

Table.3 処方と混合順序

処方-1:①生理食塩液 開栓型 500mL		
ビタメジン®静注用		1V
フラッド®注-10		1A
ビタミンC注「フソー」(2g)		5A
タチオン®注射用 200mg		1A
コンクライト® -Mg		16.6mL
亜セレン酸注射液〈Se:5 μ g〉		1A
硫酸亜鉛注射液〈Zn:30mg〉		1A
処方-2:①生理食塩液 開栓型 500mL		
フラッド®注-10		1A
ビタミンC注「フソー」(2g)		5A
タチオン®注射用 200mg		1A
コンクライト® -Mg		16.6mL
亜セレン酸注射液〈Se:5 μ g〉		1A
硫酸亜鉛注射液〈Zn:30mg〉		1A
②フィシザルツ®	50mL	
ビタメジン®静注用		1V
処方-3:①生理食塩液 開栓型 500mL		
フラッド®注-10		1A
ビタミンC注「フソー」(2g)		5A
タチオン®注射用 200mg		1A
コンクライト® -Mg		16.6mL
亜セレン酸注射液〈Se:5 μ g〉		1A
硫酸亜鉛注射液〈Zn:5mg〉		1A
②フィシザルツ®	50mL	
ビタメジン®静注用		1V
<u>混合順序</u>		
以下の順序で生理食塩液に混合した。		
1. 50mLのシリンジでビタミンC注 5Aを取る。		
2. 20mLのシリンジでコンクライト®-Mg、(処方-1の場合ビタメジン®)タチオン®注射用、フラッド®-10注の順で取る。		
3. 5mLのシリンジで亜セレン酸注射液、硫酸亜鉛注射液を取る。		
4. 処方-2.3は3.とは別の5mLのシリンジでビタメジン®を溶解する。		

C-1. 研究結果 1.

処方-1の測定結果 (Fig.1)

VB1は遮光冷所保存条件下において混合後3時間で $8.41\pm 2.22\%$ まで減少し、室温および 40°C 保存では測定限界値以下であった。GSHは、温度が上昇するにつれて残存率が減少した。それぞれの保存条件間で有意差が生じた($p<0.01$)。さらに、VB12は冷所、室温で24時間後において、それぞれ $85.04\pm 1.80\%$ 、 $84.84\pm 1.95\%$ 、 40°C では $65.85\pm 1.64\%$ まで経時的に減少し、冷所 -40°C ・室温 -40°C の間に有意差が生じた($p<0.01$)。VB2、VB6、VCは、24時間後でいずれの保存条件においても90%以上の含量を保持していた。この結果より、これ以降の処方別の保管条件は冷所・遮光条件とした。(統計手法: repeat measure ANOVA, Fisher PLSD)

処方-2の測定結果 (Fig.2)

24時間後ではVB1: $100.43\pm 6.34\%$ 、VB2 : $99.08\pm 1.94\%$ 、VB6 : $98.34\pm 0.34\%$ 、VB12 : $87.27\pm 4.80\%$ 、VC : $99.94\pm 4.41\%$ 、GSH : $84.67\pm 3.75\%$ であった。12時間ではいずれの成分も90%以上が残存していた。

処方-3の測定結果

24時間後ではVB1: $100.43\pm 6.34\%$ 、VB2 : $98.47\pm 0.37\%$ 、VB6 : $98.34\pm 0.34\%$ 、VB12 : $92.37\pm 4.26\%$ 、VC: $99.86\pm 4.26\%$ 、GSH: $77.60\pm 2.57\%$ であり、GSHは含量低下が10%を超えていた。

VB1の測定結果

VB1は混合3時間で冷所保存条件下において $8.41\pm 2.22\%$ まで減少し、室温・ 40°C では測定限界値以下となった。処方-2および3では $100.43\pm 6.34\%$ であった。

GSHの測定結果

処方-1による温度条件別残存率は、温度が上昇するにつれてGSH含量は低下した。 $(p<0.01)$

処方間の残存率は、処方-1では、処方-2および3より有意に低下していた。 $(p<0.05)$ 処方-3では処方-2と比べて12時間、24時間で有意に低下していた。(統計手法: repeat measure ANOVA, Fisher PLSD)

VB12の測定結果

処方-2では冷所、室温において24時間で $85.04\pm 1.80\%$ 、 $84.84\pm 1.95\%$ まで減少しており、 40°C では $65.85\pm 1.64\%$ であった。処方-2および3では24時間後においてVB12: $92.37\pm 4.26\%$ へ低下した。処方-1は

処方-2 および3 と比べ残存率は低く、統計的有意差が生じた。(p<0.05) (統計手法：repeat measure ANOVA, Fisher PLSD)

D-1. 考察 1.

Spelco の Technical Report (Gang Huang : Technical Report, Spelco, PA-16823,1999)を参照し、VB1、VB6、GSH、VC の測定を試みた。しかし、GSH はこの方法で測定不能であったため、日本薬局方外医薬品規格に記載の GSH の測定法で測定した。同法では VB1、VB6、GSH、VC が同時に測定可能であった。しかし、GSH 測定に必要な 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムの添加により、VB6 の保持時間が延長したため 1mL/min から 2mL/min に切り替えて測定を行い、VB1、VB6、GSH は同時分析とし、VC は単独で測定することとした。さらに VB2、VB12 は Spelco Technical Report の方法で測定可能であった。測定内および測定間変動係数は各成分 3%未満と良好であった。ビタミンやペプチド化合物は溶解後の安定性が低いため、配合変化が多いことが知られている。処方-1 における VB1 含量低下の原因は、VC 製剤に保存剤として含まれるピロ亜硫酸ナトリウムとチオグリコール酸ナトリウムが原因と考えられた。以前からチアミンやフルスルチアミン等の

VB1 製剤は亜硫酸により分解することが知られているが、混合直後に投与するのであれば問題ないと認識されている。しかし、今回の処方ではピロ亜硫酸ナトリウムとチオグリコール酸ナトリウムが各 50mg と多量に含まれていたことで急激な含量低下が起きたことが考えられる。そのため、ビタメジン®を単独投与とすることで含量の低下を避けることができた。これら亜硫酸塩等をはじめとする抗酸化剤の CS に対する影響に関しては不明である。ピロ亜硫酸ナトリウムにより、喘息患者では比較的高頻度に喘息発作を誘発するとも言われており、本症の特質上注意が必要である。

