

図1 油症認定患者、健常人血清における IL-22 値の比較

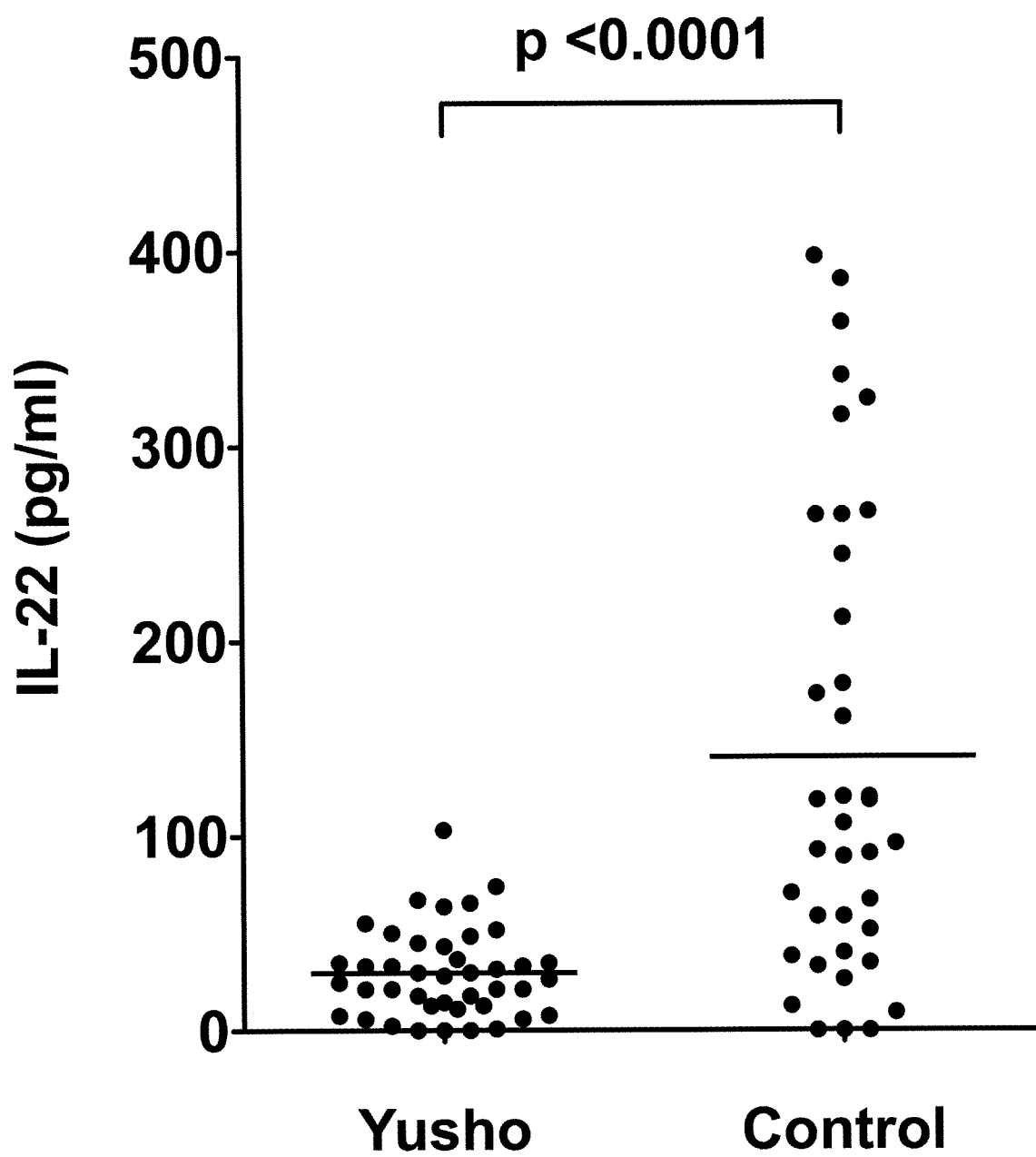
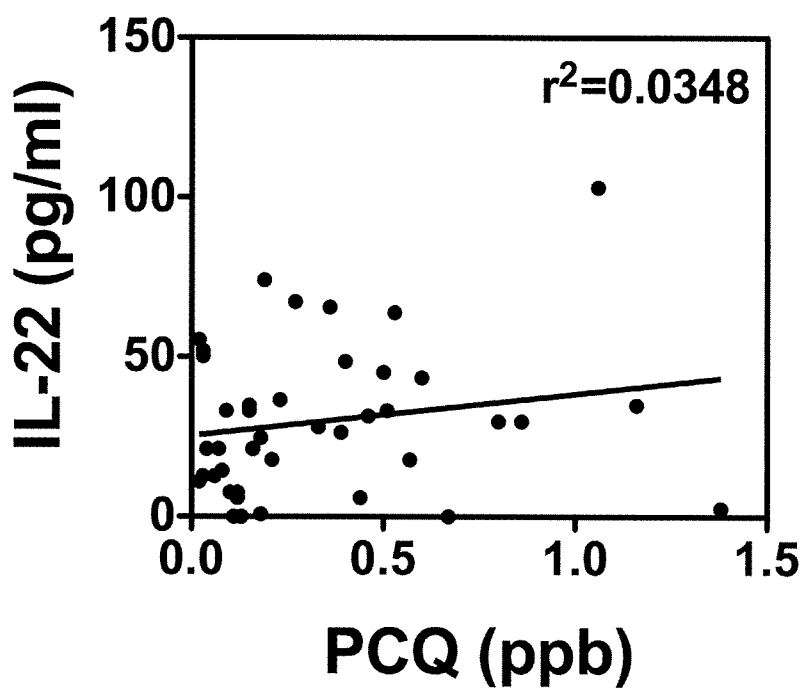
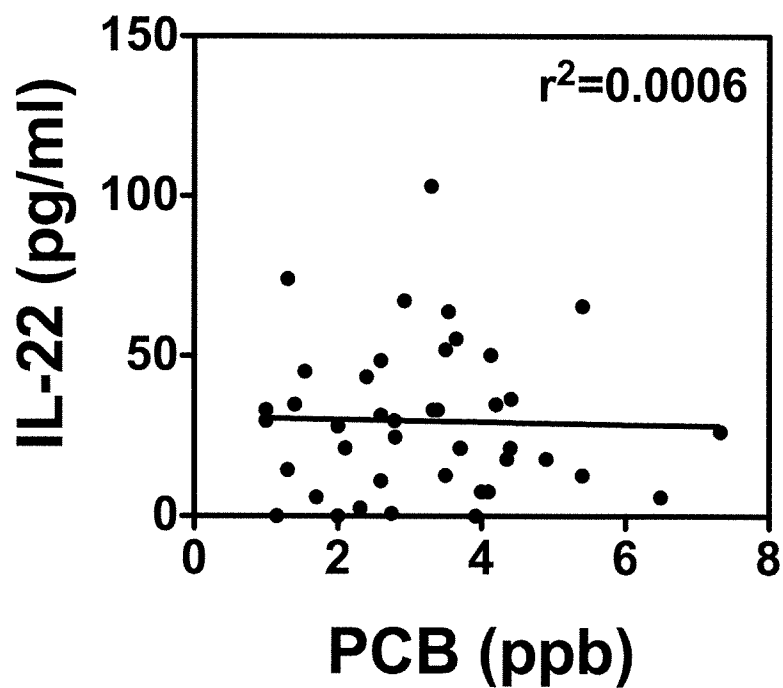
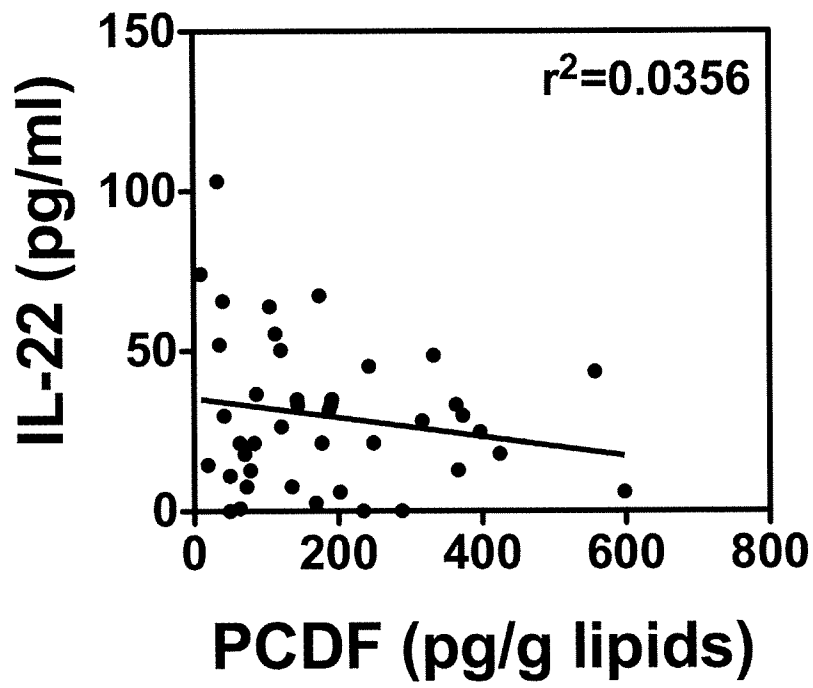


