

## 分担研究報告書

# ラット肝における2,5,3',4'-四塩素化ビフェニルメチルスルホン体生成酵素の解明

分担研究者 古賀 信幸 中村学園大学 食物栄養学科 助教授

**研究要旨** 3-MeS-及び4-MeS-2,5,3',4'-TCBを基質として、ラット肝MsによるS-酸化反応を調べ、さらに、この酸化経路にチトクロムP450 (P450)あるいはフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO)のどちらが強く関与しているかを明らかにするため、MeSO<sub>2</sub>体の生成に及ぼすP450誘導剤及び両酵素の阻害剤の影響を調べた。その結果、3-および4-MeSO<sub>2</sub>体の生成はいずれもP450の至適pHであるpH 7.4で最大になった。また、P450誘導剤のPBおよびMC前処理により、いずれの場合にもMeSO体およびMeSO<sub>2</sub>体の生成が促進された。特に、MC前処理による4-MeSO<sub>2</sub>体の生成増加は顕著であった。さらに、P450阻害剤 (SKF525-A、NBI) およびFMO阻害剤 (methimazole)の影響を調べたところ、3-および4-MeSO<sub>2</sub>体の生成はSKF525-AおよびNBIによりほぼ完全に阻害されたが、FMO阻害剤のmethimazoleの添加では3-および4-MeSO<sub>2</sub>体の生成は約30%阻害されたにすぎなかった。

以上の結果から、2,5,3',4'-TCBのMeS体からMeSO<sub>2</sub>体への酸化経路においてFMOよりはP450が主に関与していることが明らかになった。また、MC誘導性のP450は3-MeS-TCBより4-MeS-TCBをよく酸化することが明らかになった。

### A. 研究目的

最近、2,5-二塩素置換PCBの3-メチルスルホン (MeSO<sub>2</sub>) 体が、肝へ特異的に蓄積し、さらに母化合物より遙かに強いフェノバルビタール (PB) 型チトクロムP450 (P450) 誘導能を有していることが明らかになった<sup>1,2)</sup>。ところで、水酸化反応を触媒する酵素系すなわちP450分子種については、当研究室の研究により、かなり明らかになってきたが、PCBのMeSO<sub>2</sub>体生成に関与する酵素系については、ほとんどわかっていない。現在、S原子の酸化を触媒する酵素としては、これまでにP450<sup>3)</sup>あるいはフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO)<sup>4)</sup>が報告されている。そこで、本

研究ではラット肝において3-および4-メチルチオ (MeS) -2,5,3',4'-四塩素化ビフェニル (TCB) の代謝にどちらの酵素が主に関与しているか調べた。

### B. 方法

1) 2,5,3',4'-TCBの3-および4-MeS体を合成した後、NADPHおよび酸素存在下、ラット肝ミクロゾーム (Ms) とともに、37℃で60分間インキュベートし、メチルスルフォキシド (MeSO) 体およびMeSO<sub>2</sub>体の生成量を測定した。MeSO<sub>2</sub>体の測定は、代謝物をクロロホルム-メタノール (2:1) とn-ヘキサンで抽出した後、電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフ (GC/

ECD) で行った。

2) P450の典型的な誘導剤であるPBと3-メチルコラントレン (MC) で前処理したラットから肝Msを調製し、MeSO体およびMeSO<sub>2</sub>体の生成量を未処理Msと比較した。

3) P450およびFMOの阻害剤による影響は、P450阻害剤として、SKF-525AおよびN-benzylimidazole (NBI) を、FMO阻害剤として、methimazoleを用いて行った。

### C. 結果および考察

まずpHの影響について調べたところ3-および4-MeSO<sub>2</sub>体の生成はいずれもP450の至適pHであるpH 7.4で最大になった。

次にP450誘導剤の影響について調べた。Fig. 1に示すように、PBおよびMC前処理により3-および4-MeS体から、いずれもMeSO体およびMeSO<sub>2</sub>体の生成が促進された。特に、MC前処理による4-MeSO<sub>2</sub>体の生成増加は顕著であった。このことから、MC誘導性のP450は3-MeS-TCBより4-MeS-TCBをよく酸化することが明らか

