

3. 厚生省：血液中のダイオキシン類測定  
暫定マニュアル。平成12年12月22日

3. 飯田隆雄, 戸高 尊, 平川博仙, 飛石  
和大, 松枝隆彦, 堀 就英, 中川礼子：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。 2003, 94,  
148-157.

4. T. Iida, H. Hirakawa, T. Hori,  
T. Matsueda, K. Tobiishi, R. Nakagawa,  
T. Todaka: Follow-up survey of Dioxins  
and Related Chemicals in the Blood of  
Yusho Patients in 2002. 24th  
International Symposium on Halogenated  
Environmental Organic Pollutants and  
POPs. September 6-10, 2004, Berlin  
Germany

5. T. Iida, T. Todaka, H. Hirakawa, T. Hori,  
T. Matsueda, K. Tobiishi, R. Nakagawa,  
J. Kajiwara, D. Onozuka, D. Yasutake,  
T. Yoshimura, M. Furue : Follow-up survey  
of Dioxins and Related Chemicals in the  
Blood of Yusho Patients in 2003. 25th  
International Symposium on Halogenated  
Environmental Organic Pollutants and  
POPs. August 6-10, 2005, Toronto Canada

6. T. Todaka, H. Hirakawa, J. Kajiwara, K.  
Tobiishi, T. Iida, T. Yoshimura,  
M. Furue : Follow-up survey of Dioxins  
and Related Chemicals in the Blood of  
Yusho Patients in 2002-2005. 26th  
International Symposium on Halogenated  
Persistent Organic Pollutants. August  
20-25, 2006, Oslo Norway

表1 コントロール血清中PCDD s、PCDF s 及びノンオロソPCB分析値の再現性

Lot.No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Mean	SD	Min.	Max.	CV
2,3,7,8-TCDD	1.9	2.2	2.3	2.1	0.5	1.2	1.8	2.0	1.7	2.4	2.4	1.9	0.57	0.5	2.4	31%
1,2,3,7,8-PeCDD	7.2	6.8	7.1	7.3	6.9	6.5	8.3	7.5	7.1	6.4	9.4	7.3	0.85	6.4	9.4	12%
1,2,3,4,7,8-HxCDD	7.6	7.3	7.0	7.1	6.4	7.9	7.7	7.7	8.4	7.0	8.8	7.5	0.67	6.4	8.8	9%
1,2,3,6,7,8-HxCDD	53.3	58.7	59.6	52.0	60.4	60.5	54.6	53.8	57.7	54.3	55.3	56.4	3.06	52.0	60.5	5%
1,2,3,7,8,9-HxCDD	11.0	14.3	11.2	12.6	10.5	9.5	9.7	9.9	12.6	11.6	11.8	11.3	1.45	9.5	14.3	13%
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	127.2	163.0	151.6	156.6	144.4	142.9	128.7	118.6	156.0	150.6	135.2	143.2	14.15	118.6	163.0	10%
OCDD	1370.0	1725.4	1704.9	1849.5	1724.1	1577.6	1507.0	1475.8	1476.8	1591.1	1495.3	1590.7	143.92	1370.0	1849.5	9%
2,3,7,8-TCDF	ND	2.5	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.6	1.8	0.68	1.1	2.5	39%
1,2,3,7,8-PeCDF	0.5	1.4	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.4	1.1	0.42	0.5	1.4	38%
2,3,4,7,8-PeCDF	5.0	4.7	4.4	4.2	4.9	5.0	5.0	4.8	4.5	4.9	6.2	4.9	0.51	4.2	6.2	10%
1,2,3,4,7,8-HxCDF	6.8	6.6	7.3	8.3	6.9	7.5	6.0	7.4	7.5	7.0	7.6	7.2	0.60	6.0	8.3	8%
1,2,3,6,7,8-HxCDF	6.1	7.3	7.1	6.6	7.2	6.9	6.6	7.3	7.3	7.0	6.8	6.9	0.38	6.1	7.3	5%
2,3,4,6,7,8-HxCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.7	ND	ND	2.7		2.7	2.7	0%
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	14.5	17.6	16.3	18.5	15.6	17.2	15.8	16.0	18.0	17.9	18.0	16.9	1.28	14.5	18.5	8%
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	
OCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	
344'5-TCB(#81)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	
33'4'4'-TCB(#77)	41.1	55.2	40.0	42.5	42.5	41.3	38.5	34.3	41.7	43.5	43.7	42.2	5.07	34.3	55.2	12%
33'4'4'5-PenCB(#126)	21.5	24.8	26.0	24.7	22.1	25.1	19.1	18.1	20.8	23.5	22.5	22.6	2.55	18.1	26.0	11%
33'4'4'5'5'-HxCB(169)	16.1	18.3	16.6	17.4	18.6	17.0	17.2	16.8	18.0	18.2	17.5	17.4	0.78	16.1	18.6	4%
Total PCDD	1578.3	1977.6	1943.6	2087.3	1953.2	1806.2	1717.8	1675.3	1720.4	1823.5	1718.2	1818.3	154.79	1578.3	2087.3	9%
Total PCDF	39.0	45.1	42.3	43.7	40.7	42.7	39.5	41.4	50.6	42.8	46.6	43.1	3.35	39.0	50.6	8%
Total PCDD/PCDF	1617.3	2022.7	1986.0	2131.0	1993.9	1848.9	1757.2	1716.7	1771.0	1866.3	1764.8	1861.4	155.19	1617.3	2131.0	8%
Total Non-ortho PCBs	83.6	103.3	87.7	89.6	88.1	88.4	46.3	44.9	85.5	90.2	88.7	81.5	18.44	44.9	103.3	23%
Total	1700.9	2126.1	2073.6	2220.6	2082.0	1937.3	1803.5	1761.6	1856.4	1956.5	1853.5	1942.9	165.43	1700.9	2220.6	9%
◆【WHO-98】◆																
T PCDDs-TEQ	17.7	18.8	18.8	18.4	16.7	17.1	18.7	18.0	18.4	17.8	20.9	18.3	1.10	16.7	20.9	6%
T PCDFs-TEQ	4.3	4.4	4.2	4.1	4.3	4.4	4.2	4.3	4.4	4.3	5.1	4.4	0.28	4.1	5.1	6%
T PCDDs/PCDFs-TEQ	22.0	23.2	23.0	22.5	21.1	21.5	22.9	22.3	22.8	22.1	26.1	22.7	1.29	21.1	26.1	6%
T Non-ortho PCBs-TEQ	2.3	2.7	2.8	2.6	2.4	2.7	2.1	2.0	2.3	2.5	2.4	2.4	0.26	2.0	2.8	11%
Total TEQ	24.4	25.9	25.8	25.1	23.5	24.2	25.0	24.2	25.1	24.6	28.5	25.1	1.32	23.5	28.5	5%
脂肪含量(%)	0.259	0.279	0.280	0.276	0.276	0.278	0.274	0.290	0.288	0.280	0.271	0.277	0.01	0.259	0.290	3%

CB: chlorinated biphenyl; CDD: chlorinated dibenzo-p-dioxins; CDF: chlorinated dibenzofurans; Hx: hexa; Hp: hepta; ND: less than the determination limit; OCDD: octachlorodibenzo-p-dioxin; OCDF: octachlorodibenzofuran; PCB: polychlorinated biphenyl; PCDD: polychlorinated dibenzo-p-dioxin; PCDF: polychlorinated dibenzofuran; Pe: penta; TCB: tetrachlorobiphenyl; TCDD: tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TCDF: tetrachlorodibenzofuran; TEQ: toxic equivalent quantity.

