

表 1. 本調査対象とバックグラウンドレベルにおける先行研究の母体血中 PCB153 の濃度

地域	検体採取時期	検体数	PCB 153 中央値 (ng/g lipid)
アメリカ/ノースカロライナ ⁶⁾	1978-1982	872	80
オランダ/2 地域 ⁶⁾	1990-1992	415	100
ドイツ/デュッセルドルフ ⁶⁾	1993-1995	126	140
アメリカ/11 地域 ⁶⁾	1959-1965	2737	140
北海道・札幌市(本報告)	2002-2004	64	22.9

6) Environ Health Perspect. 2003 Jan;111(1):65-70

表 2. 母体血中 PCB・ダイオキシン類濃度と MDI, PDI との関連性 (n = 134)

	MDI			PDI		
	β^a	t	p-value	β^a	t	p-value
<PCDD>						
2,3,7,8-TCDD	-0.154	-1.755	0.083	-0.125	-1.477	0.142
1,2,3,7,8-PeCDD	0.074	0.847	0.398	-0.063	-0.758	0.450
1,2,3,4,7,8-HxCDD	-0.031	-0.352	0.725	-0.135	-1.608	0.110
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.033	0.365	0.716	-0.074	-0.873	0.384
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.006	0.067	0.946	-0.209	-2.549	0.012 *
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-0.222	-2.418	0.017 *	-0.243	-2.806	0.006 **
OCDD	-0.177	-1.897	0.060	-0.168	-1.895	0.060
<PCDF>						
2,3,7,8-TCDF	-0.053	-0.602	0.548	-0.204	-2.516	0.013 *
1,2,3,7,8-PeCDF	0.014	0.167	0.868	-0.203	-2.512	0.013 *
2,3,4,7,8-PeCDF	0.028	0.314	0.754	-0.069	-0.822	0.413
1,2,3,4,7,8-HxCDF	-0.113	-1.255	0.212	-0.153	-1.807	0.073
1,2,3,6,7,8-HxCDF	-0.101	-1.139	0.257	-0.166	-1.989	0.049 *
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.009	0.106	0.915	-0.074	-0.875	0.383
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	-0.038	-0.438	0.662	-0.093	-1.123	0.264
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OCDF	-0.057	-0.657	0.512	-0.032	-0.385	0.701
<Non-ortho PCBs>						
33'4'4'-TCB(#77)	0.032	0.357	0.721	-0.023	-0.274	0.785
344'5'-TCB(#81)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
33'44'5'-PenCB(#126)	-0.003	-0.032	0.975	-0.138	-1.674	0.097
33'44'55'-HxCB(#169)	0.013	0.147	0.884	-0.097	-1.181	0.240
<Mono-ortho PCBs>						
233'44'-PenCB(#105)	-0.004	-0.047	0.963	-0.112	-1.366	0.174
2344'5'-PenCB(#114)	-0.024	-0.277	0.782	-0.132	-1.607	0.111
23'44'5'-PenCB(#118)	-0.016	-0.182	0.856	-0.137	-1.671	0.097
2'344'5'-PenCB(#123)	0.033	0.379	0.705	-0.108	-1.307	0.194
233'44'5'-HexCB(#156)	0.001	0.008	0.994	-0.099	-1.201	0.232
233'44'5'-HexCB(#157)	-0.038	-0.431	0.667	-0.141	-1.723	0.087
23'44'55'-HexCB(#167)	-0.012	-0.140	0.889	-0.135	-1.652	0.101
233'44'55'-HpCB(#189)	-0.102	-1.182	0.239	-0.136	-1.662	0.099
<Di-ortho PCBs>						
22'33'44'5'-HpCB(#170)	-0.027	-0.310	0.757	-0.132	-1.612	0.109
22'344'55'-HpCB(#180)	-0.021	-0.246	0.806	-0.086	-1.042	0.299
<Total>						
Total PCDD	-0.234	-2.649	0.009 **	-0.144	-1.686	0.094
Total PCDF	-0.048	-0.535	0.594	0.071	0.833	0.407
Total PCDD/PCDF	-0.220	-2.485	0.014 *	-0.090	-1.046	0.298
Total non-ortho PCBs	0.032	0.365	0.716	-0.006	-0.076	0.939
Total mono-ortho PCBs	-0.014	-0.165	0.869	-0.136	-1.663	0.099
Total co-planar PCB	-0.013	-0.155	0.877	-0.135	-1.650	0.101
Total	-0.022	-0.247	0.805	-0.130	-1.584	0.116
<WHO-98>						
Total PCDDs-TEQ	0.046	0.522	0.603	0.004	0.043	0.966
Total PCDFs-TEQ	0.016	0.182	0.856	0.057	0.671	0.503
Total PCDDs/PCDFs-TEQ	0.037	0.419	0.676	0.032	0.378	0.706
Total non-ortho PCBs-TEQ	0.020	0.233	0.816	-0.017	-0.204	0.838
Total mono-ortho PCBs-TEQ	-0.011	-0.123	0.902	-0.127	-1.544	0.125
Total co-planar PCBs-TEQ	0.032	0.371	0.711	-0.053	-0.636	0.526
Total TEQ	0.049	0.550	0.583	0.007	0.080	0.936

重回帰分析. PCB・ダイオキシン濃度は log 変換して使用. 在胎日数, 採血時期, 妊娠中の喫煙の有無, 妊娠中のカフェイン摂取量で調整. * p < 0.05; ** p < 0.01

分担研究報告書

ダイオキシンが男性生殖機能に与える影響に関する予備的検討

分担研究者 岩本晃明 聖マリアンナ医科大学泌尿器科 教授

研究要旨 健常若年男性のダイオキシン類の曝露状況を把握し、併せてダイオキシン類の男性生殖機能への健康影響を評価することを目的に、43名の男子大学生ボランティアに対し、身体的所見（精巣容積の測定、男性生殖奇形の有無等）の診察、ダイオキシン類の測定ならびに内分泌検査のための採血、および精液検査を行った。採血と精液検査は、個人内変動をみるために1か月以内に3回実施した。平成17年10月より開始した調査の平成18年2月15日現在での途中経過を報告する。

