

分担研究報告書
ダイオキシンの病理研究

分担研究者 秦 順一 (国立成育医療センター研究所所長)

要旨：ダイオキシン類が人体にどのような影響を及ぼしているのかを評価することが求められている。本研究は、病理解剖症例における各種臓器の暴露状況を把握し、特定の疾患や病態と蓄積の相関関係を得るための基礎データとすることを目的とした。その結果、同一症例における血液、肝、胆汁中の測定から、血液と胆汁中のダイオキシン類濃度がよく相関し、肝では脂肪重量あたりの濃度が血液、胆汁よりも高いこと、ダイオキシンの異性体種類により、胆汁からの排泄量に差異が存在することが認められた。また PCB や一部の農薬の体内蓄積量は、ダイオキシン類より数桁多く、PCB 自体の直接的な人体への毒性だけでなく、ダイオキシン類その他の内分泌かく乱物質の人体への複合的な毒性を考える必要性が明らかとなった。さらに加齢に伴ってダイオキシン・PCB の蓄積が増加することが明らかとなったが、性差は認められなかった。膵癌、悪性リンパ腫症例で平均値の数倍、10 倍以上の内分泌攪乱物質蓄積例がそれぞれ 1 例見いだされた。この膵癌症例について、H-ras, K-ras 変異を検索した結果、H-ras には変異はない一方、K-ras において、コドン 12, 61 に新たな変異を見出した

A. 目的

内分泌かく乱物質は、農薬やプラスチック、PCB 等の生産過程や廃棄物の処理過程等で発生すると考えられているが、人体において、その影響がどの程度起こりえているのかを評価することが必要不可欠である。本研究は、1) 成人および小児の各種臓器の暴露状況を把握し、2) 特定の疾患や病態と蓄積の相関関係を得るための基礎データとする、ことを目的としたものである。さらに我が国におけるバックグラウンド値を明らかにすることによって、人体影響データを比較するためのデータベースが構築されることを目的とする。また脂肪組織、肝、血液、胆汁の測定結果から、内分泌かく乱物質の代謝経路についても研究・考察

した。

B. 方法

1) 剖検症例の主要臓器 (項部脂肪組織 (褐色脂肪に相当)、腋窩脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腹壁脂肪組織、下垂体、脳 (開頭症例のみ)、肝、脾、腎、膵、胃粘膜、上行結腸粘膜、乳腺、骨髄)、血液、胆汁を採取した。2) 臓器・組織に含有される内分泌かく乱物質 (PCB, HCB, コプラナおよびモノオルト PCB、ダイオキシン類) を測定し、標準的なバックグラウンド暴露値を年齢、階級、性別に得た。測定は、脂質抽出、クリンアップ後、高分解能ガスクロマトグラフ、二重収束型質量分析計あるいは GCMS で行った。(倫理面への配慮)

剖検にあたって研究対象者に対する人権擁護上の配慮および研究方法による研究対象者に対する利益・不利益等の説明を遺族に対して行い、インフォームドコンセントを得て、遺族の同意の署名を剖検承諾書へ記入していただいた。

C. 結果：ヒト臓器組織中の Mono-ortho-PCBs 分析を行ったところ、血液やいずれの臓器でも lipid basis では同程度（2 倍の範囲内）の Mono-ortho-PCBs が検出された。また、8 種類の Mono-ortho-PCBs の異性体相対比は同一であった。また同一症例における血液、肝、胆汁中のダイオキシン類濃度の測定から、血液と胆汁中の濃度がよく相関し、肝では脂肪重量あたりの濃度が血液、胆汁よりも高いことが明らかとなった。またダイオキシンの異性体種類により、胆汁からの排泄量に差異が認められた。また農薬を含む有機塩素化合物では、脂肪組織中の残留パターンは、DDTs>PCBs>HCHs>CHLs>HCB>TCPMe>TCPMOH の順であった。また PCB や一部の農薬の体内蓄積量は、ダイオキシン類より数桁多く、PCB 自体の直接的な人体への毒性だけでなく、ダイオキシン類等他の内分泌かく乱物質の人体への複合的な毒性を考える必要性が明らかとなった。

D. 考察：国際比較の結果、日本人の PCB 濃度は途上国の一般人より明らかに高く、先進国の中でも高いレベルにあることが判明した。年齢とダイオキシン・PCB・有機塩素化合物の蓄積に相関があるかどうか検討したところ、年齢に伴ってダイオキシン・PCB の蓄積が増加することが明らかとなったが、性差は認めら

れなかった。最後に本研究過程で、膀胱癌、悪性リンパ腫および子宮体癌症例で平均値の数倍? 10 倍以上の内分泌攪乱物質蓄積例がそれぞれ 1 例見いだされた。特にダイオキシン類の高濃度暴露が明らかとなった膀胱癌症例（59 歳、男性、腺扁平上皮癌）について、H-ras, K-ras 変異を検索した結果、H-ras には変異はない一方、K-ras において、コドン 12, 61 に新たな変異を見出した。今後とも日本人における内分泌攪乱物質暴露状況をモニターする必要性があると考えられた。

E. 結論

PCB や一部の農薬の体内蓄積量は、ダイオキシン類より数桁多く、PCB 自体の直接的な人体への毒性だけでなく、ダイオキシン類等他の内分泌かく乱物質の人体への複合的な毒性を考える必要性が明らかとなった。