になった。

P450阻害剤であるSKF525-AおよびNBIはいずれも1mMの添加で、3-および4-MeSO<sub>2</sub>体の生成をほぼ完全に阻害した。一方、FMO阻害剤のmethimazoleの添加では約30%阻害されたにすぎなかった。

以上の結果から、2,5,3',4'-TCBのMeS体からMeSO<sub>2</sub>体への酸化経路においてP450が主に関与していることが明らかになった (Fig. 2)。

### D. 参考文献

- 1) Y. Kato, K. Haraguchi, M. Kazashima, S. Yamada, R. Kimura, *Chem-Biol. Interaction*, **95**, 257 (1995).
- 2) Y., Kato, K. Haraguchi, M. Kazashima, S. Yamada, R. Kimura, *Chem.-Biol. Interaction*, **95**, 269 (1995).
- 3) E. Kashiyama, T. Yokoi, M. Odomi, Y. Funae, K. Inoue, T. Kamataki, *Drug Metab. Dispos.*, **6**, 716 (1997).
- 4) J. R. Cashman, *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 165 (1995).

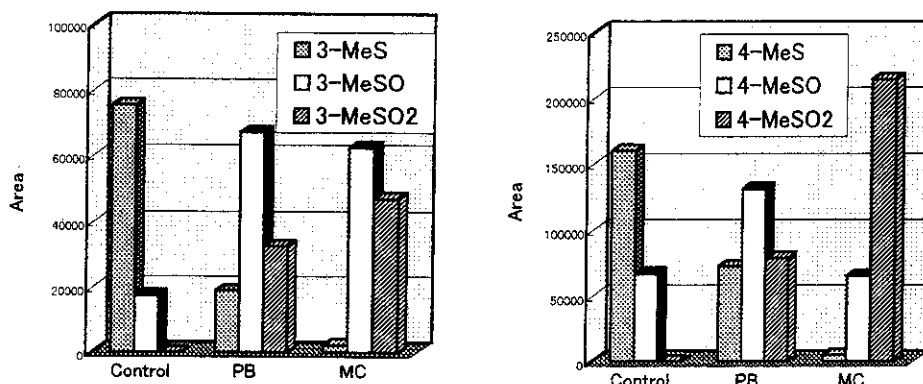


Fig. 1. 3-及び4-メチルチオ-TCBの代謝に及ぼすP450誘導剤の影響

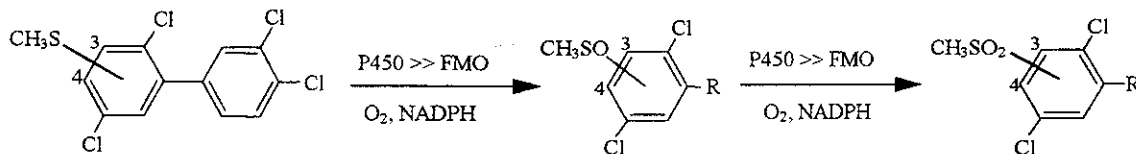


Fig. 2. メチルチオ-TCBのS-酸化反応

## PCB水酸化体の遺伝毒性 (II)

分担研究者 長山 淳哉 九州大学医療技術短期大学部 助教授

**研究要旨** 研究要旨カネミ油症中毒事件が発生してすでに30年が経過し、患者の症状や病状は発症当時とは変化している。油症発生当初の急性中毒の主要原因物質はPCDFと考えられているが、このような長い年月経過後の症状にはPCDFやPCBだけでなく、それらの代謝物の影響なども含めて考える必要がある。ここでは、PCBの主要な代謝物である水酸化体の遺伝毒性をヒトリンパ球培養細胞の姉妹染色分体交換 (SCEs) 誘発性を指標として検討した。その結果、ある種と同族体は単独でも、また、遺伝毒性物質が共存する場合にも、SCEs形成を高める作用を示した。

