB濃度が今なお高く血中PCBの組成には未だに特徴的なパターンが認められ、慢性中毒に移行していると推定される^{4)~6)}。2001年度より福岡県油症一斉検診においてダイオキシン類の測定が開始され、油症患者では未だに血中PCDF濃度が高値であり、PCDFの体内残留が推測される⁷⁾。

近年、PCB、ダイオキシン類が内分泌攪乱物質として正常なホルモン作用を攪乱し、生殖機能の阻害、悪性腫瘍の発生、免疫機能の低下等を引き起こす可能性が指摘されている⁸⁾⁹⁾。油症における免疫機能影響については、1996年度福岡県油症一斉検診において血中PCB濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認

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

め油症患者における免疫機能の障害が推測された¹⁰⁾。そして、1997年度の福岡県油症一斉検診において免疫グロブリン IgA, IgG, IgM のいずれか1分画以上の上昇を40.0%に、自己抗体では抗核抗体を45.6%と高率に認め、油症において液性免疫の障害を高頻度に認めることが報告されている¹¹⁾。

今回我々は、2019年度福岡県油症一斉検診において細胞性免疫機能検査として末梢血 CD4 陽性 T 細胞の細胞内サイトカインを測定し、油症における細胞性免疫に対する慢性的影響について検討した。

対象および方法

2019年度福岡県油症一斉検診における15歳以上の受診者225例中、細胞性免疫検査にアンケートにて同意が得られ、血中2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) 濃度の研究目的の使用に同意が得られた217例を対象者とした。

末梢血 CD4 陽性 T 細胞の細胞内サイトカインの測定は抗ヒトマウスモノクローナル抗体を用いフローサイトメトリー法により行った。細胞内サイトカインの産生は Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (Sigma-Aldrich) および Ionomycin (Sigma-Aldrich) により細胞を刺激した。細胞表面染色は CD4-PC5 (Immunotech) を用い、細胞内サイトカイン interferon (IFN)- γ および interleukin (IL)-4 の染色は BD FastImmune Anti-Human IFN- γ FITC/IL-4 PE (BD Biosciences) を用いて BD FACSCanto II フローサイトメーター (BD Biosciences) にて測定した。IFN- γ 産生かつ IL-4 産生細胞を Th0 細胞、IFN- γ 産生かつ IL-4 非産生細胞を Th1 細胞、IFN- γ 非産生かつ IL-4 産生細胞を Th2 細胞として総 CD4 陽性細胞に対する比率で表した。

PCB の測定は福岡県保健環境研究所、福岡市保健環境研究所、北九州市環境科学研究所および北九州生活科学センターで行った。血中 PCB 濃度は2019年度福岡県油症一斉検診において測定した217例の測定値を用いて Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞亜集団との関連について検討した。2,3,4,7,8-PeCDF の測定は福岡県保健環境研究所で行った。血中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は2019年度福岡県油症一斉検診に最も近い時期に

測定した2016年度20例、2017年度59例、2018年度66例、2019年度72例の計217例の測定値を用いて Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞亜集団との関連について検討した。

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

結 果

2019年度福岡県油症一斉検診における15歳以上の受診者で細胞性免疫検査および血中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の研究目的の使用に同意が得られた217例の内訳は女性125例、男性92例で、平均年齢は65.2 \pm 13.2 (16~92) 歳であり、油症患者161例、油症患者 (同居家族) 25例、未認定患者31例であった。血中 PCB 濃度と年齢の間に有意の正の相関 ($r=0.539$, $P < 0.001$) を、血中2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と年齢の間に有意の正の相関 ($r=0.434$, $P < 0.001$) を認めた。

2019年度福岡県油症一斉検診の受診者217例について血中 PCB 濃度と Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞との関連について検討した (Table 1)。血中 PCB 濃度と Th0 細胞の間に弱いながらも有意の正の相関 ($r=0.151$, $P < 0.05$) を、Th2 細胞との間にも弱いながらも有意の正の相関 ($r=0.141$, $P < 0.05$) を認めた。血中 PCB 濃度と Th1 細胞の間に相関をみなかった。