A. 研究目的

ダイオキシンが男性生殖機能に与える影響に関する予備的検討として、日本人健常若年男性の血液中のダイオキシン類濃度を測定し、それらにどの程度曝露されているか明らかにする。また、ダイオキシン類濃度と男性生殖機能のパラメータ（精巣の容積や生殖器の異常の有無、精液検査結果、内分泌検査（各種性ホルモン値測定）結果ならびに所見や各種性ホルモン値）との関連について分析するとともに、ダイオキシン類濃度の個人内変動について検討する。

B. 研究方法

対象：川崎市内の大学において、ポスターとパンフレットを使って本研究への参加を呼びかけた。参加資格は18～24歳の男子大学生、本人とその母親が日本で生まれていることとした。対象者に対する検査は1か月間に3回実施した。1回目は質問表への記入、身体所見診察と

精液検査および採血を行い、2回目と3回目は精液検査と採血のみを行った。

倫理面への配慮：参加希望者には研究目的、研究方法、プライバシーの保持等に関する文書による説明を行い、文書による同意を得た後に検査を行った。なお、本研究は聖マリアンナ医科大学倫理委員会の承認の下に行なわれた。なお、調査参加者への連絡ならびに当日の応対等は看護師または臨床検査技師の資格をもつ調査コーディネータが対応した。

質問票：参加者に質問票の記入を依頼し、出生地・居住地・生活環境・健康状態・既往歴・食生活・生活習慣等に関する情報を得た。

身体所見診察：一回目の検査（採血と精液検査）外性器発育の程度を評価するため、陰毛発育の程度、精巣容積とその位置、精巣腫瘍の有無、精管の有無、精索静脈瘤の有無などを泌尿器科医が視・触診にて診察した。

採血:採血量は1回につき35 mlとし、調査参加時点から1か月以内に3回の採血を実施した。全血14 mlをダイオキシン類測定用試料として、採血後4°Cで保存し、1週間以内に福岡県保険環境研究所(担当:飯田隆雄先生)に送付した。残りの血液のうち7 mlは全血(DNA解析用、1回目のみ採取)のまま、残りは血清(内分泌検査用)として、それぞれ使用までの間、-80°Cで凍結保存した。

精液検査:事前に48時間以上の禁欲期間を置くこと説明し、検査当日にマスターベーションにより精液を採取した。実際の禁欲期間は調査コーディネータが個々に聞き取って記録した。WHOマニュアルに準じた標準的な精液検査方法により、精液量、精子濃度、精子運動率を測定した。精液検査は熟練した4名の技師が担当した。精液検査は1か月以内に3回実施した。

C. 研究結果と考察

平成17年10月から平成18年2月の期間に43名の男子大学生が調査に参加した。検査の進捗状況は、そのうち14名が期間中に3回の検査を終了し、34名が2回目までの検査を終了した。参加者の年齢(平均±SD)は20.3±1.5歳、身長と体重はそれぞれ175.2±6.2 cmと67.1±8.9 kgだった。

精巣容積の平均値±SD(最小値/中央値/最大値)は、右側が23.2±2.6(17/24/28)ml、左側が22.8±2.8 ml(16/24/28)mlであった。3回の精液検査結果の平均値±SD(最小値/中央値/最大値)は、1回目(n=43)が、精液量(ml):2.5

±1.4(0.6/2.2/6.5)、精子濃度:73.5±53.7(1.7/67.7/222.2)×10⁶/ml、運動率(%):61.3±14.9(9/62/87)、2回目(n=34)が、精液量(ml):2.5±1.0(0.8/2.7/4.7)、精子濃度:57.0±45.9(1.8/44.5/205.3)×10⁶/ml、運動率(%):57.6±16.3(13/61/82)、3回目(n=14)が、精液量(ml):2.5±1.0(0.8/2.4/4.6)、精子濃度:66.5±46.4(1.2/54.6/173.0)×10⁶/ml、運動率(%):61.2±13.8(12/61/83)であった。今後はダイオキシン濃度の測定結果と各種ホルモン値の測定結果を待って、ダイオキシン濃度と生殖機能のパラメータとの関連について検討したい。ダイオキシン濃度においては、多数例について同一個体で3回測定された例は報告されていないので、測定値の安定性や個人内変動について詳細に検討したい。

E. 結論

平成17年10月より、川崎市の大学に在籍する43名の男子大学生を対象に、身体的所見(精巣容積の測定、男性生殖奇形の有無等)の診察、ダイオキシン類の測定ならびに内分泌検査のための採血、および精液検査を行い、平成18年2月15日現在での途中経過を報告した。

F. 健康危険情報

認めない。

G. 研究発表

1.

文発表
なし

2.

会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

ダイオキシンが男性生殖機能に与える影響に関する予備的検討

分担研究者 中堀 豊 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
分子予防医学分野 教授

研究要旨 ダイオキシンの血中濃度と精子濃度の関連を見る研究の一環において、その遺伝的側面に関して研究を行った。精子形成に関わる遺伝子をもつとされる Y 染色体の DNA 多型による男性の分類、3 番染色体上の DAZL 遺伝子の多型等について解析をおこなう方法を確立した。実際のダイオキシン濃度と精子濃度の両方のそろった検体の解析は始まったばかりであり、統計的解析などには進んでいない。

A. 研究目的

ダイオキシンがヒト生殖機能に与える影響として、巷間さまざまなことが言われているが、実際に科学的に確認されている現象はほとんどない。ヒトでは実験系が組めないため、事故によるケースで性比（男子：女子の出生比）の変化が報告されてはいるが、真偽も含めて、特に長期的影響については全く未解明である。そこで、ダイオキシンと男性の生殖機能を明らかにするための方法論について予備的に検討した。