### A. 研究目的

油症が発生後30年が経過し、ガン発病の潜伏期間としても十分な年月が過ぎつつある。そこで、油症中毒に関与した化学物質とその代謝物の遺伝毒性を評価することは、油症患者の発ガン予防に対する基礎的知見として重要であろう。ここでは、4種のPCB水酸化体の遺伝子・染色体への作用を総合的な遺伝毒性指標の一つであるSCEs誘導性を用いて検討した。

### B. 方法

4種類の水酸化PCB (OH-PCB) は2-OH-3,4,3',4'-四塩化ビフェニール (2-OH-3,4,3',4'-TeCB)、6-OH-3,4,3',4'-四塩化ビフェニール (6-OH-3,4,3',4'-TeCB)、4-OH-3,5,3',4',5'-五塩化ビフェニール (4-OH-3,5,3',4',5'-PenCB) そして6-OH-2,3,4,5,3',4'-六塩化ビフェニール (6-OH-2,3,4,5,3',4'-HCB) である。

1) ヒトリンパ球細胞の培養とOH-PCBなどの処理

15%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培養液 (4.5 ml) にヒトの末梢血 (0.3 ml) を

加え、この培養液にそれぞれ最終濃度が5.8 ~ 6.4 ppmのOH-PCBを添加し、CO<sub>2</sub> 5%、湿度100%そして温度37℃で培養する。また、遺伝毒性物質7,8-ベンゾフラボン (ANF, 4x10<sup>-5</sup>M) とOH-PCBとの相互作用を調べるために、ANFと一種類のOH-PCBを同時に末梢血リンパ球細胞の培養液に加え、同時の培養を行った。各OH-PCB同族体の最終濃度は次の通りである。

2-OH-3,4,3',4'-TeCB:6.4ppm、6-OH-3,4,3',4'-TeCB:6.4ppm、4-OH-3,5,3',4',5'-PenCB:6.0ppm、6-OH-2,3,4,5,3',4'-HCB:5.8ppm。

2) SCEs誘導性の評価

リンパ球細胞の培養71時間後にデメコルシン (0.2 μM) を加え、さらに3時間同一の条件で細胞培養を続けた。その後、リンパ球細胞を集め、低張処理 (0.075MKCl) し、メタノール：酢酸 (3:1 v/v) 溶液により、リンパ球細胞を固定した。この細胞浮遊液をスライドガラス上で感想後、ヘキスト33258-ギムザ (FPG) 法により姉妹染色分体の染色を行い、一群につき第2回目分裂期のメタフェイアの

染色体20～30組について、SCEsの計測を行った。各群間の統計学的有意性の検定は、Studentのt検定（両側）より行った。

### C. 結 果

対照群の細胞当たりのSCEs頻度は9.5であり、OH-PCB処理群では、2-OH-3,4,3',4'-TeCB:9.7、6-OH-3,4,3',4'-TeCB:11.4、4-OH-3,5,3',4',5'-PenCB:12.2、6-OH-2,3,4,5,3',4'-HCB:10.5であった。4-OH-3,5,3',4',5'-PenCBの誘発性が最も高く、統計的にも有意であった（ $p=0.029$ ）。

ANF単独処理群の細胞当たりのSCEs頻度は、13.3であり、OH-PCB同族体の一種と同時処理すると、誘発性が変化した。たとえば、2-OH-3,4,3',4'-TeCB:11.8（ $p=0.313$ ）、4-OH-3,5,3',4',5'-PenCB:18.5（ $p=0.022$ ）、6-OH-2,3,4,5,3',4'-HCB:15.0（ $p=0.239$ ）であった。ANFと6-OH-3,4,3',4'-TeCB処理群では、ANF単独処理群とほぼ