GSH はトリペプチドであり非常に不安定な物質である。そのため配合薬剤および保存温度においても含量に影響を及ぼすことが知られているが、処方-1 の成分測定結果において同様に認められた。一方では、GSH が配合薬剤により安定化することも知られている。今回の研究結果では、処方-2 と処方-3 の GSH の比較において、Zn とキレートを生成し、安定化していることが示唆された。これらキレート化した GSH は母液内では安定であるが、測定中カラムとの親和性により解離し、本測定法では測定が可能である。Zn の含量を 5mg にすることにより、キレート化する割合が低下し、GSH は不安定になり濃度が低下したと考えられた。しかし、Zn は GSH と結合し、

Zn の体内からの排泄を早めることが知られており、GSH のキレート化による安定化は Zn 製剤の有用性を低下させる可能性が考えられる。これらを考慮し、Zn 製剤を処方 2 において、GSH と配合するのではなく、ピタメジン®を溶解している 50mL の母液に混合することを検討したが、硫酸亜鉛注射液 (Zn:30mg) を混合直後にゲル化したため配合ができなかった。

本研究においては、明らかなビタミン等と Se の配合変化は認められなかった。しかし、Se は GSH となどの -SH を持つ還元性物質と配合することにより活性酸素を発生し、 SeO_3^{2-} を Se^0 に還元させることはよく知られており、さらに Se と GSH は反応性が高く、Se 濃度によっては GSH 濃度の低下させる可能性がある。本研究においては Se の投与量は $5\mu\text{g}$ と非常に少ないため、Se を起因とした明らかな配合変化は認められなかったと思われる。

A-2. 研究目的 2.

特殊院内製剤「硫酸亜鉛注射液」および「亜セレン酸注射液」の臨床使用評価

近年、微量必須金属は、次々と新たな生理活性が発見され注目を浴びている。現在、亜セレン酸注射液は特殊院内製剤の中で市販化が強く求められて

いるものであり、これは微量金属への注目の大きさを物語るものである。しかし、このような院内製剤は臨床医からの要望をもとに作られるが、製薬企業に義務づけられている品質試験・臨床試験などの、試験成績や製剤情報の収集が行われることは少ない。そこで、SHS 治療に用いられる院内製剤である「硫酸亜鉛注射液」および「亜セレン酸注射液」について臨床的な情報の収集を行った。特にその中で必要性に脚光を浴びる反面、有害事象に関する情報は少ない。本研究は有害事象と薬剤の関連について各成分の用量、治療経過、臨床検査値および患者からの聞き取り調査の結果をもとに検討を行った。

B-2. 研究方法 2.

対象患者は 2002 年 4 月 1 日から 2003 年 1 月 31 日の間に入院および外来において 1 クール 5 日間で治療を行い、研究の目的・内容等に同意が得られた患者。

同意取得

本研究に先立ち、研究対象になる患者に対し、同意取得のために必要な書類を提示し、次項の項目について十分に説明を行った後、質問する機会を与え、患者本人の自由意志による本研究への参加について同意を得た。

【同意取得時の説明内容】

- 1.本研究の目的
- 2.本研究の実施内容
- 3.参加に同意しない場合でも一切の不利益を受けないこと
- 4.例え同意後であったとしても随時これを撤回でき、一切の不利益を受けないこと
- 5.本研究に対する問い合わせ先

【除外基準】

下記の除外基準のいずれかを満たす患者は本研究の対象としない。

- 1.本研究において用いる検査値に大きな影響のある疾患の患者(肝疾患、腎疾患等)
- 2.皮内反応において輸液成分に過敏性を示す場合
- 3.極端な栄養摂取不良患者
- 4.本研究への参加が治療上悪影響を及ぼす可能性のある

評価方法

Zn 亜鉛(血清)、Se セレン(全血)、Mg マグネシウム(血清)投与前後および受診時における血中濃度の測定を行う。Znは日内変動が知られており、投与前後でできる限り同じ時刻(12:00~13:00)に採血を行った。

調査票

一部本研究の主旨に合うように改変した QEESI (Quick Environmental Exposure and Sensitivity Inventory)

を用いて(**Fig.3**)、治療前後で症状の強弱の変化を検討した。

検定方法

主にバイタルサインは Student's t-test, paired t-test, repeat measure ANOVA 分析を用い、それら検査値の変化の検定には Mann-Whitney's U-test, Willcoxon signed-ranks test を用いた。調査票(QEESI)の結果は Student's t-test を用いた。

以上の検定の結果、 $p<0.05$ で有意差ありとした。

C-2. 研究結果 2.

本研究の患者背景

人数: 10名

入院外来比: 外来:入院=6:4

男女比 : 7:3

平均年齢 : 44.1 ± 10.12 歳

Zn:30mg 投与時の血中濃度推移

投与前は $73.75 \pm 4.50 \mu\text{g/dL}$ と基準値内であり、5日目の投与終了後の濃度では $449.25 \pm 68.82 \mu\text{g/dL}$ と高値を示した。5日目の投与直後では最大で $550 \mu\text{g/dL}$ 、最も低値を示す例で $395 \mu\text{g/dL}$ と個人差が大きい。再受診時においても基準値内であったが、 $105.00 \pm 8.49 \mu\text{g/dL}$ と投与前に比べ高値を示した。(Fig.4)

Se:5 μg 投与時の血中濃度推移

投与前、投与終了後、再受診時はそれぞれ $29.24 \pm 5.70 \mu\text{g/dL}$ 、 $30.55 \pm 5.43 \mu\text{g/dL}$ 、 $26.08 \pm 3.49 \mu\text{g/dL}$ と上昇は認められなかった。(Fig.5)再受診時には有意差は認められなかったが、平均値は投与前と比較して低値を示した。

Mg:200mg 投与時の血中濃度推移

投与前は $2.34 \pm 0.20\text{mg/dL}$ であり、全ての患者で基準値内であった。投与終了後は $2.98 \pm 0.14\text{mg/dL}$ と高値を示した。再受診時には投与前とほぼ変わらない濃度推移であった。(Fig.6)

Zn:30mg と Zn:5mg 投与時の血中濃度推移の比較(Fig.7)

投与終了後の濃度は 5mg 群で $142.57 \pm 14.59 \mu\text{g/dL}$ であり、30mg 群に比べ明らかに濃度が低下した。さらに投与終了後では 30mg 投与群と同様に個人差が大きい。5mg 群の血中濃度は再受診時では投与前と同程度にまで低下していたが、これら 2 点で有意な差は認められなかった。

Zn:30mg と Zn:5mg 投与時の QEESI の比較

症状別に平均を取り、その点数を投与前後で比較した。各群で症状、総合点数共に統計的な有意差は認められなかった。しかし、30mg 群では治療前

後の点数の差(平均値)は 6 項目(2:気道粘膜 3:循環器 4:消化器 5:認識 6:情緒 10:泌尿器・性器)で悪化している傾向が見られ、特に、2.3.6 番で顕著であった。

