

胎児性油症の原因物質に関する研究

研究分担者 長山 淳哉 九州大学大学院医学研究院保健学部門 准教授

研究要旨 カネミ油症中毒事件発生後2年～5年で出生した2名の黒い新生児を含む6名の胎児性油症患者と同時期に誕生した5名の健常児の保存臍帯を用いて、PCDFs、PCDDs、ダイオキシン様PCBsおよびPCBsの濃度を分析・定量した。その結果、胎児性油症の90%はPCDFsが原因のPCDFs中毒であることが明らかになった。また、PCDDsとダイオキシン様PCBsの毒性もそれぞれ8%と2%寄与していることが判明した。

A. 研究目的

40年前に発生したカネミ油症（以下油症と略す）中毒事件では、化学分析上の技術的問題から、原因物質の分析が不可能であり、そのために油症患者はその認定や治療に際し、多大の不利益を被ってきた。この研究では、少しでもそのような認定・治療上の欠陥・不備の穴を埋めるために、油症患者と認定された母親から35年～38年前に生まれ、胎児性油症と考えられる患者の保存臍帯中に存在する発症当初の油症原因物質濃度を同じ時期に健康な母親から誕生した健常者の保存臍帯中の濃度と比較・検討することにより、胎児性油症の原因物質を究明しようとするものである。

B. 研究方法

油症と認定された母親から1970年～1973年に生まれ、1974年～1976年に油症と認定された胎児性油症と考えられる患者（男性4名、女性2名、うち男女各1名は皮膚が黒い新生児）の保存臍帯と1966年～1975年に健康な母親から誕生した健常者（男性2名、女性3名）の保存臍帯を化学分析用検体とする。これら保存臍帯中のダイオキシン類—ポリ塩化ダイベンゾフラン（PCDFs）、ポリ塩化ダイベンゾ-*p*-ダイオキシン（PCDDs）、ダイオキシン様ポリ塩化ビフェニール（ダイオキシン様PCBs）—および

PCBsの濃度をHRGC-HRMSを用いて測定し、両グループの分析結果を比較・検討する。（倫理面への配慮）

長崎地区および福岡地区の研究協力者に対して、両地区の油症相談員により、この調査の目的と方法、調査への参加とその撤回、調査による利益・不利益、プライバシーや個人情報の保護、調査費用および調査に関する連絡先について、九州大学大学院医学研究院等倫理委員会に提出し、許可された内容に従って十分に説明し、了解されている。

C. 研究結果および考察

1. 胎児性油症児について、黒い新生児との比較

通常の皮膚と黒い皮膚の胎児性油症児について2,3,7,8-四塩化ダイベンゾ-*p*-ダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)に換算したダイオキシン類濃度を比較すると、Fig.1のようであった。すなわち、前者と後者で、PCDFs、PCDDsおよびダイオキシン様PCBs濃度はそれぞれ12 pg-TEQ/g、1.2 pg-TEQ/g、0.3 pg-TEQ/gと13 pg-TEQ/g、1.4 pg-TEQ/g、0.2 pg-TEQ/gであり、いずれも統計学的有意差は認められなかった。その結果、ダイオキシン類全体の濃度はそれぞれ13 pg-TEQ/gと15 pg-TEQ/gとなった。また、PCBs濃度は前者が106105 pg/g、後者が

97889 pg/g で、ほぼ同じレベルであった。これらの結果から、胎児性油症における皮膚のメラニン色素の沈着は個人的な遺伝素因の相違にあり、ダイオキシン類への曝露のちがいでないと考えられる。

2. 胎児性油症児と健常児の比較

胎児性油症児と健常児の保存臍帯における PCDFs、PCDDs、ダイオキシン様 PCBs およびダイオキシン類全体の 2, 3, 7, 8-TCDD 換算濃度を Fig. 2 に示す。つまり、それぞれ、12.2 pg-TEQ/g、1.3 pg-TEQ/g、0.3 pg-TEQ/g、13.8 pg-TEQ/g と 0.0 pg-TEQ/g、0.2 pg-TEQ/g、0.1 pg-TEQ/g、0.3 pg-TEQ/g であり、胎児性油症児のほうが 46 倍高かった。また、PCBs 濃度は前者が 100628 pg/g、後者が 53176 pg/g で、前者のほうが約 2 倍高かったが、胎児性油症への PCBs の寄与は無視できると考えられた。これらの結果、胎児性油症への各ダイオキシン類の毒性寄与率を計算すると PCDFs が 90%、PCDDs が 8%、ダイオキシン様 PCBs が 2% となり、成人の油症と同様に、胎児性油症も PCDFs 中毒であることが明らかとなった。

D. 結論

これまで成人油症の 90% は PCDFs によるものと考えられていたが、以上のような研究結果より、胎児性油症も、その毒性の 90% は PCDFs に起因する中毒、つまり PCDFs 中毒であることが判明した。

E. 研究発表

1. 論文発表

Nagayama J., Todaka T., Hirakawa H., Kajiwaru J., Yoshimura T. and Furue M.: Evaluation on toxic contribution of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs determined in the preserved umbilical cords of Yusho patients. *Organohalogen Compounds* 70: 410-413, 2008.

Nagayama J., Hirakawa H., Kajiwaru J.,

Todaka T., Shibata S., Tsuji H. and Iwasaki T.: Promotive excretion of polychlorinated dibenzofurans by FBRA in patients with Yusho. *Organohalogen Compounds* 70: 1574-1577, 2008.

2. 学会発表

Nagayama J., Todaka T., Hirakawa H., Kajiwaru J., Yoshimura T. and Furue M.: Evaluation on toxic contribution of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs determined in the preserved umbilical cords of Yusho patients. 28th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs). Birmingham, England UK. August, 2008.

Nagayama J., Hirakawa H., Kajiwaru J., Todaka T., Shibata S., Tsuji H. and Iwasaki T.: Promotive excretion of polychlorinated dibenzofurans by FBRA in patients with Yusho. 28th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs). Birmingham, England UK. August, 2008.

Nagayama J., Todaka T., Furue M., Hirakawa H., Kajiwaru J., Hori T. and Yoshimura T.: Yusho - PCDF Poisoning -. International Symposium on Environmental Analysis 2008. Fukuoka, Japan. November, 2008.

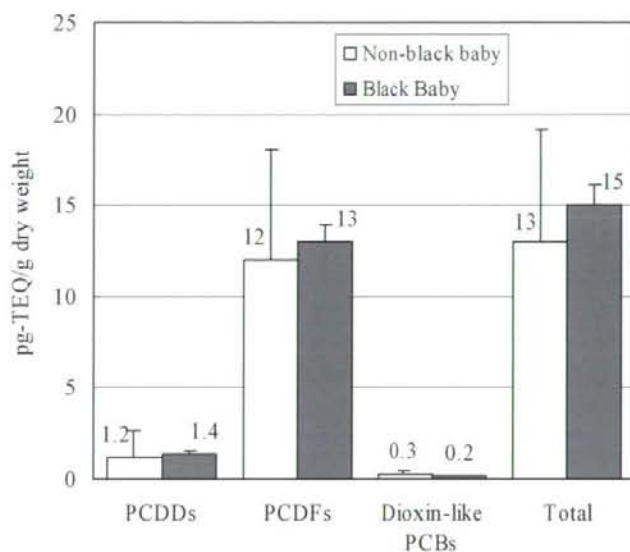


Fig. 1. 2,3,7,8-TCDD Equivalent concentrations in the preserved umbilical cords of black and non-black babies in fetal Yusho patients

