

症患者 3 例、油症患者（同居家族）1 例、未認定患者 1 例、初回受診者 1 例であった。同居家族を含む油症患者および未認定患者における検討では、抗 Sc1-70 抗体が基準値を超えるものを油症患者の 2.6%に、未認定患者の 6.5%に認め、出現率に差をみなかった。また、抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体が基準値以上の上昇を認めるものは同居家族を含む油症患者の 2.1%に、未認定患者の 2.2%に認め、出現率に差をみなかった。そして、血中 PCB 低濃度油症患者および高濃度油症患者における抗 Sc1-70 抗体および抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体の検討では、抗 Sc1-70 抗体は血中 PCB 低濃度患者の 2.2%に、血中 PCB 高濃度油症患者の 2.9%に認め、出現率に差をみなかった。また、抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体は血中 PCB 低濃度患者の 2.2%、血中 PCB 高濃度油症患者の 2.0%と出現率に差をみなかった。

今回の検討では、2014 年度福岡県油症一斉検診の受診者において、抗 Sc1-70 抗体および抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体を検討した。抗 Sc1-70 抗体および抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体は同居家族を含む油症患者と未認定患者に出現率に差をみなかった。また、抗 Sc1-70 抗体および抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体は血中 PCB 高濃度油症患者と血中 PCB 低濃度患者において出現率に差をみなかった。抗 Sc1-70 抗体および抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体の出現と 2, 3, 4, 7, 8- PeCDF の関連についても検討が必要と考えられた。

E. 結論

2014 年度福岡県油症一斉検診の受診者 252 例（油症患者 171 例、油症患者（同居家族）23 例、未認定患者 46 例、観察者 1 例、初回受診者 11 例）において抗 Sc1-70 抗体および抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体を測定した。抗 Sc1-70 抗体の基準値を超える上昇を油症患者 2 例、油症患者（同居家

族）3 例、未認定患者 3 例、初回受診者 1 例に、抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体の基準値以上の上昇を油症患者 3 例、油症患者（同居家族）1 例、未認定患者 1 例、初回受診者 1 例に認めた。同居家族を含む油症患者および未認定患者における検討では、抗 Sc1-70 抗体を油症患者 194 例中 5 例（2.6%）に、未認定患者 46 例中 3 例（6.5%）に認め、出現率に差をみなかった。また、抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体の基準値以上の上昇は同居家族を含む油症患者 4 例（2.1%）に、未認定患者 1 例（2.2%）に認め、出現率に差をみなかった。血中 PCB 低濃度油症患者および高濃度油症患者における検討では、抗 Sc1-70 抗体は血中 PCB 低濃度患者 92 例中 2 例（2.2%）に、PCB 高濃度油症患者 102 例中 3 例（2.9%）に認め、出現率に差をみなかった。抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体は血中 PCB 低濃度患者 2 例（2.2%）、PCB 高濃度油症患者 2 例（2.0%）に認め、出現率に差をみなかった。

F. 参考文献

1. Masuda Y, Yoshimura H : Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance : A Review. *Amer J Ind Med* 5 : 31-44, 1984.
2. Gonzalez FJ, Liu SY, Yano M : Regulation of cytochrome P450 genes : molecular mechanism. *Pharmacogenetics* 3 : 51-57, 1993.
3. 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一:最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニール異性体. *福岡医学雑誌* 76 : 150-152, 1985.
4. 飯田隆男, 戸高尊, 平川博仙, 飛石和大, 松枝隆彦, 堀就英, 中川礼子, 古江増隆:油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査 (2001 年). *福岡医学雑誌* 94 : 126-135, 2003.

5. 辻 博, 佐藤薫, 下野淳哉, 東晃一, 橋口衛, 藤島正敏: 油症患者における甲状腺機能: 油症発生 28 年後の検討. 福岡医学雑誌 88 : 231-235, 1997.
6. 辻 博, 平橋高明, 緒方久修, 藤島正敏: 油症患者における免疫機能の検討. 福岡医誌 90 : 147-149, 1999.
7. 辻 博: 油症における特異抗核抗体の検討. 福岡医誌 104 : 73-77, 2013.
8. 濱口儒人: 全身性強皮症における自己抗体とその臨床的特徴. 日臨免誌 36 : 139-147, 2013.

G. 研究発表

1. 論文発表

辻 博: 油症における特異抗核抗体の検討. 福岡医誌 104 : 73-77, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 油症患者および対照における抗 Sc1-70 抗体および抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体

No.	油症 194	対照 46
抗 Sc1-70 抗体		
> 7.0 U/ml	8 (4.1%)	5 (10.9%)
> 10.0 U/ml	5 (2.6%)	3 (6.5%)
抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体		
≧ 5 Index	30 (15.5%)	8 (17.4%)
≧ 28 Index	4 (2.1%)	1 (2.2%)

表 2 油症患者 194 例における血中 PCB 濃度による抗 Sc1-70 抗体および抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体の出現

