

表 1 対象者 PeCDF 濃度

	人数	PeCDF濃度(pg/g lipid)	
		平均	標準偏差
年齢不明	7	141.6	162.5
60歳未満	196	63.1	119.0
60歳以上75歳未満	205	161.7	189.7
75歳以上	177	192.0	233.1
全体	585	137.6	192.5

表 2. 症状の有無による PeCDF 濃度の差異

No	症状	症状あり人数			P-value			症状なし患者平均PeCDF濃度			症状あり患者平均PeCDF濃度			
		全体	60未満	75以上	全体	60未満	75以上	全体	60未満	75以上	全体	60未満	75以上	
1	結核炎	2	0	1	0.0000 **	0.1341	0.0000 **	134.2	63.1	160.3	186.1	838.5	446.1	1231.0
2	骨粗しょう症	93	5	40	0.0009 **	0.0890 *	0.0705 *	120.0	58.6	150.5	172.9	226.0	235.5	244.8
3	筋肉の色赤沈着(菌茎が黒い)	130	47	33	0.0000 **	0.3589	0.0002 **	124.8	47.6	161.3	165.8	186.9	112.1	162.9
4	高血圧	238	33	95	0.0000 **	0.0834 *	0.5416	109.9	61.4	140.3	178.7	176.7	71.6	186.4
5	白内障	181	3	67	0.0000 **	0.5301	0.9886	115.2	63.8	152.6	191.6	185.6	20.1	180.4
6	眼瞼腺からのチーズ状分泌物	98	23	41	0.0000 **	0.9278 **	0.0079 **	122.4	61.4	147.1	170.2	208.3	76.2	220.0
7	頭痛	255	73	98	0.0001 **	0.8424 **	0.0034 **	109.6	61.8	135.9	144.0	172.2	65.3	189.8
8	結膜の色赤沈着	37	8	14	0.0011 **	0.6103	0.0014 **	128.8	59.7	159.8	175.1	253.7	144.1	186.7
9	高脂血症	110	26	54	0.0001 **	0.1721	0.0094 **	122.3	56.2	150.8	171.5	199.5	108.0	192.0
10	爪の変形	255	71	97	0.0003 **	0.2142	0.0684 *	112.3	49.6	146.0	161.6	169.0	86.9	179.1
11	紫斑(内出血)	79	11	35	0.0004 **	0.2357	0.0763 *	125.7	59.5	154.5	177.6	207.7	124.1	196.4
12	*唾液の病変	1	1	0	0.0000 **	-----	-----	135.4	59.3	161.7	192.0	812.6	-----	-----
13	もの忘れ	205	37	78	0.0006 **	0.8429	0.4638	117.1	47.1	163.7	179.3	173.6	131.8	158.3
14	粉瘤(皮膚のふくら)	129	35	57	0.0011 **	0.0114 **	0.0499 **	123.1	65.8	140.9	174.6	185.2	50.5	215.6
15	動脈硬化	37	1	11	0.0017 **	0.1243	0.4720	130.2	63.3	156.8	186.9	232.0	17.5	247.5
16	強皮症	3	0	1	0.0019 **	0.9360	0.0074 **	134.8	63.1	161.6	187.0	478.5	0.0	177.0
17	シェーグレン症候群	3	1	1	0.0020 **	0.9491	0.0000 **	134.8	63.1	161.8	186.1	477.2	70.7	129.8
18	眼瞼過多(めやに)	290	80	118	0.0050 **	0.1114 **	0.4732	115.2	45.3	150.5	178.4	159.1	89.0	169.9
19	降膜がん	1	0	1	0.0054 **	0.0072 **	-----	135.6	63.1	159.2	192.0	668.5	-----	-----
20	*アレルギー疾患	2	1	0	0.0086 **	0.0019 **	0.0884 *	135.3	61.2	161.7	189.7	510.7	429.6	591.8
21	太陽がん	13	0	10	0.0073 **	0.3188	0.6052	136.1	63.1	160.9	193.1	200.1	223.3	127.6
22	糖尿病	72	7	29	0.0078 **	0.0223 **	0.8013	128.8	59.4	152.4	194.2	192.8	164.0	217.6
23	心肥大	48	6	21	0.0079 **	0.3736	0.5137	130.4	58.3	157.7	182.9	206.9	213.7	196.7
24	骨の変形	94	14	38	0.0080 **	0.0072 **	0.2997	127.5	56.8	162.8	182.1	184.5	145.2	156.6
25	メニエール病	59	11	25	0.0104 **	0.0024 **	0.5234	129.9	56.9	158.6	187.7	197.1	168.1	184.0
26	緑内障	31	0	15	0.0106 **	0.0003 **	0.2057	131.8	63.1	148.4	199.0	222.0	329.5	121.3
27	*脳精神神経	6	3	2	0.0126 **	0.6826	0.0022 **	134.5	59.6	162.2	187.9	330.4	289.7	106.8
28	脳梗塞	35	4	14	0.0153 **	0.5149	0.4946	131.8	62.3	150.5	195.9	212.6	101.7	314.3
29	風邪が治りにくい	183	53	81	0.0166 **	0.0233 **	0.6234	124.0	51.4	144.0	186.9	164.8	94.8	188.7
30	不眠	173	40	68	0.0184 **	0.2189	0.3971	124.7	57.8	159.4	181.0	165.4	83.8	166.2
31	胃癌	1	0	0	0.0256 **	-----	0.1111	135.8	63.1	161.7	189.9	563.6	-----	563.6
32	神経痛	134	24	45	0.0309 **	0.5774	0.8337	127.4	61.3	159.5	189.2	168.0	75.9	169.3
33	手足のしびれ	394	107	159	0.0364 **	0.0291 **	0.5064	112.4	42.8	177.2	179.6	148.7	80.0	156.1
34	鼻血が止まりにくい	17	7	8	0.0394 **	0.2829	0.4391	139.3	64.9	165.8	193.4	42.1	15.5	59.9
35	動悸	158	38	65	0.0423 **	0.0193 **	0.9105	127.0	53.4	157.0	190.7	163.0	103.6	171.8
36	認知症	23	2	3	0.0431 **	0.3845	0.3703	133.3	63.4	160.2	186.8	215.7	36.5	256.7
37	多汗症	115	23	56	0.0442 **	0.1838	0.3000	128.8	59.0	153.2	193.4	168.8	94.2	184.2
38	近視	141	74	40	0.0454 **	0.3199	0.9994	145.2	69.7	161.7	195.4	108.3	52.2	161.6
39	十二指腸潰瘍	60	14	31	0.0508 *	0.0251 **	0.6801	141.6	65.6	174.2	194.2	90.7	30.1	91.4
40	悪性リンパ腫(扁桃腺)	1	0	1	0.0518 *	0.0671 *	-----	135.9	63.1	160.0	192.0	508.9	-----	508.9