表2 油症患者血中のPCDDs, PCDFs 及びノンオロソゴブナナーPCB濃度 (2001-2005)

Congeners	Concentration (pg/g lipid)																		
	Yusito patients																		
	2001 (n = 78)			2002 (n = 279)			2003 (n = 269)			2004 (n = 242)			2005 (n = 237)			Normal controls 2004 (n = 127)			
Mean	SD	Min.	Max.	Mean	SD	Min.	Max.	Mean	SD	Min.	Max.	Mean	SD	Min.	Max.	Mean	SD	Min.	Max.
2,3,7,8-TCDD	1.8	1.1	0.5	4.1	1.7	0.8	0.5	4.4	1.7	0.8	0.5	5.6	1.4	0.8	0.5	1.9	0.8	0.5	4.3
1,2,3,7,8-PeCDD	20.4	11.0	3.3	53.5	11.1	5.9	1.5	46.8	9.7	5.4	0.5	45.2	9.7	5.6	1.0	38.6	10.4	6.0	43.1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.4	1.8	1.0	7.7	2.9	1.8	1.0	10.8	2.6	1.6	1.0	8.5	2.6	1.6	1.0	10.2	3.6	1.9	1.0
1,2,3,6,7,8-HxCDD	56.7	43.4	4.4	230.1	53.0	41.7	6.0	290.7	50.4	42.6	3.8	348.5	49.2	41.5	4.8	261.6	50.8	40.8	4.0
1,2,3,7,8,9-HxCDD	4.6	2.3	1.0	11.0	5.1	3.8	1.0	41.0	3.9	2.7	1.0	17.9	4.3	3.1	1.0	23.1	4.8	3.2	1.0
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	26.6	20.7	5.4	143.6	63.4	53.7	10.8	556.3	38.6	22.9	8.5	167.2	49.8	25.9	13.8	195.6	46.8	30.2	8.1
OCDD	667.7	750.5	137.5	6226.3	877.2	728.2	172.5	9158.6	763.3	438.9	147.6	3706.1	716.8	370.3	180.5	2305.2	797.4	636.9	225.7
2,3,7,8-TCDF	1.8	2.5	0.5	14.4	1.4	0.9	0.5	6.3	1.2	0.7	0.5	4.9	1.8	1.6	0.5	9.7	3.0	3.8	0.5
1,2,3,7,8-PeCDF	1.1	0.9	0.5	4.2	0.9	0.8	0.5	6.3	0.8	0.7	0.5	5.6	0.9	0.8	0.5	5.4	1.3	1.7	0.5
2,3,4,7,8-PeCDF	256.1	315.3	6.7	1770.6	192.0	252.1	3.1	1889.7	176.2	240.2	2.6	1933.5	181.8	241.7	2.9	1641.5	175.1	240.1	3.2
1,2,3,4,7,8-HxCDF	82.7	117.2	2.0	632.3	59.0	99.6	1.0	769.9	52.0	87.2	1.0	737.7	50.4	83.8	1.0	598.4	48.1	86.2	1.0
1,2,3,6,7,8-HxCDF	29.7	34.4	1.0	176.1	22.4	29.1	1.0	210.0	20.4	27.0	1.0	231.8	18.6	24.5	1.0	176.1	18.3	26.1	1.0
2,3,4,6,7,8-HxCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.2	0.6	1.0	5.5	1.2	0.6	1.0
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	3.9	2.3	1.0	10.8	3.2	4.0	1.0	39.8	2.8	2.6	1.0	22.8	2.7	3.1	1.0	32.0	2.7	2.7	1.0
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.0	0.2	1.0	3.4	ND	ND	ND
OCDF	2.0	0.0	2.0	2.0	2.0	0.4	2.0	9.1	2.0	0.2	2.0	5.6	2.3	2.5	2.0	37.9	2.1	1.0	2.0
3,4,4',5'-TCB(81)	5.4	2.3	5.0	20.6	5.6	3.1	5.0	41.0	5.3	1.8	5.0	21.8	5.3	3.0	5.0	37.5	5.3	2.3	5.0
3,3',4,4'-TCB(77)	7.8	4.7	5.0	28.5	11.0	7.2	5.0	46.1	8.6	6.4	5.0	71.8	11.0	8.2	5.0	69.7	11.0	20.5	5.0
3,3',4,4',5'-PeCB(126)	84.4	58.5	17.8	319.5	103.1	71.7	5.0	560.9	98.1	65.3	11.2	531.7	92.3	70.4	5.0	591.8	94.6	64.4	5.0
3,3',4,4',5',5'-HxCB(169)	207.1	166.0	31.0	964.0	200.0	154.5	12.7	1131.4	183.8	139.2	12.7	1115.6	135.4	98.5	5.0	767.1	155.4	113.2	11.9
Total PCDD	780	766	177	6423	1014	782	212	9802	870	470	181	3924	834	407	205	2459	914.8	673.1	285.1
Total PCDF	381	461	18	2594	284	375	13	2744	259	352	12	2938	262	348	12	2416	253.7	353.7	13.3
Total PCDD/PCDF	1161	840	308	6493	1299	866	232	9886	1129	602	242	3991	1096	561	218	3095	1168.4	769.8	299.9
Total coplanar PCBs	305	168	66	1006	320	186	28	1220	296	168	37	1218	244	138	26	956	266.6	147.6	36.3
Total	1466	921	373	6822	1618	948	313	10294	1425	703	293	4933	1340	645	244	3961	1435.0	837.1	340.7
PCDDs-TEQ	28.9	14.0	5.7	70.2	19.5	10.4	3.3	78.5	17.6	9.9	2.2	82.5	17.3	10.1	2.4	66.8	18.4	10.7	3.5
PCDFs-TEQ	139.8	171.8	4.1	966.7	104.6	137.9	2.1	1029.4	95.8	131.1	1.8	1074.4	98.3	131.3	2.0	897.4	94.8	131.2	2.1
PCDDs/PCDFs-TEQ	168.7	180.4	11.7	1036.9	124.1	146.7	5.4	1107.9	113.3	139.7	3.9	1156.9	115.5	139.8	4.9	964.2	113.2	140.2	7.4
Coplanar PCBs-TEQ	10.5	5.8	2.2	32.6	12.3	7.7	0.6	59.4	11.7	6.9	1.4	56.0	10.6	7.3	0.6	62.0	11.0	6.8	0.8
Total TEQ	179.3	180.5	13.9	1049.7	136.4	148.3	7.0	1126.1	125.0	141.2	5.5	1176.6	126.1	140.7	5.6	980.3	124.2	141.5	8.7
Lipid (%)	0.3	0.1	0.2	0.6	0.3	0.1	0.2	0.6	0.4	0.1	0.2	0.6	0.4	0.0	0.2	0.5	0.3	0.0	0.3
Age (years)	65.3	11.2	33.0	84.0	63.6	12.6	30.0	88.0	65.7	11.7	32.0	89.0	65.5	11.8	26.0	90.0	67.0	11.4	36.0

CB: chlorinated biphenyl; CDD: chlorinated dibenzo-p-dioxins; CDF: chlorinated dibenzofurans; Hx: hexa; Hp: hepta; ND: less than the determination limit; OCDD: octachlorodibenzo-p-dioxin; OCDF: octachlorodibenzofurans; PCB: polychlorinated biphenyl; PCDD: polychlorinated dibenzo-p-dioxin; PCDF: polychlorinated dibenzofuran; Pe: penta; TCB: tetrachlorobiphenyl; TCDD: tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TCDF: tetrachlorodibenzofuran; TEQ: toxic equivalent quantity.

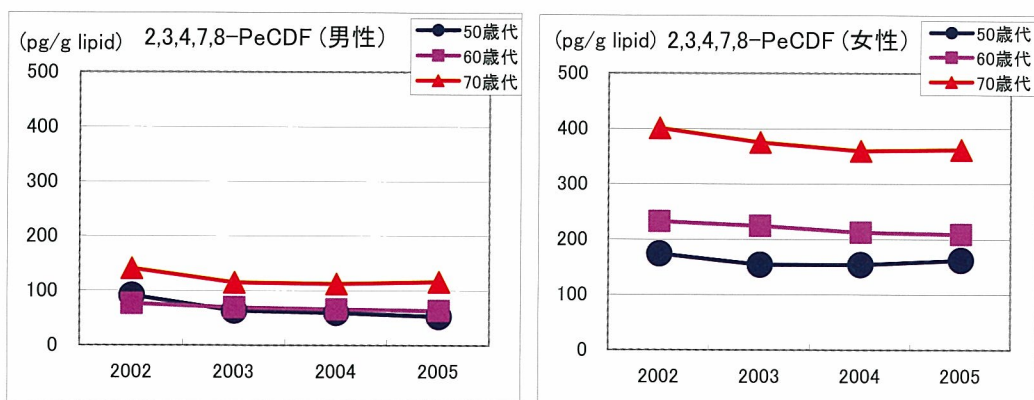
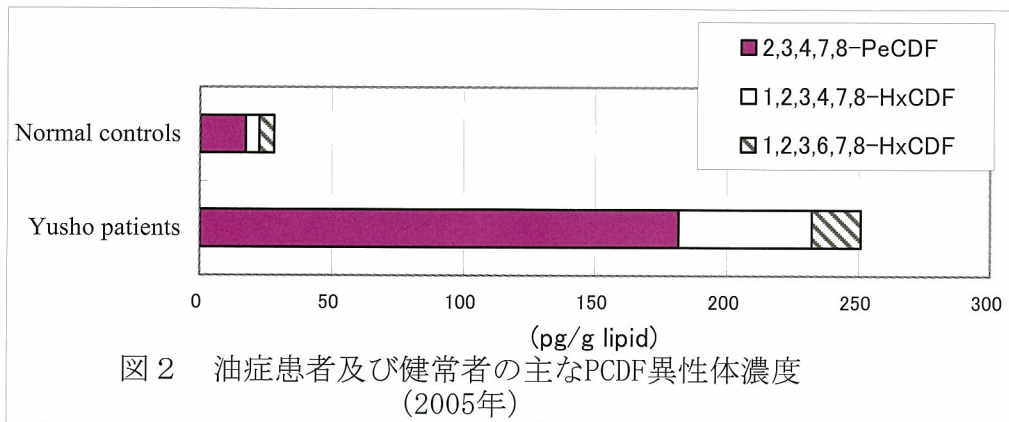
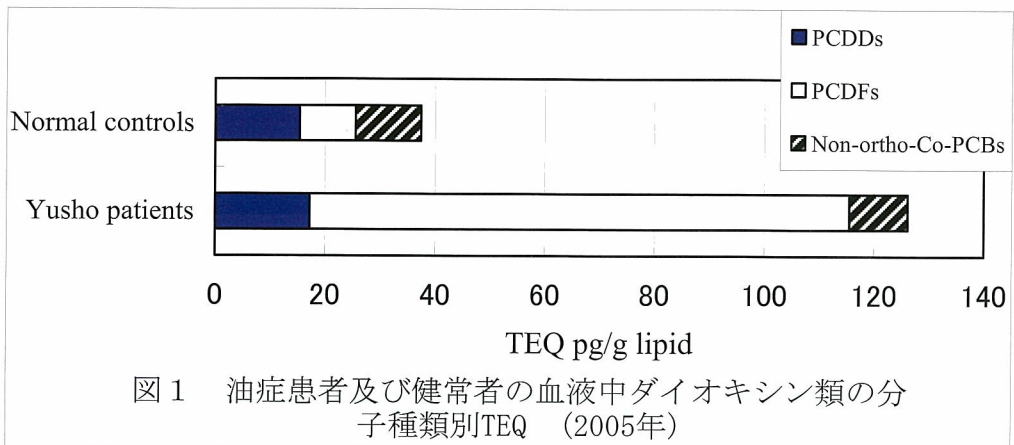