F. 健康危険情報

PCB や一部の農薬の体内蓄積量は、ダイオキシン類より数桁多く、健康への影響をモニターする必要がある。

G. 発表業績

(1) 論文発表

Fukuma M, Abe H, Yamada T, Hata J Monoclonal antibody, 4C4-mAB, specifically recognizes keratan sulfate proteoglycan on human embryonal carcinoma cells. J Pathol (in press)

Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, Yamada T, Hata J : Responsiveness of chemotherapy based on the

histological type and WT1
mutation in bilateral Wilms tumor.
Pathology International (in press)

Shibara R, Hashiguchi A, sakamoto J, Yamada
T, Umezawa A, Hata J Correlation between
a specific Wilms tumor suppressor gene
(WT1) mutation and the histological
findings in Wilms tumor. J Med Genetics 39
(12): E83, 2002

Takenaka S, Todaka T, Nakamura M, Hori S,
Iida T, Yamada T, Hata J. Polychlorinated
dibenzo-p-dioxins, polychlorinated

dibenzofurans and non-ortho, mono-ortho
substituted chlorinated biphenyls in
Japanese human liver and adipose tissue.
Chemosphere 49:161-172, 2002

(2) 学会発表

Hirai T, Furutani H, Myouren M, Fujimine Y,
Kodaira T, Hata J, Watanabe S
Concentration of polybrominated diphenyl
ethers (PBDES) in the human bile in relation
to those in the liver and blood.
Organohalogen Compounds 58: 277-280, 2002
(Dioxin 2002, Barcelona, Spain)

ヒト血中ダイオキシン類濃度とその曝露要因の関係を 明らかにするための統計モデルの開発

分担研究者 大瀧 慈 広島大学原爆放射線医科学研究所・教授

研究要旨：ダイオキシン類の人体蓄積状況を把握するため厚生労働省、環境省を中心に住民の健康調査が行われ、それらの調査結果が報告されている（Otani, et. al, 2002; Kitamura, et. al, 2000）。しかし、1時点の横断的調査に基づいた解析であるため、半減期などのダイオキシン類の体内における時間的な推移をあらわす指標の正確な推定は行われていない。本研究では、ゴミ焼却施設解体による付加的曝露を受けたあるゴミ焼却場施設の男性従業員の複数時点での測定データを用いて、ダイオキシン類血中濃度 (pg TEQ/g fat) の半減期を推定することを目的とした。解析は、血中薬物濃度の時間的推移を表現した 1-コンパートメントモデルに基づいて行った。

A. 研究の目的

本研究の目的は、人体に蓄積したダイオキシン類の排出速度を定量的に推測するための方法論の開発である。

B. 研究方法

B.1 統計的数理モデル

1-コンパートメントモデルは、薬物の体内濃度の時間的変化を薬物の体内への流入と体外への排出とで表した薬物動態理論に基づいて構成されたものである。時間 t における薬物の生体内での濃度 $y(t)$ に関して

下記の微分方程式が満たされているものとする。

$$(1) \quad \frac{d}{dt}y(t) = a - by(t),$$

ここで a は単位時間に体内に流入する薬物量、 b は単位時間に体外へ排出される薬物量

を表している。式 (1) で表される微分方程式を解くと

$$(2) \quad y(t) = \left(D - \frac{a}{b}\right)e^{-bt} + \frac{a}{b},$$

が得られる。ここで、 D は、曝露時点での血中濃度を表している。半減期は $\log 2/b$ により与えられる。

本解析に用いたデータは、あるゴミ焼却施設解体による付加的曝露を受けた16名の男性従業員に関するものであり、ゴミ焼却施設解体による被曝後1年、2年、3年および4年後に測定されたダイオキシン類血中濃度 (pg TEQ/g fat)、被曝時の年齢およびBMI (body mass index)である。なお、データに関しては、その解析および解析結果の公表については、プライバシー保護を前提として調査対象者本人からの同意を得ている。

B.2. 半減期の推定

時点 $t_j, j = 1, \dots, 4$ における各個人 $i = 1, \dots, 16$ のダイオキシン血中濃度 $u_i(t_j)$ の対数値 z_{ij} に対して

$$(3) \quad z_{ij} = \log \left\{ \left(D_i - \frac{a_i}{b_i} \right) e^{-b_i t_j} + \frac{a_i}{b_i} \right\} + \varepsilon_{ij}$$

で表される非線形モデルを適用し、最小二乗法により個人 i ごとにパラメータ (D_i, a_i, b_i) の推定を行った。

C. 研究結果

図1・左に各個人のダイオキシン血中濃度の実測値（対数値）を右にそれらの推定曲線を示す。また、表1に各パラメータの推定値および半減期を示す。

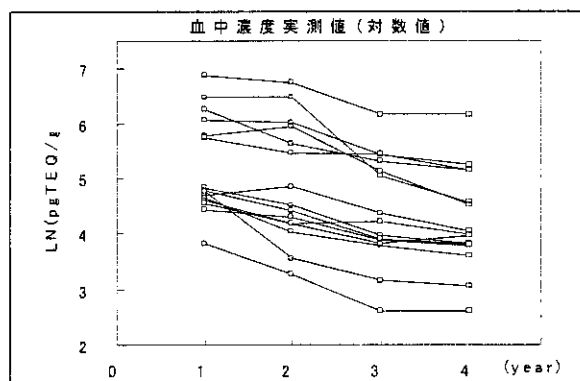
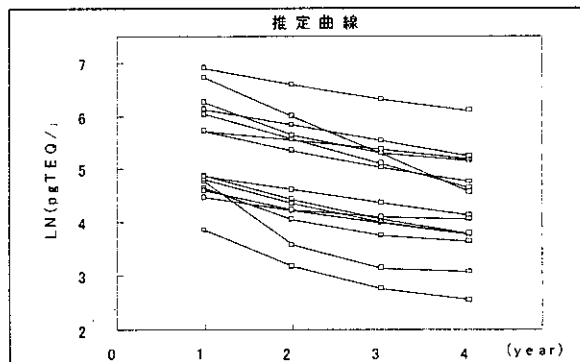