図2 油症患者血清における IL-22 値と PCB, PCQ, PCDF 値の比較





## 分担研究報告書

### 油症患者血中 soluble CD163 の検討

研究分担者 清水和宏 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 准教授  
研究協力者 佐藤伸一 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授  
穉山雄一郎 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教

**研究要旨** PCBはその代謝過程で superoxide を発生するため高 PCB 血症であるカネミ油症は酸化ストレス状態といえる。酸化ストレスの亢進により CD163 は単核球の膜上から切り出され流血中に soluble form として切り出されその量を増す。今回油症認定患者と正常健常人の血清を用いて血中 soluble CD163 を測定した。油症認定患者 35 名、健常人 45 名において血中 soluble CD163 値はそれぞれ  $973.3 \pm 43.2$  ng/ml 及び  $1035.0 \pm 45.0$  ng/ml を示し有意差を認めなかった。

#### A. 研究目的

カネミ油症事件発生から 40 年以上を経て、激的な症状を呈する患者はほとんど見られなくなった現在、良好な QOL を維持するための保健指導、健康相談の重要性が増してきている。油症の原因であるカネミオイルには Polychlorinated biphenyls (PCB)、Polychlorinated quaterphenyls (PCQ) 以外に Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) を含む dioxin 類の混在している事がわかっていた。以前は測定できなかった血中 dioxin 類の微量濃度が近年測定可能になった事により油症患者認定の新たな認定基準として PCB、PCQ 以外に血中 PCDF 値が追加されている。<sup>1)</sup> PCB はその代謝過程において superoxide を産生する事が報告されており<sup>2)</sup>、血中 PCB 高値を示す油症患者は酸化ストレスを長期間受け続けていることになる。我々はすでに脂質酸化ストレスのマーカーである 8-Isoprostane が油症患者尿中において有意に高値を示している事を報告し、油症が酸化ストレスである事を証明している。<sup>3)</sup> 一方、CD163 は 130kDa の膜貫通型蛋白で cystein-rich scavenger receptor family の Group B に属する。CD163 の発現は恒常的であるが、Glucocorticoid, Interleukin (IL)-6, -10 や endotoxin によって流血中の単核球や組織マクロファージに誘導がかかる。<sup>4)</sup> また酸化ストレスや炎症性刺激により CD163 は切り出され soluble form として血

中に放出される。<sup>5)</sup> 今回酸化ストレスにさらされている油症患者において soluble CD163 値を測定し、正常対照と比較する事により油症患者の酸化ストレスの状況を評価検討した。

#### B. 研究方法

①対象：2009 年 7 月の玉之浦地区油症検診受診者のうち同意を得られた認定患者 35 名を対象とし、検診時に採血を行い、血清を分離後凍結保存し soluble CD163 測定用サンプルとした。また、年齢を合致させた健常人 45 名を対照とした。

②血中 soluble CD163 測定：血中 soluble CD163 値は Human CD163 Immunoassay kit (R&D Systems) を用いて測定した。

③統計的処理：測定した soluble CD163 値は Mann-Whitney's U test にて比較検討した。

#### C. 研究結果

玉之浦の油症患者 35 名、健常人 45 名の平均年齢は各々  $73.2 \pm 1.0$  及び  $72.8 \pm 1.3$  才で有意差を認めなかった。血中 soluble CD163 値は各々  $973.3 \pm 43.2$  ng/ml 及び  $1035.0 \pm 45.0$  ng/ml で、有意差を認めなかった。(図)