表 3 平成14-17年連続受診患者の性別・年齢別構成

	男性	女性	合計
50歳未満	5	3	8
50歳代	12	15	27
60歳代	16	22	38
70歳代	24	29	53
80歳以上	9	3	12
合計	66	72	138

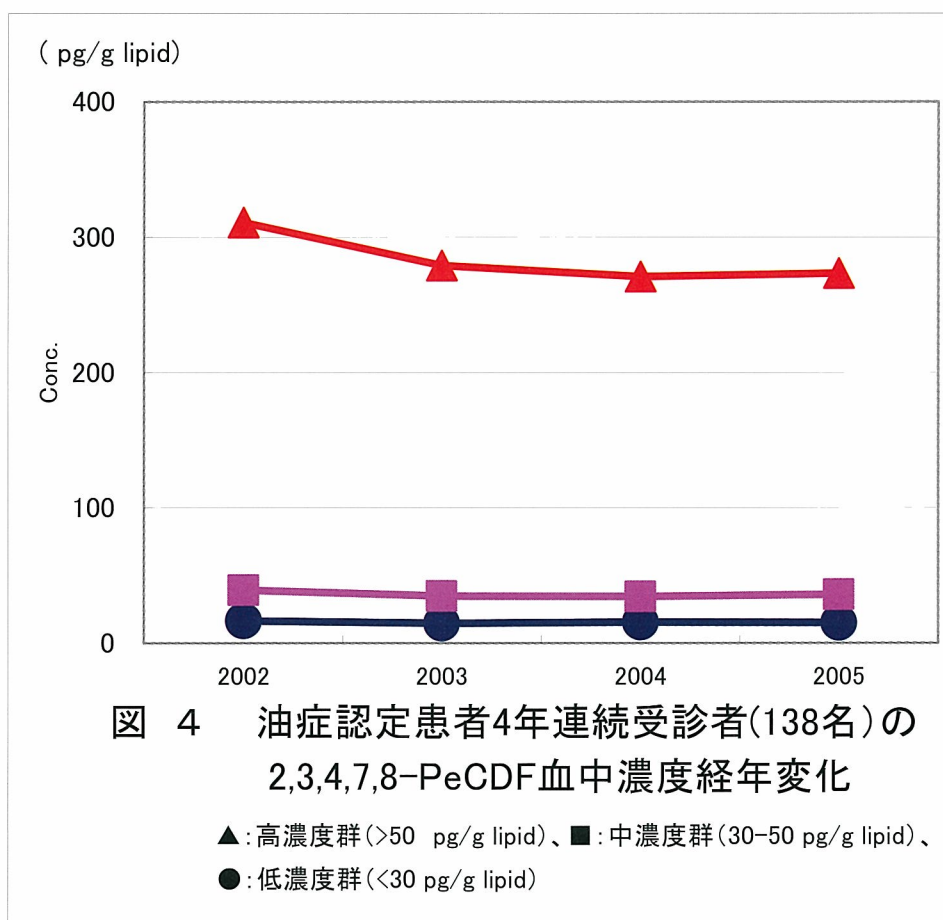


図 4 油症認定患者4年連続受診者(138名)の2,3,4,7,8-PeCDF血中濃度経年変化

▲: 高濃度群 (>50 pg/g lipid)、■: 中濃度群 (30-50 pg/g lipid)、●: 低濃度群 (<30 pg/g lipid)

## 分担研究報告書

### 油症患者血液中 PCB 等追跡調査における分析法の改良およびその評価に関する研究

分担研究者	吉村健清	福岡県保健環境研究所	所長	
研究協力者	梶原淳睦	福岡県保健環境研究所	生活化学課	専門研究員
	中川礼子	福岡県保健環境研究所	生活化学課	課長
	片岡恭一郎	福岡県保健環境研究所	情報管理課	課長
	松枝隆彦	福岡県保健環境研究所	計測技術課	専門研究員
	平川博仙	福岡県保健環境研究所	生活化学課	専門研究員
	堀 就英	福岡県保健環境研究所	生活化学課	研究員
	飛石和大	福岡県保健環境研究所	計測技術課	研究員
	芦塚由紀	福岡県保健環境研究所	生活化学課	主任技師
	安武大輔	福岡県保健環境研究所	計測技術課	主任技師
	小野塚大介	福岡県保健環境研究所	情報管理課	主任技師
	村田さつき	福岡県保健環境研究所	生活化学課	技師
	高尾佳子	福岡県保健環境研究所	情報管理課	技師
	戸高 尊	九州大学医学部	学術研究員	
	井上 英	厚生労働省	リサーチレジデント	
	飯田隆雄	北九州生活科学センター	理事長	

**研究要旨** 油症診断基準に盛り込まれた「血中 PCB 濃度および性状」と「血中ダイオキシン類濃度」を系統的に分析する方法を検討した。その結果、血中から検出される約 70 種類の PCB 同族体を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/高分解能質量分析法 (HRGC/HRMS) により迅速・精密に分離分析できる分析法を開発した。さらに、この分析法により血液中のダイオキシン類と PCB 類が一回の抽出操作で精製され測定することが可能となった。この分析法を用いて平成 16、17 年度の福岡県の油症一斉検診受診者及び油症患者の年齢に一致させた一般人について個別に PCB 異性体の濃度を測定し、受診認定者と一般人の各異性体の濃度、存在比を比較した。また、血中のダイオキシン類と PCB 類濃度の相関を見ると、2,3,4,7,8-PeCDF と PCB#156 に正の相関が見られた。

#### A. 研究目的

「血中 PCB 濃度及び性状の異常」は油症診断基準の重要な所見のひとつである。

「PCB の性状」とは、PCB のガスクロマトグラムピークパターン (GC パターン) を示しており、その異常は一般人の PCB GC パターンと異なる油症患者に特有の

GC パターンをさしている。GC パターン法は、油症患者では血中 PCB GC クロマトグラムパターンの PCB#118 を主成分とするピークが相対的に低く、PCB#156 を主成分とするピークが相対的に高いことに基づいており、PCB#153 を主成分とするピークを基準として、これに対する比を

取ることで、油症患者と一般人の違いを非常に明確にすることができる。これまでに、PCB のパックドカラムによる GC パターン法が PCB#118 および PCB#156 の PCB#153 に対する相対比で置き換えられることを明らかにしてきた<sup>2)</sup>。すなわち、PCB#118、PCB#156 および PCB#153 の 3 つの PCB を分離定量することで、PCB 同族体パターン解析をより厳密に行うことができる。一方、我々は、全国の油症患者の血中ダイオキシン類 (PCDD : 7 種、PCDF : 10 種、ノンオルソ PCB : 4 種およびモノオルソ PCB : 8 種) を測定している<sup>3,4)</sup>。これらの異なる PCB 分析 (モノオルソ PCB 分析と PCB 同族体パターンおよび総濃度分析) とダイオキシン類分析を統合的に行なうことができれば効率的である。本来、正確な PCB 分析は PCB の同族体 (209 成分) の完全な分離分析を意味するが、完全な PCB の分離分析は最新の技術をもってしても非常に困難である。ヒト試料に検出される PCB は 70 種類程度に限られているので、一回の HRGC/HRMS による測定でダイオキシン類の一部である「モノオルソ PCB」と「PCB 同族体パターンおよび PCB 濃度」の分析に必要な PCB#153 を含む PCB 同族体の分析を統合的に行うことは可能と考えられる。また、検診後できるだけ速やかにデータを確定するため、迅速で正確・精密な分析方法が必要である。