同じSCEs頻度であった。

### D. 考 察

OH-PCB同族体のSCEs誘発性については、これまで国内外のいずれにおいても研究されていない。ここで検討した4種の同族体のうち1種では、単独処理の場合SCEs頻度を高める傾向が示された。また、ANFという遺伝毒性物質と同時に処理した場合でも、この1種の同族体、つまり4-OH-3,5,3',4',5'-PenCBだけが、有意なSCEs誘発性を示した。

このように、ある種のOH-PCB同族体は単独でも、また、その他の遺伝毒性物質が共存する場合でも、SCEs頻度を高める可能性がある。今後、より多くのOH-PCB同族体について、同様の研究を行うとともに、発ガン予防などの観点から、その作用メカニズムの解明も必要である。

## 分担研究報告書

### デキサメサゾンの培養シュワン細胞の PO、NGF、CNTF、GDNF発現に対する効果

分担研究者 山田 猛 九州大学医学部附属病院 神経内科 助教授  
研究協力者 由村 健夫 九州大学医学部附属病院 神経内科  
吉良 潤一 九州大学医学部附属病院 神経内科 教授

**研究要旨** 目的：PCBによる末梢神経障害の病態における副腎皮質ステロイドの役割を明らかにするために、シュワン細胞の種々の神経栄養因子とその受容体の発現に対するデキサメサゾン (DEX) の効果を調べた。方法：ラットのシュワン細胞の培養液中に 1 nM と 1  $\mu$  M の DEX を 3 日間加え、PO、NGF、NGFR、CNTF、CNTFR、GDNF、GDNFR の mRNA の発現をノーザンブロットにて検討した。結果：PO、NGF、NGFR の発現は増加した。しかし、GDNF、GDNFR はそれぞれ 1 / 2、1 / 4 に低下した。CNTF、CNTFR はこの培養系では検出できなかった。結論：副腎皮質ステロイドの効果は神経栄養因子によって異なる。

#### A. 研究目的

Polychlorinated biphenyl (PCB) は、肝臓、精巣、副腎皮質におけるステロイド代謝に影響を及ぼすことが知られている。アザラシの副腎皮質においてコルチゾル、コルチコステロン、アルドステロンの生合成を抑制するという報告がある<sup>2)</sup>。そこで本研究では、油症に合併する末梢神経障害の病態における副腎皮質ステロイドの役割を解明するために、副腎皮質ステロイドが培養シュワン細胞の神経栄養因子とその受容体の発現に及ぼす効果を調べた。研究ではラット肝において3-および4-メチルチオ (MeS) -2,5,3', 4'-四塩素化ビフェニル (TCB) の代謝にどちらの酵素が主に関与しているか調べた。

#### B. 方法

1) 細胞培養：生後1～3日のラットの後根神経節を培養した。培養3日目から Ara-

C を 2 日間培地に加え、2 日後にデキサメサゾン (DEX) を添加した。さらに 3 日間培養後、全 RNA を抽出した。

2) ノーザンブロット：シュワン細胞全 RNA を用いて、PO、nerve growth factor (NGF)、p75 NGF receptor (p75 NGFR)、glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)、GDNF receptor- $\alpha$  (GDNF- $\alpha$ )、ciliary neurotrophic factor (CNTF)、CNTF receptor- $\alpha$  (CNTF- $\alpha$ ) の mRNA を、それぞれの cDNA プロブにより検出した。 $\beta$ -actin mRNA との比をとり、定量化した。

#### C. 結果

PO 発現は DEX  $10^{-9}$  M で 140 %、 $10^{-6}$  M で 152 % に増加した。NGF は発現が認められなかったが、DEX によって認められるようになった。GDNF は DEX  $10^{-9}$  M で 40 % に低下し、 $10^{-6}$  M でさらに低下した。GDNF- $\alpha$  も同様に低下し、DEX  $10^{-9}$  M で 28