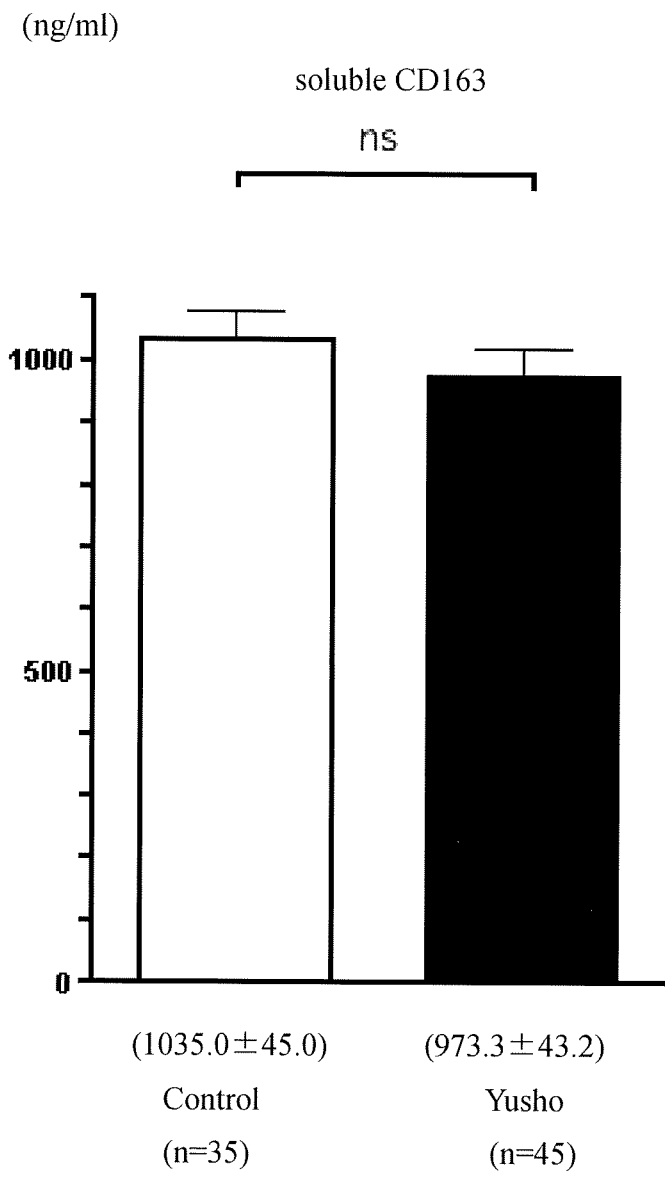
#### D. 考察

我々は脂質酸化ストレスのマーカーで

ある 8-Isoprostane の油症尿中における有意な高値を確認し、油症が酸化ストレスであることを報告している。<sup>3)</sup>更に 2006 年には初期酸化をとらえるマーカーとされる Hexanoyl-Lysine の油症患者血中における高値を報告している。(unpublished data) 即ち油症患者は 40 年の長きにわたり酸化ストレスにさらされてきた事になる。選択した soluble CD163 は酸化ストレスや炎症性疾患において高値を示す事が報告されている。<sup>5)</sup>しかしながら今回の解析では油症患者と年齢をあわせた正常対照群との間に有意差を認めなかった。Fabrick 等は多発性硬化症において CD163 の切り出しは IL-6 等の proinflammatory cytokine の減少と関連していると報告している。<sup>6)</sup>以前我々は油症患者血中の IL-6 を測定し正常健康人との間に有意差を認めなかった。(unpublished data)即ち、油症が慢性の酸化ストレス状態であるのは間違いないが、有意に CD163 が切り出される状況にない可能性が考えられる。CD163 の切り出しには metalloproteinase が関与していると報告されているが<sup>6)</sup>、油症における酸化ストレスと血中 soluble CD163 値との相関解離を説明すべく今後の精査が期待される。今後、油症における酸化ストレスの影響を細かに検討していく事により油症患者の QOL 改善に役立てれば幸いである。

## E. 文献

- 1) 油症の健診と治療の手引き 2004  
全国油症治療研究班・追跡調査班
- 2) Gregory G. Oakley et al, Oxidative DNA Damage Induced by Activation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Implications for PCB-Induced Oxidative Stress in Breast Cancer. Chem. Res. Toxicol., 9, 1285-1292, 1996
- 3) Shimizu K et al. Lipid peroxidation is enhanced in Yusho victims 35 years after accidental poisoning of polychlorinated biphenyls in Nagasaki, Japan. J Appl. Toxicol., 27: 195-197, 2007
- 4) Sulahian TH et al. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. Cytokine 12: 1312-21, 2000
- 5) Timmermann M and Hogger P Oxidative stress and 8-iso-prostaglandin F (2 alpha) induce ectodomain shedding of CD163 and release of tumor necrosis factor-alpha from human monocytes. Free Radic Biol Med 39(1): 98-107, 2005
- 6) Fabrick B et al. Proteolytic shedding of the macrophage scavenger receptor CD163 in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 187: 179-186, 2007



(図.)

## 分担研究報告書

### 油症患者における婦人科疾患に関する研究

研究分担者 月森 清巳 福岡市立こども病院 周産期医療企画部長

**研究要旨** 油症患者における母児双方のダイオキシン類血中濃度の観察を介して、母体－胎児ダイオキシン類移行動態について検討した。対象は人工栄養を行った母児 11 組(母親 9 例、児 11 例)とした。血中ダイオキシン類検査は、7 種類のポリ塩化ジベンゾ - パラ - ジオキシン(PCDDs)、10 種類のポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)、4 種類のコプラナーPCB(coplanar PCBs )を測定した。児における PCDDs、PCDFs、coplanar PCBs の TEQ 濃度は各々 8.15、4.04、3.90 TEQ pg/g lipid で、母親の値(各々 22.74、90.05、12.98 TEQ pg/g lipid)に比して有意に低値を示した。PCDDs、PCDFs、coplanar PCBs の児/母親血中濃度比は、各々 0.36、0.04、0.30 で、PCDFs は母児間較差が最も大きかった。正常健康人の血中ダイオキシン類濃度と比較すると、児における PCDDs、PCDFs、coplanar PCBs の TEQ 濃度は有意な差はなかった。また油症患者に特有に認められる 2,3,4,7,8-PeCDF の血中 TEQ 濃度は、母親は 81.05 TEQ pg/g lipid と正常健康人の値(2.48 TEQ pg/g lipid)の約 30 倍認められたが、児では 3.14 TEQ pg/g lipid と正常健康人の値と有意な差はなかった。PCDDs、PCDFs、coplanar PCBs の total TEQ 濃度に対する組成率は、油症母親、油症児、正常健康人でそれぞれ異なり、油症母親は PCDFs が最も多く、ついで PCDDs、coplanar PCBs の順、油症児は PCDDs、PCDFs、coplanar PCBs の順、正常健康人は PCDDs、coplanar PCBs、PCDFs の順であった。これらの成績から、油症児におけるダイオキシン類の血中 TEQ 濃度は母親の値と比して有意に低値を示し、正常健康人の値と有意な差はみられないこと、各異性体の組成率は油症母親、油症児、正常健康人でそれぞれ異なること、異性体の種類により母児間の血中濃度較差が異なることが分かった。油症子宮内曝露においてはダイオキシン類の児への移行は少なく、胎盤のバリア機能が存在することが示唆された。

#### A. 研究目的

ダイオキシン類のヒトの健康への影響、なかでも感受性が高いと考えられる胎児、新生児に何らかの影響を及ぼすのではないかと危惧されている。油症曝露では、流産、早産、死産の発症頻度が高くなることが報告されているが(Tsukimori et al, Environ Health Perspect 2008)、母親の油症曝露によりどの程度のダイオキシン類が児へ移行し、またそれによって児にどのような健康影響が起きているのかについてはほとんど分かっていないのが現状である。

本研究では、油症患者における母児双方のダイオキシン類血中濃度の観察を介して、母体－胎児ダイオキシン類移行動態を明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

油症一斉検診受診者のなかで母児双方の血中ダイオキシン類検査を実施した母親 19 例とその児 26 例を対象とした。これら対象者に対して児の授乳方法(母乳栄養、人工栄養、混合栄養)について調査し、人工栄養を行った母児 11 組(母親 9 例、児 11 例)を解析の対象とした。血中ダイオキ

シン類検査は、7種類のポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(PCDDs)、10種類のポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)、4種類のコプラナーPCB(coplanar PCBs)を測定した。母児間における血中ダイオキシン類濃度の差異について解析した。また、母児それぞれの血中ダイオキシン類濃度について正常健常人の値(n=152, Masuda et al. Chemosphere 2005)と比較検討した。