本研究では血中 PCB の HRGC/HRMS による異性体別分析方法の検討を行った。また試料クリーンアップ操作の効率化、迅速化を目的として多検体の自動連続精製が可能なゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を導入し、条件検討を行った。さらに、これらの検討結果をもとに、従来別個で行われていた血液中の「総 PCB 濃度および性状」測定、「モノオルソ PCB 濃度」測定及び「ダイオキシン類濃度」測定を一元化した系統的な分析法の確立を目的とした。本分析法を用いて、平成 16、17 年度の福岡県の油症一斉検診および油症患者の年齢に一致させた 60-70 代の一般人

についての血中 PCB 分析を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### (1) 検査試料

油症一斉検診を受診した福岡県内の受診者のうち血液検査を行った受診者 (平成 16 年度 126 名、平成 17 年度 146 名) および油症患者の年齢に一致させた 60-70 代の一般人 (127 名) について血中 PCB 測定を実施した。血液はヘパリン入り真空採血管を用いて採血し、検査まで 4℃以下で冷蔵保存した。

### (2) 試薬

n-ヘキサン、アセトン、ジクロロメタンはダイオキシン分析用 (関東化学 (株) 製) を用いた。n-ノナン、PCDD/DF 及び PCB 標準品は Wellington Laboratories 社製を用いた。

### (3) 血液中 PCB 類分析法

血中 PCB 類の測定は、平成 15 年に当所で開発した血中 PCB 異性体分析法<sup>1)</sup>を用いた。GPC システムは GL サイエンス (株) 製を、GPC カラムは MSpak GF-310 4D (内径 4.6mm、長さ 150mm、昭和電工 (株) 製) を用いた。測定に用いた HRGC/HRMS は HP6890 ガスクロマトグラフ (Agilent 社製)/質量分析計 Auto Spec Ultima (Micromass 社製) である。

### (4) 分析試料の調製

血液 5g を正確に量り取り、クリーンアップスパイクとして <sup>13</sup>C<sub>12</sub> ラベル標識の 2,3,7,8 位塩素置換体の PCDD/DF17 種類及びノンオルソ PCB 4 種類を各 50pg、さらに PCB の 3 から 10 塩素置換体 21 種類 (IUPAC#28、37、52、70、95、101、123、118、114、105、153、138、157、178、180、170、189、202、194、206、209) 各 500 pg を添加した。これを既報に従い精製を行った<sup>4)</sup>。活性炭カラムの第 1 画分 (10% (v/v) ジクロロメタン/n-ヘキサン画分) を減圧濃縮した後、ガラス製マイク

ロバイアルに移し、室温常圧下クリーンベンチ内で濃縮乾固した。アセトン 100  $\mu$ l を加えてミキサーで攪拌、この 50  $\mu$ l を GPC 精製に供した。精製後の試料にシリジンスパイクとして  $^{13}\text{C}_{12}$  ラベル標識の 2,3,3',5,5'-pentaCB (IUPAC#111) 250pg を添加し、全量 50  $\mu$ l として HRGC/HRMS 測定試料とした。

(倫理面への配慮)

血中 PCB 類の測定は、本人の同意が得られた者のみを対象とした。研究成果の発表に際しては統計的に処理された結果のみを使い、個人を特定できるような情報は存在しない。

### C. 結果及び考察

#### 1-1. 油症健診受診者の血中 PCB 類分析

表 1 に平成 16 年(2004)、平成 17 年(2005)に実施した福岡県の油症一斉検診受診者の血中 PCB 類分析結果及び平成 16 年に採血した一般人の血中 PCB 類分析結果を示した。各年の総 PCB 濃度は平成 16 年(2004)が 1.88ppb、平成 17 年(2005)が 1.93ppb で一般人の総 PCB 濃度 1.34ppb と比べ若干高い程度であるが、A パターンの 43 人の平均総 PCB 濃度は 2.59ppb で一般人の約 2 倍である。異性体別では PCB#74、PCB#188 は一般人に比べ低く、PCB#156、#157、#165、#189、#202 等が高い。

平成 16 年と平成 17 年の測定データを比較するため両年に連続して受診した福岡県の油症一斉検診受診者 77 名について変化を解析した。77 名のうち油症認定患者は 61 名、未認定者は 16 名であった。平成 16 年の PCB パターン分析の結果は認定患者では A パターン 35 名、B パターン 19 名、BC パターン 5 名、C パターン 15 名であり、未認定者は B パターンと BC パターンが 1 名ずつ、その他はすべて C パターンであった。平成 16 年から 17 年での PCB パターンの変化は B パターンの認定患者と、C パターンの未認定者が 1 名ずつ減り BC パターンに変わった。3 塩素

から 10 塩素の各 PCB 同族体の濃度変化を図 1 に示した。血中 PCB 類濃度は 3、4 塩素体は一般人のほうが高いが、5 塩素体以上は油症認定患者の方が高い。平成 16 年と 17 年の比較では平成 17 年のほうが若干高いがほぼ 10%程度の変化で測定誤差の範囲内と思われる。PCB パターン分析に必要な PCB#118、#153、#156 の濃度の比較を図 2 に示した。油症認定患者は一般人に比べ PCB#118 が低く、PCB#156 が高い特徴的なパターンを示した。各異性体濃度は平成 17 年の値が若干高いがほぼ同率で上昇しているため、PCB パターン分析には影響なかった。

血中 PCB 類異性体濃度とダイオキシン類濃度の関係を解析するため、図 3 に油症認定患者の血中 PCB#156 と 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の比較を示した。ライスオイル中に含まれていた PCB#156 と 2,3,4,7,8-PeCDF の血中濃度には正の相関が認められる。

### D. まとめ

GPC 装置でクリーンアップ操作を行うことにより、血中 PCDD、PCDF およびノンオルソ PCB 分析と同時に、モノオルソ PCB 分析と PCB パターン並びに総濃度の分析が系統的に行えるようになった。その結果、モノオルソ PCB を含むダイオキシン類、PCB 濃度および PCB パターンのすべての油症診定、追跡調査のデータを同時に確定することが出来るようになった。

一般人 127 名と福岡県の油症一斉検診受診者のうち血液検査を行った受診者(平成 16 年度 126 名、平成 17 年度 146 名)の血中 PCB 濃度を比較したところ、油症患者の年齢に一致させた 60-70 代の一般人の総 PCB 濃度レベルに対し油症患者の A パターンの総 PCB 濃度レベルは約 2 倍であった。PCB パターンはほとんど変化していない。PCB 同族体の存在比を比較すると油症患者は一般人に比べ PCB#118 が低く、PCB#156 が高い特徴的なパターンを示した。



血中 PCB 類異性体濃度とダイオキシン類濃度の関係を解析した結果、PCB#156 と 2,3,4,7,8-PeCDF の血中濃度には正の相関が認められた。

E. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

#### F. 参考文献

- 1) 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／高分解能質量分析法 (HRGC/HRMS) による血中 PCB 異性体分析. 福岡医誌 96 : 220-226, 2005.
- 2) 中川礼子、芦塚由紀、堀 就英、平川博仙、飛石和大、飯田隆雄：血中 PCB パターン判定における従来法と異性体分析法の同等性について. 福岡医誌 94 : 144-147, 2003.
- 3) 飯田隆雄、戸高 尊、平川博仙、飛石和大、松枝隆彦、堀 就英、中川礼子：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.
- 4) Todaka T, Hirakawa H, Tobiishi K, Iida T : New protocol of dioxins analysis in human blood. Fukuoka Acta Med. 94 : 148-157, 2003.
- 5) 劔持堅志他：第 11 回環境化学討論会要旨集 P164-165, 箱根町, 2002 年 6 月 3 日～5 日.