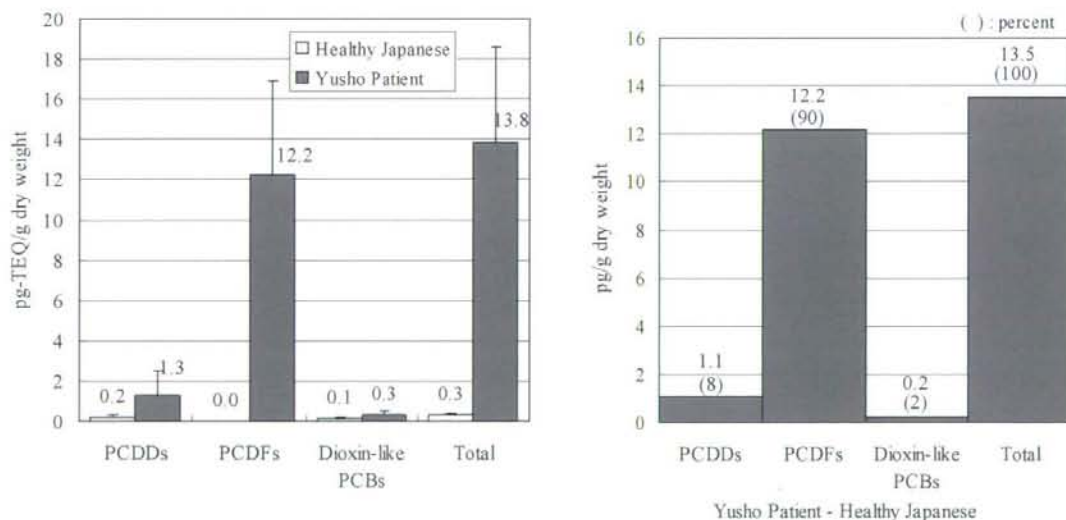


Fig. 2. 2,3,7,8-TCDD Equivalent (WHO 05) concentrations of fetal Yusho patients and healthy Japanese people

現在の患者ごとの排出速度を考慮した PeCDF 排出モデルに関する研究

研究分担者	今村 知明	奈良県立医科大学 健康政策医学講座	教授
研究協力者	小池 創一	東京大学医学部附属病院企画情報運営部	准教授
	松本 伸哉	東京大学医学部附属病院企画情報運営部	客員研究員
	神奈川芳行	東京大学大学院医学系研究科	大学院生
	赤羽 学	奈良県立医科大学 健康政策医学講座	講師

研究要旨 2001 年度～2006 年度の油症患者一斉検診を受診し、PeCDF 値を測定した油症患者では、患者ごとに半減期が異なっていた。各患者が二つの吸収機構を有するモデルを想定した数理モデルを組み立て、シミュレーションを実施した。シミュレーション結果は、検査結果とよく適合しており、想定したモデルが現実存在している可能性を示しているものと考えられた。

A. 目的

半減期のバリエーションの研究[1]により PeCDF の半減期が患者ごとに異なることがみつかった。特に、200pg/g 以上の患者では、半減期が7年程度の患者と、半減期が無限大、つまり減少していない患者群がいる可能性が示された。このような状況は、今までの研究成果だけでは説明がつかない。これらの現象について、数理モデルを組立て、可能性を見つけ出すことを目的とした。

B. 研究方法

患者ごとに異なる係数を有するモデルを組立て、計測データとの差異が最小となる係数を数値微分法により求めた。

B. 1. 対象データ

今回は、全患者を対象とせず、昨年の研究の中でみつかった、典型的と考えられる患者3名を対象とした。各患者の血中濃度を表1に示す。

B. 2. 想定モデル

PeCDF を排出する機構に対して、腸管等から再吸収する機構が存在すると仮定し、その再吸収機構として、2二つの機構を想定する。ひとつは吸収能力が低い、吸収量に限界の存在しない機構、もうひとつは吸収能力が高いが、吸収量の限界が

存在する機構を想定する。

図1に想定モデルの機構の模式図を示す。 V_0 は、摂取量である。 V_1 は、体内から腸管などへの排泄量であり、体内からの排泄量 V_1 は体内の総脂肪量 Q_t に比例すると仮定する。この体外からの摂取量と体内からの排泄量により、腸管等を通過する量 V_2 が求められる。限界のない吸収機構での吸収量 V_3 は、腸管等を通過する量 V_2 に比例すると仮定する。限界が存在する吸収機構での吸収量 V_4 は、通過量 V_2 と限界量および吸収能力で規定されるシグモイド関数を仮定する。図2に二つの吸収モデルを示す。これらのモデルを年単位に離散化し、シミュレーションを実施し、 α 、 β_1 、 β_3 、 β_4 を引数として、各患者の計測値との差異の二乗を誤差関数とし、この誤差関数を最小化するように係数を求める。

シミュレーション途中で、対数計算と足し算を実施し、計算上の誤差が蓄積しやすく、コンピュータで通常に用意されている数値型では、計算誤差のために適切な結果が得られなかった。このため、平山[2]の可変長演算パッケージ MPPACK を用いて計算を行った。

まず、4つの引数に対して推定を行った。現実と矛盾する結果となった。事件発生当初から10年程度は、制限のある吸収機構

の割合がほとんど0に近いことから、 β_1 、 β_3 を半減期を4年になるように固定して、 α と β_4 を推定することとした。

C. 結果

C. 1. 4引数に対する推定結果

表2、図3に結果を示す。現在も減少し続けている患者1では、2つの吸収機構がバランスよく配分されていた。患者2は現在ほとんど減少しておらず、高濃度を維持している患者である。このような患者は、能力制限がない吸収機構がほとんど機能しておらず、初期における暴露においても、ほとんど吸収されなかったが、能力制限がある吸収機構が高能力なため、そのままの濃度を維持している結果となった。患者2はその中間的な値を示していた。

C. 2. 半減期4年を想定した推定結果

表3、図4にシミュレーション結果を示す。患者1は、ある程度PeCDF濃度が低下しているが、現在も下がり続けている患者である。この患者では、ほぼ同一の半減期できていたが、30年目ぐらいで半減期が鈍っている。患者2は、残留濃度が高いのに、すでに半減期が停滞していると思われる患者である。この患者では、かなり初期の段階から半減期が鈍っている。患者3は、半減期のほぼ中間的な濃度で、減少を続けている患者である。この患者では、20年目程度から半減期が鈍っている。

D. 考察

4引数に対する推定を行った場合には、現在ほとんど濃度が減少していない患者では、初期暴露において率としては微量しか吸収されていなかったが、以降は、その濃度を維持していることになり、奇妙な結果となった。これは、PeCDFの濃度の計測

値がないため、過去の計測値として不自然であっても数値的な解として正しくなってしまうものと考えられた。このため、初期における濃度に関する情報を用いる必要があった。半減期4年を想定した推定では、初期暴露量と半減期が各患者において同じであったと仮定し、初期においては、ほぼ同じ濃度の動きを示しており、これがどの程度現実を反映しているのかは更なる検証が必要である。

今回想定したモデルは次の二つの吸収機構を有すると仮定した。

(1) 吸収能力は低い、吸収能力の限界が存在しない吸収機構

(2) 吸収能力は高い、吸収能力の限界が存在する吸収機構

これらの二つの吸収機構を想定したことにより、現在の血中濃度の状況を適切に表現可能であると考えられた。これらの二つ吸収機構が存在する可能性を示したのと考ええる。これらの吸収機構のうち、

(1)の機構は、純粋に浸透圧に主要因とする機構が想定でき、(2)は特定の化合物を選択的に回収する機構が想定できるものと考ええる。

E. 参考文献

- 1) 今村知明、小池創一、松本伸哉、神奈川芳行、赤羽学、「油症の各患者の血中PeCDF濃度の半減期のバリエーションに関する研究」、厚生労働科学研究 平成20年度総括・分担研究報告書。
- 2) 平山弘、「多倍長演算パッケージMPPACKの高速化」情報処理学会研究報告、計算機アーキテクチャ研究会報告 Vol. 98, No. 18(19980305) pp. 1-6

表 1. PeCDF 濃度

	患者1	患者2	患者3
2001年	166.3	1139.1	283.1
2002年	94.8	1399.1	337.1
2003年	100.7	1170.4	262.0
2004年	98.4	1155.5	226.7
2005年	95.4	1284.3	229.2
2006年	85.1	1237.5	236.7