**P<0.05、*P<0.10、△症状なしの方がPeCDF濃度が高い。

分担研究報告書

ダイオキシンと胃悪性リンパ腫の関係

研究分担者 松本 主之 九州大学大学院病態機能内科学 講師

研究協力者 東 晃一 九州大学大学院病態機能内科学

研究要旨 油症患者における *Helicobacter pylori* 感染、および胃悪性リンパ腫の研究を開始するにあたって、その基礎的データを文献的に検討した。また、胃悪性リンパ腫患者における *Helicobacter pylori* 感染と組織中ダイオキシン濃度を検討するプロトコール作成に着手した。

A. 研究目的

本研究班や欧米のデータから、ダイオキシン関連物質が悪性腫瘍のリスクであることが示されている。一方、我々の診療科では、胃悪性リンパ腫症例が増加しつつあり、なかでも組織学的に低悪性度 B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type (MALT リンパ腫) が高率である。今回、胃悪性リンパ腫に着目し、ダイオキシンと胃悪性リンパ腫の関係、および胃 MALT リンパ腫の最も重要な環境要因である *Helicobacter pylori* (以下 *H. pylori*) 感染の観点から現状の文献的データについて分析した。

B. 研究方法

1) 医学データベース (Pub-Med、および Web of Knowledge) から PCB、PCDF、ダイオキシン、胃悪性リンパ腫、*H. pylori* 等を検索用語として重要論文を抽出した。なお、本研究は、過去に構築された本研究班のデータベースを用いていないので、倫理面の問題はないと判断した。

2) 本年も油症患者の肝機能、代謝関係について検診を行い、一部の患者では胃 X 線検査も施行した。

3) 九州大学病院消化管内科で診断・治療する胃悪性リンパ腫症例を対象に、*H. pylori* と組織中ダイオキシン濃度の検

討を行うためのプロトコール作成を試みた。

C. 研究結果

1) 従来より、ダイオキシン、あるいは PCB 暴露により血液・リンパ組織系腫瘍の危険率が上昇する可能性が示されてきた。一方、ダイオキシン、PBC、PCDF はいずれも TLC とそれに続くサイトカインを介したシグナル伝達を抑制し、B リンパ球の活性化や形質細胞への分化を抑制することが明らかとなっている。逆に、B 細胞性リンパ腫細胞においてはダイオキシン受容体遺伝子のプロモーター領域がメチル化を受け、蛋白発現低下する。

最近の疫学研究のなかでは、欧州のダイオキシン暴露者において B 細胞性非ホジキン悪性リンパ腫のリスク上昇が示され、さらに Baccarelli らは、ダイオキシン暴露例の末梢血 B 細胞において、t(14:18) の染色体転座が高率に誘導されていることを報告している。これに対して、ダイオキシン類が *H. pylori* の制菌、あるいは殺菌作用を有するか否かに関しては現時点では明らかにされていない。

2) 本年検診受診者のうち、胃 X 線検査で胃悪性リンパ腫と診断されたものはなかった。

3) 胃病変を認め、生検組織で胃悪性リ

ンパ腫と診断された非ダイオキシン暴露例を対象とし、病変内から蛋白および mRNA を抽出し、さらにダイオキシン濃度を測定するプロトコールを立案中である。

D. 考察

H. pylori の持続感染により表層性胃炎から萎縮性胃炎を経て腸上皮化生が惹起され、その一部から高分化腺癌が発生する。一方、胃悪性リンパ腫のなかでも低悪性度の MALT リンパ腫は *H. pylori* 感染によって惹起される MALT を母地として発生し、一部はびまん性大細胞性悪性リンパ腫などの高悪性度へ形質転化する。すなわち、*H. pylori* 感染は胃悪性リンパ腫の原因の一つであるが、本菌の感染者における悪性リンパ腫の発生率は極めて低いのが事実である。以上のことから、胃悪性リンパ腫の発生においては他の環境要因が存在すると推測される。

今回集積された疫学的データと実験結果のなかでも、特にダイオキシン類が染色体転座を惹起する事実は極めて重要と思われる。染色体転座はリンパ系細胞の腫瘍化の第一段階であり、*H. pylori* 感染によるリンパ濾胞にダイオキシンが作用することで、胃悪性リンパ腫が発生する可能性が強く示唆される。油症患者の胃癌組織が現時点では検討できないので、平成 22 年度は胃悪性リンパ腫患者を対象にこの点について検討を行う予定である。

E. 結論

H. pylori 感染と組織ダイオキシン濃度を検討することは胃悪性リンパ腫発生のメカニズムを解明する点でも重要と思われる。

F. 健康危険情報

現時点ではない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。

分担研究報告書

油症患者の自覚症状と他覚的神経障害の変化の検討

研究分担者 重藤 寛史 九州大学大学院医学研究院神経内科 講師
 研究協力者 吉良 潤一 九州大学大学院医学研究院神経内科 教授
 大八木 保政 九州大学大学院医学研究院神経内科 准教授

研究要旨 目的：我々のこれまでの報告で、①経過 33 年後の油症認定患者・非認定対象における自覚的末梢感覚異常は油症認定患者の 6 割、非認定患者の 5 割に認められ、対象群の 1 割弱に比べ圧倒的に多かった。他覚的感覚異常は自覚的感覚異常の出現率より低かった。②自覚的感覚異常、他覚的感覚異常、アキレス腱反射低下を発症時と 33 年後で比較すると、自覚的感覚異常は発症時には 4 割であったものが 6 割と増加した。一方で他覚的感覚異常は発症時 2 割強であったものが 1 割 7 分弱と大きな変化はなく、アキレス腱反射の低下を認める人数は発症時 3 割 5 分であったものが 33 年後には 1 割 8 分弱と、正常対照と同等になっていた。という結果を得ている。自覚的感覚異常が多く、また増加傾向にあることに関しては小径神経線維や大脳での感覚認知障害が起因しているのではないかと仮定し、今回は Phase locking 法という新しい解析法を用いて大脳感覚関連皮質の連関の抽出を試みた。方法：初期の多発性硬化症の患者さんと健常コントロールに対して正中神経を刺激し、全頭型脳磁計で記録。100～120 回の反応を記録し 1 次感覚野および 2 次感覚野の反応を抽出。刺激毎の γ 域 (30～40 Hz) の反応に対し Phase locking value (PLV) を算出しコントロールと比較した。結果：刺激対側 1 次感覚野と対側 2 次感覚野の PLV 解析では、コントロールの場合、刺激後 20～50 ms において 50～70 Hz、20～100 ms において 30～40 Hz の領域で PLV の増大が記録されるのに対し、患者ではこの増大がみられなかった。結論：微細な皮質障害をもつ疾患とコントロールで反応差を生じることを検出できた。今後は、客観的な大脳認知機能を解析できる今回のような手法に加え、神経心理検査やアンケート調査など認知機能障害を簡便に抽出できる方法の開発が必要であると思われる。

A. 研究目的

我々のこれまでの報告では、経過 33 年後の油症認定患者・非認定対象における自覚的末梢感覚異常は油症認定患者の 59.4%、非認定患者の 49.3% に認め、対象群の 8.0% に比べ圧倒的に多かった。他覚的感覚異常は認定患者で 16.7%、非認定患者で 7.2%、対象群で 4.4%存在し、いずれも自覚的感覚異常の出現率より低く特に非認定患者で低かった¹⁻⁵⁾。また、自覚症状、他覚的感覚神経異常、アキレス腱反射低下を経時的変化という点からみると、四肢遠位部の自覚的