図1. 曝露停止後1年から4年のダイオキシン血中濃度実測値(上図)と血中濃度推定曲線(下図)。ただし、血中濃度は対数値。

曝露時点の血中濃度の推定値 D_i は、100 ~ 1700 pg TEQ/g fat で、通常的环境における住民の血中濃度 41 ~ 51 pg-TEQ/g fat (Environmental Agency, 1999) と比較すると、かなり高い値の職業曝露の実態を示している。半減期は 0.36 年 ~ 3.89 年と推定され個人間で大きく異なり、個体差を考慮した解析が望まれる。個人の流出係数 b_i に対する曝露時点での血中濃度 D_i 、流入係数 a_i 、BMI の影響を調べるために、 b_i を反応変数、 D_i, a_i 、年齢、BMI を説明変数とする回帰分析を行った。結果を表2に示す。 b_i と D_i 、年齢、BMI との間には有意な関係は認められないが、排出係数 b_i と流入係数 a_i の間の正の関係が示唆された (p 値=0.131)。

表1. モデル(3)の下での曝露停止時血中濃度 D 、流出係数 b 、流入係数 a の推定値および半減期

| ID | \hat{D} | \hat{b} | \hat{a} | 半減期 |
|----|-----------|-----------|-----------|------|
| 1 | 1457.5 | 0.49 | 137.66 | 1.42 |
| 2 | 1699.8 | 0.72 | 0.00 | 0.96 |
| 3 | 1267.6 | 1.12 | 180.97 | 0.62 |
| 4 | 621.8 | 0.30 | 0.00 | 2.31 |
| 5 | 663.1 | 0.46 | 0.00 | 1.50 |
| 6 | 365.2 | 0.18 | 0.00 | 3.89 |
| 7 | 458.3 | 0.49 | 29.68 | 1.42 |
| 8 | 214.5 | 0.60 | 15.46 | 1.15 |
| 9 | 217.6 | 0.71 | 23.45 | 0.97 |
| 10 | 664.7 | 1.91 | 40.39 | 0.36 |
| 11 | 162.5 | 0.24 | 0.00 | 2.88 |
| 12 | 251.0 | 1.14 | 40.46 | 0.61 |
| 13 | 199.9 | 1.23 | 70.01 | 0.56 |
| 14 | 214.1 | 1.24 | 59.09 | 0.56 |
| 15 | 113.5 | 0.31 | 4.45 | 2.23 |
| 16 | 110.5 | 1.02 | 11.44 | 0.68 |

表2. 排出係数の推定値 b を反応変数、
曝露停止時血中濃度 D , 流入係数 a の推定値、
年齢, BMI を説明変数とする回帰分析の解析結果

| 変数名 | 回帰係数 | s.e. | t | p |
|--------------|---------------------|---------------------|-------|-------|
| 1) Constant | 0.4136 | 1.025 | 0.404 | 0.694 |
| 2) \hat{D} | 0.198×10^3 | 0.282×10^3 | 0.704 | 0.496 |
| 3) \hat{a} | 0.447×10^2 | 0.274×10^2 | 1.631 | 0.131 |
| 4) Age | 0.905×10^2 | 0.103×10^2 | 0.880 | 0.398 |
| 5) BMI | 0.855×10^2 | 0.307×10^2 | 0.279 | 0.786 |

$\hat{\sigma}=0.404$ $R=0.481$

表3. モデル(4) の下での曝露停止時血中濃度 D ,
流出係数 b および半減期

| ID | \hat{D} | \hat{b} | 半減期 |
|----|-----------|-----------|------|
| 1 | 1295.5 | 0.30 | 2.31 |
| 2 | 1860.9 | 0.80 | 0.87 |
| 3 | 706.7 | 0.45 | 1.55 |
| 4 | 648.5 | 0.37 | 1.88 |
| 5 | 712.4 | 0.56 | 1.25 |
| 6 | 377.9 | 0.26 | 2.62 |
| 7 | 440.8 | 0.43 | 1.60 |
| 8 | 223.5 | 0.65 | 1.06 |
| 9 | 208.2 | 0.66 | 1.05 |
| 10 | 319.4 | 1.23 | 0.56 |
| 11 | 178.8 | 0.46 | 1.51 |
| 12 | 177.2 | 0.73 | 0.95 |
| 13 | 126.3 | 0.47 | 1.46 |
| 14 | 131.0 | 0.56 | 1.24 |
| 15 | 131.5 | 0.57 | 1.21 |
| 16 | 164.3 | 1.45 | 0.48 |

D. 考察

今回のデータは、観察期間が曝露後、4年間と比較的短期間である。(2)式より、 a_i/b_i は長い年数を経過した後のダイオキシン血中濃度 $y_i(t)$ の平衡値を示しており、ダイオキシン類の背景的曝露を示す量である。従って a_i の正確な推定をするためにはもう少し長い観察期間が必要であると考えられる。そこで、今回は、 a_i をモデル(3)において得られ