図 1. 想定モデル

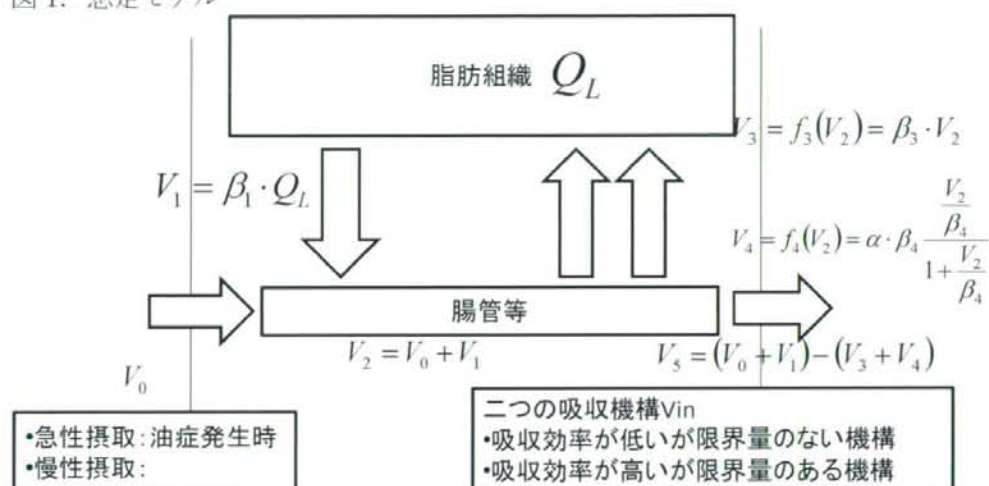


図 2. 二つの吸収モデル

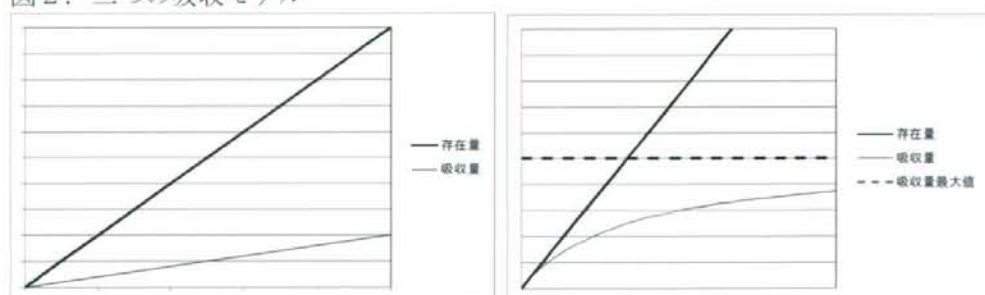


表 2. 係数 (4 係数推定)

	β_1	β_3	β_4	α
患者 1	0.39620	0.37601	3.96E-07	0.61760
患者 2	0.00134	0.00068	3.23E-07	0.55511
患者 3	0.09227	0.00261	3.22E-07	0.55052

図3. シミュレーション結果 (4係数推定)

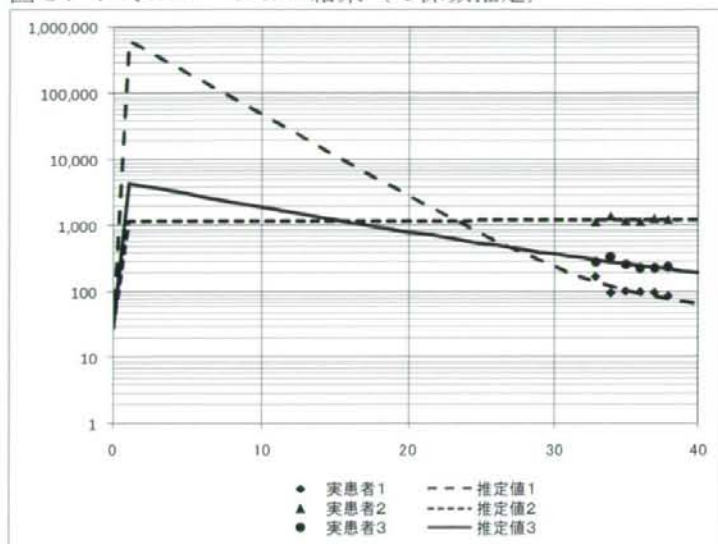
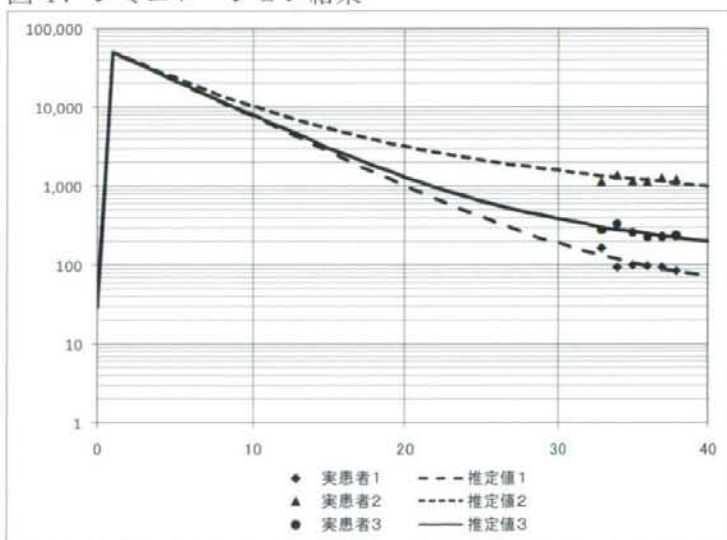


表3. 係数 (2係数推定)

	β_1	β_3	β_4	α
患者1	0.19505	0.03000	2.22E-07	0.970000
患者2	0.19505	0.03000	9.43E-06	0.970000
患者3	0.19505	0.03000	1.06E-06	0.970000

図4. シミュレーション結果



油症の各患者の血中 PeCDF 濃度の半減期のバリエーションに関する研究

研究分担者	今村 知明	奈良県立医科大学 健康政策医学講座	教授
研究協力者	小池 創一	東京大学医学部附属病院企画情報運営部	准教授
	松本 伸哉	東京大学医学部附属病院企画情報運営部	客員研究員
	神奈川芳行	東京大学大学院医学系研究科	大学院生
	赤羽 学	奈良県立医科大学 健康政策医学講座	講師

研究要旨

最近のダイオキシン類の測定技術の進歩により、PeCDF 等の測定が可能になった。油症検診で希望する患者に対して、PeCDF の血中濃度が測定され始めてから、6 年が経過している。本研究は、油症患者の測定結果から PeCDF の半減期を求めることと、さらに、本研究で得られた半減期を、これまで報告されている半減期と比較することを目的とする。

油症患者の PeCDF 濃度を 2 を底とする対数に変換したものを従属変数とし、計測年を独立変数として、線形回帰分析が行われた。この線形回帰分析でえられた 1 次の係数は、半減期の逆数である。

PeCDF の半減期は、患者間で非常に大きなばらつきがあった。特に、油症患者の診断基準の一つである PeCDF 濃度 50pg/g 以上の患者群には、既存の報告と同等の半減期 7 年程度を示す患者群と、PeCDF 濃度が減っていない患者群の 2 群が存在した。

これまでの研究は、PeCDF の半減期が約 7 年と報告している。しかし、本研究は、PeCDF 濃度が減少する群と PeCDF 濃度が高濃度で維持されている群の 2 群が存在することを示した。つまり、これまでに提唱されているような濃度に依存した PeCDF の排出モデルのみでは説明ができない患者群が存在することを示している。ゆえに、我々の研究は、ヒトにおける PeCDF の排出を説明するためには、さらに複雑なモデルが必要なことを示唆している。

A. 目的

近年、PeCDF を含むダイオキシン類の測定技術が発達したことによって、通常の血液検査に必要な血液量で、血中のダイオキシン類の定量が可能となった。2001 年度の油症検診から、希望する受診者に対して、ダイオキシン類の測定が行われている [1, 2]。油症検診におけるダイオキシン類の計測開始から 6 年が経過し、実際の患者の計測値を用いた半減期の推定が可能になった。そこで、本研究の目的は、100 名を超える油症患者に対して測定した PeCDF 濃度の変化を元に、PeCDF の半減期を推定することである。

B. 研究方法

B. 1. 対象データ

2001 年から 2006 年までの油症定期検診において、PeCDF の血中濃度を 3 回以上測定された患者 762 名を対象とした。毎年 1 回の検診を 6 年連続で受診した患者は 38 名、5 回受診した患者は 162 名、4 回受診は 236 名、3 回受診は 326 名であった。本研究は、各患者における PeCDF の半減期を計算することを目的としているため、PeCDF 濃度を測定したすべての検診受診者を分析の対象にした。