統計学的解析には、母児間の差異には paired t-検定を、正常健常人と比較には Student's t-検定を用いた。

#### (倫理面への配慮)

データ解析にあたっては、連結不可能な匿名化データとして処理するなど、研究対象者へ倫理的な問題が生じないように配慮した。

### C. 研究結果

母親および児の血中ダイオキシン類検査時の年齢(mean ± SD)は、各々64.3 ± 4.1、35.5 ± 2.3歳であった。児の出生年は中央値1971年(範囲1968-1976年)で、性別は男児7例、女児4例であった。

母親および児におけるダイオキシン類血中濃度を表1に示す。母親におけるPCDDs、PCDFs、coplanar PCBsのTEQ濃度は各々22.74、90.05、12.98 TEQ pg/g lipidであった。児におけるPCDDs、PCDFs、coplanar PCBsのTEQ濃度は各々8.15、4.04、3.90 TEQ pg/g lipidで、母親の値と比して有意に低値を示した。異性体毎にみると、測定感度以上であった14異性体のうち11異性体において児の値は母親の値と比して有意に低値を示した。なかでも油症患者に特有に認められる2,3,4,7,8-PeCDFの血中濃度は、児は10.45 pg/g lipidで、母親の値(270.17 pg/g lipid)と比して有意に低値を示した。PCDDs、PCDFs、coplanar PCBsの児/母親血中濃度比は、各々0.36、0.04、0.30で、PCDFsは

母児間での較差が最も大きかった。各異性体における児/母親血中濃度比は0.04から0.81で、2,3,4,7,8-PeCDFが母児間での較差が最も大きく、1,2,3,4,6,7,8-HpCDDが母児間での較差が最も小さかった。

PCDDs、PCDFs、coplanar PCBsおよび主な異性体5種類における油症母児と正常健常人との比較およびtotal TEQ濃度に対する組成率を表2に示す。油症母親におけるPCDDsおよびPCDFのTEQ濃度は正常健常人の値と比して有意に高値を示した。また母親における1,2,3,7,8-PeCDD、1,2,3,6,7,8-HxCDD、2,3,4,7,8-PeCDおよび3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)のTEQ濃度は、正常健常人の値と比して有意に高値を示した。一方、児におけるPCDDs、PCDFs、coplanar PCBsおよび主な異性体5種類のTEQ濃度は、全て正常健常人の値と比して有意な差はなかった。ダイオキシン類のtotal TEQ濃度に対する組成率については、油症母親ではPCDFsが71.6%と最も多く、ついでPCDDs 18.1%、coplanar PCBs 10.3%の順であった。油症児においてはPCDDs 50.7%、PCDFs 25.1%、coplanar PCBs 24.2%の順で、正常健常人ではPCDDs 43.9%、coplanar PCBs 36.7%、PCDFs 16.5%の順であった。このように油症児におけるダイオキシン類の血中TEQ濃度は正常健常人の値と有意な差はみられないものの、各異性体の組成率は油症母親、油症児、正常健常人でそれぞれ異なっていた。

### D. 考察

ヒトにおけるダイオキシン類の胎児への移行に関する研究は数少ない。Schecterら(Chemosphere 1989)は5人のNew York在住米国人妊婦の血液、胎盤および臍帯血を採取し、それらの中のダイオキシン類(PCDDs、PCDFs、coplanar PCBs)濃度を測定した。その結果、血中total TEQ濃度(TEQ pg/g lipid)は、母体血12.1、胎盤10.5、臍帯血5.8で、臍帯血のダイオキシン類濃度



は母体血のほぼ半分であった。Suzuki ら (Biosci Biotechnol Biochem 2005)は奈良県在住日本人妊婦の血液(n=4)、胎盤(n=21)および臍帯血(n=16)中のダイオキシン類濃度を測定し、total PCDDs/PCDFs TEQ 濃度(TEQ pg/g lipid)は、母体血 26、胎盤 31、臍帯血 14 であった。これらの報告から、ダイオキシン類の胎児への移行は少なく、胎盤のバリア機能が存在することが示唆される。

今回、油症患者における母児双方のダイオキシン類血中濃度について検討した。対象には母乳を介する児へのダイオキシン類曝露の影響を除くために人工栄養を行った母児を用いた。児における PCDDs、PCDFs、coplanar PCBs の TEQ 濃度は母親の値に比して有意に低値を示し、正常健康人の値と比して有意な差はなかった。児/母親血中濃度比でみると、PCDDs、PCDFs、coplanar PCBs は、各々0.36、0.04、0.30 であり、また油症患者に特有に認められる 2,3,4,7,8-PeCDF は 0.04 と異性体のなかで最も母児間較差が大きかった。これらダイオキシン類の児/母親血中濃度比は、正常健康人における臍帯血/母体血比(PCDDs 0.50、PCDFs 0.40、coplanar PCBs 0.48、2,3,4,7,8-PeCDF 0.38) (Schechter et al. Chemosphere 1989)より低く、なかでも PCDFs は約 1/10 の値であった。これらの成績から高濃度ダイオキシン類曝露においても胎盤のバリア機能により、ダイオキシン類、なかでも PCDFs の胎児への移行は少ないことが示唆された。

一方、PCDDs、PCDFs、coplanar PCBs の total TEQ 濃度に対する組成率は、油症母親、油症児、正常健康人でそれぞれ異なり、油症児では正常健康人より PCDFs の組成率が高かった。

ダイオキシン類の胎盤への移行には、ダイオキシン受容体である arylhydrocarbon (Ah) receptors との親和性が関連することが報告されている。胎盤には Ah receptor

が存在し(Nakai and Bunce. J Biochem Toxicol 1995)、Ah receptor との親和性の高いダイオキシン類である 2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD および 2,3,4,7,8-PeCDF の胎盤組織中の濃度は母体血濃度よりも有意に高く、胎盤に蓄積することが報告されている(Suzuki et al. Biosci Biotechnol Biochem 2005)。しかしながら、これら Ah receptor との親和性の高いダイオキシン類の胎児への移行は母体血の 38-60%と少なく、ダイオキシン類の血清蛋白との結合能やオクタノール/水分配係数(Kow)が胎児への移行に関与する可能性が指摘されている。今後、どのようなダイオキシン類がどの程度胎児へ移行するのか、ひいてはダイオキシン類の胎児への移行に関わる機序を明らかにすることは、油症曝露とそれによる児の健康影響との関連を検討するための基礎的な資料を提供することとなると考えられる。

## E. 結論

油症患者より出生した児におけるダイオキシン類の血中 TEQ 濃度は母親の値と比して有意に低値を示し、正常健康人の値と有意な差はみられないこと、各異性体の組成率は油症母親、油症児、正常健康人でそれぞれ異なること、異性体の種類により母児間の血中濃度較差が異なることが分かった。これらの成績から油症子宮内曝露においてはダイオキシン類の児への移行は少なく、胎盤のバリア機能が存在することが示唆された。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 分担研究報告書