B. 研究方法

精子濃度とダイオキシン血中濃度との関連を若年男性において観察するための研究が当研究班内で行われている。この研究に加わり、遺伝的背景を加味して統計的手法でダイオキシンの影響があるかどうかを判断する。

男性が属する遺伝的集団（Y 染色体の系譜）によって、男性の造精能力に差があるという私たちが提出した考え方

（Kuroki et al, 1999）が、世界的に定着しつつある。そこで、本研究で解析されている日本人若年男性の Y 染色体の分類および細分類を世界的な分類の中に位置づけるための DNA 解析を行って男性集団間の精子濃度の差異をみる。

（倫理面への配慮）

本研究で使われる若年男性の検体の採取はインフォームドコンセントの下に聖マリアンナ医科大学で行われている。徳島大学においては非連結匿名化されたサンプルの DNA 解析を行うが、Y 染色体染色体の解析に対する大学ゲノム倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

本研究においては、若年男性集団の検体採取が始まったばかりでまだ 5 検体しか解析に供していない。したがって、データはこれから出るものであり、現段階では統計的な処理までは至っていない。

ただし、以前から聖マリアンナ医科大

学などとの共同で集められた(ダイオキシンが測定されていない) ボランティアの精子濃度と Y 染色体多型, また無(乏)精子症の患者と Y 染色体多型に関する研究としては以下のような進展があった。

日本人における精子濃度の季節的変動に関しては, 「Y 染色体からみた日本人」(岩波書店: 科学ライブラリー) に大枠を記した。

また, 精子形成に関連する遺伝子として染色体 3p24 に存在する DAZL 遺伝子の多型解析を行い T12A の多型が無精子症の患者では乏精子症の患者に比べて有意に高いことを報告した (Yang X-J et al, 2005)。

これらの解析をするための方法論として, Microchip 電気泳動で短時間に簡単に DNA が分離できる方法も開発してきた。(Jabasini M et al, 2005)

Y 染色体上の HSFY (Heat Shock factor on Y) 遺伝子は興味深い遺伝子であり, 先年その性質を報告した (Shinka T et al, 2004) が, 続いてマウスでの相当する遺伝子の解析も行っている。この遺伝子は高温に対応して, 細胞内のタンパクを安定化させ, 細胞を守ろうとするタンパク HSP (Heat Shock Protein) の発現調節に関わる遺伝子と類似の遺伝子である。

D. 考察

ヒトの精子濃度は常に一定ではなく, 一人の男性においても, 検査の時期, 検査前の射精状況で大きく変動するようである。また, 我々が報告しているように皆が共通ではなく, 遺伝的背景によって異なるようである。このような変動の影響を考慮した上で, ダイオキシンの血

中濃度とそれが男性の精子形成に与えている影響を推定しなければならない。そのためには, ダイオキシン暴露集団と非暴露集団の比較をする際に, 症例対照をきわめて厳格な管理の下で比較するか, 対象集団をきわめて大きく設定するかが必要であると思われる。

E. 参考文献

Kuroki, Y., Iwamoto, T., Lee, J.W., Yoshiike, M., Nozawa, S., Nishida, T., Ewis, A.A., Nakamura, H., Toda, T., Tokunaga, K., Kotliarova, S.E., Kondoh, N., Koh, E., Namiki, M., Shinka, T., Nakahori Y.: Spermatogenic ability is different among males in different Y chromosome lineage. *J. Hum. Genet.* 44:289-292, 1999.

Shinka T., Sato Y., Gang Chen, Naroda T., Kinoshita K., Unemi Y., Tsuji K., Toida K., Iwamoto T., Nakahori Y.: Nakahori Y.: Molecular characterization of HSFY, HSF-like factor encoded on the human Y chromosome, and implications for male infertility. *Biol. Reprod.*, 71:297-306, 2004.

Yang XJ, Shinka T, Nozawa S, Yan HT, Yoshiike M, Umeno M, Sato Y, Chen G, Iwamoto T, Nakahori Y. Survey of the two polymorphisms in DAZL, an autosomal candidate for the azoospermic factor, in Japanese infertile men and implications for male infertility. *Mol Hum Reprod.* 11:513-515, 2005.

Jabasini M, Ewis AA, Xu F, Mohamadi MR,

Ping G, Shinka T, Nakahori Y, Baba, Y.
Multiplex PCR with multichannel
microchip electrophoresis: an
ultrafast analysis for genetic
diseases. *J Chromatogr. Sci.* 43:221-5,
2005.

Jabasini M, Ewis AA, Xu F, Ping G,
Fouad M, Shinka T, Nakahori Y,
Ishikawa M, Baba Y.: Ultrafast
diagnosis of the genetic-related
disorders using the combined
technologies of multiplex PCR and
multichannel microchip
electrophoresis. *Anal. Sci.* 21:
1537-1539, 2005.

Shinka T., Sato Y., Gang Chen, Naroda
T., Kinoshita K., Unemi Y., Tsuji K.,
Toida K., Iwamoto T., Nakahori Y.:
Nakahori Y.: Molecular
characterization of HSFY, HSF-like
factor encoded on the human Y
chromosome, and implications for male
infertility. *Biol. Reprod.*,
71:297-306, 2004.