B. 2. 想定モデル

血液脂質中の PeCDF 濃度を 2 を底とする対数に変換した値を従属変数とし、測定

年を独立変数として、以下に示す関数を用いて、線形回帰分析は実施された。

$$\log_2 C_{\text{year}} = a \cdot \text{year} + b$$

これによって得られた傾きの逆数が半減期を示す。例えば、傾きが-1であれば、1年で従属変数の値が1減少し、PeCDF濃度が半分になるため、半減期は1年となる。傾きが-0.1であれば、10年で従属変数の値が1減少し、PeCDF濃度が半分になるため、半減期は10年である。

C. 結果

C. 1. 傾き・濃度関係

図1は代表的な患者の計測値と線形回帰の推定式を示している。患者1では、傾きが-0.023であるため、PeCDFの半減期は、43.5年である。患者2では、傾きが0.006で正であるために半減期ではなく、PeCDFの倍增期間が167年と算出された。

受診回数別、濃度区分別の各患者の傾きの平均値を表1に示す。2004年におけるPeCDF濃度によって、濃度区分は作られている。500pg/g以上の区分で6回受診した患者は、10人いた。その10人の患者の傾きの平均値は-0.0199であったため、半減期は50.2年であった。10人での傾きの標準偏差は0.0438であり、傾き0が95%の信頼区間に含まれていた。

C. 2. 受診回数ごと、濃度区分ごとの傾きの平均値

図2に、受診回数ごと、濃度区分ごとの傾きの平均値が示されている。PeCDF濃度20pg/gから50pg/gの範囲では、各受診回数における傾きの平均値は0に近く、PeCDF値の増減があまりない。これに対し、50pg/gから100pg/gの範囲では、傾きが-0.04から-0.08であり、体内のPeCDFは減少傾向にある。濃度がさらに高くなるにつれて、傾きが小さくなり、半減期が大きくなる傾向があるようにみえる。

C. 3. 5回以上受診患者の濃度別傾き

傾きを0.025刻みの区分にして、そこに入る患者の人数が、図3～図7の度数分布グラフに示されている。横軸は、推定され

た半減期を表している。PeCDF測定の誤差によるぶれが半減期の推定に影響を及ぼしている場合には、この度数分布において、患者の人数の分布が釣鐘型になると考えられる。油症検診は単一の測定装置を用いて行われているために、測定機器の違いによる測定値の偏差は存在しない。

(1) PeCDF濃度：500pg/g lipid以上

図3は、500pg/g以上のPeCDF濃度の患者における、推定半減期ごとの度数分布グラフである。推定半減期が8年から10年であった患者が1名、13.3年から20年が2名、20年から40年が3名、40年以上が2名であった。驚くことに、増加傾向を示すものが6名おり、そのうちの4名は40年以上で、2名は20年から40年でPeCDF濃度が倍増すると推定された。

(2) 200-500pg/g lipid

PeCDF濃度が200-500pg/gの患者における、度数分布グラフが図4に示されている。推定半減期が20年から40年の患者が7名で、もっとも人数が多かった。推定半減期が20年から40年の区分を中心とした釣鐘型の分布傾向があった。

(3) 100-200pg/g lipid

半減期40年以上と推定される患者が8名いた(図5)。半減期40年以上とは、実際の生体内濃度はほとんど変化していないと推測される。また、推定半減期8年から10年、10年から13年の区分にそれぞれ3名の患者がおり、もう一つの小さなピークを作っている。

(4) 50-100pg/g lipid

推定半減期が40年以上の患者が4名いる一方、半減期8年から10年の患者が3名おり、ふたつのピークをなしているように思われる(図6)。

(5) 20-50pg/g lipid

半減期5年から6.67年の範囲に3名の患者がいる一方、13年から20年で体内のPeCDF濃度が倍増する患者が6名いた(図7)。患者の度数分布は、PeCDF濃度が増加傾向を示す者と減少傾向を示す者の両方にまたがっていた。一部の患者の半減期

は、この群のピークから離れた傾向を示していた。

D. 考察

ダイオキシン類による人に対する健康被害は、これまでにいくつかある。代表的なものとして、日本での油症、台湾での Yucheng、そして Seveso での被害が報告されている。ダイオキシン類は、生体内に取り込まれると、脂肪と親和性が高いために脂肪組織に蓄積されることが報告されている。ダイオキシン類の排泄に関する研究は、ラットやヒトで行われており、多数のダイオキシン類の半減期に関する研究がある[3, 4, 5, 6]。Geyer[3]らは、ダイオキシン類の人における半減期は、ラットの150倍であり、種による違いが非常に大きいと報告している。Kerger[4]らは、Sevesoで被害を受けた子供たちの調査を行い、ダイオキシン類の半減期が年齢と濃度に依存していると報告している。Leung[5]らは、5名の油症と3名の Yucheng の患者の調査結果から、PeCDFの半減期を推定し、高濃度の場合には1.1年であり、低濃度の場合には7.2年であったと報告している。PCDFsの半減期は濃度と年齢に依存していると結論している。

我々も本研究で、100名以上の油症患者の検診結果を用いて、PeCDFの半減期を計算した。我々の結果は、PeCDF濃度が50pg/g以下である患者の半減期は、比較的長く、中には増加している患者さえ存在することを示している。これは生体内PeCDFの排泄と自然増が拮抗している状態であろうと我々は考える。濃度が50pg/g以上の患者では、傾きが大きくなっていったが、これは半減期が短いことを示している。さらに、濃度が100pg/gの患者では、濃度が高くなるにつれて、推定半減期は長くなっていった。先に述べたように、これまでの報告では、PeCDF濃度が高い場合は半減期が短く、濃度が下がるとともに半減期が長くなるとされているが、この点は我々の結果と異なっていた。

我々の結果は、図8に示すような二つのタイプの患者群が存在する可能性を示唆

している。これまでに報告されているような単純なモデルでは、この現象を説明することが困難である。ゆえに、これまでのモデルに加えて、別なモデルが必要であると我々は考える。新たなモデルを考える上で、次の2パターンの患者群が存在する可能性に留意する必要がある。

(1) 一般的な半減期として知られているスピードで現在もPeCDFが減少している患者(図8の患者Bのパターン)

(2) 初期の排出速度は速かったが、現在は極めてPeCDFの排出速度が遅い患者(少なくとも半減期が20年以上である患者、図8の患者Aのパターン)

特に、患者Aのパターンに関しては、次のように言いなおすことができる。

(1) 初期と後期で半減期や排泄率は異なり、それぞれに個人差がある

(2) 排泄率に鈍化が起こる濃度に個人差がある。

本研究にはリミットが存在する。一つ目は、今回得られた結果には、計測上の誤差が含まれている点である。誤差をできるだけ小さくするために、今後さらに経過観察を行うことで、データの精度を上げる必要がある。二つ目は、すでに事件発生後何年も経過しており、現在のPeCDF濃度を元にして、PeCDFの濃度の推定を行うことが困難な点である。各患者の個人差を加味し、過去に遡って詳細に暴露量の推定が可能になれば、慢性症状に関して詳細な分析が可能になるかもしれない。

結論として、我々は、2001年から2006年で行われたPeCDF濃度の測定結果から、その半減期を推定した。我々のデータは、これまでに報告されている半減期とは異なるPeCDF濃度の変化を示す患者群が存在することを示した。PeCDF濃度の変化が少ない患者が、すべての濃度区分で存在した。

E. 参考文献

- 1) Iida T, Todaka T, Hirakawa H, Tobiishi K, Matsueda T, Hori T, et al: Follow-up

- survey of dioxins in the blood of Yusho (in 2001). *Fukuoka Igaku Zasshi* 2003, 94:126-135.
- 2) Kanagawa Y, Imamura T: Relationship of clinical symptoms and laboratory findings with the blood levels of PCDFs in patients with Yusho. *J Dermatol Sci* 2005, (Suppl 1):85-93.
 - 3) Geyer HJ, Schramm KW, Feicht EA, Behechti A, Steinberg C, Brüggemann R, Poiger H, Henkelmann B, Kettrup A. Half-lives of tetra-, penta-, hexa-, hepta-, and octachlorodibenzo-p-dioxin in rats, monkeys, and humans--a critical review. *Chemosphere*. 2002;48(6):631-644.
 - 4) Kerger BD, Leung HW, Scott P, Paustenbach DJ, Needham LL, Patterson DG Jr, Gerthoux PM, Mocarrelli P. Age- and concentration-dependent elimination half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Seveso children. *Environ Health Perspect*. 2006;114(10):1596-1602.
 - 5) Leung HW, Kerger BD, Paustenbach DJ, Ryan JJ, Masuda Y. Concentration and age-dependent elimination kinetics of polychlorinated dibenzofurans in Yucheng and Yusho patients. *Toxicol Ind Health*. 2007;23(8):493-501.
 - 6) Ryan JJ, Levesque D, Panopio LG, Sun WF, Masuda Y, Kuroki H. Elimination of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from human blood in the Yusho and Yu-Cheng rice oil poisonings. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1993;24(4):504-512.