福岡県油症一斉検診受診者217例について血中 PCB 濃度上位25%を PCB 高濃度群、下位25%を PCB 低濃度群とし両群間の Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞について検討した (Table 2)。PCB 高濃度群54例の血中 PCB 濃度は1.15 ppb 以上、平均血中 PCB 濃度は1.95 \pm 1.09 ppb であり、油症患者51例、油症患者 (同居家族) 3例であった。PCB 低濃度群54例の血中 PCB 濃度は0.40 ppb 以下、平均血中 PCB 濃度は0.26 \pm 0.08 ppb であり、未認定患者16例、油症患者30例、油症患者 (同居家族) 8例であった。Th0 細胞は PCB 高濃度群2.0 \pm 2.1%と PCB 低濃度群1.3 \pm 0.8%に比べ有意の上昇を認めた ($P < 0.05$)。Th1 細胞は PCB 高濃度群24.7 \pm 12.6%、PCB 低濃度群22.3 \pm 9.8%であり、両群間に差をみなかった。Th2 細胞は PCB 高濃度群2.4 \pm 1.5%と PCB 低濃度群1.9 \pm 0.7%に比べ有意の上昇を認めた ($P < 0.05$)。

Table 1 Correlation coefficients between helper T lymphocyte subpopulation and PCB concentration in blood

		r
Th0 cell	(%)	0.151*
Th1 cell	(%)	0.050
Th2 cell	(%)	0.141*

*P < 0.05.

Table 2 Th0, Th1 and Th2 cells in Yusho patients with high PCB concentration and subjects with low PCB concentration

No.		PCB concentration	
		≥ 1.15 ppb 54	≤ 0.40 ppb 54
Th0 cell	(%)	2.0 ± 2.1*	1.3 ± 0.8
Th1 cell	(%)	24.7 ± 12.6	22.3 ± 9.8
Th2 cell	(%)	2.4 ± 1.5*	1.9 ± 0.7

*P < 0.05 vs. blood PCB concentration ≤ 0.40 ppb.

Table 3 Correlation coefficients between helper T lymphocyte subpopulation and 2,3,4,7,8-PeCDF concentration in blood

		r
Th0 cell	(%)	0.109
Th1 cell	(%)	0.024
Th2 cell	(%)	0.063

Table 4 Th0, Th1 and Th2 cells 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	
		≥ 66.22 pg/g lipids 54	≤ 8.45 pg/g lipids 54
Th0 cell	(%)	1.9 ± 2.0	1.3 ± 0.9
Th1 cell	(%)	23.8 ± 10.7	22.7 ± 9.7
Th2 cell	(%)	2.8 ± 2.0*	2.0 ± 0.8

*P < 0.01 vs. blood 2,3,4,7,8-PeCDF concentration ≤ 8.45 pg/g lipids.

2019 年度福岡県油症一斉検診の受診者 217 例について血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と Th0 細胞, Th1 細胞および Th2 細胞との関連について検討した (Table 3). 血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と Th0 細胞, Th1 細胞あるいは Th2 細胞の間に関連をみなかった。

福岡県油症一斉検診受診者 217 例について血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度上位 25% を 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群, 下位 25% を 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群として両群間の Th0 細胞, Th1 細胞および Th2 細胞について検討した (Table 4). 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群 54 例の血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 66.22 pg/g lipids 以上, 平均血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 205.36 ± 129.69 pg/g lipids であり, 油症患者 54 例であった。2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群 54 例の血中 PCB 濃度は 8.45 pg/g lipids 以下, 平均血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 5.80 ± 1.61 pg/g lipids であり, 油症患者 29 例, 油症患者 (同居家族) 9 例, 未認定患者 16 例であった。Th0 細胞は 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群 $1.9 \pm 2.0\%$, 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群 $1.3 \pm 0.9\%$, Th1 細胞は 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群 $23.8 \pm 10.7\%$, 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群 $22.7 \pm 9.7\%$ であり, 両群間に差をみなかった。Th2 細胞は 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群 $2.8 \pm 2.0\%$ と 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群 $2.0 \pm 0.8\%$ に比べ有意の上昇を認めた ($P < 0.01$)。