表1 油症患者及び一般人の血中のPCB濃度 (pg/g)

	油症患者								一般人			
	2004 (n=99)				2005 (n=92)				2004 (n=127)			
	平均	標準偏差	最小	最大	平均	標準偏差	最小	最大	平均	標準偏差	最小	最大
245-TrCB(#29)	0.1	0.1	0.0	0.4	0.2	0.1	0.0	0.9	0.1	0.1	0.0	0.3
244'-TrCB(#28)	6.1	3.7	0.0	27.4	4.5	5.5	0.0	28.1	8.5	6.2	2.3	43.3
344'-TrCB(#37)	1.5	1.6	0.0	10.3	0.1	0.5	0.0	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0
22'55'-TeCB(#52)	4.4	2.2	1.5	16.5	3.4	7.2	0.0	58.9	4.1	2.6	1.3	16.1
22'45'-TeCB(#49)	1.1	0.4	0.4	3.0	1.7	2.4	0.1	16.5	1.0	0.4	0.3	2.3
22'44'-TeCB(#47)	2.2	0.7	1.0	4.9	2.8	3.4	0.1	22.5	1.9	0.6	0.8	4.6
22'35'-TeCB(#44)	1.7	0.7	0.7	7.5	2.7	4.1	0.5	27.8	1.5	0.5	0.3	3.3
23'4'6'-TeCB(#71)	0.8	0.4	0.0	3.8	0.1	0.4	0.0	3.3	0.6	0.2	0.0	1.2
23'4'5'-TeCB(#63)	0.3	0.2	0.1	1.1	0.2	0.2	0.0	1.0	0.5	0.3	0.1	2.0
244'5'-TeCB(#74)	35.0	33.7	0.0	200.8	31.8	35.5	0.0	180.5	63.4	36.4	12.1	233.0
23'4'5'-TeCB(#70)	1.0	0.4	0.2	3.5	1.4	3.0	0.0	21.4	0.8	0.3	0.2	2.2
23'44'-TeCB(#66)	5.0	4.7	1.0	40.5	5.6	4.5	0.0	26.8	7.7	6.6	1.4	40.2
233'4'-/2344'TeCBs(#56/60)	2.4	1.9	0.4	11.5	2.2	1.8	0.0	9.9	2.9	2.6	0.5	16.2
22'35'6'-PeCB(#95)	2.7	1.1	1.0	6.9	3.4	4.5	0.0	32.0	2.7	1.3	0.9	9.5
22'35'5'-PeCB(#92)	2.0	1.3	0.3	7.3	2.5	2.0	0.0	9.7	2.8	2.2	0.5	15.6
22'45'5'-PeCB(#101)	5.4	3.5	1.1	19.1	6.7	5.6	0.0	30.5	6.1	4.1	1.3	26.3
22'44'5'-PeCB(#99)	55.2	53.3	2.4	320.2	75.5	74.3	5.1	413.5	40.4	22.3	10.2	120.7
23'4'5'6'-PeCB(#117)	5.1	6.0	0.4	33.6	7.1	9.7	0.0	53.5	3.0	2.2	0.6	14.0
22'34'5'-PeCB(#87)	2.9	2.3	0.6	13.3	3.4	2.9	0.0	13.2	2.2	1.2	0.6	8.2
22'344'-PeCB(#85)	0.6	0.4	0.0	2.8	0.5	0.6	0.0	2.2	0.7	0.4	0.2	2.8
23'3'4'6'-PeCB(#110)	1.3	0.7	0.4	3.9	2.3	2.2	0.2	14.1	1.3	0.5	0.4	2.9
23'3'4'5'-PeCB(#107)	2.0	1.5	0.2	12.3	2.4	1.5	0.0	7.9	3.2	2.5	0.6	16.7
2'344'5'-PeCB(#123)	0.8	0.7	0.0	3.6	0.8	0.7	0.0	3.8	1.5	1.1	0.2	8.0
23'44'5'-PeCB(#118)	45.5	35.3	1.9	206.0	57.1	38.8	8.2	205.7	79.2	50.0	15.9	362.4
2344'5'-PeCB(#114)	7.3	7.2	0.0	45.0	5.1	7.2	0.0	50.4	5.5	2.8	1.6	16.6
233'44'-PeCB(#105)	9.7	7.7	0.6	53.5	12.0	8.1	2.1	40.7	16.6	11.9	3.0	77.8
22'35'5'6'-HxCB(#151)	3.3	2.8	0.4	21.4	4.3	4.2	0.5	31.2	4.0	2.9	0.8	18.2
22'33'5'6'-HxCB(#135)	1.3	0.9	0.2	5.9	1.6	1.3	0.0	8.0	1.5	0.9	0.4	6.3
22'34'5'6'-HxCB(#147)	1.6	1.1	0.0	6.4	1.5	1.5	0.0	7.3	1.6	1.0	0.1	6.1
22'344'6'-HxCB(#139)	2.5	1.9	0.3	11.4	3.5	2.3	0.3	10.9	2.6	1.5	0.4	9.5
22'33'5'6'-HxCB(#134)	0.1	0.1	0.0	0.4	0.0	0.1	0.0	0.7	0.1	0.1	0.0	0.5
233'5'5'6'-HxCB(#165)	32.8	34.8	0.0	204.0	4.6	20.6	0.0	130.8	0.0	0.0	0.0	0.0
22'34'5'5'-HxCB(#146)	56.1	39.1	3.1	244.9	75.8	54.5	5.0	332.7	44.5	21.2	15.2	152.9
22'33'4'6'-HxCB(#132)	0.9	0.6	0.1	3.6	0.8	0.9	0.0	4.4	0.9	0.6	0.0	3.7
22'44'5'5'-HxCB(#153)	334.0	204.3	18.2	1069.0	428.7	267.0	37.6	1481.2	288.1	130.0	93.5	879.2
22'34'5'5'-HxCB(#141)	0.8	0.6	0.0	3.5	0.8	0.9	0.0	5.1	1.0	0.7	0.1	4.9
22'344'5'-HxCB(#137)	21.1	23.4	0.5	156.5	26.3	32.7	0.9	212.7	9.6	4.7	2.9	32.8
22'33'4'5'-HxCB(#130)	14.4	15.3	0.8	95.3	17.6	20.9	0.7	132.6	8.4	5.1	1.9	34.8
23'3'4'5'6'-HxCB(#164)	97.0	70.2	4.9	385.9	95.7	81.1	4.5	506.8	62.0	32.0	0.0	194.5
22'344'5'-HxCB(#138)	192.3	161.1	7.0	940.8	255.2	228.7	16.9	1413.4	131.6	64.4	40.9	421.3
22'33'44'-HxCB(#128)	2.1	1.7	0.2	14.0	2.8	1.9	0.6	9.1	2.8	1.7	0.4	9.2
23'44'5'5'-HxCB(#167)	9.4	6.6	0.4	31.5	12.9	8.1	1.1	38.3	11.8	5.9	3.4	46.7
23'344'5'-HxCB(#156)	107.8	126.0	1.7	775.1	142.1	168.2	1.4	888.9	25.7	12.7	8.9	91.8
233'44'5'-HxCB(#157)	29.5	35.0	0.3	212.2	40.2	48.4	0.4	261.9	6.5	3.0	2.3	21.3
22'33'566'-HpCB(#179)	0.6	0.4	0.1	2.5	0.5	0.6	0.0	3.4	0.7	0.4	0.1	3.0
22'33'55'6'-HpCB(#178)	20.0	10.9	0.9	59.3	24.4	12.2	2.3	73.0	19.9	9.6	7.4	62.0
22'344'5'6'-HpCB(#182)	90.9	49.9	6.0	253.4	113.0	57.0	11.2	350.4	89.9	43.9	31.9	276.0
22'344'5'6'-HpCB(#183)	23.4	15.1	1.9	71.3	31.1	19.1	2.5	101.2	19.8	10.0	6.5	58.9
22'344'5'6'-HpCB(#181)	1.3	1.8	0.0	10.0	1.7	2.4	0.0	13.3	0.2	0.2	0.0	0.8
22'33'4'5'6'-HpCB(#177)	21.2	13.3	2.1	61.7	24.9	15.8	1.7	88.9	18.5	9.7	5.1	60.0
22'33'455'-HpCB(#172)	15.8	11.7	0.7	66.7	19.0	14.8	0.9	92.0	9.5	4.7	3.4	31.3
22'344'5'5'-HpCB(#180)	260.9	159.1	10.5	833.0	316.6	200.6	24.0	1235.5	189.8	91.7	74.0	650.3
233'44'5'6'-HpCB(#191)	5.8	5.7	0.1	32.8	7.3	7.8	0.4	49.1	2.4	1.1	0.9	6.6
22'33'44'5'-HpCB(#170)	103.9	81.7	2.4	492.7	137.8	114.7	6.6	699.1	55.2	27.0	21.8	183.7
233'44'5'5'-HpCB(#189)	14.3	14.8	0.1	84.5	19.6	19.8	0.4	101.8	3.4	1.6	1.3	11.2
22'33'5'5'6'-OeCB(#202)	53.5	155.7	0.0	774.6	18.3	17.5	0.0	54.7	9.0	14.8	0.0	129.5
22'33'4'5'6'-OeCB(#200)	8.4	27.0	0.1	173.8	3.3	2.7	0.3	10.0	2.1	4.9	0.0	38.6
22'33'4'5'6'-OeCB(#201/198)	39.4	22.1	0.5	95.3	69.0	38.3	5.5	239.1	32.2	17.1	12.4	131.0
22'344'5'6'-OeCB(#203)	37.4	23.6	0.5	126.8	59.0	40.8	3.1	273.5	25.0	12.8	8.9	90.8
22'33'44'5'6'-OeCB(#195)	10.2	7.5	0.5	43.8	14.3	11.9	1.2	77.8	5.8	3.0	1.9	20.9
22'33'44'5'5'-OeCB(#194)	40.8	24.7	1.0	130.7	53.9	34.2	4.0	216.2	27.4	15.3	8.6	129.3
233'44'5'6'-OeCB(#205)	1.8	1.5	0.2	9.1	3.1	2.9	0.3	18.1	1.0	0.4	0.3	2.7
22'33'4'5'5'6'-NoCB(#208)	2.9	1.5	0.1	6.5	3.1	1.7	0.5	9.7	2.5	1.2	0.4	7.4
22'33'44'5'6'6'-NoCB(#207)	1.4	0.8	0.1	4.0	1.4	0.9	0.3	5.8	1.1	0.6	0.2	3.2
22'33'44'5'5'6'-NoCB(#206)	8.8	5.2	0.2	29.2	10.4	6.7	1.3	40.2	6.3	2.8	2.2	19.8
22'33'44'5'5'6'6'-DeCB(#209)	4.1	1.9	0.2	11.1	5.2	2.0	1.1	11.7	4.4	1.8	1.6	12.1
Total TrCBs	7.7	4.0	0.0	28.8	6.8	5.6	0.1	28.9	8.6	6.2	2.4	43.5
Total TeCBs	53.8	37.7	10.6	224.4	57.7	45.5	5.2	213.2	84.4	46.3	18.2	317.9
Total PeCBs	140.5	93.7	11.3	449.5	161.6	103.2	0.7	610.9	165.2	96.0	41.2	676.9
Total HxCBs	907.6	677.8	39.9	4131.0	1167.3	928.1	161.8	5245.4	603.0	275.7	201.3	1908.4
Total HpCBs	558.1	345.9	25.2	1853.6	724.6	439.9	110.1	2689.7	409.4	195.7	159.2	1294.0
Total OeCBs	191.6	197.8	3.0	1043.1	208.5	130.8	22.1	857.3	102.6	57.7	37.8	416.0
Total NoCBs	13.1	7.4	0.4	39.0	14.9	9.0	2.3	55.7	9.9	4.4	2.8	29.1
DeCB	4.1	1.9	0.2	11.1	5.2	2.0	1.1	11.7	4.4	1.8	1.6	12.1
Total PCBs	1878.5	1208.7	116.2	6958.7	1935.5	1598.3	341.5	9566.9	1387.3	643.4	518.7	4600.7
脂肪含量(%)	0.35	0.05	0.27	0.53	0.34	0.05	0.27	0.47	0.33	0.05	0.22	0.49