表1 受診回数別濃度区分ごとの傾きの平均値

2004年推定濃度		500-	200-500	100-200	50-100	20-50	10-20	-10
6回受診	患者数	10	6	7	4	8	2	1
	傾き平均	-0.0199	-0.0490	-0.0585	-0.0850	-0.0080	-0.1389	-0.1089
	標準偏差	0.0438	0.0465	0.0542	0.0677	0.1090	0.0919	
	半減期(年)	50.20	20.43	17.09	11.76	125.56	7.20	9.18
	半減期95%信頼区間	-15.2年以下 又は 9.5年以上	-23.8年以下 又は 7.1年以上	-21年以下 又は 6.1年以上	-20.9年以下 又は 4.6年以上	-4.9年以下 又は 4.5年以上	-24.3年以下 又は 3.1年以上	
5回以上受診	患者数	14	31	26	18	36	23	14
	傾き平均	-0.0202	-0.0429	-0.0489	-0.0702	0.0048	-0.0218	0.0197
	標準偏差	0.0414	0.0585	0.0820	0.1078	0.0806	0.0918	0.1209
	半減期(年)	49.60	23.33	20.45	14.25	-209.13	45.77	-50.70
	半減期95%信頼区間	-16.4年以下 又は 9.9年以上	-13.9年以下 又は 6.3年以上	-8.9年以下 又は 4.8年以上	-7.1年以下 又は 3.6年以上	-6.1年以下 又は 6.5年以上	-6.3年以下 又は 5年以上	-3.9年以下 又は 4.6年以上
4回以上受診	患者数	17	44	34	26	50	40	25
	傾き平均	-0.0396	-0.0351	-0.0430	-0.0491	0.0125	-0.0081	-0.0010
	標準偏差	0.0682	0.0673	0.0792	0.0974	0.0763	0.1124	0.1365
	半減期(年)	25.26	28.45	23.25	20.36	-79.86	123.62	1032.18
	半減期95%信頼区間	-10.6年以下 又は 5.8年以上	-10.3年以下 又は 6年以上	-8.9年以下 又は 5年以上	-7.1年以下 又は 4.2年以上	-6.2年以下 又は 7.9年以上	-4.7年以下 又は 4.4年以上	-3.8年以下 又は 3.7年以上
3回以上受診	患者数	22	63	40	36	65	61	39
	傾き平均	-0.0461	-0.0227	-0.0390	-0.0479	0.0083	0.0010	-0.0161
	標準偏差	0.0758	0.0865	0.0975	0.0921	0.1408	0.1089	0.1638
	半減期(年)	21.71	43.99	25.63	20.88	-120.31	-1013.08	62.06
	半減期95%信頼区間	-9.8年以下 又は 5.1年以上	-6.8年以下 又は 5.2年以上	-6.6年以下 又は 4.3年以上	-7.5年以下 又は 4.4年以上	-3.5年以下 又は 3.7年以上	-4.7年以下 又は 4.7年以上	-3.3年以下 又は 3年以上