中堀 豊：Y 染色体からみた日本人、岩
波科学ライブラリー、2005年9月、岩波
書店

分担研究報告書

油症原因物質等の体外排泄促進に関する研究

分担研究者 長山 淳哉 九州大学医学部保健学科 助教授

研究要旨 現在でもカネミ油症患者体内に高濃度で残存する原因物質を体外へ積極的に排泄することが患者の健康障害の改善に最も有効である。動物実験では食物繊維と葉緑素にダイオキシン類の体外排泄促進作用が示されている。そこでこの研究では食物繊維と葉緑素を多量に含む栄養補助食品である株式会社キューサイの青汁にそのような作用が認められるかどうか、10組の夫婦の協力により検討した。その結果、1年間の青汁摂取によりカネミ油症の原因物質であるノンオルソ PCBs の体内負荷が1人当りにして平均 22 TEQ-ng 減り、またダイオキシン類でも 128 TEQ-ng 減少した。一方、青汁を摂取していないグループでは同じ期間でノンオルソ PCBs は1人当り 11 TEQ-ng、ダイオキシン類は 91 TEQ-ng の体内負荷の改善が認められた。これを1人1日当りの平均減少量にすると青汁摂取グループのノンオルソ PCBs では 60 TEQ-pg となり、ダイオキシン類では 353 TEQ-pg となる。また青汁非摂取グループではノンオルソ PCBs は 30 TEQ-pg、ダイオキシン類は 248 TEQ-pg となる。このように青汁の摂取により油症原因物質であるノンオルソ PCBs とダイオキシン類の体外への排泄がそれぞれ2倍と1.4倍高まることが認められ、青汁が患者の健康障害改善に有効と考えられた。

A. 研究目的

カネミ油症の原因物質はノンオルソ PCBs やダイオキシン類 (PCDDs + PCDFs + Co-PCBs) である。油症発症以来 36 年以上にわたって患者を苦しめているこの猛毒物質による健康障害を少しでも改善するための最善の方策は体外への積極的な排泄促進である。これまでの動物実験による知見では食物繊維や葉緑素がダイオキシン類を吸着し、消化管での吸収と再吸収を抑制し、体外への排泄を促進することが示唆されている^{1) 2) 3)}。そこで、この研究では食物繊維と葉緑素を比較的少量に含む栄養補助食品によるダイオキシン類の体外への排泄を血液の汚染レベルにもとづく体内負荷量の変化を指標として調べた。

B. 研究方法

この研究で用いた食物繊維と葉緑素を多量に含む栄養補助食品は株式会社キューサイ(本社：福岡県福岡市)が 20 年以上にわたって製造・販売している青汁である。

被験者は健康なボランティアの夫婦 10 組で、各夫婦に青汁摂取グループと非摂取グループに分かれてもらった。その結果、青汁摂取グループでは男性；5 人、女性；5 人で平均年齢は 44.6 歳となり、非摂取グループでは男性；5 人、女性；5 人で平均年齢は 44.3 歳となった。

この両グループについて、青汁摂取前のノンオルソ PCBs およびダイオキシン類による汚染レベルを調べる目的で 1 週間以内に 2 回の採血 (1 回当りの採血量は約 100ml) を行い、それらの濃度を平均して摂取前の各自の汚染

レベルとした。

このようにして研究開始前のノンオルソ PCBs とダイオキシン類による汚染レベルの判明したボランティアに対して、青汁摂取グループでは毎日毎食後 1 人当り 90ml の青汁を飲んでいただいた。この他は摂取グループでも非摂取グループでも毎日自由に喫食した。

青汁の摂取開始 1 年後に、再び 1 週間以内に 2 回の採血を行い、それらの平均濃度を 1 年後の汚染レベルとした。これと摂取前のレベルを比較することにより、青汁によるノンオルソ PCBs とダイオキシン類の体外排泄促進作用を評価した。

C. 研究結果

青汁摂取グループの摂取前のノンオルソ PCBs とダイオキシン類の血液の平均汚染レベル±標準偏差(以下同様)は脂肪重量当りそれぞれ 9.9 ± 4.3 TEQ-pg/g と 37.4 ± 11.0 TEQ-pg/g であった。また摂取 1 年後の両者の汚染レベルはそれぞれ 8.1 ± 2.7 TEQ-pg/g と 26.6 ± 10.0 TEQ-pg/g に減少した。この結果青汁摂取グループでは摂取前と比べ、ノンオルソ PCBs とダイオキシン類の汚染レベルはそれぞれ 18.4% と 28.7% 低下した。

一方、青汁非摂取グループの研究開始前の汚染レベルはノンオルソ PCBs が 10.3 ± 5.4 TEQ-pg/g であり、ダイオキシン類は 37.6 ± 14.4 TEQ-pg/g であった。そして 1 年後のそれぞれの汚染レベルは 9.4 ± 6.0 TEQ-pg/g と 30.0 ± 12.3 TEQ-pg/g に低下した。このように青汁非摂取グループでも 1 年後にはノンオルソ PCBs とダイオキシン類による汚染レベルは下がっており、低下率はそれぞれ 8.8% と 20.1% であった。

D. 考察

青汁摂取グループと非摂取グループの低下率を比較すると、ノンオルソ PCBs では 18.4% : 8.8% であり、ダイオキシン類では

28.7% : 20.1% となる。このことから青汁を 1 年間飲んだほうが汚染の改善度合いが大きく、青汁がこれらのダイオキシン類の吸収と再吸収を抑制し、体外への排泄を促進し、体内汚染レベルを下げたと考えられる。つまり、青汁はダイオキシン類による汚染を改善するのに有効と判定される。

人体内でダイオキシン類が最も偏在しているのは脂肪組織である。ここで血液の脂肪当りの濃度で体内の脂肪組織がダイオキシン類により汚染されていると仮定して、青汁の摂取による体内負荷量の変化を考えてみる。体重が 60kg の場合、体脂肪率を 20% とすると体内には 12 kg の脂肪が存在することになる。そしてこの脂肪が上記の濃度のダイオキシン類で汚染されているとする。

まず青汁摂取グループの場合、摂取前の体内に存在するノンオルソ PCBs の量は 1 人当り 119 TEQ-ng であり、ダイオキシン類は 448 TEQ-ng である。そしてこれが 1 年後にはそれぞれ 97 TEQ-ng となり、320 TEQ-ng となる。つまり、この 1 年間に 1 人当りノンオルソ PCBs は 22 TEQ-ng 減り、ダイオキシン類は 128 TEQ-ng 減ったことになる。これを 1 人 1 日当りにするとノンオルソ PCBs とダイオキシン類はそれぞれ 60 TEQ-pg と 353 TEQ-pg 減っている。