感覚異常は発症時には 39.1%であったものが、11年後には 46.2%、33年後には 59.4%と増加した一方で、他覚的感覚異常は発症時 21.7%であったものが 11年後にはいったん 7.7%にまで減少し、33年後には 16.7%と再び増加した。アキレス腱反射の低下を認める人数は発症時 34.8%、11年後 34.6%、33年後 17.4%と経時的に減少し、2002 年に集計された正常対照でのアキレス腱反射低下 14.6%に近くなっていた¹⁻⁵⁾。感覚認知が認知されるまでには多種の皮膚受容器、腱受容器、小径から大径の末梢神経線維、

脊髄の知覚伝導路，視床から大脳皮質 1 次感覚野および 2 次感覚野と，様々な伝導・認知機構が関係している．末梢神経の電気刺激による神経伝導速度検査や、感覚誘発電位検査では末梢神経中の大径神経線維の伝導や、脊髄の後索の伝導を評価するのに有用であるが、痛みやしびれ感など小径線維末梢神経障害に起因する感覚障害を検出するのは困難であった。これに対して我々は小径線維末梢神経障害を検出する方法として電気生理学的手法では電流知覚閾値測定や温度閾値テスト、病理学的手法として皮膚パッチ生検を対神経抗体

(protein-gene-product 9.5 抗体) で免疫染色して無髄 C 線維を定量する方法などを提示してきた⁶⁾。痛みやしびれに対する主観的感覚認知と客観的評価の乖離は感覚認知の変化から生じている可能性がある。この乖離を埋め、高次脳機能の変化として経時的に感覚認知障害を評価する方法として、今回我々は全頭型脳磁計を用いて複数の皮質反応を同時記録し、Phase locking 法を用いて解析を行った。Phase locking 法は一般の誘発電位記録が反応の加算平均を記録するのに対して、刺激毎の各皮質の反応相の連関を抽出することにより、加算平均では相殺しあって消えてしまう皮質の連関を抽出できる新しい解析方法である^{7, 8)}。

B. 研究方法

皮質に軽度の障害があると想定されている初期の多発性硬化症の患者さんと健常コントロールに対して、各左右の正中神経を最小運動閾値で電気刺激。刺激は刺激幅 0.2ms の矩形波、刺激間隔 2.5 秒～3.5 秒。全頭型脳磁計 (Vectorview, ELEKTA, Neuromag, Helsinki) で記録。サンプリングレートは 5 KHz。被検者は検査中ベッドに仰臥して開眼状態で眠らず覚醒度を一定に保つように指示される。100～120 回の反

応を記録し 1 次感覚野および 2 次感覚野の反応を抽出。刺激毎の γ 域 (30～40 Hz) の反応に対し Phase locking value (PLV) を算出しコントロールと比較した。

(倫理面での配慮)

個人情報 は原則的に検証の対象としないが、個人のプライバシーが侵害されぬよう配慮した。

C. 研究結果

刺激対側に 1 次感覚野の反応と刺激対側および同側に 2 次感覚野の反応が記録された (図 1)。患者とコントロールでは 2 次感覚野の潜時に差は見られなかった。刺激対側 1 次感覚野と対側 2 次感覚野の PLV 解析では、コントロールの場合刺激後 20～50 ms において 50～70 Hz、20～100 ms において 30～40 Hz 領域で PLV の増大が記録されるのに対し、患者ではこの増大がみられなかった (図 2)。

D. 考察

急性薬物中毒では急性期を過ぎた後、徐々に神経障害が改善してくることが多い⁹⁾。我々が以前の報告で示したように⁵⁾、PCB (polychlorinated biphenyl) あるいは PCDF (polychlorinated dibenzofuran) ヘヒトが暴露することによって生じた末梢神経障害は、一旦出現した後に徐々に改善するという報告がある。一方暴露後 8 年経ても進行するという報告もあった¹⁰⁾。また、PCB, PCDF, dioxin による末梢神経障害は感覚神経障害が主であるが、神経伝導速度検査まで行っている報告は少なく¹¹⁻¹⁵⁾、障害の程度の判断は対象の主観によるものが主であった。診察者間で差を生じる可能性がある他覚的感覚検査にくらべてアキレス腱反射検査は手技的なばらつきが少なく結果の出る検査である点、末梢神経障害は腱反射を構成する Ia, Ib, α 運動神経においては急性時よりも改善している可能性があ

った。これに対して自覚的感覚異常は経年的に増加しており、腱反射を構成する太い神経線維以外の神経、もっと小径の神経線維の障害が改善していない可能性や、痛みやしびれを認知する大脳皮質機能の障害の可能性が考えられた。今回、脳磁界計測と Phase locking 解析法を用いて、微小な皮質障害を抽出することが可能であることが示唆されたが、点字のように詳細な形態をした触覚刺激で刺激すれば、正中神経電気刺激による反応よりもより詳細な大脳皮質知覚認知機能を客観的に評価できると考えられた。

一方、大脳皮質認知機能を簡便に経時的に評価するためには一般的に行われている脳波や認知機能バッテリーを使用すればコントロールとの比較を取りやすい。我々は認知症の評価バッテリーとして長谷川式認知機能検査、ミニメンタルテスト、三宅式記銘力検査、レーブン色彩マトリクス検査、脳血流検査、脳 MRI 検査、脳波検査を行っている。ただしこれらの検査をすべて行うと多大な時間を要することもあり、スクリーニングとしてアンケート形式の質問表を用いている。本人用、家族用に加え、現在本人用と家族用をあわせた簡易アンケートを準備しつつある(図 3, 4, 5)。アンケートは主観的なものであり、客観的な評価を求める場合は、今回用いた電気生理学的手法や神経放射線画像、神経心理検査を含む神経診察と合わせて評価していくことが望ましいと思われる。

E. 結論

今回、脳磁図と Phase locking 解析法を用いて、微細な皮質機能障害をもつと想定される疾患でコントロールとの差を検出することができた。今後、今回用いた正中神経電気刺激よりも触覚刺激で刺激すれば、より詳細な大脳皮質知覚認知機能を客観的に評価できると考えられた。また認知機能

障害の評価として、今回用いた電気生理学的手法以外にも神経放射線画像、神経心理検査を含む神経診察と合わせて評価していくことが望ましいと思われた。

F. 文献

- 1) 黒岩ら：福岡医誌 60：462-463, 1969
- 2) 岩下ら：福岡医誌 68：139-144, 1977
- 3) 柴崎ら：福岡医誌 72：230-234, 1981
- 4) 古谷ら：福岡医誌 96：152-156, 2005
- 5) 重藤ら：食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究, 平成 19 年度総括・分担研究報告書, 2008
- 6) 栄ら：食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究, 平成 21 年度 総括・分担研究報告書, 2010
- 7) Lachaux JP, et al: Hum. Brain Mapp 8: 194-208, 1999
- 8) Hagiwara K, et al: Neuroimage 51: 412-420, 2010
- 9) Kim JS, Ind Health 41: 149-157, 2003
- 10) Chia LG, et al: J Neurol Neurosurg Psychiatry 48: 894-901, 1985
- 11) Michalek JE, et al: Neurotoxicology 22: 479-490, 2001
- 12) Thömke F, et al: Acta Neurol Scand 100: 1-5, 1999
- 13) Barbieri S, et al: Neuroepidemiology 7: 29-37, 1988
- 14) Chia LG, et al: J Neurol Neurosurg Psychiatry 48: 894-901, 1985
- 15) Murai Y, et al: Neurology 21: 1173-1176, 1971