5mg 群では治療前後で悪化傾向の項目は認められなかった(Fig.8)。その中で両群間を比較した結果、改善率に最も大きな差を示したのは循環器症状であった。投与前後の総点数の平均値および標準偏差を用い比較を行ったが、各群に有意差は認められなかった。しかし、平均値で比較したところ、5mg では 30mg よりも改善傾向を示した。投与前に各症状を“ある”と答えた人数を 100%とし、その割合がどのように変化したか調べた。その結果、5mg 群に比べて 30mg 群では症例数が少なく、両群の比較・検討は行えなかった。5mg 群では 2:気道粘膜 4:消化器症状は再受診時に最も改善している傾向があり、その他の症状はいずれも投与終了時に改善する傾向が認められた。

1 人あたりの症状の個数を投与前後および再受診時にて比較を行った。5mg 群の症状の個数は治療終了後に減少し、投与前と比較して有意に減少していた($p < 0.05$)。30mg 群と 5mg 群の間では、各時点で両群間に有意差は認められなかった。

有害事象

投与時の体勢(座位)から軽度の疲労

感を全患者が訴えた。投与時に血管痛を訴える患者が2名いたが、点滴後の軽度の疲労感・血管痛は、いずれも点滴治療における一般的訴えであり、本治療に特徴のあるものではない。その他の有害事象としては口渇と排尿回数の増加が両群に共通して認められた。

D-2. 考察 2.

Zn、Seの欠乏が薬物代謝酵素にも影響を与えることが報告されており、微量元素の持つさまざまな可能性に期待をして投与を計画している。通常輸液にてZnを投与する場合、TPN(完全静脈栄養)などではZn約 $60\mu\text{mol}$ (約 3.9mg)を24時間前後で投与する。本治療におけるZn 30mg ($459\mu\text{mol}$)・2時間半投与は、比較的急激なZnの負荷による、倦怠感出現を生じさせる可能性があるため、注意を要する。よって本症における投与量は臨床効果も十分である 5mg が適量と考えられた。

Se投与前後で血中濃度の上昇は見られなかった。これはSeの投与量が $5\mu\text{g}$ と微量であり、血中濃度を上昇させるには至らなかったと思われる。特にSeは日本人の食生活において摂取する機会が多く、長期にTPNを必要とする患者など特殊な栄養状況下でない限りSeの欠乏は起きにくいと考えられている。ある報告によると日本人はSeを1日に $100\mu\text{g}$ 以上摂取していると言われてお

り、他国と比較して決して少なくない量である。この量から考えて投与により血中濃度に変化がなかったのは妥当である。よって本治療では、欠乏しているSeを補給するという意味合いではなく、Seの薬理作用としての、グルタチオンペルオキシターゼの活性促進に期待するということになる。

投与前のMg濃度で、特に異常値を示す患者はいなかった。さらに投与後 $2.99\pm 0.15\text{mg/dL}$ と一時的に高濃度を示したが、投与直後であることと臨床 3.5mg/dL 以下では高Mg血症による臨床症状の発現率はきわめて低いとされていることから、問題はないと考えられた。QEESIは、SHSの補助診断に用いるものであり、本来治療効果の判定に用いるものではないが、症状の強弱が判断できると考え本研究では用いた。結果、総点数の平均点の比較では、本治療を行うことにより、症状が緩和されることがわかった。しかし、今回の研究ではこの調査票の回答は、診療で日常的に行っている治療日決定の日と治療後の再受診において得ており、治療前後との間に時間があり、純粋な治療における結果を反映できているかに問題が残っており、より多角的な視点で評価することが必要である。また、本研究では症例数も少ないため、症例数を重ねた上でさらなる検討が必要であると考え。よって新たな治療を取り入れる場合、各

医療機関での多角的な視点で evidence を評価する必要があると考える。

E. 結語

1. 処方-1ではVB1の含量低下が認められたが、ビタメジン®を別投与とすることにより、明らかな含量低下は認められなくなった。
2. Zn 30mg 投与時には全ての患者で倦怠感が発症していたが、5mg と減量することにより、これらの症状は認められなくなり、5mg 製剤は 30mg 製剤と比較し、安全かつ有用であることが示唆された。
3. 亜セレン酸注射液は、投与量が少量であり血中濃度の上昇は認められなかったが、グルタチオンペルオキシダーゼ活性を上昇させる作用を有することから、本症では有効であると考えられた。
4. 治療前後における臨床症状のスコアには、統計学的有意差が認められ、本治療の有効性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 坂部 貢、 “内分泌攪乱物質の免疫系への影響”、

最新医学、57 (2): 32-29、2002

2) 坂部 貢、 “シックハウス症候群”、水環境学会誌、25 (2): 87-90、2002

3) 宮田幹夫、坂部 貢、松井孝子、遠乗秀樹、石川 哲、 “多種類化学物質過敏症患者に二重盲検試験と瞳孔”、神経眼科、19 (2): 155-161、2002

4) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲、角田和彦、 “シックハウス症候群と脳循環”、神経眼科、19 (2): 162-168、2002

5) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲、 “シックハウス症候群の診断と治療の実状”、建築雑誌、117 (1491): 12-14、2002

6) 坂部 貢、 “居住環境と健康障害—シックハウス症候群を中心として”、化学と教育、50 (11): 777-779、2002

7) 坂部 貢、吉田貴彦、香山不二雄、 “微量環境化学物質と胸腺の微細構造”、Immunotox Letter、7 (2): 3-4、2002

8) Y. Fujita, T. Kakuta, M. Asano, J. Itoh, K. Sakabe, T. Tokimasa, A. Saito, “Evaluation of Na⁺ active

transport and morphological changes for bioartificial renal cell device using Madin-Darby canine kidney cells ” , Tissue Eng, 8(1):13-24, 2002

- 9) M. Ojima, H. Tonori, T. Sato, K. Sakabe, M. Miyata, S. Ishikawa, Y. Aizawa, “Odor perception in patients with multiple chemical sensitivity” , Tohoku J. Exp. Med., 198, 163-173, 2002

2. 学会発表

- 1) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲、相澤好治、吉田貴彦、相川浩幸、永倉貢一、赤塚 明：低用量フタル酸類の一次免疫中枢に対する影響、第11回日本臨床環境医学会、2002
- 2) 坂部 貢、国松佳奈、角田隆俊、齋藤 明、相川浩幸、相澤好治、宮田幹夫、石川 哲：甲状腺C細胞におけるエストロゲン受容体ベータ型の意味－環境エストロゲンの作用と関連させて－、第11回日本臨床環境医学会、2002
- 3) 坂部 貢、島 正則、徳永正俊、勝岡洋治、吉田貴彦、香山不二雄、相澤好治、宮田幹夫、石川 哲：環境ホルモンは前立腺癌細胞の増殖にどう影響するか？ 第11回