%,  $10^{-6}$  Mで20%であった。CNTF、CNTF- $\alpha$ はこの実験系では発現が認められなかった。

#### D. 考 察

DEX投与によりPO発現が増加したことは、DEXがミエリン再生に作用していると考えられた。さらにDEXは感覚神経系に作用するNGFとp75 NGF mRNAの発現を促進した。しかし運動神経系に作用すると考えられているGDNFとGDNF- $\alpha$ の発現は抑制された。このことから、副腎皮質ステロイドの神経栄養因子の発現調節に対する効果は一定ではなく、神経によっては再生が促進される場合と抑制さ

れる場合があり、障害神経に対しても多様な効果をもたらすものと考えられる。

#### E. 参考文献

- 1) Machala M, et al., Effects of chronic exposure to PCBs on cytochrome P450 systems and steroidogenesis in liver and testis of bulls (*Bos taurus*). *Comp. Biochem. Phys.*, **12**, 65-70 (1998).
- 2) Freeman HC, Sangalang GB, A study of the effects of methyl mercury, cadmium, arsenic, selenium, and a PCB (Aroclor 1254) on adrenal and testicular steroidogenesis in vitro, by the gray seal *Halichoerus grypus*. *Arch. Env. Cont. Toxicol.*, **5**, 369-383 (1977).

## カネミ油症検診者におけるCK上昇の意義

分担研究者 吉村 俊朗 長崎大学医療技術短期大学部 教授  
沖田 実 長崎大学医療技術短期大学部 助手

**研究要旨** カネミ油症検診者で認められたCK上昇の要因の一つに、血液中PCB濃度が血清CK上昇の要因の一つである可能性を報告してきた。カネミ油症検診者の血液中PCB濃度は、CK上昇群で有意に高値であった。しかし、PCQ濃度は有意差を認めなかった。また、ラットを用いた動物実験では筋線維直径の減少と筋細胞膜のフリーズフラクチャーでの検討では、PCB投与群でorthogonal arrayが増加し、Caveolae密度では差を認めなかった。PCBは筋細胞膜構成成分を変化させる可能性がある。

### A. 研究目的

カネミ油症患者検診者において、血清クレアチン・ホスホカイネース（以下、血清CK）の上昇が受診者の約20%に認められているが、その要因は不明である。一般に血清CKの上昇は、筋疾患や末梢神経の異常で認められ、さらに、甲状腺機能低下症でもCKが上昇するとされている。そしてカネミ油症検診者においては、血清CKの上昇は甲状腺機能低下症が原因とは考え難いことを報告した。また、PCB濃度が高いことが血清CK上昇の要因の一つである可能性を報告してきた。今年度もカネミ油症検診者の血液中PCB濃度と血清CK上昇の関係を調査し、併せて、ラットにPCBを投与し、筋細胞膜の変化の有無をFreeze fracture法を用いて検討した。

### B. 方法

#### 1) 検診データ

平成7年から平成10年までのカネミ油症検診受診者のうち、血清CKを測定できた延べ389名（平成7年84名、平成8年101名、平成9年97名、平成10年107名）を

今回の研究対象とした。分析にあたっては、まず血清CK値をもとに対象者を2群に振り分けた。すなわち、血清CK値が198 IU/L未満の者を正常群、198 IU/L以上の者を上昇群とし、血液中のPCB濃度とPCQ濃度を比較した。なお、統計処理には対応のないt検定を用い、有意水準は5%未満とした。

#### 2) 動物実験

実験動物には4週齢のSprague-Dawley系雄ラット9匹を用い、PCB投与群（n=4）と対象群（n=5）に分けた。PCB投与群に対しては、濃度42%のPCB42（東京化成工業）をサラダ油に100 mg/mlの分量で溶解し、ラット用ゾンデ針を用いて一回あたり0.15 mlの量を1週間に5回の頻度で経口投与した。また、投与量は2週毎に0.15 mlずつ増やし、延べ8週間投与した。その結果、ラット1匹あたりのPCBの総投与量は450 mgとなった。一方、対照群には同量のサラダ油のみを8週間経口投与した。2群のラットとも実験開始10週後にエーテル麻酔下で、長趾伸筋とヒラメ筋を採取し、筋を液体窒素で冷却したイソペンタンで