た推定値の中央値 19.96 で与えたモデル

$$(4) z_{ij} = \log \left\{ \left(D_i - \frac{19.96}{b_i} \right) e^{-b_i t_{ij}} + \frac{19.96}{b_i} \right\} + \varepsilon_{ij}$$

を用いて b_i を推定し、半減期を求めた。モデル(4)のもとでは、ダイオキシン類の半減期は0.48年~2.62年と推定された。表3にパラメータの推定結果を示す。ここで、調査段階において付加的な曝露を受けていないと考えられるコントロール群に対して年度ごとの測定が行われていれば、ダイオキシン類の背景的曝露量が推定でき、より精度の高い半減期の推定値を得ることができた。

ダイオキシン類の各異性体ごとの半減期の推定に関して Portier ら(1999)の2.69年~19.09年という報告があり、またダイオキシンの異性体の一つである2,3,7,8-TCDDを経口投与した場合の半減期が5.8年、9.7年、またベトナム戦争の兵士を対象とした調査で7.1年、8.7年、11.3年などという報告がある(Environmental Agency, Ministry of Health and Welfare, 1999)。それらの報告に比べ今回は比較的短い半減期の推定結果を得た。

E. 研究結果の公表

E.1 平成14年度での刊行物による発表

Otani, K., Ohtaki, M., Watanabe, S.: A random effects nonlinear regression model for analysis of environmental contamination data., *Environmetrics* 13: 1-9, 2002.

E.2 平成14年度での口頭発表

藤岡照夫、大谷敬子、大瀧 慈:ダイオキシン類血中濃度の半減期の推定に関して、平成14年度統計数理研究所共同研究集会「環境統計データ解析の理論と実際」、平成14年11月21日、統計数理研究所

分担研究報告書

ダイオキシン類のヒト曝露状況の把握と健康影響に関する研究

分担研究者 鎌滝哲也 北海道大学大学院薬学研究科

研究要旨

ダイオキシン類への高曝露が疑われるヒトの凍結末梢血より全 RNA を調製し、ダイオキシン類で誘導されることが知られている CYP1A1 および CYP1B1 の mRNA 量を高感度リアルタイム PCR 法により定量した。CYP1A1 mRNA 量はいずれの検体においても検出限界以下であったのに対し、CYP1B1 mRNA 量は 0.16~671 分子/ 10^7 分子 18S rRNA であった。プロビット解析の結果、ダイオキシン類による CYP1B1 誘導は三峰性を示した。中および高誘導能群における CYP1B1 mRNA 量は血漿中ダイオキシン類濃度と有意に相関した。また、CYP1B1 誘導を指標としたときの最小ダイオキシン類濃度は 6.5 pg/g lipid であった。以上の結果から、CYP1B1 はダイオキシン類のヒト曝露を評価するための高感度なマーカーとなることが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシン類に対する生体応答は多岐に渡るが、その中でも顕著に見られる現象は薬物代謝酵素の誘導である。薬物代謝酵素の中でもチトクローム P450 (以下、CYP) の誘導は、リンパ球などの肝細胞以外の細胞でも認められる。したがって、ヒトリンパ球における CYP の誘導能を定量的に評価する系ができれば、ダイオキシン類への曝露を簡便に予測できると考えられる。そこで本研究では、ヒトリンパ球における CYP の定量法の開発を目的とした。

B. 研究方法

CYP の中でもヒトリンパ球においてダイオキシン類により誘導されるのは CYP1A1

および CYP1B1 分子種である。そこで、両分子種の mRNA を定量するためのリアルタイム RT-PCR 法を開発した。東京農業大学応用生物科学講座の渡辺昌先生より御供与戴いた、ダイオキシン類への高曝露が疑われるヒトの凍結末梢血液検体より total RNA を調製し、CYP1A1 および CYP1B1 mRNA 量を定量した。また、18S rRNA 量も定量し、内部標準とした。血液検体は、インフォームドコンセントを得た上で採取した。なお、本研究は本学の倫理委員会により了承を得た上で実施した。

C. 研究結果

用いた検体 (n=72) における CYP1A1 mRNA 量は検出限界以下であった (Fig. 1)。

一方, CYP1B1 mRNA 量は $0.16 \sim 671$ 分子/ 10^7 分子 18S rRNA であった (Fig. 2A) . プロビット解析の結果, ダイオキシン類による CYP1B1 誘導 (CYP1B1 mRNA 量/血漿中ダイオキシン類濃度) は三峰性を示した (Fig. 2B) . それぞれの群の頻度は, 高誘導能群が 54.2%, 中誘導能群が 34.2%, 低誘導能群が 11.1% であった. 中および高誘導能群における CYP1B1 mRNA 量は血漿中ダイオキシン

類濃度と有意に相関した (Fig. 3) . また, CYP1B1 の誘導を指標として, ダイオキシン類の影響を調べた結果, CYP1B1 の誘導にはダイオキシン類曝露量に閾値 (6.5 pg/g lipid) があることが判明した (Fig. 3) . 以上の結果から, CYP1B1 はダイオキシン類のヒト曝露を評価するための高感度なマーカーとなることが明らかとなった.