これと同様の計算を青汁非摂取グループでも行う。そうすると、ノンオルソ PCBs では 1 人当り 124 TEQ-ng の体内負荷量が 113 TEQ-ng となり、11 TEQ-ng 減少している。また、ダイオキシン類では 451 TEQ-ng が 360 TEQ-ng となっているので、91 TEQ-ng 下がっている。これらを 1 人 1 日当りにするとノンオルソ PCBs は 30 TEQ-pg となり、ダイオキシン類は 248 TEQ-pg となる。

この 1 人 1 日当りの排泄量を両グループで比較すると、ノンオルソ PCBs では 60 TEQ-pg と 30 TEQ-pg だから、青汁摂取グループのほうが日々の排泄量は 2.0 倍多い。また、ダイ

オキシン類では 353 TEQ-pg と 248 TEQ-pg だから、摂取グループのほうが 1.4 倍低下している。このように毎食後 90ml の青汁を飲むことにより、ノンオルソ PCBs とダイオキシン類の体内負荷量がそれぞれ 2 倍、1.4 倍速いスピードで改善・低下していた。

以上のような研究結果より、青汁はカネミ油症原因物質の体内汚染レベルを積極的に下げるので、油症患者の健康障害改善にも有効と考えられる。

E. 参考文献

- 1) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄: ラットにおける Polychlorinated Dibenzop-dioxins の糞中排泄に対する食物繊維の効果. *衛生化学*, 43, 35-41 (1997).
- 2) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄: ラットにおける Polychlorinated dibenzo-p-dioxins の糞中排泄に対するクロレラ, スピルリナ及びクロロフィリンの効果. *衛生化学*, 43, 42-47 (1997).
- 3) 森田邦正: 食物繊維による体内ダイオキシン類の排泄促進. *生活と環境*, 43, 39-44 (1998).

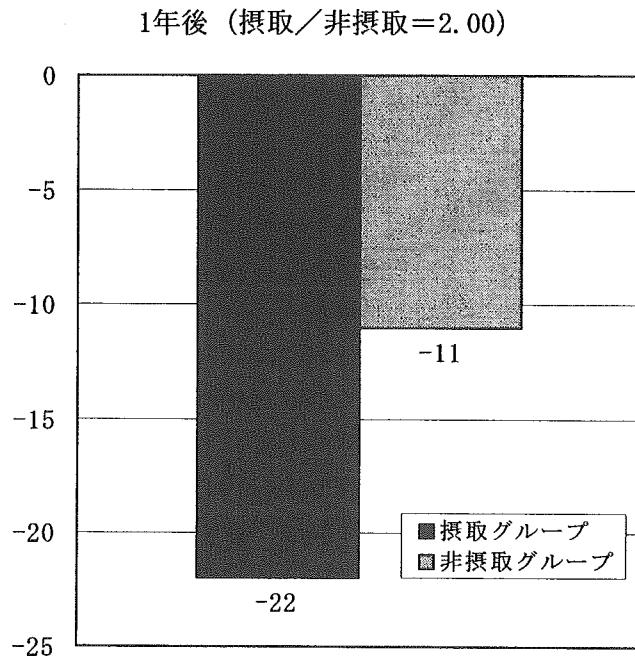


図1. 青汁によるノンオルソ PCBs の体外排泄促進 (TEQ-ng/人・年)

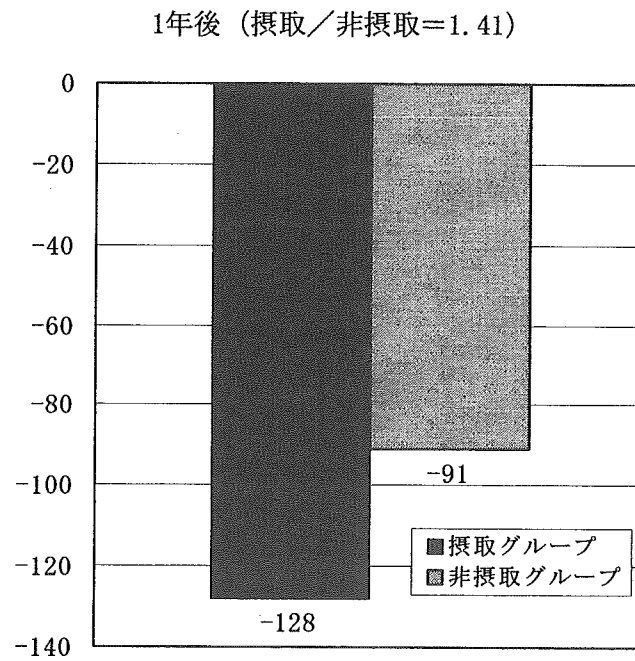


図2. 青汁によるダイオキシン類の体外排泄促進 (TEQ-ng/人・年)

分担研究報告書

食品成分によるダイオキシン毒性軽減の試み：レスベラトロールによる ダイオキシン誘発性脂肪肝の軽減

分担研究者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 教授
研究協力者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助教授
石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助手

研究要旨 赤ワインやピーナッツの渋皮に含まれるポリフェノール、レスベラトロールは、*in vitro* あるいは腹腔内投与でダイオキシン作用に拮抗することが示唆されているが、その効果は良く分かっていない。本研究では、レスベラトロールを経口投与した場合にダイオキシン毒性を軽減できるか否かを検討した。

C57BL/6J 雄性マウスにレスベラトロール 20 mg/kg (p.o.)を前投与したのち、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)を 100 μ g/kg (p.o.)投与した。その後、27 日間毎日レスベラトロール投与を行った。それぞれの単独処理群およびコントロール群についても検討を行った。体重変化を経日的に記録し、最終投与 24 時間後に肝臓を摘出し、肝臓の ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)活性、チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS)およびトリグリセリド含量について比較検討を行った。