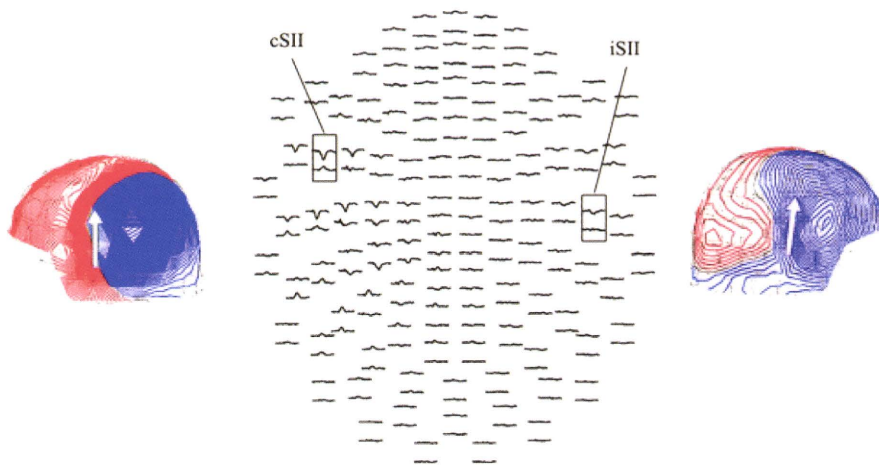
G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

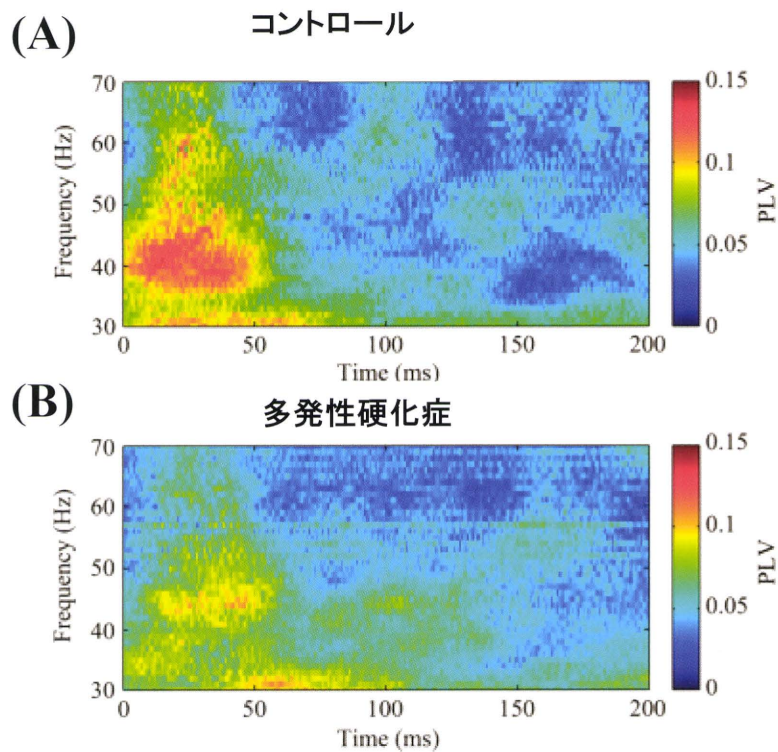
なし

図 1 右正中神経刺激時の脳磁界反応



左が刺激対側の 2 次感覚野(cSII)、右が同側の 2 次感覚野の反応(iSII)。矢印は推定電流源の位置と方向を示す。

図 2 コントロールと多発性硬化症患者での Phase locking valueの比較



横軸：反応時間 (ms)。

縦軸：Phase locking value；値が大きいくほど反応相の一致度が高い。

図 3 九州大学病院もの忘れ外来問診票（本人用）

氏名 _____ 住所 _____

各問に対し、はい、いいえのどちらかで答えてください。わからないところは何もつけな
いで結構です。

1.

- (1) 最近、物の置き場所をよく忘れる
- (2) 知っている人の名前をしばしば思い出せない
- (3) 大切なものをなくしたことがある
- (4) 大事な約束を忘れたことがある
- (5) あった出来事をすっかり忘れていたことがある
- (6) 買い物で、同じものを買ってしまったこと何度もある
- (7) 字を書く時に、字が思い出せないことがよくある

2

- (1) 新しい電化製品の使い方が覚えられない
- (2) 新しく知り合いになった人の名前を覚えられない

3

- (1) 仕事や家事がうまく出来なくなった
- (2) 計算力が落ちた
- (3) 文章や字がうまく書けないようになっている
- (4) 話す時に、言葉が思い浮かばず、「あの」とか「あれ」といった言葉が増えてきた
- (5) 1人で旅行や遠くに行くことが出来ない

4

- (1) ぼんやりすることが多くなった
- (2) やる気が出ない
- (3) ゆううつだ
- (4) イライラしやすくなった

5

- (1) 夜あまり眠れなくなっている
- (2) 昼間うとうとすることが多い
- (3) 食欲がない、食事が美味しく感じられない
- (4) やせてきている
- (5) 性欲がない
- (6) 外出する気にならない
- (7) 趣味や好きなことをやめた

図 4 九州大学病院もの忘れ外来問診票（家族用）

患者さんの氏名 _____ あなたの氏名 _____
 続柄 _____ 同居（している、していない）

下記の各事項について、患者さんに当てはまるかどうかをお聞きします
 はい、いいえ、わからない、のいずれかで答えてください。

1

- (1) 先刻あったこともすっかり忘れることがある
- (2) しばらく前にあった出来事をすっかり忘れる
- (3) 同じ事を何度も言ったり、尋ねたりする
- (4) 大事な物を何度かなくした
- (5) よく何か探しものをしている
- (6) 火の消し忘れや戸締り忘れなどが多い
- (7) 大事な約束や伝言も忘れてしまう
- (8) 久しぶりにあった人の名前を全く覚えていない
- (9) 言葉が思い浮かばず、あれ、これと言いよどむ

2

- (1) 日付や曜日がわからない
- (2) 季節にあわない服装をする

3

- (1) 知らない場所や旅行先で迷子になったことがある
- (2) 近所でも迷子になることがある
- (3) 家の中でも場所が判らなくなることもある

4

- (1) 家族を別の家族の名前で呼ぶことがある
- (2) 家族を他人のように勘違いすることがある

5

- (1) 今まで出来ていた家事や仕事ができない
- (2) 1人では必要な買い物ができない
- (3) 計算ができない
- (4) テレビや新聞などの内容が判らないことがある
- (5) 適切な服を選ぶことができない
- (6) 自分で着脱衣することができない
- (7) 字を書けなくなっている