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。油症発生 28 年後の 1996 年の甲状腺機能検査において, 甲状腺ホルモンは血中 PCB 濃度 3.0 ppb 以上の PCB 高濃度群と 3.0 ppb 未満の PCB 低濃度群の間に差がみられなかったが, 抗サイログロブリン抗体を高濃度群の 19.5% と低濃度群の 2.5% に比べ高頻度に認めた¹⁰⁾。そして, 1997 年度福岡県油症一斉検診において免疫機能検査として免疫グロブリンおよび自己抗体を測定し, 油症患者において免疫グロブリン IgA, IgG, IgM のいずれか 1 分画以上の上昇を 40.0% に, 自己抗体についてはリウマチ因子を 8.9% に, 抗核抗体

を 45.6% と高率に認め, 液性免疫を中心とする免疫機能に対する慢性的影響が示唆された¹¹⁾。さらに, 2007 年度福岡県油症一斉検診において, 血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と免疫グロブリン IgA およびリウマチ因子との間に正の相関を, 抗核抗体を血中 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ高濃度群に高頻度に認め, 油症における免疫グロブリン IgA およびリウマチ因子の上昇, 抗核抗体の出現に 2,3,4,7,8-PeCDF が関与している可能性が考えられ, 液性免疫に対する 2,3,4,7,8-PeCDF の慢性的影響が示唆された¹²⁾。また, 油症におけるリンパ球亜集団への影響については 2008 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者 156 例について末梢血リンパ球亜集団を測定し, 血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度との関連について報告されている¹³⁾。血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と末梢血リンパ球数, CD4 陽性細胞数の間に相関が認められ油症患者の末梢血リンパ球, CD4 陽性細胞の増加に 2,3,4,7,8-PeCDF の関与が示唆された。また, 血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者において低値の油症患者に比べ末梢血リンパ球, CD4 陽性細胞の増加が認められ, 細胞性免疫に対する 2,3,4,7,8-PeCDF の慢性的影響が示唆された。

Mosmann ら¹⁴⁾¹⁵⁾ はマウス CD4 陽性 T 細胞が産生されるサイトカインの違いにより Th1 細胞および Th2 細胞の亜集団に分けられることを報告した。ヒトにおいても Th1 細胞および Th2 細胞の亜集団が認められ, ナイーブ CD4 陽性 (Th0) 細胞が IFN- γ や IL-2 を産生する Th1 細胞, IL-4, IL-5, IL-13 を産生する Th2 細胞に分化すると考えられている^{16)~18)}。そして, Th1 細胞は T 細胞の活性化や細胞障害活性の増強により細胞性免疫に, Th2 細胞は B 細胞の活性化により液性免疫に関与すると考えられる。

2019 年度福岡県油症一斉検診の受診者について PCB 高濃度群では PCB 低濃度群に比べ Th0 細胞および Th2 細胞の上昇が, 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群では 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ Th2 細胞の上昇が認められた。血中 PCB 濃度および血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者に認められる Th2 細胞の上昇は, これまで報告されてきた油症における免疫グロブリンの上昇や自己抗体の出現の原因となっている

可能性も考えられる。そして、血中 PCB 濃度と末梢血 Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞亜集団の関連について検討し、血中 PCB 濃度と Th0 細胞および Th2 細胞との間に正の相関を認めた。一方、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と Th0 細胞、Th1 細胞あるいは Th2 細胞の間に関連をみなかった。油症における Th2 細胞に対する慢性的影響に PCB の関与が大きいことが示唆される。