日本臨床環境医学会、2002

- 4) 坂部 貢、山崎 等、尾上球子、相川浩幸、相澤好治、吉田貴彦、香山不二雄、宮田幹夫、石川 哲：重症筋無力症ラット（BUF/Mna）の胸腺腫発育と環境ホルモン、第11回日本臨床環境医学会、2002
- 5) 坂部 貢、吉田貴彦、香山不二雄：微量環境化学物質と胸腺の微細構造－フタル酸エステル類を中心として－、第9回日本免疫毒性学会、2002
- 6) 坂部 貢、“シックハウス症候群・化学物質過敏症”、第33回日本職業アレルギー学会、2002
- 7) K. Sakabe, “Present status of chemical sensitivity in Japan ”, 20th Annual International Symposium On Man and His Environment, 2002
- 8) K. Sakabe, “Immunological analysis of the low dose exposure syndromes”, International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters 2002, 2002
- 9) 坂部 貢、“化学物質過敏症の

治療と対策”、第52回日本アレルギー学会総会、2002

ハウス症候群医療情報講演会、2002

10) K. Sakabe, “Objective diagnosis for patient with chemical sensitivity”, 3rd International Symposium on Indoor Air Quality, 2003

5) 坂部 貢: 家庭から地球規模までの環境マネジメントーシックハウス、日本薬学会主催市民フォーラム、2002

G. 知的財産の出願・登録状況

3. その他の学術講演

特になし

1) 坂部 貢: 環境ホルモンと子供の健康、愛知県保険医師会公害環境問題講演会、2002

2) 坂部 貢: 化学物質から身を守る、2002市民のための政治スクール、2002

3) 坂部 貢: 住まいと化学物質過敏症、静岡県都市住宅部シックハウス問題に係る研修会、2002

4) 坂部 貢: 化学物質過敏症に関する最新情報、旭川市主催・シック

図タイトル

Fig.1 処方-1における各成分含量の変化(遮光冷所保存条件下)

Fig.2 処方-2における各成分含量の変化(遮光冷所保存条件下)

Fig.3 QEESI(調査問診票)

Fig.4 血清亜鉛 Zn 濃度

Fig.5 全血セレン Se 濃度

Fig.6 血清マグネシウム Mg 濃度

Fig.7 QEESI; Zn 5mg 投与時の投与前後の変化(症状別)

Fig.8 血清 Zn 濃度(30mg と 5mg の比較)

Fig. 1 処方-1における各成分含量の変化
(遮光冷所保存条件下)

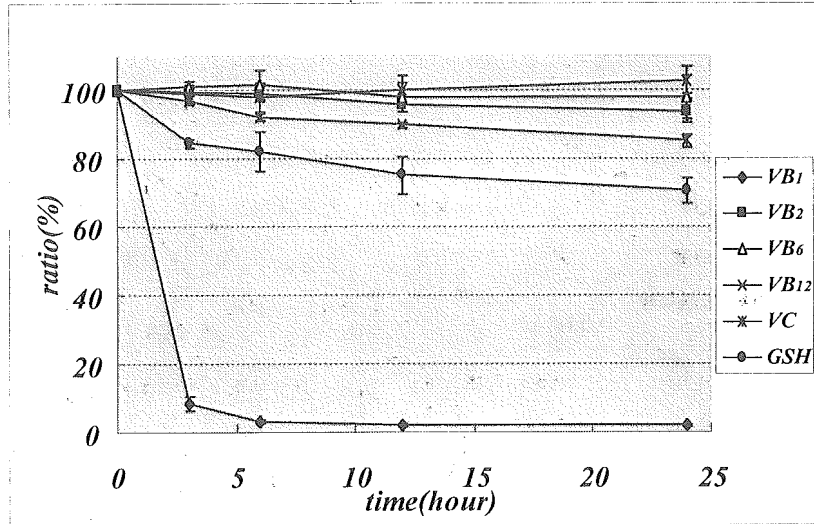


Fig. 2 処方-2における各成分含量の変化
(遮光冷所保存条件下)

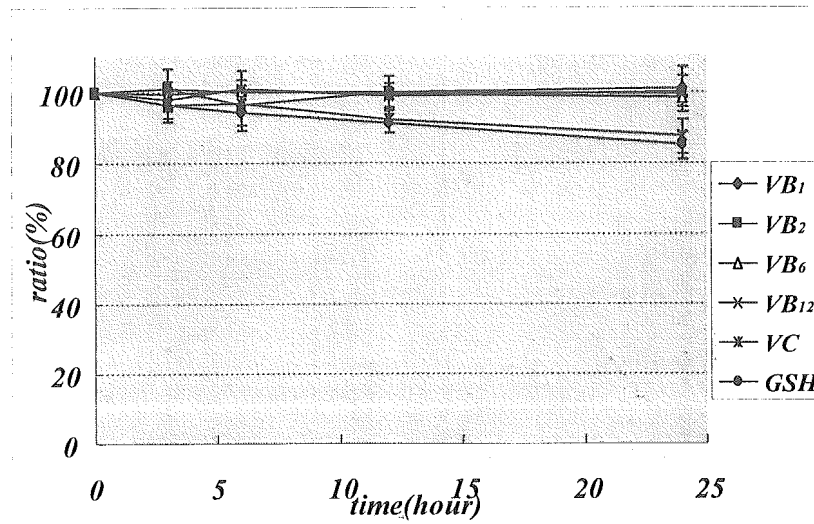


Fig. 3 QEESI (調査問診票)