### 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** 油症中毒事件発生後の1970年～1973年に出生した胎児性油症患者と同時期に誕生した健常児および1981年～1992年に油症の母親から出生した未認定の新生児と同時期に誕生した健常児の保存臍帯に存在する油症原因物質の化学分析を行い、各グループの濃度を比較検討した。その結果、1970年～1973年に出生した胎児性油症患者の臍帯では健常児のものよりも3種類のダイオキシン様 PCBs つまり、2,3,3',4,4',5-HxCB、2,3,3',4,4',5'-HxCB および 2,3,3',4,4',5,5'-HpCB の濃度が6倍から20倍も高かった。この3種類のダイオキシン様 PCBs は1981年～1992年に誕生した未認定の新生児でも同時期の健常児よりも4倍から6倍も高濃度であった。これらの油症に特徴的なダイオキシン様 PCBs を活用することにより、新しい油症診断手法開発の可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

1968年に発生した油症中毒事件では、発生当初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、油症患者の母親から1970年～1973年に生まれた胎児性油症患者および1981年～1992年に生まれた未認定児の保存臍帯中に存在する油症原因物質濃度をそれぞれ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、油症原因物質の特徴を究明する。

#### B. 研究方法

油症の母親から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患者（男性4名、女性2名）および1981年～1992年に生まれた未認定児（男性4名、女性3名）の保存臍帯、1966年～1975年に健康な母親から誕生した健常児（男性2名、女性3名）と1980年～1989年に誕生した健常児（男性6名、

女性2名）の保存臍帯を化学分析用検体とした。これら保存臍帯中のダイオキシン類ー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)ーおよび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。統計学的有意性はStudentの*t*検定により行った。

(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

Table 1 に胎児性油症患者とその当時の健常児の臍帯におけるダイオキシン類

同族体と PCBs の化学分析結果を示す。P CDF 同族体については健常児ではいずれの同族体も検出限界以下であり、胎児性油症患者でのみ毒性の高い同族体がすべての臍帯で測定された。PCDD 同族体については両者でいくつかの同族体が検出定量されたが、毒性学上有意な相違は認められなかった。ダイオキシン様 PCBs については 12 種の同族体のうち、両者で 10 種の同族体が分析定量できた。しかし、いずれの同族体でも胎児性油症患者が高く、特に 2, 3, 3', 4, 4', 5-HxCB、2, 3, 3', 4, 4', 5'-HxCB と 2, 3, 3', 4, 4', 5, 5'-HpCB はそれぞれ 6.4 倍、15 倍、20 倍と顕著に高濃度であった。これら 3 種の同族体は油症に特徴的なダイオキシン様 PCBs と考えられた。ダイオキシン様 PCBs と PCBs の濃度は胎児性油症患者がそれぞれ 2.5 倍と 1.9 倍高かった。

Table 2 に未認定児と同時期に誕生した健常児の臍帯での分析結果を示す。PCDD 同族体については 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD と OCDD が両者で検出されたが、それらの平均濃度はいずれも健常児のほうが高かった。PCDF 同族体については未認定児の 1 人の臍帯で 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF と 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF が、そして健常児でも 1 人の臍帯で 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF が検出されたが、その他の臍帯ではいずれの PCDF 同族体も検出限界以下であった。ダイオキシン様 PCBs のノンオルソ PCBs については未認定児の 1 人の臍帯で 3, 3', 4, 4'-TCB が、また健常児の 1 人の臍帯で 3, 4, 4', 5-TCB と 3, 3', 4, 4'-TCB が検出されたが、その他の臍帯ではいずれのノンオルソ PCB 同族体も検出されなかった。モノオルソ PCBs についてはいずれの同族体についてもそれらの平均濃度は未認定児と健常児がほぼ同レベルか未認定児のほうが高濃度であった。Table 1 で胎児性油症に特徴的と考えられた 3 種の同族体については、未認定児のほうが 4~6 倍高濃度であり、これらの同族体を利用する

ことにより、新しい認定手法の開発が可能となるかもしれない。

PCBs の濃度は健常児のほうがやや高かった。

#### D. 結論

胎児性油症の原因物質が PCDFs であることはすでに報告しているが、ダイオキシン類同族体の分析結果でも、このことが明確に示された。ダイオキシン様 PCBs のなかで、2, 3, 3', 4, 4', 5-HxCB、2, 3, 3', 4, 4', 5'-HxCB および 2, 3, 3', 4, 4', 5, 5'-HpCB の 3 種の同族体が胎児性油症患者で特に高く、胎児性油症に特徴的な同族体と考えられた。これら 3 種の同族体は油症発生後 20 年前後も経って誕生した未認定児でも依然として高く、これらの同族体を活用することにより、油症の新認定法開発の可能性が示唆された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nagayama J., Hirakawa H., Kajiwara J., Todaka T., Shibata S., Tsuji H., Iwasaki T.: Promotive excretion of polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins by FBRA in patients with Yusho. *Organohalogen Compounds* 71: 398-403, 2009.
2. 長山淳哉, 平川博仙, 梶原淳睦, 飯田隆雄, 戸高尊, 上ノ土武, 柴田智子, 辻博, 岩崎輝明: 玄米発酵健康補助食品による油症原因物質の体外排泄促進 -PCDFs と PCDDs の場合-. *福岡医誌*, 100(5): 192-199, 2009.
3. 梶原淳睦, 戸高尊, 平川博仙, 堀就英, 安武大輔, 中川礼子, 飯田隆雄, 長山淳哉, 吉村健清, 古江増隆: 油症患者の保存さい帯 (へその緒) 中のダイオキシン類濃度. *福岡医誌*, 100(5): 179-182, 2009.

## 2. 学会発表

1. Nagayama J., Hirakawa H.,  
Kajiwara J., Todaka T., Shibata  
S., Tsuji H., Iwasaki T. :  
Promotive excretion of  
polychlorinated dibenzofurans  
and polychlorinated  
dibenzo-*p*-dioxins by FBRA in  
patients with Yusho. 29th  
International Symposium on  
Halogenated Persistent Organic  
Pollutants. Beijing, China,  
August, 2009.

**Table 1. Concentrations of PCDD, PCDF and dioxin-like PCB congeners and PCBs in the preserved umbilical cords of healthy babies and babies with fetal Yusho born in 1966 to 1975**