レスベラトロールの併用は、TCDD による体重増加抑制作用を弱いながら有意に軽減したが、Ah-レセプターを介したシトクロム P450 1a1 (Cyp1a1)の誘導指標である EROD 活性の誘導の抑制は認められなかった。TCDD 処理により肝トリグリセリド含量が有意に、また著しく増加しており、脂肪肝が惹起されたことが示唆された。しかし、興味深いことに、レスベラトロール併用により TCDD による肝トリグリセリド含量の上昇は有意に軽減された。また、酸化的ストレス、脂質過酸化の指標である肝 TBARS は TCDD 処理により有意に増加したが、レスベラトロール併用により有意に低下した。このようにレスベラトロールが、*in vivo* でもダイオキシン毒性を一部軽減し得ることが初めて明らかになった。レスベラトロールは抗酸化作用によりダイオキシンによる酸化的ストレスを軽減することを通じて、脂肪肝軽減作用を示す可能性が考えられた。

A. 研究目的

1968 年に西日本一帯で起こった油症では、ポリ塩化ジベンゾフランを中心としたダイオキシン類が混入したオイルを摂取したことが、毒性発現の主な原因であると考えられている (1)。油症発症から 37 年が経過した現在で、客観的な症状は改善され

てきてはいるものの、油症患者の血中のダイオキシンレベルは健常人に比べて高い値を示している (2)。また、ダイオキシン類は、その高蓄積性及び難分解性から、ヒトへの影響が危惧されており、このような状況下で、ダイオキシン類の毒性の軽減や予防方法の構築は、重要な研究課題の一つ

でもある。これまでに当研究室では、geranylgeranylacetone (GGA) による体重増加の抑制と致死性の軽減 (3) や、クルクミンやケルセチンによる体重増加の抑制の軽減などが報告されている (4, 5)。予防を目的として考えた場合、これらの物質のように、その安全性とともに、日常的に摂取可能であることが要求されるが、食品中の成分はこれらを満足する候補として考えることができる。

Fig. 1 に示す、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 等のダイオキシン類は、体重減少、肝臓肥大、胸腺の萎縮、酸化ストレスの増加、シトクロム P450 1A1 (Cyp1a1) などの薬物代謝酵素の誘導など、多面的な生体影響を引き起こすことが報告されている (6-9)。これらの毒性発現の多くは、その受容体であるとともに、転写調節因子でもある、aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介していることが多くの研究から支持されている (6-9)。また一般的に、酸化ストレスの増加は脂肪肝につながると考えられており、実験動物をダイオキシン類に曝露した場合にも酸化ストレスや脂肪肝が惹起されることが知られている。そして、これが二次的な毒性につながる懸念される。

赤ワインやピーナッツの渋皮に多く含まれている、植物性ポリフェノールの一つとして、*trans*-レスベラトロール (レスベラトロール) がある。Fig. 2 にはその構造を示している。レスベラトロールは *in vitro* あるいは腹腔内投与でダイオキシンによる毒性を軽減することが示唆されている (10)。そして AhR のアンタゴニストである

との考え方が普及しており、この前提でいくつもの研究が展開されている (11; references therein)。また、ポリフェノールであるレスベラトロールは抗酸化作用を有するとの報告があり、ダイオキシン誘発性の酸化ストレス増加の抑制が大いに期待される (11)。しかし通例食品は経口で摂取するが、現時点では、経口投与での検討の報告はない。そこで本研究ではレスベラトロールを経口投与した場合の、ダイオキシン毒性の軽減効果についての検討を行い、TCDD 誘発性脂肪肝への影響を検討した。

B. 方法・結果

予備的検討として、C57BL/6J 雄性マウスにレスベラトロールを 14 日間単独投与し、適切な投与量を 20 mg/kg (p.o.) に決定した。併用実験では、レスベラトロール 20 mg/kg (p.o.) を前投与した後、TCDD を 100 μ g/kg (p.o.) 投与した。その後、27 日間毎日レスベラトロール投与を行った。それぞれの単独処理群およびコントロール群についても検討を行った。体重変化を経日的に記録し、最終投与 24 時間後に肝臓を摘出し、肝臓の ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) 活性、チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS)、トリグリセリド含量およびグルタチオン含量について比較検討を行った。有意差の検定は Fisher の PLSD で行った。

1) レスベラトロール単独投与の影響 (予備的検討)

レスベラトロール併用による TCDD の

毒性軽減の検討を行う前に、まず レスベラトロールの投与量を決定するために、予備実験を行った。レスベラトロールはラットに対して高用量の 3,000 mg/kg で腎毒性を示すと報告されている、一方、300 mg/kg/day でははっきりとした毒性は観察されていない (12)。ここではそれに比べるとさらに低用量の 1, 10 および 20 mg/kg の 3 種類の投与量を選択した。レスベラトロールを 14 日間連続経口投与し、最終投与から約 24 時間後にサンプリングを行った。ここではダイオキシンの毒性指標を適用し、経日的体重変化量、肝臓・脾臓・胸腺の湿重量を計測した。酸化ストレスの指標として TBARS および AhR を介した Cyp1a1 誘導の指標として EROD 活性を測定した。なお、レスベラトロールは調製後数時間で褐色を帯び、翌日には完全に褐色に変化していたことから、酸化されやすい性質であることが分かった。よって、投与する レスベラトロールは投与直前に 0.2% Tween 80/ 0.5% methylcellulose 溶液に懸濁して調製し、対照群の動物にはレスベラトロールの懸濁に用いた溶液のみを投与した。また、投与用量は 1 kg 当たり 5 mL とした。

予備実験の投与スケジュールを Fig. 3 に示す。Fig. 4 には投与期間中におけるマウスの経日的体重変化量を示す。経日的体重変化量は投与初日の体重を基準としている。最初の 6 日間は、体重が有意に増加したが、14 日後では有意な差はなくなっていた。それぞれの群の投与開始の平均体重は、対照群は 16.40 g \pm 0.28 g、レスベラトロール 1 mg/kg の群は 16.68 g \pm 0.14

g、10 mg/kg の群は 16.32 g \pm 0.35 g、20 mg/kg の群は 16.62 g \pm 0.35 g、であった。

各種臓器重量 (Table 1)、EROD 活性 (Fig. 5) には 4 群間で有意な差はみられなかった。一方、TBARS では 10 mg/kg を投与した群において有意な上昇がみられた (Fig. 6)。しかし、レスベラトロールの体内からの消失が速いことを考え、ほぼ無毒性で、なるべく多い投与量として 20 mg/kg を採用した。