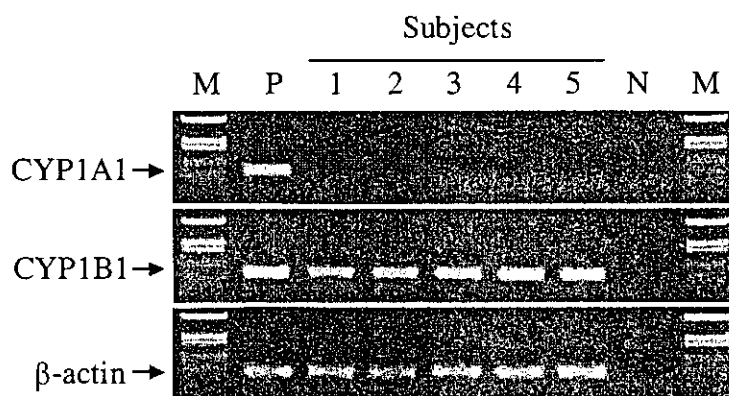


Fig. 1. Expression of CYP1A1 and CYP1B1 mRNA in total RNA prepared from 5 subjects who might be highly disclosed to dioxins. An amplified fragment size for CYP1A1, CYP1B1, or β -actin is 139 bp, 139 bp, or 78 bp, respectively. M, DNA size marker; N, none template control; P, positive control.

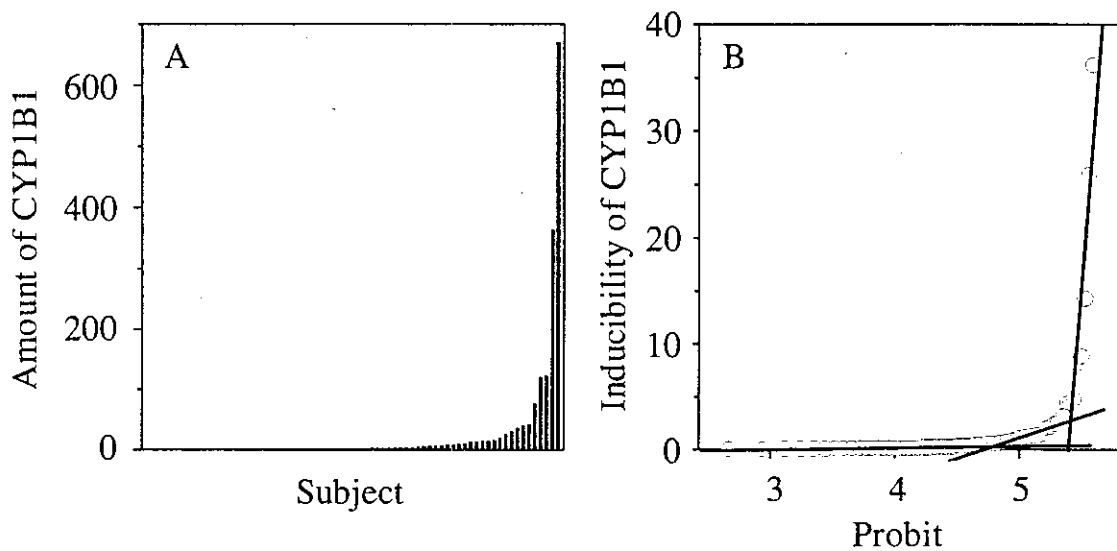


Fig. 2. A. The amount of CYP1B1 mRNA in human blood. The amount of CYP1B1 mRNA represents copy number of CYP1B1 mRNA per 10^7 copies of 18S rRNA (molecules/ 10^7 molecules of 18S rRNA). B. Probit plot for the distribution of CYP1B1 mRNA inducibility in human leucocytes. The ratio between the amount of CYP1B1 mRNA (molecules/ 10^7 molecules of 18S rRNA) and the concentration of dioxins (pg TEQ/g lipid) was defined as the inducibility of CYP1B1.

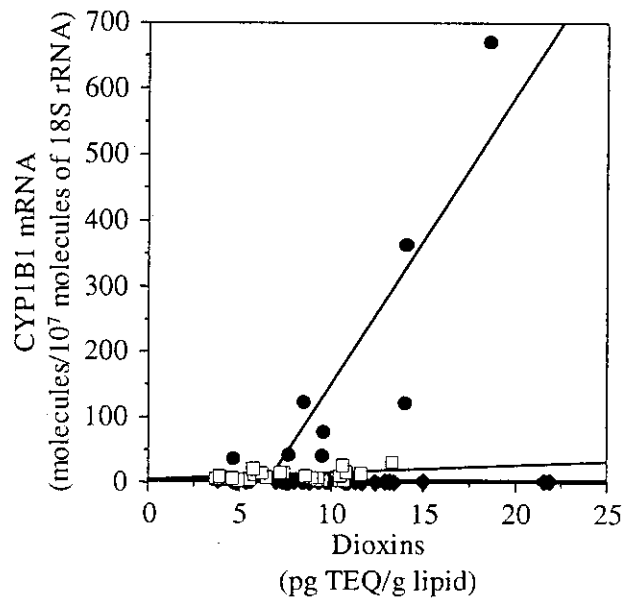


Fig. 3. Correlation between the amount of CYP1B1 mRNA and dioxins concentration in each inducibility group. A significant correlation was observed in intermediate ($r=0.412$, $p=0.041$) or high inducibility group ($r=0.861$, $p=0.006$), respectively.

D. 考察

従来、ヒトリンパ球におけるダイオキシン類曝露のマーカー遺伝子としては CYP1A1 が主に用いられてきた。しかしながら、本研究の結果より CYP1B1 の方がより高感度なダイオキシン類曝露のマーカー遺伝子であることが示唆された。また、本研究により明らかになったダイオキシン類による CYP1B1 誘導の閾値 (6.5 pg/g lipid) は、ヒトにおけるダイオキシン類への曝露およびそれに伴う毒性発現の指標となることが示唆された。

E. 結論

リンパ球における CYP1B1 がダイオキシン類へのヒト曝露を評価するための高感度なマーカーであることを明らかにした。

F. 健康危惧情報

血漿中ダイオキシン類濃度が 6.5 pg/g lipid を越えるヒトは毒性発現の危険性がある。

G. 研究発表

Kamataki T, et al. Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated white cells: Trimodal distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxins, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, in press.