図1 実際の患者の濃度と線形回帰式

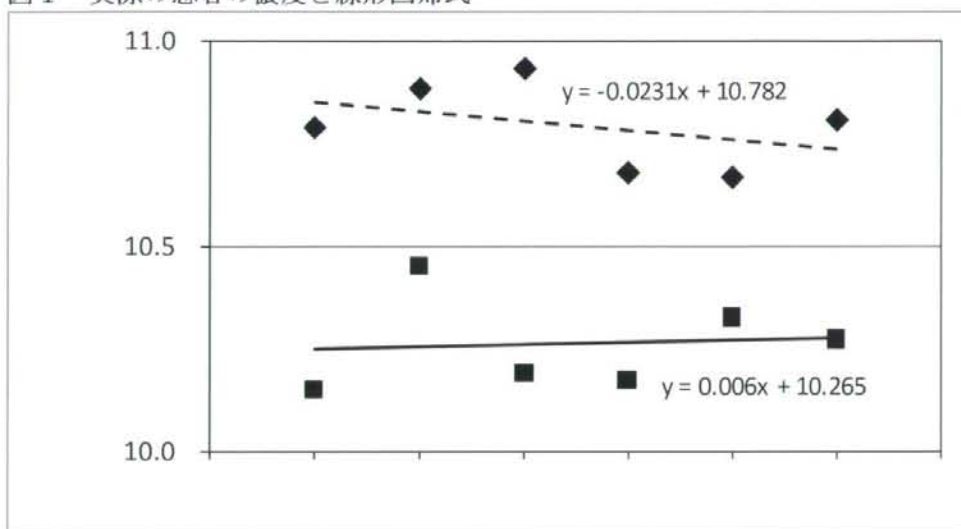


図2 受診回数別濃度区分ごとの傾きの平均値

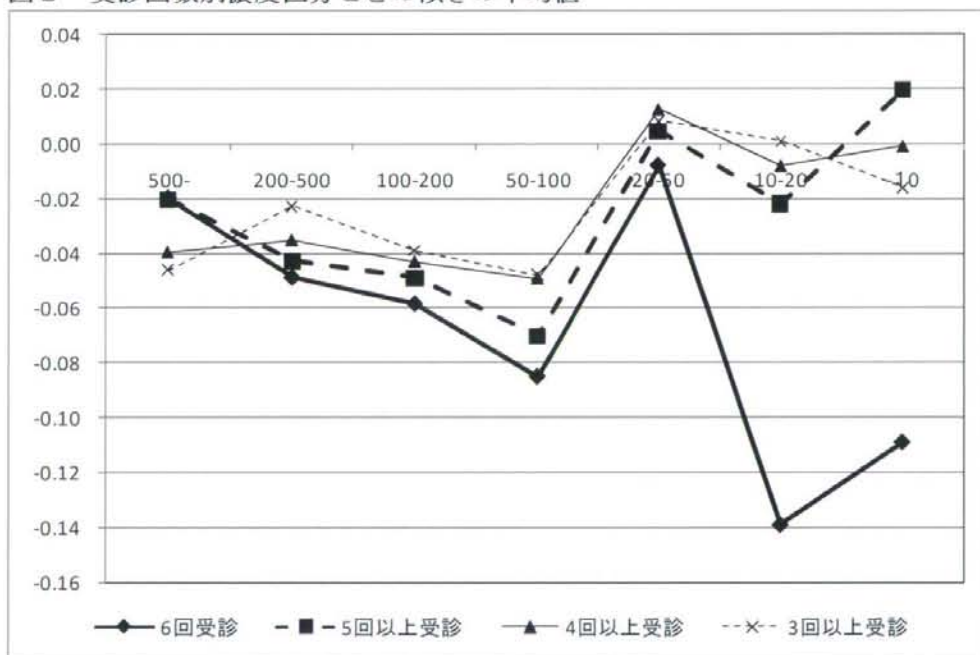


図3 500pg/g以上の患者の半減期＝傾きの分布

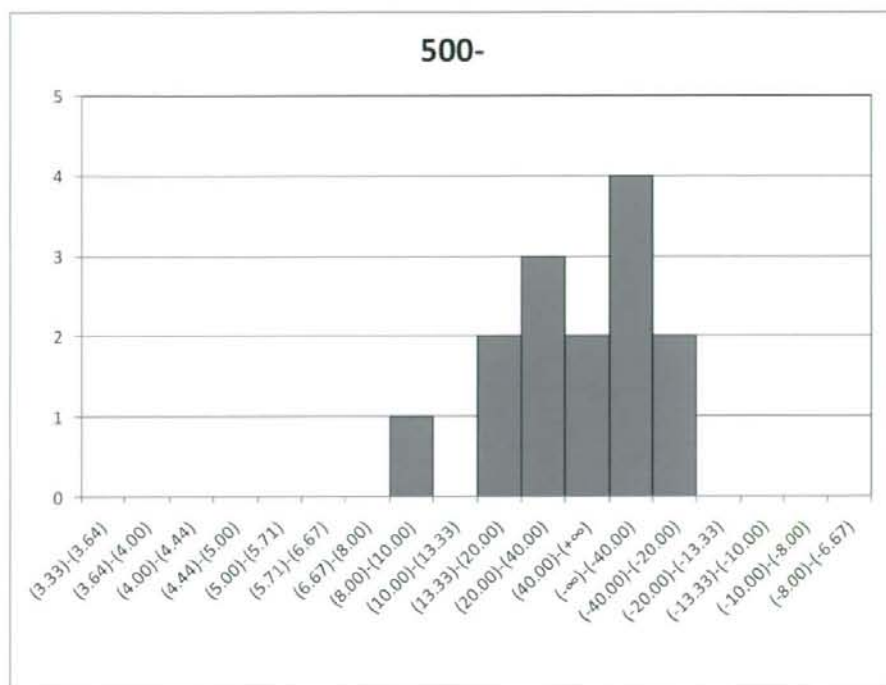


図4 200pg/g～500pg/g以上の患者の半減期＝傾きの分布

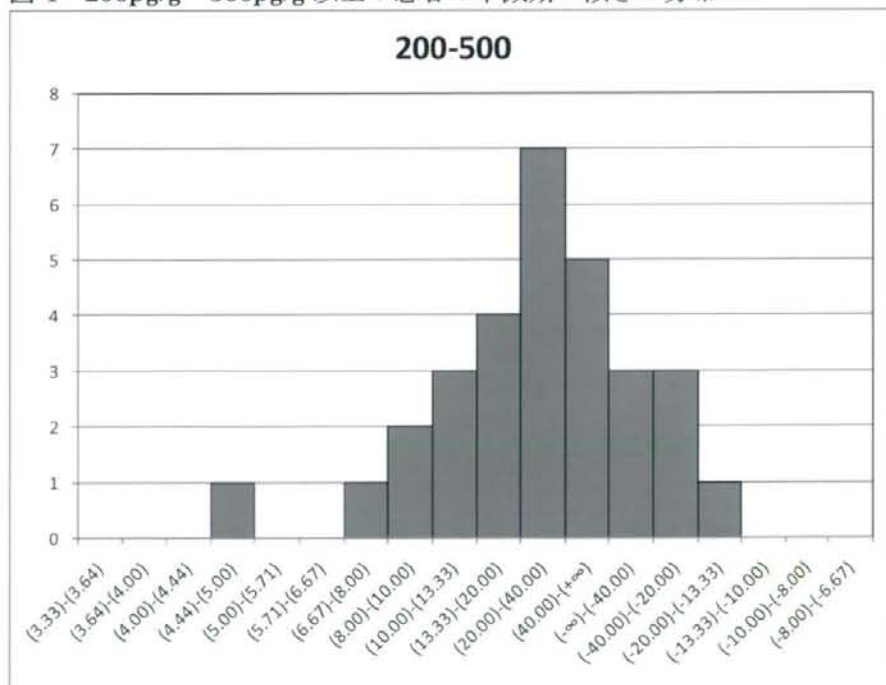


図5 100pg/g～200pg/g以上の患者の半減期＝傾きの分布

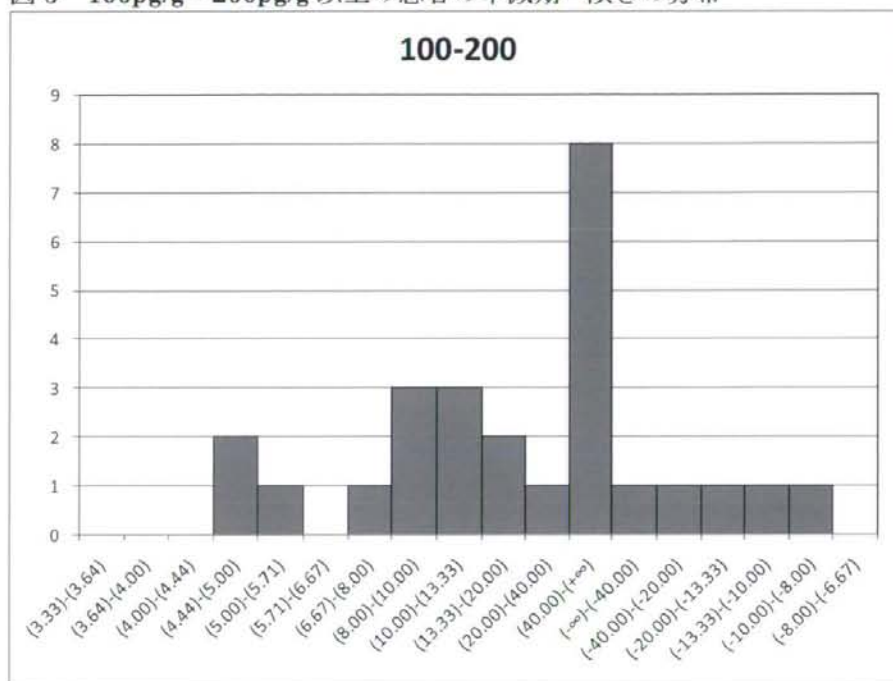


図6 50pg/g～100pg/g以上の患者の半減期＝傾きの分布

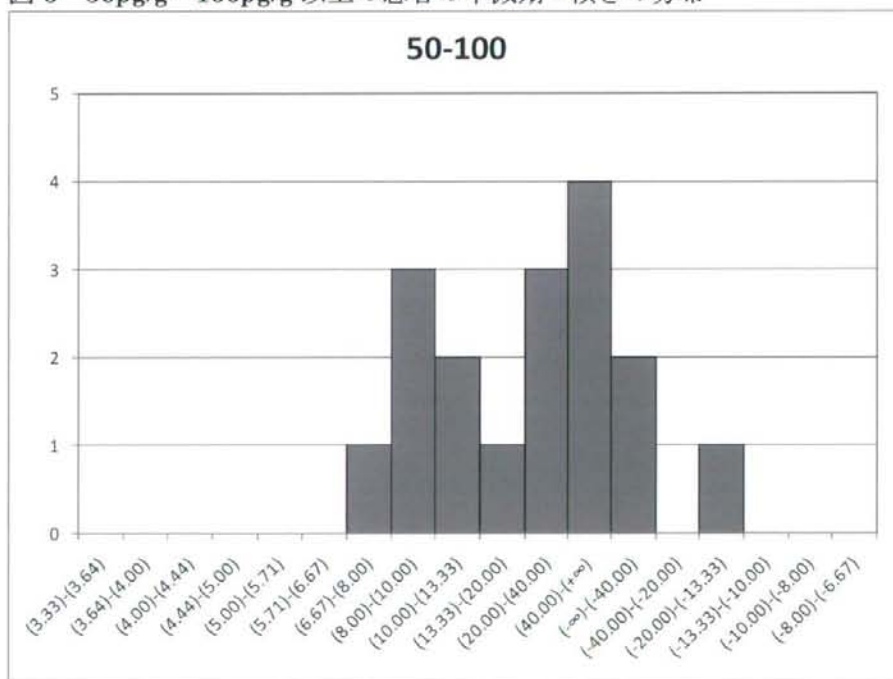


図7 20pg/g~50pg/g以上の患者の半減期=傾きの分布

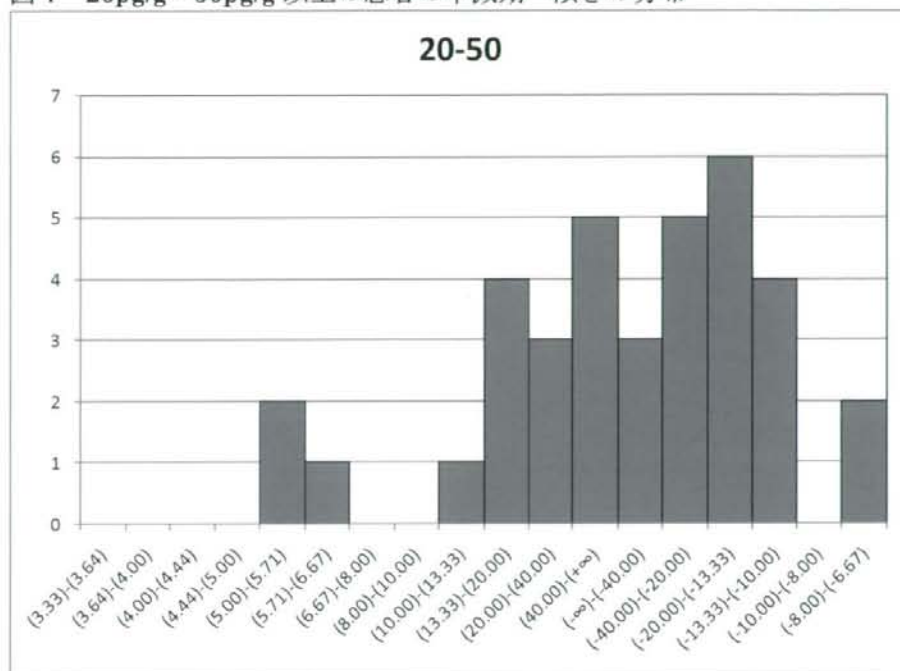
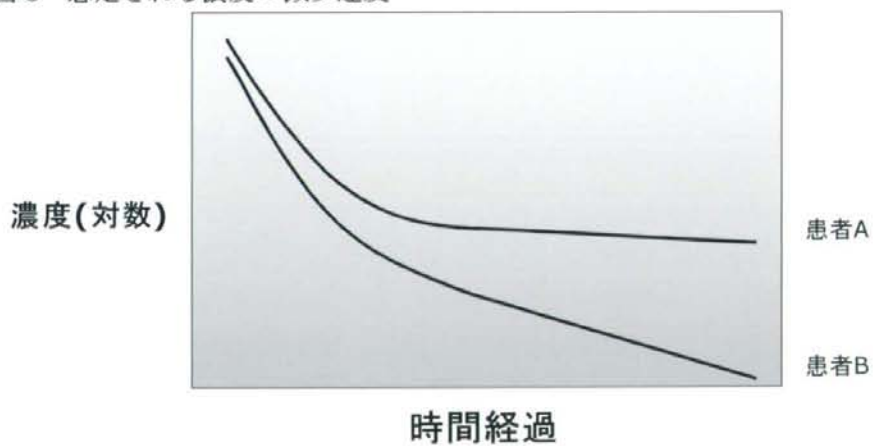


図8 想定される濃度の減少速度



ダイオキシンの aryl hydrocarbon receptor signaling を介したケモカイン・サイトカインの産生について：ヒト表皮細胞への benzo(a)pyrene 投与による IL-8 産生の検討

研究分担者 古江 増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 教授
研究協力者 辻 学 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野
高原 正和 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 助教

研究要旨 喫煙者の血中濃度と報告される 40nM の benzo(a)pyrene (BaP) をヒト表皮細胞に投与したところ、コントロールと比較して有意な IL-8 の産生量の増加が認められた。IL-8 の産生量は、BaP の用量依存性の増加が認められた。また、aryl hydrocarbon receptor (AhR) の選択的な antagonist である resveratrol を BaP と同時に投与したところ、IL-8 の産生量が減少したことから、ヒト表皮細胞における BaP による IL-8 の産生は、AhR signaling を介していることが示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、ダイオキシン類が、皮膚免疫にどのような影響を与えるかを解明することにある。これまでダイオキシン類の人体への影響は、各臓器にわたって検討され、先天性異常、代謝・内分泌疾患、悪性腫瘍、自己免疫疾患については数多くの報告がなされている 1)。しかし、皮膚は外界物質から人体を防護するバリアー機能の役割と免疫能を有する器官であるが、その免疫能への影響を研究した報告は数少ないと考えられる。

そこで、我々は、皮膚の最外層に位置するヒト表皮細胞にダイオキシン類を投与し、ケモカインであり炎症性サイトカインとしても機能する IL-8 の産生について検討することとした。IL-8 は病巣への好中球遊走を強力に促進するため、皮膚科領域では、皮膚感染症（細菌感染症、真菌感染症）や好中球が病態形成で重要な位置を占める皮膚疾患（乾癬、掌蹠膿疱症等）において、重要な役割を果たしていると考えられている。