6

- (1) 性格や行動パターンが変わってきた
- (2) 最近元気がなく、ぼんやりしていることが多い
- (3) 何事にも無関心になってきた
- (4) 無精、不潔になってきた
- (5) 怒りっぽくなった
- (6) 疑い深くなった

7

その他、特に気になることの詳細をお書きください

図 5 認知症早期発見のめやす

- 少し前のことが思い出せない
- 同じ事を何度も言う・問う・する
- 大切な物をなくしたり、置き忘れてりする
- 物の名前が出にくく「あれ」「これ」と言うことが多い
- 料理、片付け、運転などの失敗が多くなった
- 簡単な計算を間違えたり、小銭の計算ができなくなった
- 前に買ったことを忘れ、同じ物を何個も重ねて買ってることがある
- 月・日・曜日が判らない
- 慣れているところで道に迷う
- イライラ・不安・落ち込みなど、情緒が不安定になった
- 昼間ウトウトすることが増え、睡眠リズムが不規則になった
- 身だしなみを気にしなくなった
- 人との交流が減り、外出をおっくうがるようになった
- 今まで好きだったことへの興味・関心が薄くなった
- 物を盗られたなどと、被害的になることがある
- 実際にはない物や人がいると言うことがある

*チェック数が多くご心配な場合はご相談ください

分担研究報告書

ダイオキシンの末梢神経および脊髄神経に及ぼす作用に関する研究

研究分担者 吉村 恵 熊本保健科学大学大学院保健科学研究科 教授

研究要旨 末梢神経細胞体から細胞内記録を行い、末梢電気刺激によって誘起された活動電位に対して、ダイオキシンの慢性投与はその伝導速度を変化させることが明らかになった。

A. 研究目的

油症患者には手足のしびれや多発神経炎、自律神経失調症などの末梢神経障害および中枢神経障害が多く報告されているが、その発生機序については未だ明らかではない。そこで、ラットにダイオキシンを経口投与し、1週間後に後根神経節細胞から記録を行い、末梢神経の静止膜電位や伝導速度等を正常ラットのそれらと比較検討することによってダイオキシンの末梢神経に対する作用を検討した。

B. 研究方法

成熟ラットにダイオキシン 30 mg/Kg を経口投与し、一週間後にウレタン麻酔下に後根神経節に末梢神経を付した標本を作製した。後根神経節を覆う結合組織を注意深く除去し、記録用チェンバーに設置したシルガードに微細なピンで固定した。末梢神経を刺激用の吸引電極に設置した後、記録用チェンバーを加温した Krebs 液で持続的に灌流した。微小ガラス電極を用いて神経節細胞から細胞内記録を行い、静止膜電位や末梢神経刺激によって誘起される活動電位の振幅と伝導速度を調べ、正常ラ

ットから得られたものと比較検討した。神経節細胞は A-beta, A-delta および C ニューロンを含むため、各々のニューロンから記録を行い正常ニューロンとの相違を観察した。尚、今年度は A-beta と A-delta ニューロンを主にして解析を行った。

全身麻酔下にラットの後根神経節を取り出し、その後、過量のウレタンを腹腔内に追加投与して死に至らしめるため痛みなどの侵襲は殆ど無い。

C. 研究結果

後根神経節に存在する 2 種類の細胞から細胞内記録を行い、静止膜電位、入力抵抗、自発性活動電位を記録した。次いで、末梢神経線維刺激によって誘起される活動電位の振幅、および刺激からの潜時と刺激部位からの距離を指標にして伝導速度を計算した。先ず正常ラット後根神経節細胞から記録を行い、活動電位の振幅およびそれぞれの線維の伝導速度を調べた。A-beta 線維は活動電位が 71 ± 4 mV でその伝導速度は 20.6 ± 1.1 m/s であった。また、A-delta 線維はそれぞれ 75 ± 4 mV,

8.8 ± 0.8 m/s であった。C 線維の活動電位および伝導速度は細胞が微小なため安定した記録が困難で、十分な数の細胞からデータが得られていない。今後、記録電極をより細いものにするによって安定した記録が可能になるものと考えられた。

次いで、ダイオキシンを経口投与したラットから摘出した後根神経節細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、活動電位の振幅には若干の差が見られるものの有意ではなかった。次に伝導速度を計測した。A-beta 線維ではその伝導速度は 17.3 ± 3.1 m/s で有意にコントロールラットより遅かった。また、A-delta 線維では 7.9 ± 4.1 m/s で遅い傾向はあったが有意ではなかった。これらのパラメータ以外では、静止膜電位、活動電位の幅などは有意差が見られなかった。今後、記録細胞の数を増やしてより詳細に検討したい。また、C 線維において如何なる変化が見られるかを明らかにしていきたい。

D. 考察

ダイオキシン投与ラット後根神経節の A-beta 細胞では伝導速度が有意に遅い結果を得たが、A-delta 線維では緩徐化傾向はあったが有意差は見られなかった。記録を行った細胞数が未だ少ないため結論を出すには細胞数を増やし、有意差があるか検討する必要があると考える。また、C 線維からの記録は細胞数が少ないため今後細胞数を増やして詳細に検討したい。いずれにしても A-beta 細胞での伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感の原因となっている可能性は否定出来ない。今後 A-delta お

よび C 線維についてデータが得ることが必要である。

E. 結論

正常ラットとダイオキシン投与ラットの後根神経節細胞から記録を行い、A-beta 線維の伝導速度が有意に緩徐化していることを見いだした。その他の静止膜電位、活動電位の振幅およびその幅などには有意な差を見いだすことは出来なかった。伝導速度の変化がしびれなどの感覚異常に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

分担研究報告書

ダイオキシン類による気道症状を引き起こすメカニズムに関する検討

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 マウスに Benzo(a)pyrene を経気管的に投与することにより、気道分泌物が増加するマウスモデルを作成した。ダイオキシン類による肺傷害の動物実験モデルとして有用と考えられた。

A. 研究目的

油症の主な原因物質と考えられる PCDFs を投与した動物実験モデルでは、電子顕微鏡にてクララ細胞の壊死が認められており、病変の主座はクララ細胞を中心とした細気管支領域と考えられている。クララ細胞は Aryl hydrocarbon receptor (AhR) を発現しており、それを介してダイオキシン類が肺傷害を引き起こすと考えられるが不明な点も多い。当科では、そのメカニズムを解明するために、まずは動物実験モデルの作成を目指して研究を進めてきた。これまでマウスに TCDD を経口あるいは経腹腔内に投与することで検討を繰り返してきたが、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液の解析、肺組織の免疫組織学的解析では、一部の肺胞上皮細胞に SP-D 発現の亢進を認めるのみで、蛋白レベルで解析可能な十分な動物実験モデルの作成ができたとはいえなかった。

ダイオキシン類は、消化管、皮膚、肺から吸収されることが知られている。そこで今回我々は、経気管的にダイオキシン類を直接肺に投与することにより、肺傷害の動物実験モデルの確立と肺傷害のメカニズム解明を目指すことを目的とした。