Kamataki T, et al. CYP2D6.10 present in human liver microsomes shows low catalytic activity and thermal stability.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **293**:969-973.

Kamataki T, et al. A population phenotyping study of three drug-metabolizing enzymes in Kyushu, Japan, with use of the caffeine test. *Clin. Pharmacol. Ther.* **72**:200-208.

Kamataki T, et al. Inhibition of human cytochrome P4501B1, 1A1 and 1A2 by antigenotoxic compounds, purpurin and alizarin. *Mutation Research - Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **508**:147-156.

Kamataki T, et al. A major genotype in UDP-glucuronosyltransferase 2B15. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **17**:164-166.

Kamataki T, et al. Hepatocyte nuclear factor-1 α is a causal factor responsible for interindividual differences in the expression of

UDP-glucuronosyltransferase 2B7 mRNA in human livers. *Drug Metab.Dispos.* **30**:613-615.

Kamataki T, et al. *CYP2A6* gene deletion reduces oral cancer risk in betel quid chewers in Sri Lanka. *Carcinogenesis* **23**:595-598.

Kamataki T, et al. Variation in coumarin 7-hydroxylase activity associated with genetic polymorphism of cytochrome P450 2A6 and the body status of iron stores in adult Thai males and females. *Pharmacogenetics* **12**:241-249.

ダイオキシン類のヒト曝露状況の把握と健康影響に関する研究

分担研究者 白杵 靖晃

大塚製薬株式会社大塚ライフサイエンス事業部

EDC 分析センター

研究要旨：本研究においては、簡便で、安価に、また同時に多数の検体を処理できる Ah-immunoassay 法に着目して、全血 13 検体及び血漿 9 検体の合計 22 検体を用いてその有用性を検討した。その結果、GC/MS 法及び Ah-immunoassay 法で得られた測定値の間には相関係数 $r=0.851$ 、回帰式 $y=0.812x-10.439$ と正の有意な相関関係が認められた。さらに、四元分割表による分析を行った結果、診断感度 80.0%、診断特異度 42.9%、有効度 68.2% であり、ヒト血中ダイオキシン類のスクリーニング法に使用できる可能性が示唆された。今後の検討課題として検体測定時のブランク値が高値を示さない抽出法及びクリーンアップ法が必要と考えられた。

A. 研究目的

ダイオキシン類は非意図的の化学物質と定義され、多岐にわたる発生源が報告され、また、その毒性も強いことから、ダイオキシン類による汚染は大きな問題となっている。しかし、わが国におけるダイオキシン類による人体への曝露量の測定はなされていないために、各種施策の実施にあたりその評価ができず、またその影響も十分に推し量れないといわれている。人体中ダイオキシン類の測定は平成12年12月22日に厚生労働省が定めた「血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」にしたがって測定する方法が一般的である。この方法は血液からダイオキシン類を抽出するのに煩雑な抽出操作が必要であること及び高分解型ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) 法

を用いた分析であるために、測定費用が高価であり、また、多数の検体は測定できない等の問題点があった。本研究においては、簡便で、安価に、また同時に多数の検体を処理できる Ah-immunoassay 法に着目して、その有用性を検討し、わが国におけるダイオキシン類による被曝量の実態を明らかにすることに資する目的で研究を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. サンプル

サンプルはインフォームドコンセントの得られた個人からそれぞれ採血し、さらに、血中ダイオキシン類の測定が厚生省暫定マニュアルにしたがって測定されたものを用いた。なお、サンプル数は全血 13

例、血漿 9 例であった。

2. Ah-immunoassay 法におけるサンプルからのダイオキシン類の抽出及びクリーンアップ方法

Ah-immunoassay 法におけるサンプルからのダイオキシン類の抽出及びクリーンアップも同様に厚生省暫定マニュアルにしたがって行った。

3. Ah-immunoassay 法による測定

Ah-immunoassay 法の測定方法にしたがって測定した。すなわち、ビオチン標識 DRE (Dioxin Responsive Element) を介して、ダイオキシン類が結合した Ah-レセプター (Aryl hydrocarbon Receptor)・ARNT (Ah-Receptor Nuclear Trans-locator) 複合体をウエルの底部に固相化したアビジンと反応させる。次に、ARNT に特異的に反応するポリクローナル抗体 (ウサギ) を反応させ、さらにアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG モノクローナル抗体と反応させた。ここに発色試薬として pNPP (*p*-Nitrophenyl phosphate) を加え、その吸光度を測定し、同時に測定した 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2, 3, 7, 8-TCDD) 標準液の吸光度からサンプル中のダイオキシン類濃度を 2, 3, 7, 8-TCDD 相当量 (2, 3, 7, 8-TCDD Equivalent : DEQ) として求めた。

C. 研究結果

1. 全血

全血 13 例の GC/MS 法及び Ah-immunoassay 法でのそれぞれの測定値を表 1 に示した。GC/MS 法及び

Ah-immunoassay 法で得られた各測定値の相関分析の結果、回帰式 $y = 0.862x - 6.228$ 、相関係数 $r = 0.845$ の良好な相関関係が認められた。