油症発生 51 年後の 2019 年度福岡県油症一斉検診受診者における末梢血 CD4 陽性 T 細胞の細胞内サイトカインを検討し、血中 PCB 濃度および血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者に Th2 細胞の上昇を認め、血中 PCB 濃度と Th2 細胞の間に正の相関を認めた。油症における Th2 細胞に対する慢性的影響の機序は不明であるが、Th2 細胞の上昇に PCB の関与が示唆される。Th2 細胞は気管支喘息、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患、全身性強皮症、特発性肺線維症等の自己免疫疾患の発症や病態形成に関与することが報告されている^{19)~21)}。油症と気管支喘息、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患、全身性強皮症、特発性肺線維症等の自己免疫疾患との関連についての検討が必要と思われる。

総 括

油症発生 51 年後の 2019 年度福岡県油症一斉検診受診者 217 例について末梢血 CD4 陽性 T 細胞の細胞内サイトカインを測定し、血中 PCB 濃度および血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度との関連について検討した。血中 PCB 濃度と Th0 細胞および Th2 細胞の間に正の相関を認めた。一方、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と Th0 細胞、Th1 細胞あるいは Th2 細胞の間に関連をみなかった。そして、血中 PCB 高濃度群では PCB 低濃度群に比べ Th0 細胞および Th2 細胞は上昇を認め、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群では 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ Th2 細胞の上昇を認めた。油症において Th2 細胞に対する PCB の慢性的影響が示唆された。

参 考 文 献

1) Masuda Y and Yoshimura H : Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance : A

Review. *Amer. J. Ind. Med.* 5 : 31-44, 1984.

- 2) Oishi S, Morita M 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, 佐藤薫, 下野淳哉, 東晃一, 橋口衛, 藤島正敏 : 油症患者における甲状腺機能 : 油症発生 28 年後の検討. *福岡医誌* 88 : 231-235, 1997.
- 11) 辻博, 平橋高明, 緒方久修, 藤島正敏 : 油症患者における免疫機能の検討. *福岡医誌* 90 : 147-149, 1999.
- 12) 辻博 : 油症患者における免疫機能の検討. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業「熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究」平成 19 年度総括・分担研究報告書 (主任研究者 : 古江増隆) pp. 37-39, 2008.
- 13) 辻博 : 油症における末梢血リンパ球亜集団の検討. *福岡医誌* 100 : 131-135, 2009.
- 14) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL : Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136 : 2348-2357, 1986.

- 15) Mosmann TR and Coffman RL : TH1 and TH2 cells : different patterns of lympho- kine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7 : 145-173, 1989.
- 16) Romagnani S : Human TH1 and TH2 subsets : doubt no more. *Immunol. Today* 12 : 256-257, 1991.
- 17) Romagnani S : Biology of human TH1 and TH2 cells. *J. Clin. Immunol.* 15 : 121-129, 1995.
- 18) Miner KT and Croft M : Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells : role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. *J. Immunol.* 160 : 5280-5287, 1998.
- 19) Barnes PJ : Th2 cytokines and asthma : an introduction. *Respir. Res.* 2 : 64-65, 2001.
- 20) Brandt EB and Sivaprasad U : Th2 cytokines and atopic dermatitis. *J. Clin. Cell Immunol.* 2 : 1-25, 2011.
- 21) Romagnani S : T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 85 : 9-18, 2000.

(Received for publication March 15, 2021)

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。

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

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

令和3年6月25日発行

発行所 福岡医学会

〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1番1号(九州大学医学部内)

TEL ダイヤルイン (092) 642-6896

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

(日本出版協会準会員番号 B211042 振替 01750-2-2233)

編集兼発行者 笹栗俊之

印刷所 ダイヤモンド秀巧社印刷株式会社
福岡市東区松田3丁目9-32

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