Compound	Concentration <sup>a</sup> , pg/g dry weight		
	Healthy Baby (A)	Baby with Fetal Yusho (B)	B/A
PCDDs			
2,3,7,8 -	ND	ND	-
1,2,3,7,8 -	ND	ND	-
1,2,3,4,7,8 -	ND	ND	-
1,2,3,6,7,8 -	ND	9.2 ± 8.3	-
1,2,3,7,8,9 -	ND	1.6 ± 3.9	-
1,2,3,4,6,7,8 -	11.5 ± 8.6	16.6 ± 12.2	1.4
OCDD	106 ± 115	96.3 ± 82.4	0.9
Total	117 ± 122	124 ± 88	1.1
-----			
PCDFs			
2,3,7,8 -	ND	7.3 ± 9.9	-
1,2,3,7,8 -	ND	ND	-
2,3,4,7,8 -	ND	27.4 ± 12.0	-
1,2,3,4,7,8 -	ND	29.4 ± 13.0	-
1,2,3,6,7,8 -	ND	2.2 ± 3.6	-
2,3,4,6,7,8 -	ND	ND	-
1,2,3,7,8,9 -	ND	ND	-
1,2,3,4,6,7,8 -	ND	6.3 ± 7.2	-
1,2,3,4,7,8,9 -	ND	ND	-
OCDF	ND	ND	-
Total	ND	73 ± 28	-
-----			
Dioxin-like PCBs			
3,4,4',5 -	8.7 ± 19.5	32.3 ± 36.5	3.7
3,3',4,4' -	197 ± 237	499 ± 490	2.5
3,3',4,4',5 -	ND	ND	-
3,3',4,4',5,5' -	ND	ND	-
2,3,3',4,4' -	528 ± 357	1110 ± 722	2.1
2,3,4,4',5 -	43.4 ± 24.6	161 ± 70.7 <sup>p=0.006</sup>	3.7
2,3',4,4',5 -	1032 ± 611	1949 ± 1152	1.9
2',3,4,4',5 -	29.3 ± 18.2	42.0 ± 30.0	1.4
2,3,3',4,4',5 -	101 ± 62.2	642 ± 302 <sup>p=0.005</sup>	6.4
2,3,3',4,4',5' -	23.2 ± 13.4	344 ± 444 <sup>p=0.14</sup>	15
2,3',4,4',5,5' -	39.0 ± 28.4	103 ± 43.6 <sup>p=0.02</sup>	2.6
2,3,3',4,4',5,5' -	3.1 ± 1.8	60.6 ± 32.0 <sup>p=0.007</sup>	20
Total	2004 ± 1270	4944 ± 2710	2.5
-----			
PCBs	53176 ± 26276	100628 ± 49025 <sup>p=0.09</sup>	1.9

a : Mean ± SD

ND : Less than the detection limit

**Table 2. Concentrations of PCDD, PCDF and dioxin-like PCB congeners and PCBs in the preserved umbilical cords of healthy babies and babies born to mothers with Yusho born in 1980 to 1992**

Compound	Concentration <sup>a</sup> , pg/g dry weight		
	Healthy Baby (A)	Baby born to Mother with Yusho (B)	B/A
<b>PCDDs</b>			
2,3,7,8 -	ND	ND	—
1,2,3,7,8 -	ND	ND	—
1,2,3,4,7,8 -	ND	ND	—
1,2,3,6,7,8 -	1.9 ± 5.3	ND	—
1,2,3,7,8,9 -	ND	ND	—
1,2,3,4,6,7,8 -	48.1 ± 108	2.7 ± 7.2	0.06
OCDD	70.2 ± 83.2	28.9 ± 40.1	0.41
Total	120 ± 194	31.6 ± 47.0	0.26
<b>PCDFs</b>			
2,3,7,8 -	1.6 ± 4.5	ND	—
1,2,3,7,8 -	ND	ND	—
2,3,4,7,8 -	ND	1.9 ± 5.1	—
1,2,3,4,7,8 -	ND	1.3 ± 3.4	—
1,2,3,6,7,8 -	ND	ND	—
2,3,4,6,7,8 -	ND	ND	—
1,2,3,7,8,9 -	ND	ND	—
1,2,3,4,6,7,8 -	ND	ND	—
1,2,3,4,7,8,9 -	ND	ND	—
OCDF	ND	ND	—
Total	1.6 ± 4.5	3.2 ± 8.5	2.0
<b>Dioxin-like PCBs</b>			
3,4,4',5 -	2.2 ± 6.3	ND	—
3,3',4,4' -	36.3 ± 103	5.5 ± 14.6	0.15
3,3',4,4',5 -	ND	ND	—
3,3',4,4',5,5' -	ND	ND	—
2,3,3',4,4' -	110 ± 111	89.2 ± 110	0.81
2,3,4,4',5 -	11.1 ± 14.4	24.3 ± 31.1	2.2
2,3',4,4',5 -	234 ± 213	301 ± 140	1.3
2',3,4,4',5 -	6.8 ± 7.8	6.8 ± 7.5	1.0
2,3,3',4,4',5 -	34.0 ± 23.0	158 ± 175 <sup>p=0.11</sup>	4.6
2,3,3',4,4',5' -	8.5 ± 7.0	49.5 ± 58.8 <sup>p=0.12</sup>	5.8
2,3',4,4',5,5' -	16.3 ± 11.5	16.7 ± 14.6	1.0
2,3,3',4,4',5,5' -	4.6 ± 1.8	19.0 ± 17.5 <sup>p=0.07</sup>	4.1
Total	463 ± 489	671 ± 620	1.4
PCBs	15571 ± 23983	14145 ± 19820	0.91

a : Mean ± SD

ND : Less than the detection limit

## 分担研究報告書

### TCDD 誘導肺傷害マウスモデルの SP-D, CC10 発現に関する研究

研究分担者 中西洋一 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 教授

**研究要旨** 油症患者には咳や痰など特有の呼吸器症状があるが、PCB/ダイオキシン類による呼吸器障害の機序は不明な点も多い。マウスを用いて検討を行ったところ TCDD 投与はマウス肺組織での SP-D 産生亢進をおこすことが明らかとなった。

#### A. 研究目的

PCB/ダイオキシン類による呼吸器障害の機序解明には動物モデルの作成が必要と考えられるが、確立された動物モデルはない。マウスを用いた検討で TCDD は肺構造に影響を与えないことを昨年度に報告した。今回は肺細胞の分泌物に着目して検討を行った。

#### B. 研究方法

コーンオイルで溶解した 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 200 µg/kg を C57B1/6 マウス雌、6 週齢に day1 から day5 まで経口摂取させた。対象群にはコーンオイルのみを摂取させた。Day 7 に肺を取り出し、SP-D, CC10 の免疫染色をおこなった。

(倫理面への配慮)

九州大学動物実験実施規則に従って実験を行った。

#### C. 研究結果

##### 肺組織所見

対象群と比較して TCDD 200 µg/kg 群では肺組織所見に違いは認めなかった。

##### SP-D および CC10 の発現

SP-D 蛋白の発現は気道上皮細胞と肺胞上皮細胞で認められた。TCDD 投与群では対象群と比較して肺胞上皮細胞における SP-D 蛋白の発現がより亢進していた(図

1)。CC10 蛋白の発現は気道上皮細胞に認められたが TCDD 投与群と対象群の間に違いはみられなかった(図 2)。

#### D, E. 考察

油症患者では慢性気管支炎に類似した呼吸器症状がみられる。PCB/ダイオキシン類が肺に及ぼす作用に関してラットを用いたモデルでは、ダイオキシン類投与により II 型肺胞上皮細胞、クララ細胞の形態異常が電顕的に示されているが、確立した動物モデルはない。今回の実験でマウスへの TCDD 経口投与によって肺胞上皮細胞での SP-D 産生が亢進すること示された。SP-D は肺サーファクタントを構成する肺特異的蛋白であり、肺胞上皮細胞から分泌される。本来は自然免疫調節作用を有すると考えられるが、ヒトでは肺胞上皮傷害をきたす病態で血清中の濃度が上昇することが知られている。SP-D 産生の亢進は TCDD による肺胞上皮傷害を反映していることが示唆される。今後は本モデルを用いて麦門冬湯の作用検討をおこう予定である。