研究に用いたダイオキシン類は、我々が

身近に遭遇する機会があるものとして、ディーゼル排気ガスやタバコの煙中に存在する benzopyrene (BaP) を用いることとした。BaP は、市街地の環境汚染物質として検出され、また喫煙者からは、20-40nM の濃度で血中から検出される 2) と報告がある。BaP によるヒト表皮細胞への影響を調べることは、環境汚染あるいはタバコによる健康被害の一部を調べることにもなり、今後増々有用な知見となりうると考えられる。

B. 研究方法と結果

○ 蛍光抗体法

蛍光抗体法を用いて、AhR の細胞内局在について検討を行った。BaP 1 μ M をヒト表皮細胞に投与し、3, 6 時間後に抗 AhR 抗体を用いて、蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

Fig.1 に示すように、ヒト表皮細胞の AhR は BaP 投与 6 時間で、細胞質から核内への移行が認められた。BaP 投与前 (non-treatment) では、細胞質に存在する AhR が染色され、BaP 投与 3 時間後では

細胞質と核が共に染色され、6時間後では核のみが染色された。

○リアルタイム PCR

AhR signaling の標的蛋白の mRNA 発現をみるため、*AhR*, *AhR nuclear translocator (ARNT)*, *CYP1A1*, 及び *IL-8* についてリアルタイム PCR を行った。24 穴シャーレに培養した 1.0×10^5 個のヒト表皮細胞に BaP (20 nM-10 μ M) 投与し、3, 6, 24 時間後に細胞を回収した。各投与群の遺伝子発現量 (Ct 値) とコントロール群 (DMSO, 3, 6, 24 時間投与群) の Ct 値とを *GAPDH* で補正を行い、比較を行った。

Fig. 2 に遺伝子発現の比率を示す。全ての群において、BaP 投与 6 時間後にコントロール群に比べて、発現の増加が認められ、24 時間後に発現の低下が認められた。また、*AhR*, *ARNT*, *IL-8* は、BaP 濃度が高くなるにつれて、発現の比率が低下するのに対し、*CYP1A1* は BaP の用量依存性に発現の増加が認められた。

○ウエスタンブロット

BaP (20nM-10 μ M) をヒト表皮細胞に投与し、24 時間後に蛋白の抽出を行った。BCA 法で、各群の蛋白濃度を測定し、10 μ g の蛋白質が泳動されるようにサンプルを調整した。電気泳動した蛋白は、PVDF 膜に転写し、抗 AhR 抗体、抗 ARNT 抗体、抗 CYP1A1 抗体を用いて検出した。

Fig. 3B に結果を示す。

AhR と ARNT は、BaP の濃度が高くなるにつれて、蛋白量が減少するのに対し、CYP1A1 は BaP の濃度依存性に、蛋白量の増加が認められた。

○ELISA 法による IL-8 の産生量の測定

24 穴シャーレに培養した 1.0×10^5 個のヒト表皮細胞に BaP (20 nM-10 μ M) 投与し、24 時間後に培養液 (1ml) 中の IL-8 の産生量を ELISA 法で測定した。また、BaP10 μ M 投与群は、resveratrol (10nM-10 μ M) を同時に投与した群を設け、resveratrol の IL-8 産生への影響を検討