急速凍結した。そして、クライオスタットで連続横断切片を作成、ヘマトキシン・エオジン（以下H&E）染色し、NIH画像解析ソフトで筋線維直径を計測した。また、対側の長趾伸筋とヒラメ筋は3%グルタルアルデヒドに固定した後、徐々に30%グリセリン濃度まで浸漬した。筋組織は固相の液体窒素中で急速凍結後、JFD7000（JEOL）で凍結切断し、 $-110^{\circ}\text{C}$ 、 $5 \times 10^{-7}$  Torrで白金・パナジウムで蒸着、続いて炭素を蒸着し、日本電子1200EXで写真撮影し、それぞれの筋細胞膜の Orthogonal array 密度、Caveolae 密度を求めた。

## C. 結果

### 1) 検診データ

各年度において血清CK値の上昇を認められたものは、平成7年度17名（20.2%）、平成8年度21名（20.8%）、平成9年度10名（10.3%）、平成10年度14名（15.9%）であり、4年間の延べ数では62名（15.9%）であった。図1にCK値のヒストグラムを示す。また、血中PCB濃度をCK上昇群と正常群で比較すると、血清CK上昇群で有意にPCB濃度は高い値を示した。

### 2) 動物実験

実験期間中のラットの体重は2群とも有意に増加したが、その変化には2群間で有意差が認められた。そして、実験終了時の体重はPCB投与群で $378.5 \pm 61.7\text{g}$ 、対照群 $445.0 \pm 30.6\text{g}$ で有意差があった。

長趾伸筋の平均筋線維直径はPCB投与群 $47.2 \pm 13.0 \mu\text{m}$ 、対照群 $54.9 \pm 14.3 \mu\text{m}$ で2群間に有意差を認めた。また、ヒラメ筋においても、平均筋線維直径はPCB投与群 $54.1 \pm 11.1 \mu\text{m}$ 、対照群 $64.0 \pm 13.4 \mu\text{m}$ で2群間で有意差を認めた。さらに、筋線維直径のヒストグラムをみると両筋ともPCB投与群は対照群より左方に位置し、明らかな筋線維萎縮を認めた。しかし、筋線維壊死などの異常所見は認めなかった。

フリーズフラクチャーによる筋細胞膜のCaveolaeに関して、長趾伸筋では、P面ではPCB投与群 $9.8 \pm 1.2 / \mu\text{m}^2$ （ $n=68$ ）、対照群 $12.5 \pm 2.4 / \mu\text{m}^2$ （ $n=38$ ）、E面ではPCB投与群 $9.5 \pm 1.3 / \mu\text{m}^2$ 、対照群 $11.2 \pm 1.9 / \mu\text{m}^2$ 、ヒラメ筋では、P面はPCB投与群 $17.6 \pm 2.3 / \mu\text{m}^2$ 、対照群 $15.1 \pm 1.9 / \mu\text{m}^2$ 、E面はPCB投与群 $14.8 \pm 1.3 / \mu\text{m}^2$ 、