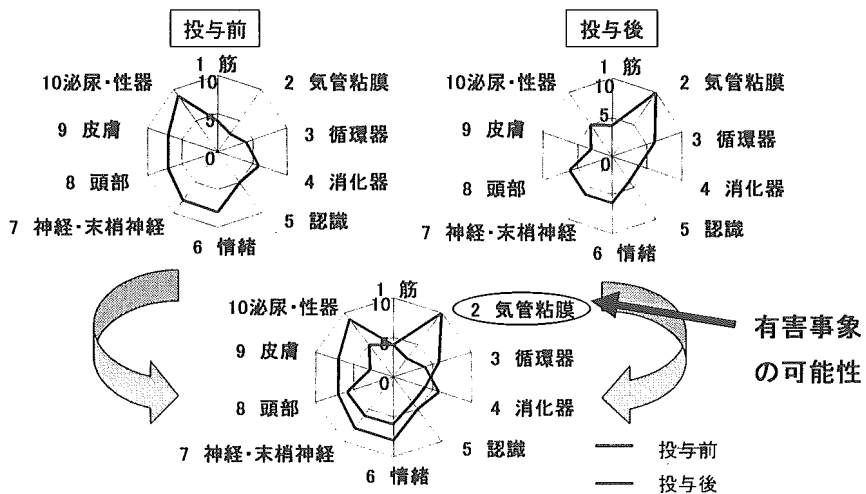


Fig. 4 血清亜鉛 Zn 濃度

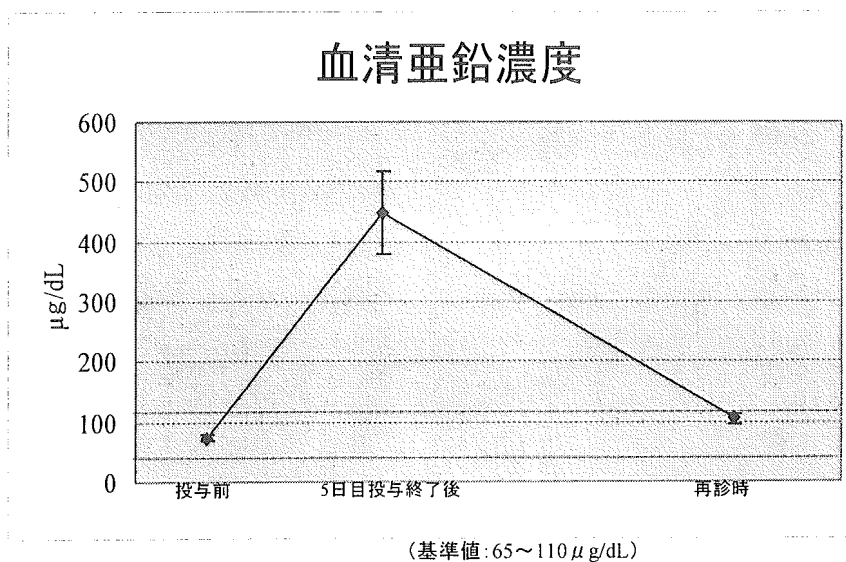


Fig.5 全血セレンSe濃度

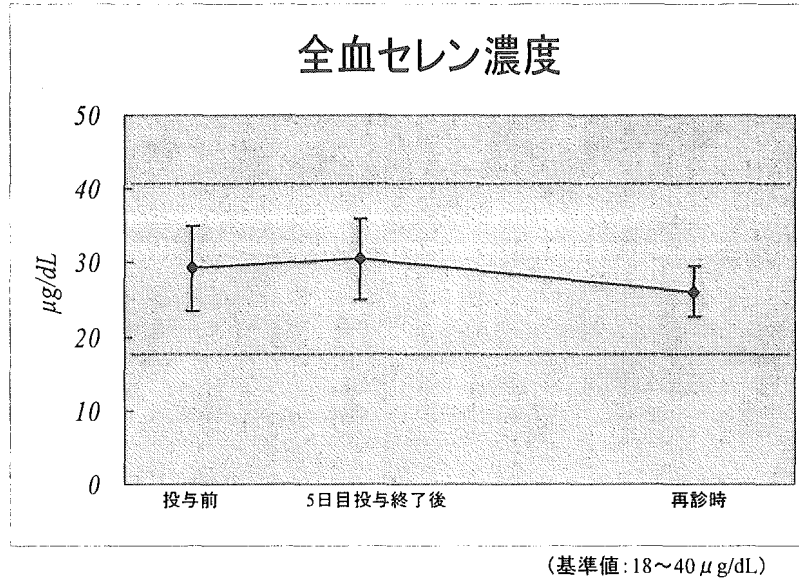


Fig.6 血清マグネシウムMg濃度

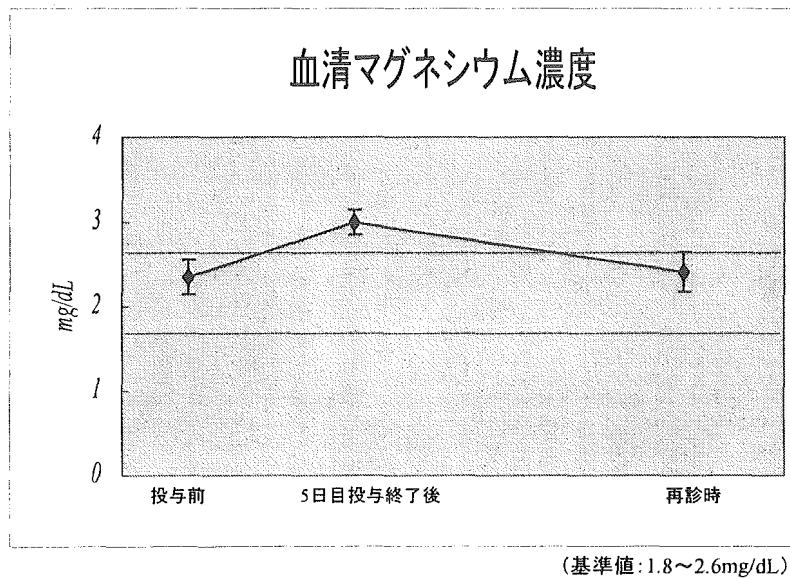
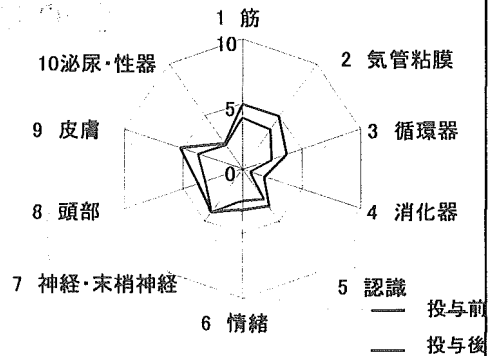