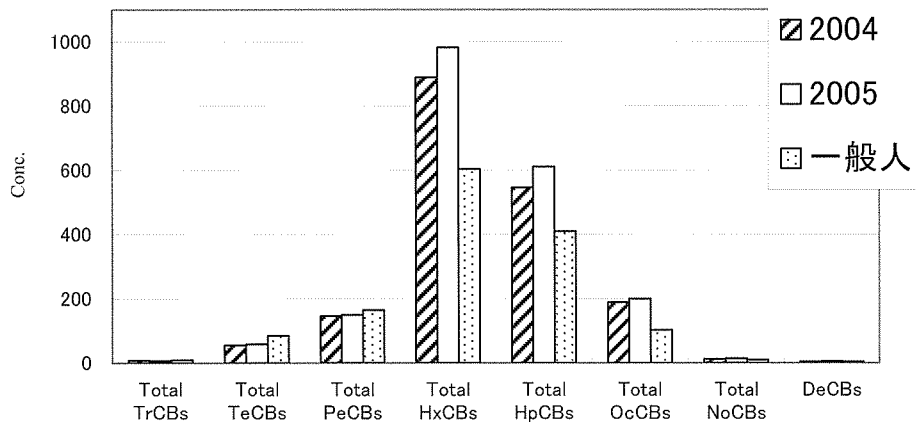


図1 油症患者と一般人のPCB同族体の濃度比較

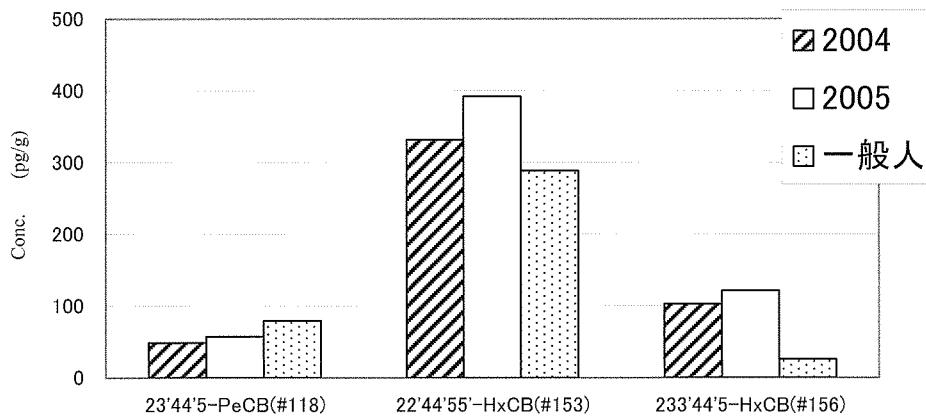


図2 油症患者と一般人のPCB異性体濃度の比較

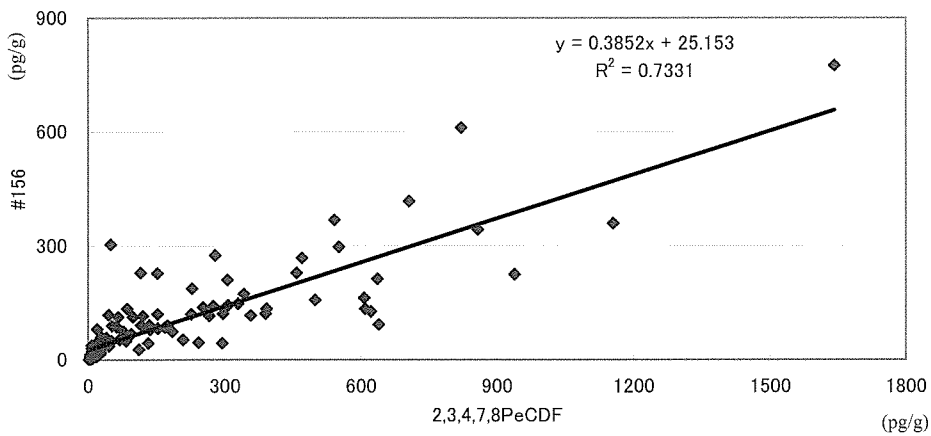


図3 油症患者血中2,3,4,7,8-PeCDF、#156濃度の相関

## 分担研究報告書

### マイクロアレイを用いた環境化学物質代謝に関与する遺伝子多型判別法の評価

分担研究者

岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 教授

研究協力者

坂 晋 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 研究員

#### 研究の要旨

Cytochrome P450 (P450、CYP)、GSTP1、NAT2、PPAR $\gamma$ 、AhRなどは外来異物代謝に大きく関わっていることから、体内の環境化学物質には、体内の様々な外来異物代謝系分子の影響が考えられる。また、これまでに外来異物代謝系の様々な分子において、遺伝子多型がその活性に影響を及ぼすことが数多く知られていることから、これらの遺伝子型を迅速、簡便かつ安価に判定する方法を開発することは、非常に有益であると考え、我々は、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調整因子として、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR $\gamma$ の10遺伝子、28アレルをスポットした試験版ガラスアレイとMultiplex-PCR法を用いたマイクロアレイ法を開発した。本研究では、妊婦380人のDNAを用いて、このマイクロアレイ法の妥当性を検討した。その結果、マイクロアレイ法においてCYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K遺伝子多型について妥当性を得ることができた（(一致率、 $\kappa$ 係数)が、それぞれ(0.98、0.95)、(0.97、0.92)、(0.89、0.74)、(0.94、0.90))が、他のアレルについては、安定した発色を得るには至らなかった。そのため、今後、方法に改良を加えるなどして、精度を高めることが必要である。

#### A. 研究目的

Cytochrome P450 (P450、CYP)は、微生物から高等生物、哺乳動物に至るまで、多くの生物に存在している。ヒトをはじめとした動物では主に肝に存在するが、赤血球や精子など一部を除くほぼすべての臓器にも少量ながら存在することが知られている。CYPは、種々の生理活性物質の生合成や代謝の他に、多くの外来性異物代謝なども行っている。CYPには様々な分子種が存在し、巨大なスーパーファミリーを形成している。また、GSTP1やNAT2などは代謝の第2相反応を担い解毒に関