2. 血漿

血漿 9 例の GC/MS 法及び Ah-immunoassay 法でのそれぞれの測定値を表 2 に示した。GC/MS 法及び Ah-immunoassay 法で得られた各測定値の相関分析の結果、回帰式 $y = 0.629x - 10.368$ 、相関係数 $r = 0.875$ の良好な相関関係が認められた。

D. 考察

今回の試験では全血 13 例及び血漿 9 例の合計 22 例の血液検体を用いて GC/MS 法と Ah-immunoassay 法による測定結果の相関関係を求めた結果、両者の測定方法の間に良好な相関関係が認められた。この理由として Ah-immunoassay 法の測定原理はダイオキシン類の毒性メカニズムを利用していることに起因するものと考えられる。すなわち、ダイオキシン類の毒性メカニズムは Ah-レセプターと ARNT が関与していることが知られている。体内では細胞膜を通過したダイオキシン類は Ah-レセプター及び ARNT と結合・変形し、複合体を形成する。

表1 全血中ダイオキシン類濃度の
測定値の比較

| Sample No. | GC/MS (pg-TEQ/g-lipid) | Ah-immunoassay (pg-DEQ/g-lipid) |
|------------|---------------------------|------------------------------------|
| 1 | 57 | 10.4 |
| 2 | 91 | 48.5 |
| 3 | 84 | 38.7 |
| 4 | 173 | 85.9 |
| 5 | 176 | 280.1 |
| 6 | 397 | 304.3 |
| 7 | 71 | 0.0 |
| 8 | 120 | 69.4 |
| 9 | 84 | 90.9 |
| 10 | 150 | 145.9 |
| 11 | 187 | 176.9 |
| 12 | 56 | 77.0 |
| 13 | 46 | 49.5 |

表2 血漿中ダイオキシン類濃度の
測定値の比較

| Sample No. | GC/MS (pg-TEQ/g-lipid) | Ah-immunoassay (pg-DEQ/g-lipid) |
|------------|---------------------------|------------------------------------|
| 1 | 28.0 | 17.6 |
| 2 | 38.5 | 0.0 |
| 3 | 45.0 | 44.9 |
| 4 | 119.5 | 55.5 |
| 5 | 122.0 | 0.0 |
| 6 | 300.7 | 204.6 |
| 7 | 48.1 | 0.0 |
| 8 | 27.8 | 33.6 |
| 9 | 33.8 | 30.4 |

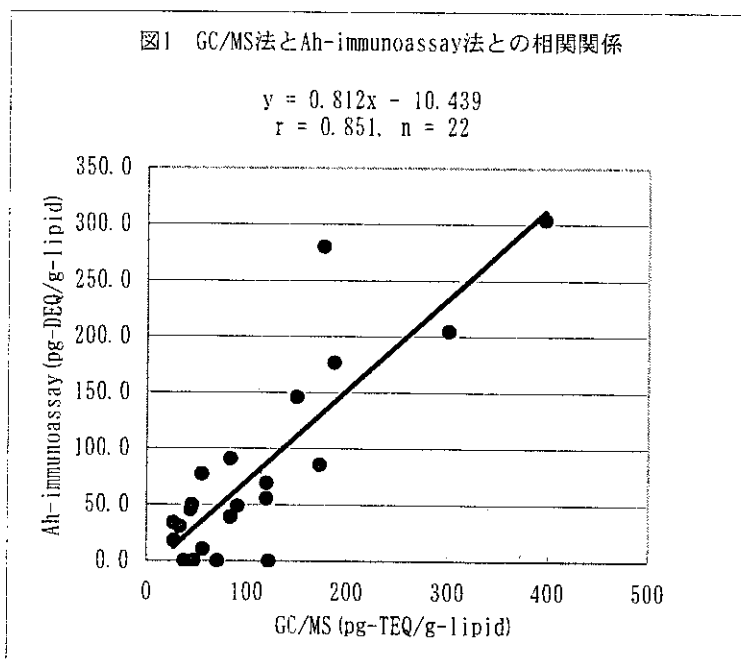
さらにこの複合体は DRE と結合し、毒性が誘発される。Ah-immunoassay 法によるダイオキシン類の測定原理はこの毒性メカニズムに基づいているため、ダイオキシン類等の化学物質の毒性量を包括的に測定できると考えられる。また、Ah-immunoassay 法を

用いたダイオキシン類との交差反応性試験結果から、塩素数が 6 以下の PCDDs、PCDFs の 2, 3, 7, 8 位塩素置換体及びコプラナー PCB に関しては WHO-TEF とよく一致すること、7 塩素化及び 8 塩素化体では WHO-TEF と比較して大きくなる可能性がある」と報告

されている。これらのことから、Ah-immunoassay 法で得られた測定値は GC/MS 法で得られた値と相関性が高いと考えられた

今回得られた測定結果から、四元分割表を用いた Ah-immunoassay 法の有用性を検討した。すなわち、全血 13 例及び血漿 9 例を用いて相関関係を求めた結果、図 1 にダイ示したように相関係数 $r = 0.851$ 、オキシシン類濃度のカットオフ値を回帰式 y

$0.812x - 10.439$ であった。血液中の $=50\text{pg-TEQ/g-lipid}$ と考えた場合、求めた回帰式から Ah-immunoassay 法のカットオフ値は 30pg-DEQ/g-lipid と設定することが可能である。