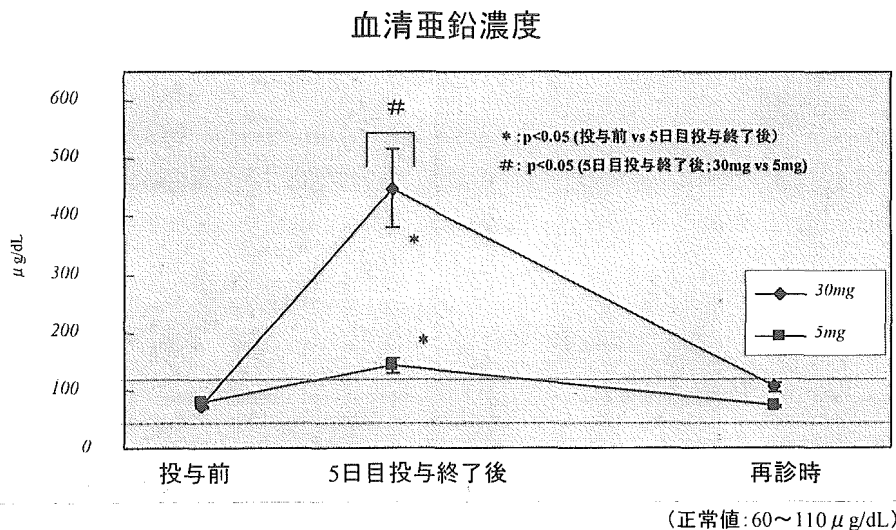
Fig. 7 QEESI; Zn 5mg 投与時の投与前後の変化
(症状別)

	有害事象
患者1	なし
患者5	なし
患者6	頻尿・口渴
患者7	頻尿・口渴
患者8	なし
患者9	なし
患者10	頻尿・口渴



⇒ 30mg投与時のような倦怠感を訴える患者は認められず、QEESI
においても投与前後で点数の増加する項目は認められなかった。

Fig. 8 血清Zn濃度(30mgと5mgの比較)



⇒ 亜鉛30mg投与時に比べ、5mg投与時では
5日目投与終了後の血中濃度は有意に低下した。

低用量フタル酸エステル類の免疫機能に対する影響

石川 哲、坂部 貢、宮田幹夫

(社) 北里研究所・北里研究所病院・臨床環境医学センター

研究要旨

フタル酸エステル類は、厚生労働省による室内空気汚染物質のガイドライン値の設定されている物質として重要であるばかりか、環境省によって内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の疑いのある物質としてもリストアップされている要注意化学物質である。しかしながら、この物質の生体に対する影響、特に一般居住環境で曝露されるような低用量作用についてはほとんど知られていない。そこで本年度の研究では、免疫系に対する作用、1) 特に一次免疫中枢としての胸腺の機能形態にどのような影響を及ぼすかについてラットを用いて検討し、2) さらに本研究の主旨を十分に理解し、同意の得られた12名の成人健常者から得られた末梢リンパ球を用いて、そのサイトカイン反応性に対するフタル酸エステル類の影響について、主として細胞生物学的手法を用いて検討した。1) ラット胸腺に対する機能形態学的影響：ラット胸腺に対する影響：動物は、卵巣を摘出したBDII/Hanラットを用いた。5週齢時に背部皮下にフタル酸エステル類(DBPおよびDEHP)を埋め込み、8週間後に胸腺を取り出し、通常観察・組織化学・サブセット解析に用いた。フタル酸エステル類投与群では、胸腺皮質の著明な退縮が認められ、胸腺細胞（未熟Tリンパ球）の密度も減少した。また、小葉間結合組織の軽度脂肪化も認められた。髄質は、コントロール群と比して大きな形態変化は認められなかった。電子顕微鏡観察では、Tリンパ球のアポトーシス変化が、被膜直下、皮髄境界に数多く観察され、胸腺上皮細胞の細胞質に多数の脂肪滴が観察された。胸腺細胞のサブセット解析では、投与群で、Double Positive細胞(CD4+CD8+)のNegative Selectionが増強された。以上の結果より、フタル酸エステル類は、主として胸腺の皮質に作用し、未熟Tリンパ球の分化・成熟に強い影響を及ぼすことがわかった。2) ヒト末梢Tリンパ球に対する影響：本研究の主旨を十分に理解し、同意の得られた12名の成人健常者（男性6名：女性6名）から得られた末梢血を使用した。血液は、Leuco-Prep（リンパ球分離用溶液）を用いて、総リンパ球分画得たのち、無血清培地のみにて48時間培養した。培養48時間の後、総リンパ球は、CD3-Positive-SelectionカラムでTリンパ球分画のみ採集し、さらにCD4-/CD8-Positive-Selectionカラムを用いてほぼ純粋なCD4リンパ球、CD8リンパ球を得た。培養液中で一定量にしたCD4リンパ球及びCD8リンパ球に、各種濃度に調整したフタル酸エステル類の一つである、フタル酸ジ-n-ブチル(DBP)あるいはフタ

ル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)を添加し24時間培養、引き続きインターロイキン2(IL-2)を添加し72時間培養した。その結果、フタル酸エステル類の添加は、サイトカインに反応したCD8リンパ球において、細胞周期G1期→S期の遂行に重要なPKC活性、S期の遂行に重要なADR活性、M期の遂行に重要なcdc2-kinase活性のいずれの活性も抑制させた。一方、CD4リンパ球は、いずれの因子も今回用いた濃度の範囲では、有意な影響を受けなかった。以上のことから、フタル酸エステル類は、主としてCD8リンパ球に対して影響を及ぼし、その結果としてCD8によるCD4に対する抑制作用が減弱し、免疫機能を攪乱させる可能性が示唆された。

A-1. 研究目的 1.

フタル酸エステル類は、壁材・床材・合成樹脂・合成ゴムの可塑剤などに頻用されている有害化学物質であり、厚生労働省による室内空気汚染物質のガイドライン値の設定されている有害物質として重要であるばかりか、環境省によって内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の疑いのある物質としてもリストアップされている要注意物質である。中枢神経作用に加え、母ラット曝露における新生仔の生殖器の構造異常、ラット経口曝露における精巣への病理学的影響などが報告されている。よって、フタル酸エステル類の「内分泌攪乱物質」としての「免疫応答に対する影響」、即ち「免疫攪乱作用」について注目が集まっている。周知のごとく、「内分泌攪乱物質」の多くは、性ホルモン作用を有しているが、性ホルモン（特にエストロゲン類）による免疫応答の制御に関しては、興味深い報告が多い。例えば、卵巣摘出により移植皮膚片への拒絶時間は延長し、逆にエストロゲン（E）投与で短縮する。またPHA、ConAあるいはpokeweedなどのマイトジェンで誘発されるT細胞の幼若化は、E投与によって抑制される。さらに、胸腺組織は、卵巣摘出すると皮質-髄質の胸腺未熟Tリンパ球（胸腺細胞）の数の増加によって肥大し、逆にE投与によって胸腺細胞の死滅（特に皮質に顕著）、胸腺実質の脂肪変性などの結果、著しく萎縮する。このように、性ホルモンの免疫組織・

器官に対する研究知見は、「性ホルモン動態の変動と免疫応答」という観点から重要な意味をもつ。そこで、体内ホルモンの生理的環境を乱す「内分泌攪乱物質問題」を考えた時、これらの環境化学物質が、免疫系に対してどのような影響を及ぼすかについて情報を得ることが、当然のことながら必要になってくるが、これまでの報告例は皆無に等しい。そこで今回、上述のごとく、厚生労働省の室内濃度ガイドライン値が設定されていると同時に、環境省の内分泌攪乱作用を有する疑いのある物質としてリストアップされているフタル酸エステル類について、この物質の一次免疫中枢としての胸腺に対する作用、特に低用量作用について検討した。

B-1. 研究材料および方法 1.