B. 研究方法

Benzo(a)pyrene (BaP) をマウスに経気管的に投与し、組織、BAL 液の解析を行った。

具体的には、C57BL/6 マウス雄、8 週齢に、Tricaprylin で溶解した BaP を 1 匹あ

たり 400 μ g、50 μ l、3 日間連続で経気管的に投与した¹⁾²⁾。対照群には Tricaprylin を 50 μ l 投与した。最終投与の 24 時間後に BAL を施行し、また肺を取り出し、HE 染色、Alcian blue-PAS (AB-PAS) 染色、CYP1A1、CC10、SP-D による免疫染色を施行した。

(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

BaP 投与群では、対照群と比較して、BAL 液中の好中球数は増加傾向にあった(図 1a)。BAL 液中の蛋白濃度は有意に上昇していた(図 1b)。また組織学的には、HE 染色では明らかな差を認めなかったが(図 2)、AB-PAS 染色にて、BaP 投与群では中樞側気管支の気道上皮細胞に多数の陽性細胞を認め(図 3)、気道分泌物が増加していると考えられた。免疫染色では CYP1A1 陽性細胞は、対照群では主にクララ細胞を中心とした細気管支上皮に認められたが(図 4a)、BaP 投与群では、クララ細胞のみならず、肺胞上皮細胞にも強く認められた(図 4b)。CC10 陽性細胞はクララ細胞に認められたが、対照群と BaP 投与群とに明らかな差を認めなかった(図 5)。SP-D 陽性細胞はクララ細胞に認められたが、BaP 投与群ではそれに加えて II 型肺胞上皮細胞にも強く認められた(図 6)。

D. 考察

今回我々は、マウスに BaP を経気管的に投与することにより AB-PAS 染色陽性の気道上皮細胞の増加を認めた。これらはムチン類の増加、即ち気道分泌物の増加を表していると考えられる³⁾。油症患者に喀痰の増加が認められる点からも、このモデルは動物実験モデルとして有用と思われる。また、BAL 液中の蛋白濃度の増加を認めたことと、肺胞上皮細胞で CYP1A1 や SP-D の発現が亢進していたことは、肺傷害のメカニズムを解明する点から重要な知見と考えられ、こちらに関しても解析を進めていく予定である。

今回、投与するダイオキシン類を TCDD から BaP に変更した点と、投与法を経口、経腹腔内投与法から経気管投与法に変更した点とが以前と異なる。TCDD よりも BaP の方が一般に毒性は軽いと考えられており、経気管投与法に変更し肺に直接ダイオキシン類を投与した点が、より影響が強いと思われる。しかし経口投与等の方が、実際の病態には近いと考えられ、経気管投与では実際の病態とは必ずしも一致しないことに留意する必要がある。

また、近年、TCDD をマウスの腹腔内に投与し、全肺を mRNA レベルで検討すると、CYP1A1、MUC5AC の上昇や、IL-1 β 等のサイトカインの上昇が認められ、かつそれらは AhR の発現を変異させたマウスでは抑制されていたという報告があった³⁾。我々の結果と一致すると考えるが、気道分泌増加のメカニズムについては未だ不明な点が多く、今後 mRNA レベルでの解析も併せて施行していく予定である。

以上、我々が作成した BaP 経気管投与によるマウス肺傷害モデルは、再現性も高く、蛋白レベルでも評価可能な動物実験モデルであると考えられる。更に検討を加えていくと同時に、油症患者の呼吸器症状が漢方薬の麦門冬湯で改善された報告⁴⁾を参考に、麦門冬湯の効果についてもこの動物実験

モデルを使用して検討予定である。

E. 結論

マウスに Benzo(a)pyrene を経気管的に投与することによって気道分泌物が増加するマウスモデルを作成した。ダイオキシン類による肺傷害の動物実験モデルとして有用と考えられた。そのメカニズムの解明が、油症患者の咳、痰等の呼吸器症状の原因解明に役立つ可能性がある。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- 1) Podechard N, et al. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett.* 2008;177(2):130-7
- 2) N' Diaye M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *J Biol Chem.* 2006;281(29):19906-15.
- 3) Wong PS, et al. Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(2):210-7.
- 4) Uchi H, et al. A clinical trial of Kampo Formulae for the treatment of symptoms of Yusho, a poisoning caused by dioxins and related organochlorine compounds. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009 Dec 8. Epub ahead of print.

図 1 気管支肺胞洗浄液 (BALF)

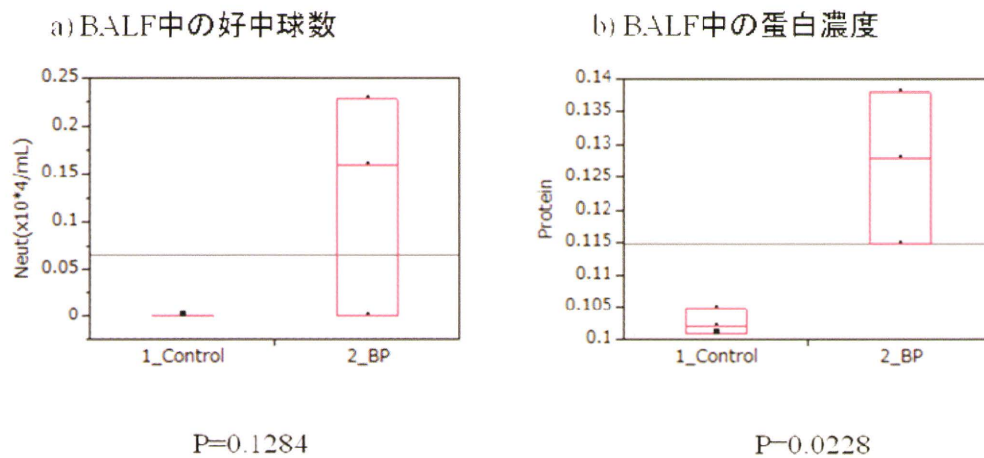


図 2 HE 染色 a) 対照群, b) Benzo(a)pyrene 投与群 (x100)

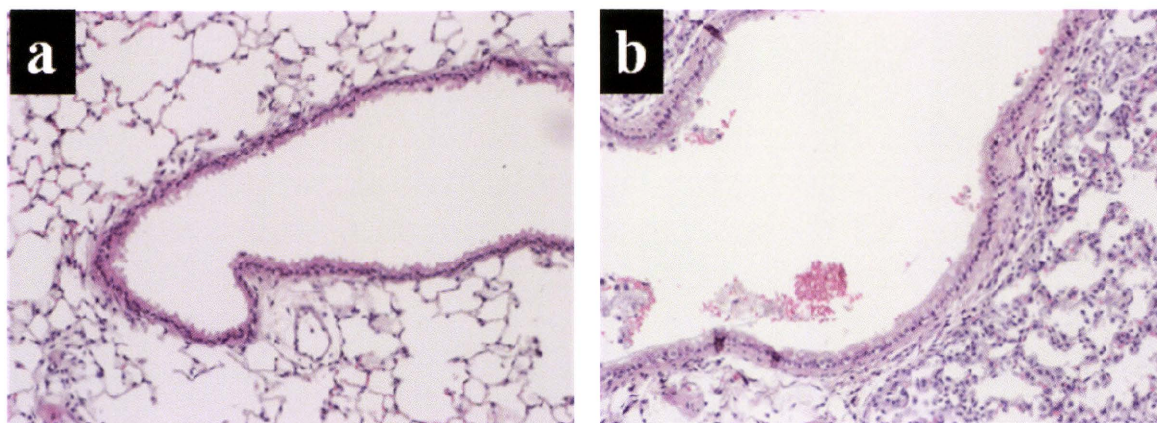


図 3 Alcian blue-PAS 染色 a) 対照群, b) Benzo(a)pyrene 投与群 (x100)