この結果に基づき 22 例の測定結果を四元分割表としてまとめた結果を表 3 に示した。GC/MS 法による結果が陽性のとき Ah-immunoassay 法でも陽性と判定する診断感度は 80.0%、GC/MS 法による結果が陰性のとき Ah-immunoassay 法でも陰性と判定する診断特異度は 42.9%であり、GC/MS 法と Ah-immunoassay 法の両者の判定結果が一致する割合である有効度は 68.2%であった。

血中ダイオキシシン類のスクリーニング法に Ah-immunoassay 法を用いた場合、疑陰性率が 13.6%と高値であり、今後この疑陰性率を下げる必要があると考えられた。

表3 四元分割表による測定結果の解析

| | | Ah-immunoassay法 | |
|--------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | | 30pg-DEQ/g-lipid以下 | 30pg-DEQ/g-lipid超 |
| GC/MS法 | 50pg-TEQ/g-lipid以下 | 3 | 4 |
| | 50pg-TEQ/g-lipid超 | 3 | 12 |

この疑陰性率が高かった理由は、疑陰性を示した検体の Ah-immunoassay 法の測定結果はすべて 10pg-TEQ/g-lipid 以下であり、これらの検体のブランク値が高値を示したことに起因すると考えられた。今後検体測定時のブランク値が高値を示さない抽出法及びクリーンアップ法が必要と考えられた。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

E. 結論

今回の研究結果から下記の結論が導かれた。

1、Ah-immunoassay 法を用いてヒト血中ダイオキシン類を測定した結果、GC/MS 法で得られた測定値と良好な相関関係が認められた。

2、四元分割表による分析を行った結果、ヒト血中ダイオキシン類のスクリーニング法に使用できる可能性が示唆された。

20020957

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Health effects of low dose exposure of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar PCB among Japanese residents.

Watanabe S, Iida T, Ohtaki M, Hosseinpour J.
Organohalogen Compounds. 2002;59:335-7.

The kinetics of dioxin congeners in human body.

Fujimine Y, Hirai T, Mochiduki A, Usuki Y, Kodaira T, Watanabe S, Miyata H.
Organohalogen Compounds. 2002;55:413-6.

A new destruction technique for dioxin analogues in landfills and fly ash concerning waste combustion by DCR-dehalogenated method.

Miyata H, Nakao T, Ito H, Nakatsuji K, Adachi K, Suguro K, Hosoya M, Nishimura H, Tsuji H, Kameko T, Higashi N.
Organohalogen Compounds. 2002;56:425-8.

Development of simple and accurate evaluation method on air pollution by dioxin analogues using Japanese black pine needle as indicator.

Miyata H, Iwata N, Nakao T, Aozasa O, Simamura A, Ohta S.
Organohalogen Compounds. 2002;59:103-6.

Variation in blood dioxin level, characteristics of isomer composition, and isomer changes in residents near an incineration facility.

Aozasa O, Ohta S, Nakao T, Miyata H, Mochizuki A, Fujimine Y.
Organohalogen Compounds. 2002;55:335-8.

Investigation of PCDD/DF, PXDD/DF, PBDD/DF and nitro-PAH detected on flue gas from waste incinerator.

Nakao T, Ohta S, Aozasa O, Miyata H.

Organohalogen Compounds. 2002;56:349–52.

Contamination levels of PBDEs, TBBPA, PCDDs/DFs, PBDDs/DFs and PXDDs/DFs in the environment of Japan.

Ohta S, Nakao T, Nishimura H, Okumura T, Aozasa O, Miyata H.

Organohalogen Compounds. 2002;57: 57–60.

Sexual difference in effects of dioxins on immune response system in Japanese infants.

Nagayama J, Tsuji H, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Fukushige J, Watanabe T.

Organohalogen Compounds. 2002;59:135–8.

Effects of organochlorine compounds such as pesticides, PCBs and dioxins on thyroid hormone system in Japanese mothers.

Nagayama J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Fukushige J, Watanabe T.

Organohalogen Compounds. 2002;56:115–8.

Effects of organochlorine compounds such as pesticides, PCBs and dioxins on immune response system in Japanese mothers.

Nagayama J, Tsuji H, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Fukushige J, Watanabe T.

Organohalogen Compounds. 2002;55:425–8.

Frequency of sister chromatid exchanges in Japanese infants lactationally exposed to organochlorine pesticides and dioxins.

Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Fukushige J, Watanabe T.

Organohalogen Compounds. 2002;55:429–32.

Application of accelerated solvent extraction (ASE) and solvent cut large volume (SCLV) injection system for determination of dioxins in foods.

Hori T, Tobiishi K, Ashizuka Y, Nakagawa R, Iida T.
Organohalogen Compounds. 2002;55:95–8.

New protocol for dioxins analysis of human blood.

Todaka T, Hirakawa H, Takenaka S, Tobiishi K, Nakagawa R, Iida T.
Organohalogen Compounds. 2002;55:155–8.

Comparison of solvent cut large volume (SCLV) injection system with conventional technique in dioxins analysis by HRGC–HRMS.

Tobiishi K, Hori T, Kurokawa Y, Ishiguro Y, Iida T.
Organohalogen Compounds. 2002;55:179–82.

A random effects nonlinear regression model for analysis of environmental contamination data.

Otani K, Ohtaki M, Watanabe S.
Environmetrics. 2003;14:149–57.

Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated white cells: trimodal distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxins.

Toide K, Yamazaki H, Nagashima R, Itoh K, Iwano S, Takahashi Y, Watanabe S, Kamataki T.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003 Mar;12(3):219–22.