#### F. 研究発表なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況なし

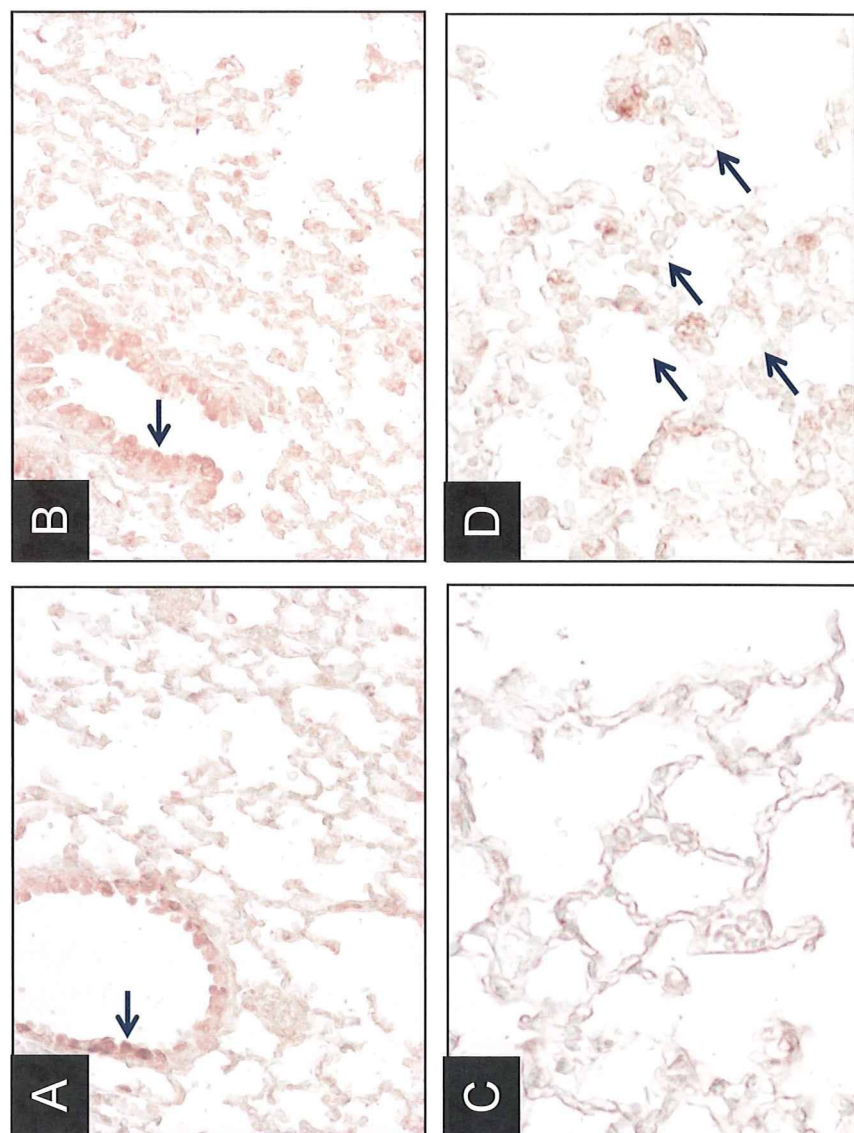


図 1. 肺組織中SP-D蛋白の発現  
 SP-Dの発現は気道上皮細胞および肺胞上皮細胞に認められた。気道上皮細胞での発現は対象群 (A、矢印) とTCDD投与群 (B、矢印) で違いは認められなかったが、肺胞上皮細胞における発現は対象群 (C) と比べてTCDD投与群で亢進していた (D、矢印)。



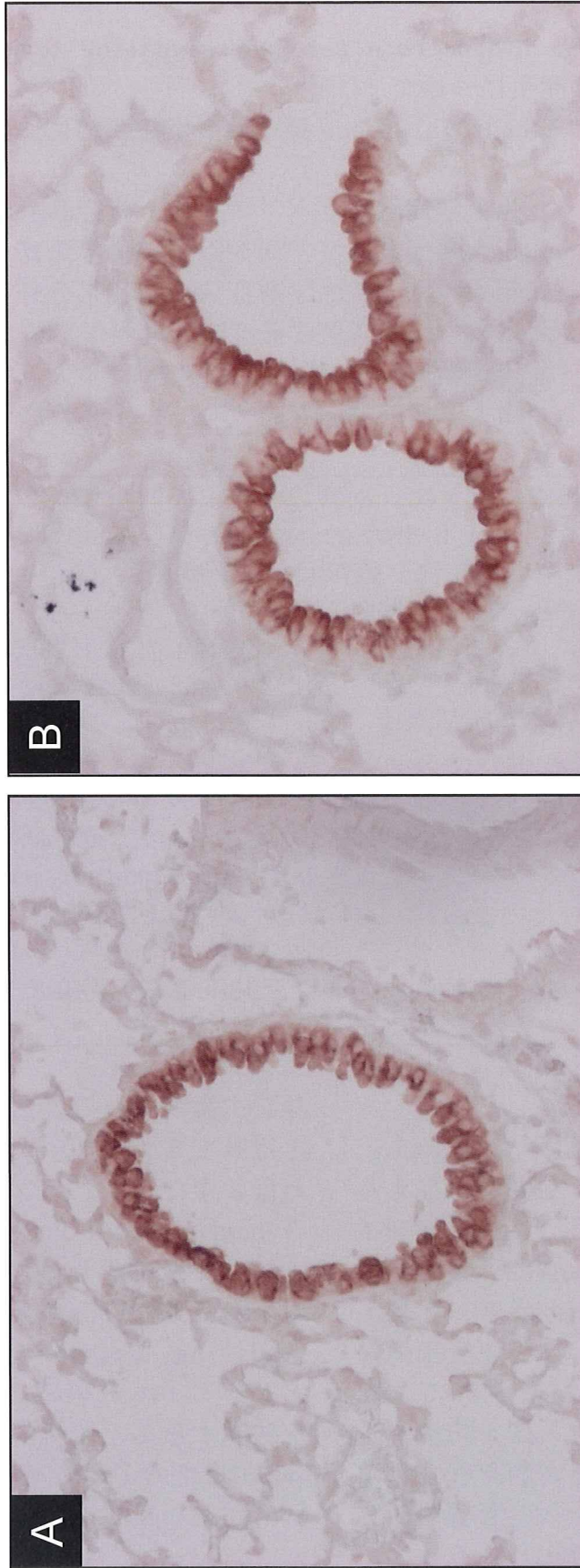


図 2. 肺組織中CC10蛋白の発現  
CC10の発現は気道上皮細胞に認められたが、対象群(A)と  
TCDD投与群(B)でその発現に違いはなかった。

## 分担研究報告書

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：

ヒト表皮細胞における benzo(a)pyrene 誘導性の炎症反応について

研究分担者 内 博史 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 准教授  
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 講師  
師井 洋一 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 准教授  
古江 増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 教授  
三苫 千景 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教

**研究要旨** 前年度の報告で我々は、たばこに含まれる benzo(a)pyrene (BaP) が、ヒト表皮細胞において、aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathway を介して IL-8 の産生する可能性を報告した。今回、我々は、BaP 誘導性の IL-8 産生の機序についてさらに詳細に検討した。