2) レスベラトロールによる TCDD 毒性軽減効果

レスベラトロール併用による、TCDD の毒性軽減効果の検討を行った。Fig. 7 にはこのときの投与スケジュールを示している。TCDD の用量は当教室の検討で体重増加抑制が観察されることが明らかとなっている、100 μ g/kg とした (3)。C57BL/6J 雄性マウスにレスベラトロール 20 mg/kg を経口投与し、その約 1 時間半後に TCDD 100 μ g/kg を単回経口投与した。対照としてレスベラトロールに対しては 0.2% Tween 80/ 0.5% methylcellulose 溶液を、TCDD に対してはコーンオイルを投与した。この日を初回投与日として翌日から体重測定後に、20 mg/kg のレスベラトロールを 27 日間毎日 1 回、連続経口投与した。そして最終投与から約 24 時間後にサンプリングを行った。レスベラトロールの効果は、TCDD の毒性指標への影響として検討した。すなわち、経日的体重変化量、肝臓、脾臓、胸腺の重量、TBARS の変動、EROD 活性、肝臓中の トリグリセリド 含量および肝臓中の グルタチオ

ン含量を測定した。

Fig.8 に、その時の経日的体重変化を示している。それぞれの群の投与開始の平均体重は、対照群は 20.98 g \pm 0.36 g、レスベラトロール群は 20.4 g \pm 0.31 g、TCDD 単独群は 20.98 g \pm 0.41 g、TCDD とレスベラトロールの併用群は 20.98 g \pm 0.28 g であった。TCDD 単独群では TCDD 投与から 24 日後に 1 匹が、死亡した。今回の検討では、TCDD 単独処理群では経日的体重変化量の 23 日後までの結果を除く、全ての解析で、死亡したマウスのデータは排除している。Fig. 8 からわかるように、TCDD 処理の 2 つの群では投与後約 16 日目までは同程度の体重増加の抑制がみられるが、TCDD とレスベラトロール併用群では 17 日目以降から徐々に改善効果がみられ、27, 28 日後では TCDD 単独群と比較して有意に毒性が軽減された。

Table 2 には肝臓、脾臓、胸腺の湿重量の値を示している。肝臓肥大に対してほとんど毒性軽減効果はみられなかった。脾臓、胸腺の萎縮に対しては、有意差はないもののレスベラトロール併用群では TCDD 単独群に対して毒性軽減の傾向がみられた。

Fig. 9 には EROD 活性測定の結果を示している。EROD 活性は TCDD 処理の 2 つの群で有意に上昇したが、TCDD 単独群とレスベラトロール併用群間ではほとんど差はみられなかった。

Fig.10 には TBARS の測定結果を示している。レスベラトロール単独では、ほとんど影響はなかった。TCDD 単独処理群では約 6 倍にまで上昇していた。これによ

り、酸化ストレスが上昇し、脂質過酸化が亢進したことが示唆された。一方、レスベラトロール併用群では TCDD 単独群に対して有意に毒性軽減効果がみられた。

酸化ストレスは脂肪肝につながるとされているので、次にトリグリセリド含量を測定した。Fig.11 には肝臓中のトリグリセリド含量を示している。レスベラトロール単独群では、トリグリセリド含量にほとんど影響はなかった。TCDD 単独処理群では、対照群に比べて 10 倍以上に上昇し、TCDD によって脂肪肝が誘発されていることが示唆された。レスベラトロール併用群ではその上昇が約 40% 抑制された。このように、レスベラトロールが酸化ストレスの低減を通じて脂肪肝誘発を抑制している可能性が示唆された。

酸化ストレスに対する生体での防御因子のひとつとしてグルタチオンが知られている。TCDD はグルタチオン含量を低下させることが知られている。レスベラトロールがそれに対して影響を示すかについて検討した。Fig.12 には肝臓中のグルタチオン含量の測定結果を示している。TCDD 処理の 2 群ではコントロールに比べて減少していたが、併用群との間に有意な差はみられなかった。

このように TCDD 処理による Cyp1a1 の活性誘導に差がないにもかかわらず、TBARS やトリグリセリド含量に対しては毒性軽減効果がみられた。

C. 考察

本研究の結果から、100 μ g/kg の TCDD による体重増加の抑制が、28 日間

のレスベラトロール連続経口投与によって部分的に軽減されることが明らかとなった。また、臓器重量に対しても毒性軽減傾向がみられることが分かった。TCDD 誘発性毒性の酸化ストレスに対しては、レスベラトロール併用により有意に軽減された。それに伴って、TCDD 誘発性の脂肪肝に対してレスベラトロール併用により有意な軽減効果がみられることが、初めて明らかとなった。そして、レスベラトロールによる酸化ストレスの軽減効果は、グルタチオン含量の変動以外の機構で効果を示すことが示唆された。

本研究では、レスベラトロール投与約 24 時間後をサンプリング時間としている。一方、レスベラトロールは体内からの消失が速やかであることから、投与したレスベラトロールが体内に存在する間は、Cyp1a1 の誘導の抑制や活性の阻害をしている可能性も残された。この点を検討するため、レスベラトロール最終投与後比較的速やかにサンプリングを行うなどの対策が考えられる。予備的検討の結果、TCDD で誘導された EROD 活性が、レスベラトロール併用によって低下することと、その時に Cyp1a1 レベルはほとんど変わらないことが示唆されている（データ未掲載）。上記の仮説の通り、レスベラトロールは短い体内残存時間であるが、肝臓に到達し、作用を示す可能性が支持されつつある。