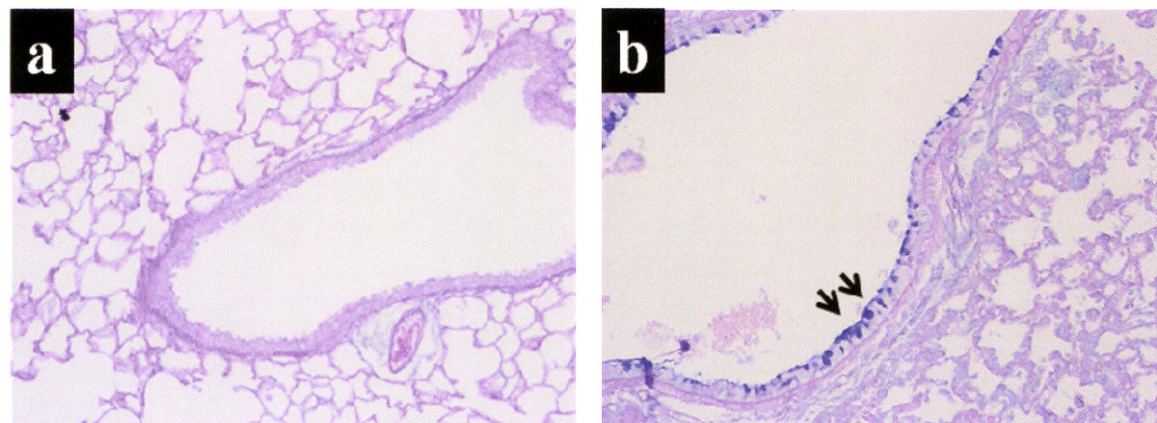


図 4 CYP1A1 免疫染色 a) 対照群, b) Benzo(a)pyrene 投与群 (x200)

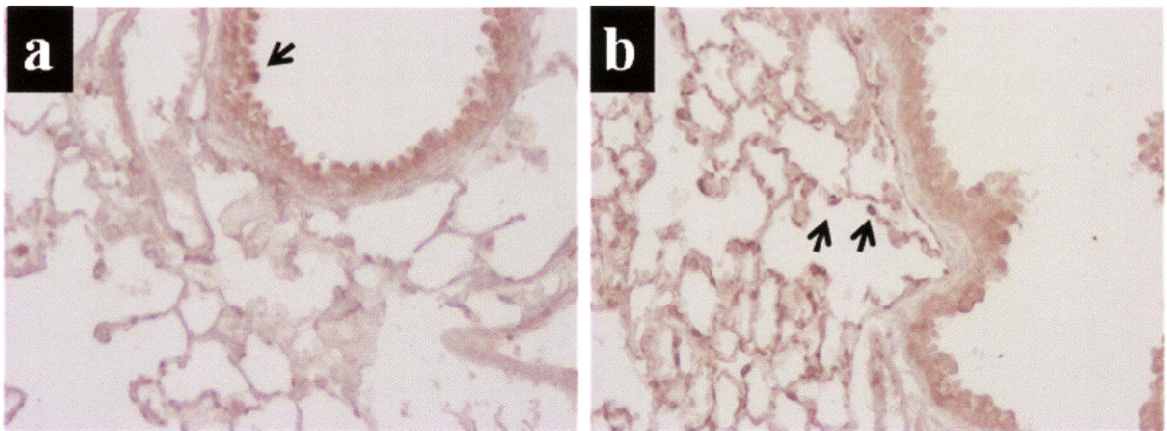


図 5 CC10 免疫染色 a) 対照群, b) Benzo(a)pyrene 投与群 (x100)

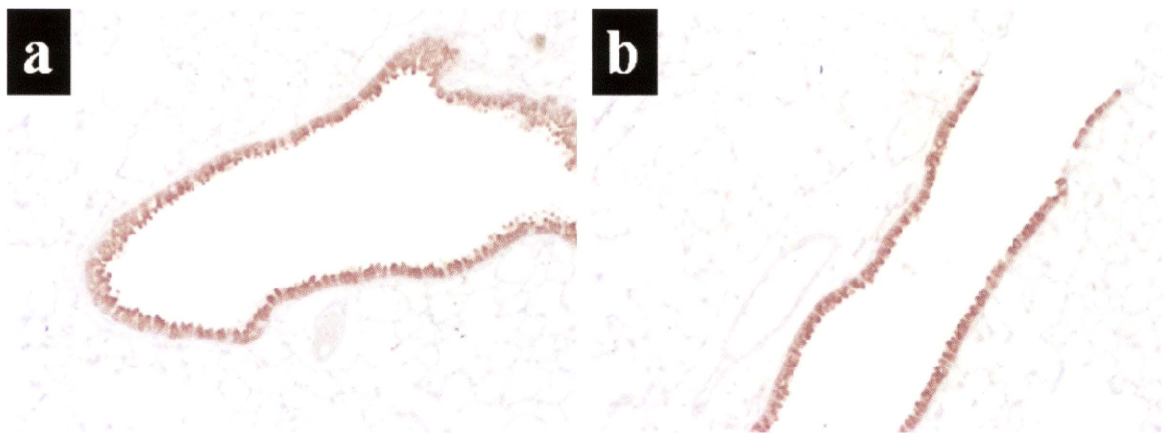
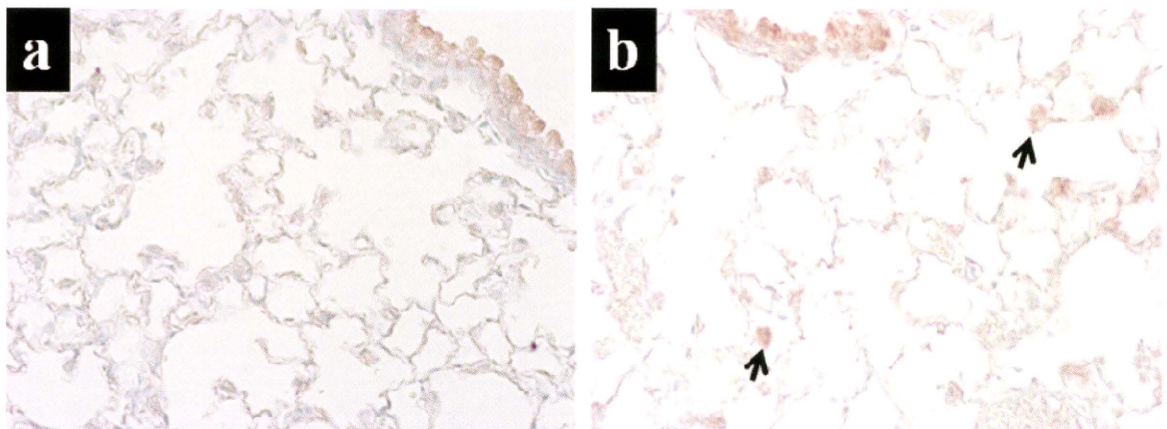