1) 動物は、エストロゲン（E）高感受性ラットの一種であるBDII/Hanラットを用いた。2) 3週齢にて両側卵巣を摘出し、5週齢時に埋め込み投与用サイラスティック・チューブにフタル酸ジ-n-ブチル(DBP)またはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)を充填し、左背部皮下に埋め込んだ（投与量：約30ng/day）。3) 非投与コントロール群には、同チューブにコーンオイルを充填し、同様に皮下に埋め込んだ。4) 8週間の後、屠殺し胸腺

を取り出した。取り出した胸腺の右葉部は、4%PLP液にて常法通りに固定し、通常観察（光学、走査・透過型電顕）・組織化学に用いた。5）残りの左葉部は、周辺の結合組織等を十分に取り除いた後、常法通りにリンパ球分画と上皮分画に分け、それぞれ胸腺細胞のサブセット解析に用いた。

C-1. 研究結果 1.

1) 光学顕微鏡所見：フタル酸エステル類投与群では、胸腺皮質の著明な萎縮（退縮）が認められ、胸腺細胞の密度も減少した。また、小葉間結合組織の軽度脂肪化も認められた。髄質は、非投与コントロール群と比して大きな形態変化は認められなかった。2) 電子顕微鏡所見：フタル酸エステル類投与群では、マクロファージに取り込まれた胸腺細胞のアポトーシスが、被膜直下、皮髄境界に数多く観察され、非投与コントロール群とは明らかに異なる所見を示した(Figs. a, b)。さらに投与群では、胸腺上皮細胞の細胞質に多数の脂肪滴が観察された。3) 胸腺細胞のサブセット解析では、投与群でダブルポジティブ細胞(CD4⁺CD8⁺)の相対的減少(Control: 84.3%, DBP: 77.5%, DEHP: 80.7%)が認められた。4) 以上の結果より、フタル酸エステル類は、主として胸腺の皮質に作用し、未熟Tリンパ球の分化・成熟に対して、直接的に、あるいは胸腺上皮を介して影響を及ぼすことがわかった。

D-1. 考察 1.

本研究では、いまだ不明な点の多い内分泌攪乱物質の免疫毒性作用について、一次免疫中枢としての胸腺に対する影響をモデルとして検討した。今回投与したフタル酸エステル類も含め、内分泌攪乱物質は何らかのエスロゲン作用を有するものが多い。しかしながら、これら環境化学物質の免疫系に対する影響を調べる以前の問題として、内因性エストロゲンの免疫系に対する作用ですら十分に解明されているとは言えず、今回の研究結果を解明の糸口として今後更なる研究を継続する必要がある。

図の説明

Fig. a: 胸腺皮質：コントロール

胸腺細胞の密集像が認められ、アポトーシス像も認められない。矢印：正常胸腺細胞（拡大：×2,000）

Fig. b: 胸腺皮質：DBP投与

コントロールと比して、胸腺細胞ポピュレーションの低下が認められ、アポトーシス細胞に特徴的なブレブ形成を呈する胸腺細胞が認められる（矢印）。

(拡大：×2,500)

A-2. 研究目的 2.

シックハウス症候群患者における免疫機能検査では、総リンパ球数、Tリンパ球分画の相対比(CD4/CD8 ratio)において異常所見を認める例があり、「総リンパ球数の減少」と「CD8 リンパ球の抑制」は、比較的高い頻度で認められる。

そこで研究目的 2. では、フタル酸エステル類のヒト免疫機能に対する作用について主として細胞生物学的手法を用いて検討し、本症の病態生理学的解釈をする上での有益な情報を得ることを目的とした。

B-2. 研究材料および方法 2.

使用試薬類

Methylthymidine-5'-triphosphate ($^3\text{H-TTP}$) は、New England Nuclear (Boston, MA) より供与された。また添加したフタル酸エステル類であるフタル酸ジ-n-ブチル(DBP)およびフタル酸-2-エチルヘキシル(DEHP)は、(財) 残留農薬研究所より入手したものを使用した。サイトカインとして使用した Interleukin-2(IL-2) は、Sigma Chemical Co. (St Louis, MO) より供給を受けた。その他の試薬類はすべて特級品を用いた。

細胞培養

本研究の目的と結果の取り扱いについて十分に説明、同意を得た健康成人男女12名(男女各6名)から静脈採血を施行した。採取した血液は、末梢リンパ球分離試薬である Leuco-Prep 溶液に注入、

3000rpm で 20 分間遠心した。遠心後、総リンパ球分画のみを採取(1.5×10^6 cells/ml)、無血清 RPMI1640 で 48 時間培養した。48 時間の培養後、CD3-Positive Selection カラムで CD3 陽性細胞(Tリンパ球)を分離、引き続き CD4-あるいは CD8-Positive Selection カラムを通して、ほぼ純粋な CD4(+)T リンパ球と CD8(+)T リンパ球を得た。得られた各種リンパ球は、10%AB 血清加 RPMI1640 培養液(IL-2 含む)にて 72 時間培養した。同時にフタル酸エステル類処理群には、DBP あるいは DEHP を $1.0 \sim 10 \mu\text{M}$ 濃度で添加した。

Protein Kinase C (PKC) 活性の測定

PKC 活性の測定は、Promega PKC detection キット (Madison, WI)を用いた。72 時間の培養後、各ウェルの細胞数を計測し、フリーザーミル(液体窒素ホモゲナイザー)にて細胞を粉砕し、トリス緩衝液にて希釈した。その後、75,000G で 60 分間超遠心分離し、上清をサンプルとした。C1 peptide (PKC によってリン酸化される基質) 反応溶液*に $10 \mu\text{l}$ の各種サンプルを添加し 30 分間反応させた。30 分反応させた溶液は、0.8%アガロースゲルに塗布し、120V で 15 分泳動、Scanning Film-Densitometer(Bio-Rad Japan)で定量化した。

*PKC reaction buffer: 100mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 6.5 mM CaCl_2 , 5 mM DTT, 50 mM MgCl_2 , 5 mM adenosine triphosphate, $0.4 \mu\text{g}$ C1 peptide, 1mg phosphatidyl serine