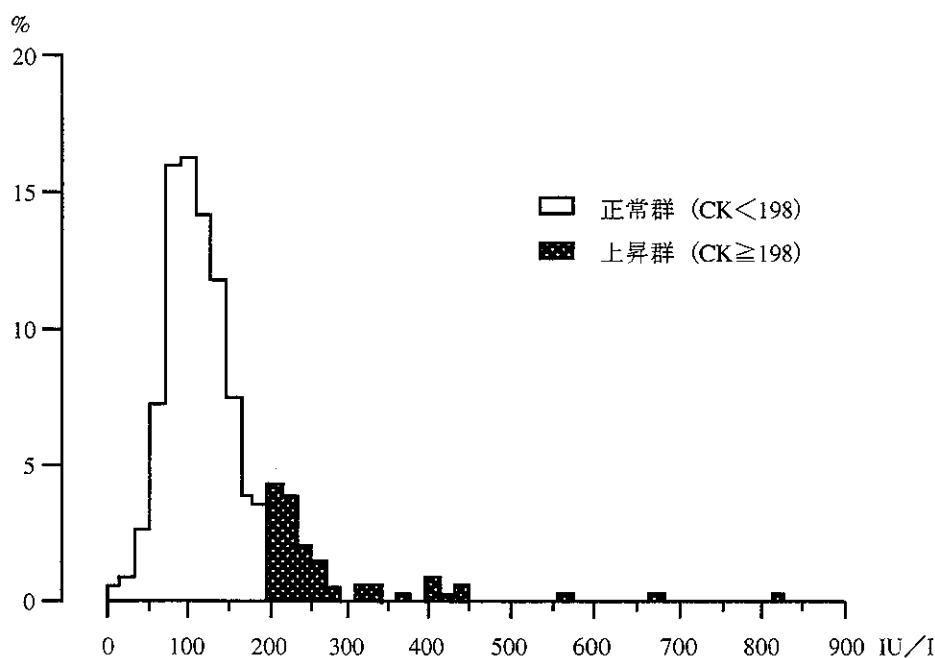


図1 血清CKの分布状況



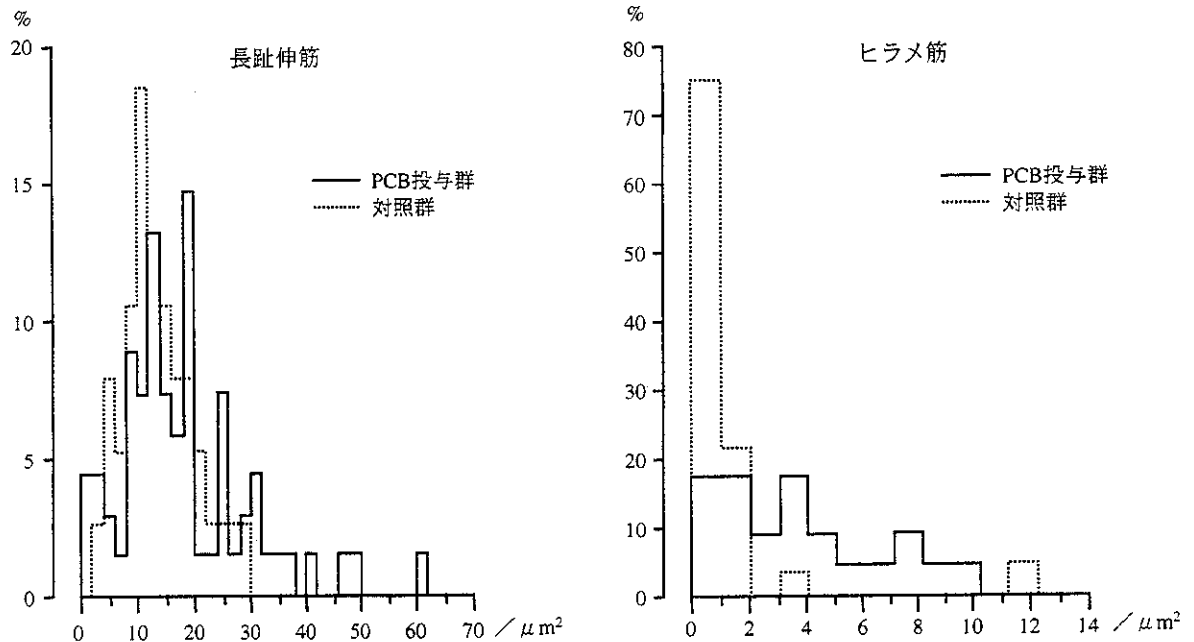


図2 Orthogonal arrays density

対照群  $14.9 \pm 1.9 / \mu\text{m}^2$  で PCB 投与群と対照群で有意差を認めなかった。Orthogonal array の密度に関しては長趾伸筋とヒラメ筋両筋ともに、PCB 投与群で Orthogonal array 密度の高い筋線維が増加していた (図2)。