図 6 SP-D 免疫染色 a) 対照群, b) Benzo(a)pyrene 投与群 (x200)



分担研究報告書

ダイオキシン受容体 (aryl hydrocarbon receptor) シグナルによる 気道上皮細胞の機能解析

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 千葉 貴人 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 特任助教
安川 史子 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教
古江 増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 教授

研究要旨 これまでわれわれは、ダイオキシン類化合物受容体である Arylhydrocarbon Receptor (AhR) 刺激によりヒト気道上皮細胞株 (NCI-H₂₉₂) からムチン産生が増強することを報告した。そこで、AhR 刺激によるムチン産生のシグナル経路について検討した。AhR 刺激による (NCI-H₂₉₂) からの活性酸素産生を測定したところ、その産生が増強され、活性酸素中和剤により、ムチン産生が抑制された。以上より、ダイオキシン類化合物による AhR 活性化は、気道上皮細胞からの活性酸素産生を促進し、気道粘液産生を増強させることにより、咳・痰などの呼吸器障害に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

煙草、環境ホルモンや油症による中毒事件で知られているダイオキシン類化合物は、呼吸器系にも様々な作用を及ぼすことが報告されている。肺腫瘍のプロモーター作用の他、近年、慢性閉塞性呼吸器疾患のリスクが高まるという報告もあり、慢性気道炎症性疾患への関与が示唆されている。

実際、喫煙者・油症患者において、咳嗽・喀痰・喘鳴などの気道症状、いわゆる慢性閉塞性気道疾患や慢性気管支炎に類似した症状があらわれることが知られている¹⁾が、これら喫煙や油症により体内へ取り込まれたダイオキシン類化合物の呼吸器症状 (咳・痰) への関与については不明な点が多い。これまで、我々はダイオキシン類化合物受容体である Arylhydrocarbon Receptor (AhR) 刺激によりヒト気道上皮細胞株 (NCI-H₂₉₂) からムチン産生が増強することを報告した。

本研究の目的は、ダイオキシン類化合物刺激による気道上皮細胞からのムチン産

生のシグナル経路について検討する。

B. 研究方法

気道上皮細胞からのムチン産生に関与する因子としてサイトカイン、活性酸素、上皮成長因子受容体 (EGFR) の関与について解析した。

1、気道上皮細胞株 (NCI-H₂₉₂) からのサイトカイン産生

NCI-H₂₉₂ を AhR アゴニストであるベンゾピレン (BaP) で 24 時間刺激し、その後上清中のサイトカインをサイトカインアレイ (ELISA) 法で測定した。

2、気道上皮細胞株 (NCI-H₂₉₂) からの活性酸素産生

NCI-H₂₉₂ を AhR アゴニストであるベンゾピレン (BaP) で 12 時間刺激し、その後活性酸素発現を蛍光染色法にて解析を行った。

3、ムチン産生における EGFR の関与

NCI-H₂₉₂ を EGFR 拮抗薬にて前処理した後、AhR アゴニストであるベンゾピレン

(BaP) で 24 時間刺激し、その後ムチン発現を real time RT-PCR 法および PAS 染色法にて、メッセージ・タンパクレベルで解析を行った。

4、NAC (抗酸化剤) を用いたムチン産生の検討

NCI-H₂₉₂ を NAC にて前処理した後に、AhR アゴニストであるベンゾピレン (BaP) で 24 時間刺激し、その後ムチン発現を real time RT-PCR 法および PAS 染色法にて、メッセージ・タンパクレベルで解析を行った。

5、siRNA (低分子干渉 RNA) を用いたムチン産生の検討

siRNA 法を用い、NCI-H₂₉₂ 細胞の AhR をノックダウンし活性酸素産生・ムチン産生が抑制されるか検討を行った。

(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判断した。

C. 研究結果

1、気道上皮細胞株 (NCI-H₂₉₂) を AhR アゴニストであるベンゾピレン (BaP) で 24 時間刺激し、その後上清中のサイトカイン産生を測定した。ムチン産生に参与する可能性のある IL-4、IL-13、TNF- α 、TGF- α 、EGF を測定したが、いずれも産生増強は認められなかった。

2、AhR アゴニストであるベンゾピレン (BaP) で 12 時間刺激により NCI-H₂₉₂ から活性酸素産生を認めた (図 1)。

3、EGFR リン酸化阻害剤前処理を行った後、AhR アゴニストであるベンゾピレン (BaP) 24 時間刺激を行ったが、MUC5AC mRNA の発現増強およびムチン (PAS 染色) の産生を抑制できなかった。

4、NCI-H₂₉₂ を抗酸化剤である NAC にて前処理することにより AhR アゴニストであるベンゾピレン (BaP) による MUC5AC mRNA の発現増強およびムチン (PAS 染色) の産生を抑制した (図 2)。

5、siRNA 法を用い、AhR ノックダウン細胞を作製した。AhR ノックダウン NCI-H₂₉₂ 細胞を AhR アゴニストであるベンゾピレン (BaP) で刺激すると、コントロール細胞 (通常 NCI-H₂₉₂) と比較し、ムチン産生および活性酸素産生が減弱した (図 3)。

D. 考察

これまで煙草抽出液などを用いた in vivo の実験によりダイオキシン類化合物による気道上皮細胞からのムチン産生増強、炎症性サイトカイン産生、EGFR (表成長因子受容体) 活性化などが明らかとなっている²⁾。さらに近年、これらダイオキシン類化合物によるムチン産生は、AhR を介して産生されることが報告され³⁾、我々も同様の結果を得た。しかし AhR 刺激が、どのようなシグナル経路を介し、ムチン産生を引き起こすのか不明であった。今回、我々は、ダイオキシン類化合物受容体 (AhR) を刺激することにより、気道上皮細胞からの活性酸素産生が増強することを確認した。また、ムチン産生の増強は、抗酸化剤の添加にて抑制された。これらの結果は、AhR 活性によるムチン産生が活性酸素産生を介し惹起している可能性が示唆された。以上から、喫煙やダイオキシン類化合物などによる咳・喀痰などの気管支症状に、抗酸化剤を治療に応用することで、症状改善につながる可能性を見出した⁴⁾。

E. 結論

AhR 刺激により気道上皮細胞株からのムチン産生を確認したが、これらの作用は、AhR 刺激による活性酸素産生を介して惹起されることが分かった。

F. 研究発表

1、論文発表

Chiba T, Uchi H, Tsuji G, Gondo H, Moroi Y, Furue M. Arylhydrocarbon receptor (AhR) activation in airway epithelial