Activator of DNA Replication (ADR) 活性の測定

ADR 活性は、Sakabe ら方法 (Int. J. Immunopharmacol. 20:205-212, 1998) に従って測定した。72時間の培養後、各ウェルの細胞に低張緩衝液を添加し細胞を膨化させ後、超音波ホモゲナイザーで細胞を粉砕、3000g で遠心の後に上清を採取し、上清の ADR 活性を測定した。裸核にしたアフリカツメガエルの脾細胞と上清を buffer*中で反応させ、この時の ³H-TTP 取り込み量を、ADR 活性の指標とした。

*buffer: 0.5 mM 2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate [dATP], 0.5 mM 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate [dGTP], 0.5 mM 2'-deoxycytidine [dCTP], 5 mM adenosine 5'-triphosphate [ATP], 125 mM phosphoenolpyruvate, 10U pyruvate kinase/ml, 38mM HEPES, 100mM KCl, 125mM sucrose, 12.5mM MgCl₂, 2mM dithiothreitol

p34cdc2 Kinase (cdc2) 活性の測定

cdc2 の測定は、immunoblot 法により行った。

72時間の培養後、各ウェルの細胞を採取、超音波ホモゲナイザーで細胞を粉砕後 800G にて遠心、上清を常法通りに泳動し転写した後、転写膜を酵素免疫反応処理、最終的にバンド定量するために画像解析した。

C-2. 研究結果 2.

フタル酸エステル類(DBP および DEHP)のヒト T リンパ球のサイトカイン反応性に対する影響を細胞

生物学的手法で検討し、表-1、表-2 のような結果が得られた。

表-1

ヒト CD8 リンパ球の PKC 活性、ADR 活性および cdc2 活性に及ぼすフタル酸エステル類の影響

Treatment	PKC activity (ng/culture±SD)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	59.2±6.8	-
IL-2+ DBP	32.5±6.9*	46
IL-2+ DEHP	42.7±4.8*	28
Treatment	ADR activity (cpm/culture±SD)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	12,356±1,318	-
IL-2 + DBP	6,130±927*	51
IL-2 + DEHP	9,765±1,765*	21
Treatment	Cdc2 activity (% expression)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	100±11	-
IL-2 + DBP	62±7*	38
IL-2 + DEHP	77±11*	23

*P<0.01 vs IL-2 alone. The mean percent suppression of PKC, ADR or cdc2 activity was calculated as (1-observed/expected) x 100, where "expected" = IL-2 alone and "observed" = IL-2 plus 1 μM DBP/DEHP.

表-2

ヒト CD4 リンパ球の PKC 活性、ADR 活性および cdc2 活性に及ぼすフタル酸エステル類の影響

Treatment	PKC activity (ng/culture±SD)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	48.6±7.1	-
IL-2+ DBP	46.2±5.7	-
IL-2+ DEHP	47.1±5.2	-
Treatment	ADR activity (cpm/culture±SD)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	9,356±812	-
IL-2 + DBP	9,112±764	-
IL-2 + DEHP	9,448±934	-
Treatment	Cdc2 activity (% expression)	% suppression (vs IL-2 alone)
IL-2 alone	100±7	-
IL-2 + DBP	98±6	-
IL-2 + DEHP	100±9	-

The mean percent suppression of PKC, ADR or cdc2 activity was calculated as (1-observed/expected) x 100, where "expected" = IL-2 alone and "observed" = IL-2 plus 1 μM DBP/DEHP.

D-2. 考 察 2.

本研究では、未だ不明の点の多いフタル酸エステル類のヒト免疫系に対する影響を、細胞生物学的手法を用いて検討した。我々は、昨年度の分担研究報告で、シックハウス症候群患者等、室内空気汚染に伴う微量有害化学物質の影響を受けている患者の免疫プロファイルでは、CD8 リンパ球の減少が60%近くの患者で認められ、その結果として CD4/CD8 ratio が上昇していることを報告した。即ち、本症では、CD8 リンパ球の機能が抑制されることにより、患者の機能的免疫バランスは CD4 リンパ球有意に傾いていると言える。今回のヒトTリンパ球を用いた細胞生物学的解析は、これまでに臨床的上観察されたシックハウス症候群患者に認められた免疫諸現象を、見事に培養系で再現できることを証明しただけでなく、本症患者に比較的高い頻度で観察される一般アレルギーの悪化、甲状腺に関連する自己免疫疾患の有症率の上昇等の病態生理学的解釈に寄与できる新知見と考えられる。しかしながら、「なぜCD8 リンパ球が標的になるか？」についての答えは、未だ不明であり、今後に残された大きな課題である。

E. 結 論

フタル酸エステル類は、ラット未熟Tリンパ球に対しては、女性ホルモンと同様の作用を有することがわかった。また、ヒト末梢Tリンパ球に対しては、主としてCD8 リンパ球の機能を選択的に抑制することにより、免疫応答を攪乱することがわかった。これらの現象は、シックハウス症候群患者に比較的高い頻度で観察される CD8 リンパ球の相対的減少、

CD4/CD8 ratio 上昇の病態を解析する上での有益な知見と思われた。

F. 健康危険情報

建材等の可塑剤として頻用されているフタル酸エステル類は、中枢神経系に作用するだけではなく、極めて微量でもアレルギーの悪化・自己免疫疾患発症等を誘発する可能性をもつ有害化学物質である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 坂部 貢、 “内分泌攪乱物質の免疫系への影響”、最新医学、57(2) : 32-29、2002
- 2) 坂部 貢、 “シックハウス症候群”、水環境学会誌、25(2) : 87-90、2002
- 3) 宮田幹夫、坂部 貢、松井孝子、遠乗秀樹、石川哲、 “多種類化学物質過敏症患者に二重盲検試験と瞳孔”、神経眼科、19(2) : 155-161、2002
- 4) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲、角田和彦、 “シックハウス症候群と脳循環”、神経眼科、19(2) : 162-168、2002
- 5) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲、 “シックハウス症候群の診断と治療の実状”、建築雑誌、117(1491) : 12-14、2002
- 6) 坂部 貢、 “居住環境と健康障害—シックハウス症候群を中心として”、化学と教育、50(11) : 777-779、2002
- 7) 坂部 貢、吉田貴彦、香山不二雄、 “微量環境化学物質と胸腺の微細構造”、Immunotox Letter、7(2) : 3-4、2002
- 8) Y. Fujita, T. Kakuta, M. Asano, J. Itoh, K. Sakabe, T. Tokimasa, A. Saito, “Evaluation of Na⁺ active transport and morphological changes for bioartificial renal cell device using Madin-Darby canine kidney cells ” ,