わる。さらに、PPAR、AhRなどは、外来異物代謝系CYPの分子種の調整因子であり、ダイオキシンやPCB類、フタル酸エステルなどのリガンド受容体でもあることが知られている(1, 2)。しかし、これらの外来性異物代謝に関わる分子の遺伝子多型とダイオキシンやPCB類などの環境化学物質の感受性についての報告は少ない。

体内の環境化学物質には、体内の様々な外来異物代謝系分子の影響が考えられること、また、これまでに外来異物代謝系の様々な分子において、遺伝子多型がその活

性に影響を及ぼすことが数多く知られていることから（3、4）、これらの遺伝子型を迅速、簡便安価に判定する方法を開発することは、非常に有益であると考え、我々は、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調整因子として、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR $\gamma$ の10遺伝子、28アレルをサポートした試験版ガラスアレイと Multiplex-PCR 法を用いたマイクロアレイ法を開発し、妊婦 380 人の DNA を用いて、このマイクロアレイ法の妥当性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

本研究は、ヘルシンキ宣言に基づいて、札幌市内の産科において、インフォームドコンセントを得られた妊娠 23 週-35 週の妊婦 380 人を対象とした。対象者から、遺伝子多型を判定するために、血液を採取した。

（倫理面への配慮）

北海道大学医学研究科医の倫理委員会および研究協力施設の研究倫理委員会に諮り、承認を得たうえで実施した。

### 2. マイクロアレイ法による遺伝子多型判定の妥当性評価

我々は、これまで P450 として CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調整因子として、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR $\gamma$ の10遺伝子、28アレル（表1）をサポートした試験版ガラスアレイを開発した。対象者 380 人より抽出した DNA を鋳型として、Multiplex-PCR 法により、10 遺伝子、

28 アレルを増幅させ、ガラスアレイ上の DNA とハイブリダイズさせた。その後、ペルオキシダーゼにより発色させ、各遺伝子多型を判定した。このマイクロアレイ法の妥当性を、380 サンプルについて、遺伝子多型の判別としては信頼性の高い TaqMan 法ならびに Allelic discrimination 法を用いた結果から統計量を計算し一致率の検定を行うことにより、検討した。

表1 マイクロアレイ上の遺伝子とその機能

遺伝子	機能
<i>CYP1A1</i> (①I462V)	ベンツピレン代謝、肺がんリスク
<i>CYP1A2</i> (②-3860A>G)	変異により活性低下、TCDDにより AhR 依存的に発現誘導
<i>CYP1B1</i> (③A119S, ④L432V)	TCDDにより AhR 依存的に発現誘導
<i>CYP2A6</i> (⑤ <i>del</i> , ⑥ I471T)	ニトロソアミン→発ガン性ニトロソアミン、活性低下
<i>CYP2C19</i> (⑦636G>A, ⑧681G>A)	活性低下,(S)-mepheytoin 代謝
<i>CYP2D6</i> (⑨P34S)	多くの薬物代謝に関わる。多型により活性低下
<i>GSTP1</i> (⑩I105V)	ダイオキシン類による第2相薬物代謝酵素
<i>NAT2</i> (⑪R197Q, ⑫G286E)	薬物代謝酵素
<i>AhR</i> (⑬R554K)	外来異物を受容し、P450 遺伝子発現誘導 (CYP1A,1B)
<i>PPAR<math>\gamma</math></i> (⑭P12A)	P450 遺伝子発現誘導 CYP4A、変異により機能低下

### C. 研究結果

試験版ガラスアレイにスポットした 10 遺伝子、28 アレルのうち、CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K については、安定した発色を得ることができたが、他のアレルについては安定した発色を得ることができなかった。

安定した発色を得ることができた CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K について、今回の対象者である妊婦 380 人の多型頻度は表 2 のようであった。また、これらの判定結果について、信頼性の高い TaqMan 法での結果と比較することにより評価した。その結果、CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K について、(一致率、 $\kappa$  係数) はそれぞれ (0.98、0.95)、(0.97、0.92)、(0.89、0.74)、(0.94、0.90) であった。(表 3)。

表 2 マイクロアレイ法の判定による妊婦 380 人における遺伝子多型

CYP1A1 I462V		CYP1B1 L432V	
I/I	233 (61.3%)	L/L	286 (75.2%)
I/V	132 (34.7%)	L/V	86 (22.6%)
V/V	15 (3.9%)	V/V	8 (2.1%)
Undetermined	—	Undetermined	—
GSTP1 I105V		AhR R554K	
I/I	274 (72.1%)	L/L	148 (38.9%)
I/V	96 (25.3%)	L/V	156 (41.1%)
V/V	4 (1.1%)	V/V	75 (19.7%)
Undetermined	6 (1.6%)	Undetermined	1 (0.3%)

表 3 マイクロアレイ法による結果の妥当性

遺伝子	一致率	$\kappa$ 係数	<i>P</i>
CYP1A1 I462V	0.98	0.95	0.00
CYP1B1 432V	0.97	0.92	0.00
GSTP1 I105V	0.89	0.74	0.00
AhR R554K	0.94	0.90	0.00

### D. 考察

今回、CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K については、マイクロアレイ法で安定した結果を得ることができた。これら 4 遺伝子 8 アレルほどの検出力であれば、遺伝子型を判定するための初期スクリーニングとして、十分活用できると考えられる。しかし、その他の遺伝子については、安定した発色はられなかった。特に、CYP2A6 I471T、NAT2 R197Q、NAT2 G286E、CYP2C19 681G> A については、発色そのものを得ることができなかった。そのため、遺伝子型を網羅的に判定するための初期スクリーニングとして、ガラスアレイ上にスポットするアレルは、CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K で得られたような検出力と精度が必要であると考えられる。

本研究で CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K 以外のアレルでは安定した発色を得ることができなかった原因として、PCR の正確性、ハイブリダイゼーションの条件などが原因として考えられる。今回行った multiplex PCR 法を利用したマイクロア

レイ法は、従来の PCR-RFLP 法と比較して、簡便に多くの遺伝子アレルの検出を行うことができるため、約 4000 個報告されている薬物代謝関連遺伝子の遺伝子多型を短時間で網羅的に判定するためには適した方法と考えられたが、本研究の結果から、網羅的に行うという点では、実用性が低いと考えられる。そのため、今後、方法に改良を加えるなどして、精度を高めることが必要である。現在マイクロアレイ法による遺伝子多型の解析として、Invader 法や Arrayed primer extension (APEX) 法が主流となっている。これらの方法は最終的に蛍光シグナルを検出することによって多型を判別することから、特殊な機器を必要としなくてはならない。しかし、APEX 法の原理である on chip で DNA サンプルの extension を検出する原理などを利用した方法に、最終的に本研究で用いた HRP 発色法を組み合わせることができれば、特殊な機器を必要とすることなく、より精度の高いマイクロアレイ法による遺伝子多型の判定を行うことができる可能性がある。

#### E. 参考文献

- 1) Chen G and Bunce NJ (2004) Interaction between halogenated aromatic compounds in the Ah receptor signal transduction pathway. *Environ. Toxicol.* 19: 480-489.
- 2) Lapinskas PJ, Brown S, Leesnitzer LM, Blanchard S, Swanson C, Cattley RC and Corton JC (2005) Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology* 207: 149-163.
- 3) Harper PA, Wong JMY Lam MSM and Okey AB (2002) Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem. Biol. Interact.* 141: 161-187.
- 4) Wong JMY, Okey AB and Harper PA (2001) Human aryl hydrocarbon receptor polymorphisms that result in loss of CYP1A1 induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 990-996.