した。

Fig. 3A に示すように、IL-8 の産生量は、BaP の用量依存性に増加が認められた。また、コントロール群 (DMSO 投与群) と BaP40nM 投与群の IL-8 の産生量を比較したところ、BaP40nM 投与群の IL-8 の産生量は有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた。次に、BaP10 μ M と resveratrol (10nM-10 μ M) を同時に投与した結果を Fig. 3C に示す。

Resveratrol 10 μ M のみの投与で、IL-8 の産生量はわずかに増加しているが、コントロール群と較べて、有意な増加は認められなかった。BaP10 μ M による IL-8 産生量の増加は、Resveratrol 10nM, 100nM, 1 μ M を加えることで有意 ($p < 0.05$) な抑制が認められた。

(倫理面への配慮)

本研究は、培養細胞を用いた実験系で構成されており、倫理面の特別な配慮は必要ないと考えた。

C. 考察

本研究は、ヒト表皮細胞における BaP 投与による IL-8 の産生について検討を行った。まず、BaP 投与によりヒト表皮細胞の AhR signaling が活性化するかどうか検討を行ったところ、Fig. 1 で示したように、BaP の投与によって、AhR は細胞質から核内へ移行が認められた。これは AhR が、核内で ARNT とともに XRE (xenobiotic response elements) を活性化し、CYP1A1 を誘導するものと考えられた。次に、Fig. 2 に示したように、BaP は用量依存性に、ヒト表皮細胞の AhR signaling の標的蛋白の mRNA を調整し、これは蛋白レベルでも確認された。(Fig. 3) これらのことから、ヒト表皮細胞には、機能的な AhR signaling が備わっていることが示唆された。

次に、IL-8 の産生は、Fig. 2 に示すよ

うに BaP 投与により mRNA の発現増加が認められ、培養液中の IL-8 の産生量は、BaP の用量依存性に増加が認められた (Fig. 4A) ことより、BaP 投与によってヒト表皮細胞は IL-8 を産生しうることが示された。特に、BaP40nM という喫煙者の血中濃度とされる濃度で、有意に IL-8 の産生の増加が認められたことは、BaP が極低用量でヒト表皮細胞に、IL-8 を産生させ、その結果、炎症性サイトカインの産生を誘導しうることを示唆しており、これは喫煙で悪化すると報告される皮膚疾患 (掌蹠膿疱症や乾癬) の病態解明の一助になる可能性がある。また、BaP は、タバコの他にも環境汚染物質として検出されることから、環境汚染に伴う皮膚症状に関与している可能性も十分に考えられる。

BaP による IL-8 の産生は、AhR の選択的 antagonist である resveratrol によって抑制された (Fig. 4B) ことから、IL-8 の産生は AhR signaling を介していることが示唆された。これは同時に、resveratrol が治療薬になりうると考えられ、臨床応用にむけた更なる基礎研究による検討が必要と考えられる。

D. 研究発表

1. 学会発表

2007 年 7 月 18 日

第 39 回日本・職業アレルギー学会総会・学術大会 (東京)

2008 年 12 月 5 日

International Conference on Environmental Hormones and Health Effects (台北)

E. 参考文献

1. Developmental Immunotoxicology: Focus on Health Risks Chem Res Toxicol. 2008 Sep 11

Dietert RR.

2. Benzopyrene diolepoxide-DNA adducts in alveolar macrophages of smoker Carcinogenesis A. Izzoti

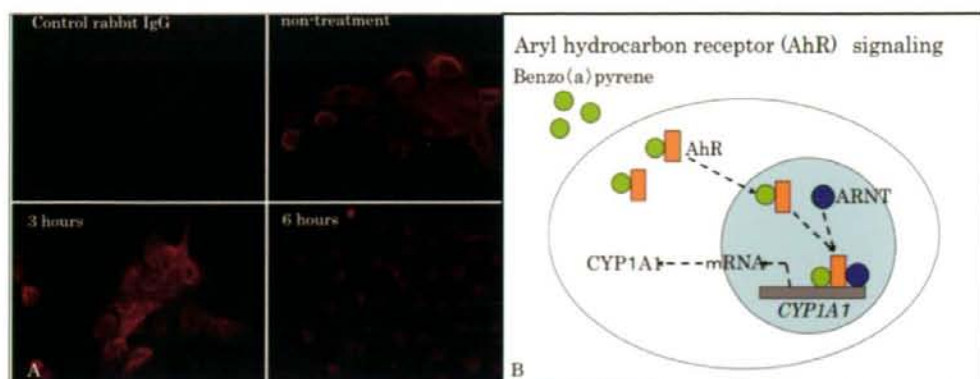


Figure 1 The aryl hydrocarbon receptor (AhR) translocates in the nucleus within 6 hours after BaP is administered.

A. Normal human epidermal keratinocytes grown on coverslips were non-treatment (Control), treated with 1 μ M BaP for 3h and 6 h. The distribution of AhR was observed by immunocytochemical staining with anti-AhR antibody. Immunofluorescence was visualized and captured with fluorescence microscopy. In normal condition (non-treatment), the AhR locate in the cytoplasm. Not only cytoplasm but also nucleus were stained 3h administering BaP later. And only the nucleus were stained 6h later.

B. Once the BaP binds to the AhR, the complex translocates to the nucleus and the ligand-bound receptor forms a heterodimer with the aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT). This heterodimer then binds to specific DNA elements, in the regulatory regions of target genes, such as cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), which leads to gene expression changes and ultimately result in various toxic and biochemical responses.

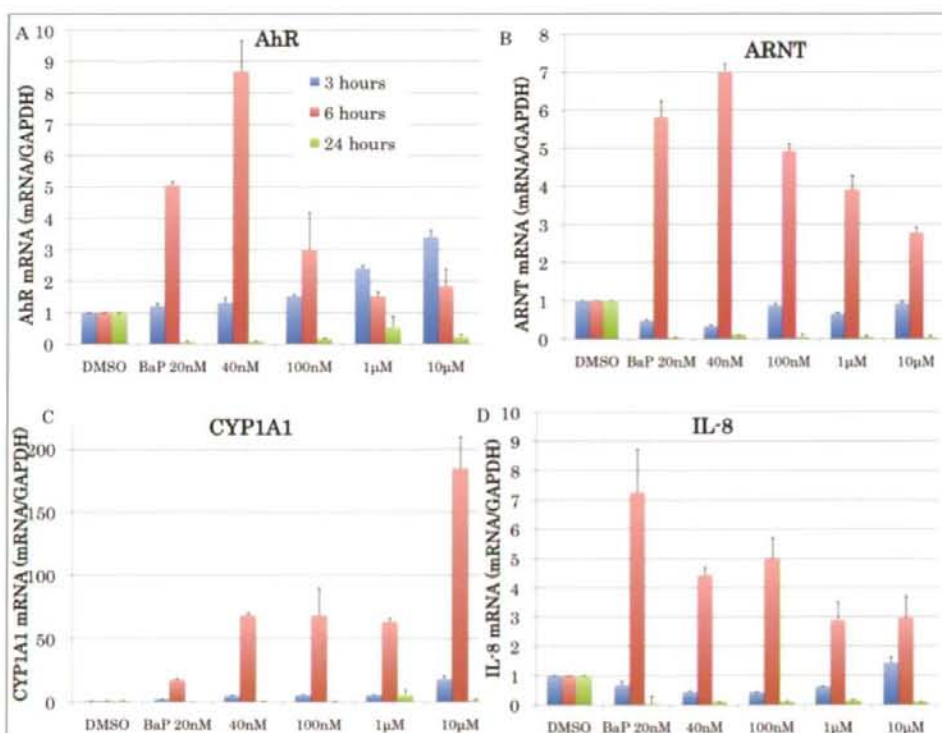


Figure 2 BaP (at least 20nM) could increase the mRNA levels of AhR, ARNT, CYP1A1 and IL-8 in normal human epidermal keratinocytes.

Normal human epidermal keratinocytes were exposed to either DMSO (control) or BaP in several concentration (20nM, 40nM, 100nM, 1 μ M and 10 μ M) for 3h, 6h and 24h. The mRNA levels of AhR, ARNT, CYP1A1 and IL-8 were estimated by RT-qPCR.