赤ワイン 1 L には、最大で 57.8 mg のレスベラトロール（配糖体も含む）が含まれていると言われている（13）。仮に赤ワインに含まれるレスベラトロールの量を 25 mg/L、ヒトの体重を 60 kg とした場合、20

mg/kg は 1 日 50 L 分程度の量になる。したがって、今回用いた量をヒトに適用するには、サプリメントの形でなければ難しいと思われる。今後、適切な評価を行うためのサンプリング時間、レスベラトロールの投与量、投与回数などを詳細に検討して行く必要がある。

D. 参考文献

- 1) Furue, M. et al, J. Dermatol. Sci. s1, 3-10 (2005).
- 2) Masuda, Y., J. Dermatol. Sci. s1, 11-20 (2005).
- 3) Ishida, T. et al, Biol. Pharm. Bull. 27, 1397-1402 (2004).
- 4) Ishida, T. et al, J. Health Sci. 50, 474-482 (2004).
- 5) Ishida, T. et al, J. Health Sci. 51, 410-417 (2005).
- 6) Hankinson, O., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35, 307-340 (1995).
- 7) Poland, A., and Knutson, J. C., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22, 517-554 (1982).
- 8) Petrusis, J. R., and Bunce, N. J., Toxicol. Lett. 105, 251-260 (1999).
- 9) Whitlock Jr., J. P., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39, 103-125 (1999).
- 10) Casper, R. F. et al., Mol. Pharmacol. 56, 784-790 (1999).
- 11) 石井祐次 他 3 名 福岡医誌 96, 204 - 213 (2005).
- 12) Crowell, J. A. et al., Toxicol. Sci. 82, 614-619 (2004).
- 13) Ribeiro de Lima, M. T. et al., J. Agric. Food Chem. 47, 266-2670 (1999).

E. 研究発表

- 1) 日本薬学会第126年会(仙台, 2006年3月) 予定

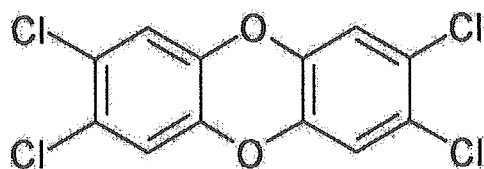


Fig. 1. Structure of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

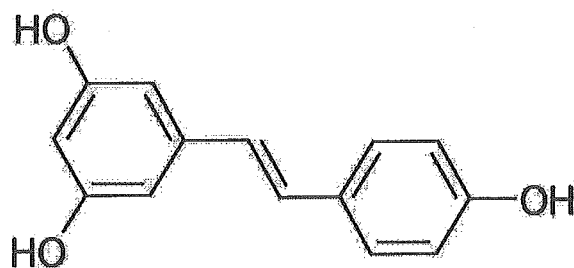


Fig. 2. Structure of *trans*-Resveratrol

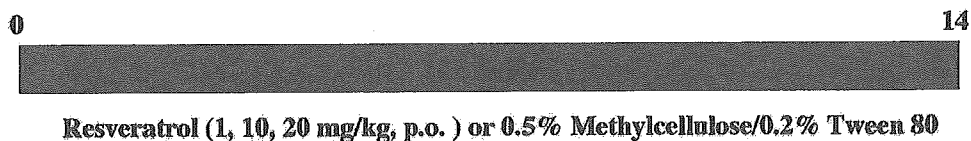


Fig. 3. Administration schedule of Resveratrol in experiment 1

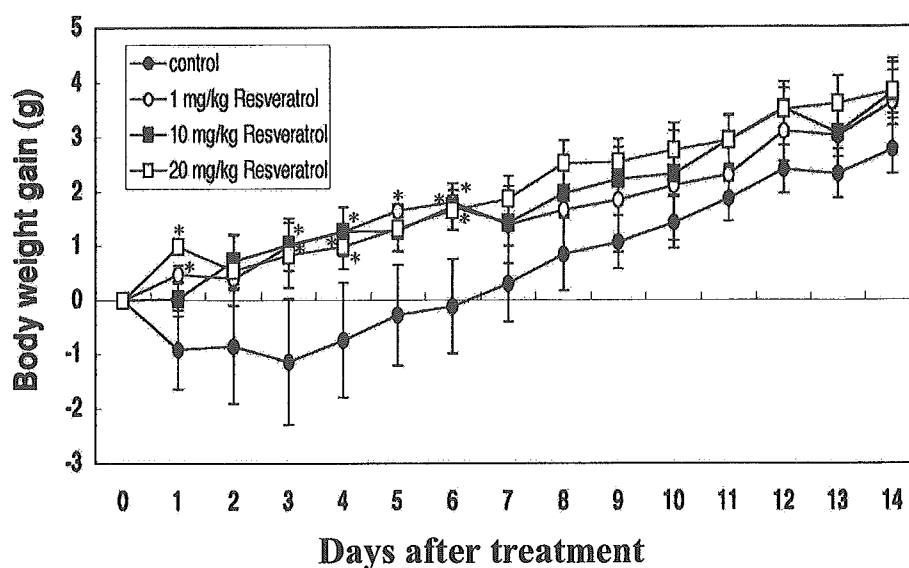


Fig. 4. Effects of Resveratrol on body weight gain in C57BL/6J mice in experiment 1. The values represent the mean \pm S.E. of 5-6 mice. Significantly different from the control group; *, $p < 0.05$. Symbols are control (●); 1 (○), 10 (■) and 20 (□) mg resveratrol/kg/day (p.o.), respectively.

Table 1. Effects of Resveratrol on the tissue weights of C57BL/6J mice

	(% of body weight)		
	Liver	Spleen	Thymus
Control	5.797 \pm 0.474	0.365 \pm 0.207	0.303 \pm 0.098
Resveratrol			
(1 mg/kg/day)	5.682 \pm 0.882	0.384 \pm 0.204	0.300 \pm 0.097
(10 mg/kg/day)	5.29 \pm 0.168	0.272 \pm 0.021	0.248 \pm 0.025
(20 mg/kg/day)	5.226 \pm 0.304	0.301 \pm 0.061	0.270 \pm 0.083

The values represent the mean \pm S.D. of 5-6 mice.