Si RNA transfection によって AhR をノックダウンしたヒト表皮細胞では、IL-8 の産生の増加は認められないことから、IL-8 は AhR signaling pathway に依存性であることが強く示唆された。

IL-8 の産生と reactive oxygen species (ROS) 産生には、強い相関があることが報告されていることから、ヒト表皮細胞に BaP を投与し、ROS を測定したところ、BaP の用量依存性に ROS の産生の増加が認められた。BaP 誘導性の ROS 産生は、AhR のノックダウンで減少したことより、AhR signaling pathway に依存性であることが示唆された。さらに、BaP 誘導性の ROS 産生を N-アセチルシステインで抑制したところ、IL-8 の産生も抑制されたことから、BaP 誘導性の IL-8 産生には、AhR signaling pathway によって生じた ROS が必要であることが分かった。

### A. 研究目的

本研究の目的は、ダイオキシン類が、免疫システム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<sup>1)</sup>。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、誘導される炎症反応について検討を行ってきた。前年度の報告で、我々はたばこ中に含まれるダイオキシン類である benzopyrene (BaP) が、ヒト表皮細胞においてダイオキシン類の代謝経路である aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathway を活性化し、炎症反応のメディエーターである IL-8 の産生を誘導することを報告した。今年度は、BaP 誘導性の IL-8 の産生機序についてさらに詳細な検討を行った。

### B. 研究方法と結果

○ Si RNA transfection による AhR のノ

## ックダウン

ヒト表皮細胞 ( $5.6 \times 10^4$  個) にトランスフェクション試薬及び Si RNA(AhR) を加え、48 時間後インキュベートした。AhR のノックダウンは、mRNA・タンパクレベルを RT-PCR 及び蛍光抗体法で評価したところ、Si RNA(control) を加えた群に比べて AhR の発現の低下が認められた。(Figure 1)

## ○ ELISA 法による IL-8 産生の測定

Si RNA(control) または Si RNA(AhR) をトランスフェクションしたヒト表皮細胞に BaP ( $1 \mu\text{M}$ ) 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。AhR のノックダウンした群では、有意に BaP 誘導性の IL-8 産生は抑制されており、これにより BaP 誘導性の IL-8 産生は AhR signaling pathway に依存性であることが示唆された。(Figure 2)

## ○ H2DCF による細胞内活性酸素の測定

BaP  $1 \mu\text{M}$  を投与し、24 時間後に H2DCF を加えて細胞内の活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) を測定した。H2DCF は細胞内に ROS 存在すると、450nm 波長で励起する化合物を生じる。

BaP による ROS 産生は、用量依存性に増加が認められた。さらに、AhR のノックダウンによって ROS 産生は抑制されたことより、BaP 誘導性の ROS 産生は、AhR signaling pathway に依存性であることが示唆された。(Figure 3)

## ○ N-アセチルシステインによる BaP 誘導性の ROS 産生の抑制

N-アセチルシステイン (NAC) は、抗酸化作用があり ROS 産生を抑制することが報告されている 2)。そこで、我々は NAC を用いて、BaP 誘導性の ROS 産生の抑制を試みた。NAC (30mM) により、BaP 誘導性の ROS 産生に抑制が認められた。(Figure 4a)

さらに、NAC (15mM, 30mM) を投与すると、

培養液中の BaP 誘導性の IL-8 の産生は抑制された。これにより、BaP 誘導性の IL-8 の産生には、AhR signaling pathway を介して生じる ROS が必要であることが示唆された。(Figure 4b)

## (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

ヒト表皮細胞における BaP 誘導性の IL-8 産生の機序について詳細な検討を行った。今年度の研究では、BaP は AhR signaling pathway を介して、ROS を産生することが分かった。細胞内に生じた ROS は、直接的に DNA 障害を来す 3) 他に、シグナル伝達因子を修飾する 4) ことにより、様々な影響をもたらし、これらは酸化ストレスといわれている 5)。細胞内 ROS レベルと IL-8 産生には、密接な関係があるとの報告 6) があり、これは ROS によって RelA(p65) が核内に移動し NF- $\kappa$ B signaling を活性化するためとされている 2, 7)。今年度の研究では、NF- $\kappa$ B signaling に関しては検討を行っていないが、NAC による ROS の抑制によって、IL-8 産生が抑制されたことは、これらの知見を支持するものと考えられる。

BaP は環境汚染物質と検出されるほかに、タバコの煙中にも存在する。今回の結果は、BaP が酸化ストレスを生じることによって、IL-8 主体の炎症反応を誘導するというものであり、BaP による AhR signaling pathway の活性化は、喫煙に伴って悪化する疾患の病態形成に関わっている可能性が強く示唆される。特に皮膚科領域では、掌蹠膿疱症 8)、乾癬 9)、ざ瘡 8) は、喫煙に伴う悪化がよく知られており、これらの疾患には IL-8 は病態形成に重要な役割を占める 10, 11, 12) こと

からも、BaP による AhR signaling pathway 活性化の関与が非常に疑われる。

#### D. 研究発表

##### 1. 学会発表

Benzo(a)pyrene induces expression of interleukin-8 via aryl hydrocarbon receptor signaling in normal human keratinocytes.

39<sup>th</sup> Annual European Society for Dermatological Research Meeting (2009.9.10-15, Budapest)

ヒト表皮細胞における Aryl hydrocarbon receptor を介した炎症反応

第 13 回九州基礎皮膚科研究会 (2009.12.12, 福岡市)

たばこによる炎症反応のメカニズム

第 30 回福岡臨床免疫研究会 (2010.1.23, 福岡市)

#### E. 参考文献

1. Dietert RR et al.  
Developmental Immunotoxicology: Focus on Health Risks  
Chem Res Toxicol. 2008 Sep 11
2. Young CN et al.  
Reactive oxygen species in tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated primary human keratinocytes: implications for psoriasis and inflammatory skin disease. J Invest Dermatol. 2008 128:2606-14
3. Shimizu Y et al.  
Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 97:779-82
4. Thannickal VJ et al.  
Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 279:1005-28
5. Burczynski et al.  
Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase. Cancer Res. 1999 59: 607-14
6. Kang JS et al.  
Regulation of UVB-induced IL-8 and MCP-1 production in skin keratinocytes by increasing vitamin C uptake via the redistribution of SVCT-1 from the cytosol to the membrane. J Invest Dermatol. 2006 127:698-706
7. Shyong EQ et al.  
Synergistic enhancement of H2O2 production in human epidermoid carcinoma cells by Benzo[a]pyrene and ultraviolet A radiation. Toxicol Appl Pharmacol. 2003 188:104-9
8. A. Freiman et al.  
Cutaneous effects of smoking, J Cutan Med Surg 2004 8: 415-423.
9. Jankovic S et al.  
Risk factors for psoriasis: A case-control study. J Dermatol. 2009 36: 328-34
10. Anttila HS et al.  
Interleukin-8 immunoreactivity in the skin of healthy subjects and patients with palmoplantar pustulosis and psoriasis. J Invest Dermatol 1992 98:96-101
11. Duan H et al.  
Interleukin-8-positive