#### D. 考察

検診データから、血清CK値上昇群では、血清PCB濃度の上昇が認められた。また、PCBが投与された筋細胞膜では orthogonal array 密度の上昇が認められた。

一般に、血清CK上昇はその95%以上が筋組織に由来し、筋組織障害の指標として知られている。健常人でも過度の運動負荷により血清CKの上昇が認められる。カネミ油症検診者で血清CKが高い群でより高い血液PCB濃度を示しており、PCBが血清CK上昇に関与していると推定される。PCBが末梢神経に影響を及ぼし、二次的に血清CKが上昇している可能性も考えられるが、今回PCB投与ラットの筋細胞膜を観察し、orthogonal array密度が上昇している筋線維の増加が認められた。orthogonal array密度は糖尿病性昏睡時の筋細胞膜で増

加、あるいは酸度が低い溶液に筋細胞膜を曝した時また、虚血時の脳のアストロサイトで増加しているなどの報告がなされていて、何等かの物質の輸送に関与している可能性が推定されている。また、水晶体での orthogonal array は曲面の維持、形成に関与している可能性が推定されている。PCBが投与されたラットの筋細胞膜で orthogonal arrayが増加しているのは、同様に筋細胞膜においても、形態の維持や何等かの代謝を維持するために増加している可能性が推定される。カネミ油症患者でCKが上昇が高頻度に認められるのは、筋細胞膜にも何らかの変化が生じている可能性が推定される。

#### E. 参考文献

- 1) H. Aizawa, K. Morita, H. Minami, N. Sasaki and K. Tobise, *J. Neurol Sci.*, **132**, 239 (1995).
- 2) Chia LG and Chu FL, *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.*, **48**, 894 (1995).
- 3) 伊藤 聖, 吉村俊朗, 古屋孝文, 辻野彰, 末永章人, 長瀧重信, *福岡医誌*, **86**, 267 (1995).

- 4) T. Gotow, *J. Neurocyt.*, **13**, 431 (1984).
- 5) Weisglas-Kuperus N, Lutkeschipholt IJ, Van der Paauw CG, Tuinstra LG, Brouwer A and Sauer PJ, *Pediatr Res.*, **36**, 468 (1994).
- 6) Kuipers H, *Int. J. Sports Med.*, **15**, 132 (1994).
- 7) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司, *福岡医誌*, **60**, 462 (1969).
- 8) Landis DM, Reese TS, *J. Experi. Biol.*, **95**, 35 (1981).
- 9) Lo WK, Harding CV, *J. Ultrastruc Res.* **86**, 228 (1984).
- 10) Schneider CM, Dennehy CA, Rodearmel SJ, Hayward JR, *Ann Emerg Med.*, **25**, 520 (1995).
- 11) Seo BW, Li MH, Hansen LG, Moore RW, Peterson RE, Schantz SL, *Toxicol Lett.*, **78**, 253 (1995).
- 12) 庄司進一, 上銘外喜夫 編, *クレアチンキナーゼ*, 第4版 日本臨床社, 262 (1995).
- 13) Sorichter S, Koller A, Haid C, Wicke K, Judmaier W, Wemer P and Rass E, *Int J. Sports Med.*, **16**, 288 (1995).
- 14) Stone R, *Science.*, **267**, 1770 (1995).
- 15) 吉村俊朗, 沖田 実, 東 登志夫, 上山裕文, 伊藤 聖, *福岡医誌*, **88**, 216 (1997).
- 16) 吉村俊朗, 沖田 実, 上山裕文, 伊藤 聖, 後藤公文, 末松貴史, *福岡医誌*, **88**, 211 (1997).
- 17) T. Yoshimura, Schotland DL, *J. Neuropathol experi neuro.*, **46**, 522 (1987).
- 18) 吉村俊朗, 沖田 実, 川副巧成, 中野治郎, 中尾洋子, *福岡医誌*, **90**, 246 (1999).