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

坂 晋、近藤朋子、佐々木成子、加藤静恵、中島そのみ、前田信彦、飯田隆雄、西條泰明、佐田文宏、岸 玲子、「胎児期の化学物質暴露による次世代影響に関する前向きコホート研究—血液中ダイオキシン濃度とマイクロアレイを用いた遺伝子多型との関連」第 76 回日本衛生学会総会、山口県宇部市、2006 年 3 月

## 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** カネミ患者の健康障害の改善には、現在でも患者体内に高濃度で残存する原因物質を積極的に体外へ排泄することが最も有効である。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に富む栄養補助食品である玄米発酵食品ハイ・ゲンキ葉緑素入り (FBRA) にそのような作用が認められるかどうか、油症患者の協力により検討した。その結果、FBRA を1年目のみ摂取したAグループと2年目のみ摂取したBグループでそれぞれFBRAの摂取により、カネミ油症の最も重要な原因物質である2,3,4,7,8-PeCDFが2.9%と1.6%、1,2,3,4,7,8-HxCDFが16.5%と2.7%、1,2,3,6,7,8-HxCDFが14.7%と1.6%血中濃度が低下し、これらのPCDFs同族体の体外排泄が示された。そして、もともとの汚染レベルが高かったAグループのほうがBグループよりもFBRAによるPCDFs同族体の体外への排泄に効果があった。

#### A. 研究目的

カネミ油症の主原因物質はダイオキシン類の一種、PCDFsである。油症発症以来38年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<sup>1) 2) 3)</sup>。そこで、この研究では食物繊維と葉緑素を比較的多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の変化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に富む栄養補助食品は株式会社玄米酵素(本社:北海道札幌市)が30年以上にわたって製造・販売している玄米発酵食品ハイ・ゲンキ葉緑素入り(以下FBRAと略)である。

被験者は油症患者で、Aグループは最初

の1年間、そしてBグループは2年目の1年間FBRAを摂取する。したがって、Aグループは2年目の1年間、Bグループは最初の1年間は自由に喫食した。

Aグループは男性3名、女性7名で、平均年齢が67.7歳、Bグループは男性4名、女性4名で、平均年齢が64.1歳であった。

この両グループについて、FBRA摂取前のPCDFs同族体による汚染レベルを調べるために1週間以内に2回の採血(1回当りの採血量は約10ml)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PCDFsによる汚染レベルの判明した油症患者に対して、Aグループでは最初の1年間、Bグループは2年目の1年間、毎日毎食後1人当たり2~3包(7.0~10.5g)のFBRAを食べていただいた。この他はAグループでもBグループでも毎日自由に喫食した。

FBRAの摂取開始1年後と2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年後および2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、FBRA による PCDFs の体外排泄促進効果を評価した。

### C. 研究結果および考察

A グループと B グループの摂取前、1 年後および 2 年後の 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF、1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF、1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF の血中平均濃度の変化は表 1 のようであった。

表 1 からわかるように、PCDFs の 3 種の同族体について、A グループのほうが平均濃度で B グループよりも 2 倍以上高い。つまり、最初の 1 年間 FBRA を摂取した、A グループのほうが B グループよりも PCDFs による汚染レベルの高い患者が多かった。

FBRA の摂取による PCDFs 各同族体の血中濃度の低下は次のようであった。( ) 内は各同族体の減少率である。

2, 3, 4, 7, 8-PenCDF では A グループ: 0.04 pg/g (2.9%)、B グループ: 0.009 pg/g (1.6%)。1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF では A グループ: 0.081 pg/g (16.5%)、B グループ: 0.004 pg/g (2.7%)。1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF では A グループ: 0.022 pg/g (14.7%)、B グループ: 0.001 pg/g (1.6%) であった。

このように、FBRA による PCDFs 同族体の血中濃度の低下は B グループよりも A グループで大きく、PCDFs による汚染レベルが高いほど、有効であるように思えた。

ここで、血液の脂肪含有率を 0.3% と仮定して、PCDFs 同族体の脂肪重量当りの平均濃度を算出すると、表 2 のようになる。

これらの脂肪重量当りの濃度で、体内の脂肪組織が各 PCDFs 同族体に汚染されていると考え、FBRA の摂取によりどの程度体内蓄積量が減少したのか考えてみる。まず、体重を 60kg、体脂肪率を 20% と仮定する。すると、体内には脂肪が 12kg 存在する。

FBRA 摂取前の A グループと B グループには、体内にそれぞれ 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF が 5436ng と 2280ng、1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF が 1968ng と 588ng、1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF

が 600ng と 240ng 存在した。それが 1 年間 FBRA を摂取することにより、体内残留量は 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF が 5280ng と 2244ng に、1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF が 1644ng と 576ng に、そして 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF が 516ng と 240ng になった。これらの結果より、体内から A グループ、B グループそれぞれ 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF は 156ng (2.9%) と 36ng (1.6%)、1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF は 324ng (16.5%) と 12ng (2.0%)、1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF は 84ng (14%) と 0ng 排泄されたことになる。

以上の結果から、FBRA は油症の主要原因物質であるこれら 3 種の PCDFs 同族体の体外への排泄を促進するが、体内汚染レベルの高い油症患者からの排泄がより有効と考えられた。

このような FBRA によるダイオキシン類の体外排泄促進は、これまでの我々の一般人を対象とした研究でも実証されている<sup>4) 5) 6) 7)</sup>。

### 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 Dibenzo-p-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.
- 4) Nagayama J., Takasuhga T., Tsuji H. and Iwasaki T.: Decrease in blood levels of dioxins after the one year intake of FBRA in Japanese. *Organohal. Comp.* **52**: 293-296, 2001.
- 5) Nagayama J., Takasuhga T., Tsuji H., Umehara M., Sada T. and Iwasaki T.:

Active elimination of causative PCDFs/DDs congeners of Yusho by one year intake of FBRA in Japanese people.

*Fukuoka Acta Med.* 94: 118-125, 2003.

6) Takasuga T., Senthilkumar K., Takemori H., Ohi E., Tsuji H. and Nagayama J. : Impact of FEBRA (fermented brown rice with *Aspergillus oryzae*) intake and concentrations of PCDDs, PCDFs and PCBs in blood of humans from Japan. *Chemosphere* 57: 1409-1426, 2004.

7) Nagayama J., Takasuga T., Tsuji H. and Iwasaki T. : Promotive excretion of causative agents of Yusho by one year intake of FBRA in Japanese people. *Fukuoka Acta Med.* 96: 241-248, 2005.

表 1. PCDFs 同族体の血中濃度の変化

同族体	血中濃度 (pg/g)*		
	摂取前	1 年後	2 年後
2, 3, 4, 7, 8-PeCDF			
A グループ	1.36 ± 1.71	1.32 ± 1.68	1.31 ± 1.67
B グループ	0.571 ± 0.465	0.570 ± 0.476	0.561 ± 0.473
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF			
A グループ	0.491 ± 0.734	0.410 ± 0.609	0.423 ± 0.648
B グループ	0.159 ± 0.113	0.148 ± 0.107	0.144 ± 0.113
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF			
A グループ	0.150 ± 0.195	0.128 ± 0.159	0.133 ± 0.174
B グループ	0.064 ± 0.037	0.061 ± 0.037	0.060 ± 0.040

\* : 平均値 ± 標準偏差

表 2. PCDFs 同族体の脂質重量当りの血中平均濃度の変化

同族体	血中平均濃度 (pg/g 脂肪)*		
	摂取前	1 年後	2 年後
2, 3, 4, 7, 8-PeCDF			
A グループ	453	440	437
B グループ	190	190	187
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF			
A グループ	164	137	141
B グループ	53	49	48
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF			
A グループ	50	43	44
B グループ	21	20	20

\* : 血液の脂肪含有率を 0.3% と仮定した。

## 分担研究報告書

### 食物成分 resveratrol による TCDD 誘発性脂肪肝軽減の試み

分担研究者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野 教授  
赤峰 昭文 九州大学大学院歯学研究院  
口腔機能修復学講座 歯内疾患制御学研究分野 教授

研究協力者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野 助教授  
石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野 助手  
橋口 勇 九州大学大学院歯学研究院  
口腔機能修復学講座 歯内疾患制御学研究分野 助手

#### 研究要旨

当研究室では、昨年度の研究報告において、赤ワインやピーナッツの渋皮に多く含まれる植物ポリフェノールである resveratrol が、ダイオキシン類の毒性の一部を軽減することを明らかにした。本年度は、resveratrol の投与による 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 毒性への影響を、特に誘発性脂肪肝および酸化ストレス発生を中心として検討した。その結果、TCDD と resveratrol を併用投与したマウスにおいて、TCDD 単独投与したマウスに比べ体重増加抑制の軽減、並びに肝トリグリセリド蓄積の軽減が観察された。一方、TCDD による酸化ストレスの発生、並びに肝障害に対しては顕著な改善効果は見られなかった。また、resveratrol 単回投与による影響を観察した結果、TCDD 誘発性脂肪肝に対する resveratrol の軽減効果において、酸化ストレスの関与は低いものである可能性が示された。本研究より、resveratrol の摂取は、ダイオキシン類の毒性の一部を軽減することが明らかとなった。今後は、油症患者への適応を考える上で、低用量の TCDD 曝露に対する resveratrol の効果、さらに、resveratrol による脂肪肝軽減機構の解明などが必要であると考えられる。

#### A. 研究目的

当研究室では、これまでに、ダイオキシン類の毒性を軽減する作用をもつ成分の探索を、主に食物成分に注目して行ってきた。その結果、赤ワインやピーナッツの渋皮に多く含まれる植物ポリフェノールである *trans*-resveratrol (resveratrol, Fig.

1) が、ダイオキシン類の一つである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, Fig. 1) の毒性の一部を軽減することを明らかにした(平成17年度分担研究報告書にて報告済み)。さらに、TCDD による脂肪肝を軽減する可能性があることも併せて報告している。油症患者に見られる高脂