No.	血中 PCB 濃度	
	< 1.0 ppb 92	≧ 1.0 ppb 102
抗 Sc1-70 抗体		
> 7.0 U/ml	3 (3.3%)	5 (4.9%)
> 10.0 U/ml	2 (2.2%)	3 (2.9%)
抗 RNA ポリメラーゼⅢ抗体		
≧ 5 Index	14 (15.2%)	16 (15.7%)
≧ 28 Index	2 (2.2%)	2 (2.0%)

分担研究報告書

油症認定患者における soluble EGFR の検討

研究分担者 宇谷厚志 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 教授
 研究協力者 鋤塚大 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 助教

研究要旨 近年種々の悪性腫瘍に対して EGFR 阻害剤による抗腫瘍効果が示され、本邦でも広く用いられている。だが、EGFR 阻害剤による皮膚障害として痤瘡様皮疹や爪囲炎が生じる。一方で多くの油症患者においても、発症当時は激しい痤瘡様皮疹が認められた。現在症状は軽減してきているが、一部の油症患者においては痤瘡様皮疹による QOL の低下が見受けられる。TCDD により誘発された塩素性痤瘡の組織中では EGFR が高発現していたという報告がみられたことから、我々は油症患者において EGFR の変動が何らかの形で生じている可能性を考えた。一方、非肺小細胞癌や膵癌などにおいて可溶性 EGFR (sEGFR) が血清中で確認され、病勢と関連していることが報告されている。よって、油症患者血清中では sEGFR に何らかの変動が生じているものと考え、正常人との比較を行った。その結果、血清中 sEGFR 値は油症患者で 63.10 ± 23.52 ng/ml、健常人で 58.81 ± 16.84 ng/ml であった。油症患者血清中でやや上昇傾向が見られたが、2 群間に有意な差はなかった。

A. 研究目的

1968 年カネミ油症事件発生後 40 年以上経過し、初期に認められた激しい症状は消退傾向にあるが、現在でも痤瘡様皮疹などの皮膚症状、咳嗽や喀痰過多などの呼吸器症状、しびれや頭重などの神経症状、全身倦怠感などの全身症状など多彩な症状が残存している。油症の原因であるカネミオイルには Polychlorinated biphenyls (PCB) , Polychlorinated quarterphenyls (PCQ) 及び Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) を含む dioxin 類が混在している事がわかっている¹⁾。しかし、これらのダイオキシン類は自己代謝が進まず、また代謝経路が不明であることから治療薬の開発が遅れ、油症患者では依然として高濃度のダイオキシン類が検出されている。

近年、医学の進歩により細胞増殖に特徴的な分子を標的とする分子標的薬の

開発が進んでいる。中でも、分子標的薬の一つである EGFR 阻害剤は本邦でも大腸癌や肺癌、頭頸部癌などに広く用いられている。だが、その副作用として痤瘡様皮疹が生じることが知られ、痤瘡様皮疹と EGFR の関与が示唆されている。最近の研究によると、TCDD 投与により発症した塩素性痤瘡組織中において EGFR の発現が亢進していることが報告された²⁾。したがって、油症患者においても痤瘡様皮疹の発症に EGFR が関与している可能性が考えられる。その一方で、非肺小細胞癌や転移性乳癌などにおいて、血清中に存在する可溶性 EGFR (soluble EGFR; sEGFR) 値が病勢と関連しているとする報告が散見される^{3,4)}。以上から、油症認定患者においても血清中 sEGFR に変動が生じている可能性を考え、油症患者血清における sEGFR 値を検討した。

B. 研究方法

①対象:2005 年から 2008 年に施行された長崎県油症検診受診者のうち、同意を得られかつ PCB, PCQ, PCDF の測定を行った油症認定患者 29 名および年齢をあわせた健常人 28 名を対象とした。検診時に採血を行い凍結保存し sEGFR 測定用サンプルとした

②sEGFR の測定;ヒト EGFR ELISA キット(R&D 社製)を用いてサンプル血清中の EGFR を測定した。

③検査値との相関;油症患者データベースを元に血清採取時の PCB, PCQ, PCDF と sEGFR 値との相関を検討した。

④統計的処理:測定した sEGFR 値の統計的処理に Mann-Whitney の U 検定、Spearman の順位相関係数の検定を使用した。

(倫理面への配慮)

データの解析は個人情報特定されないよう、連結不可能な匿名化データとして解析を行った。

C. 研究結果

検討した油症患者におけるダイオキシン濃度は PCB 2.89 ± 1.21 ppb、PCQ 0.39 ± 0.43 ppb、PCDF 277.6 ± 150.6 pg/g lipids であった。油症患者血清を用いて、soluble EGFR の検討を行った。長崎県の油症患者 29 名、および健常人 28 名の平均年齢は各々 71.7 ± 6.36 歳および 71.4 ± 6.28 歳で有意差はなかった。血清中 soluble EGFR 値はそれぞれ油症患者で 63.10 ± 23.52 ng/ml、健常人で 58.81 ± 16.84 ng/ml であり、2 群間に有意な差は見られなかった ($p=0.06$) (図 1)。つづいて、油症認定患者血清中の sEGFR 値と PCB, PCQ, PCDF 値に関し検討を行ったが相関は認められなかった。

D. 考察

EGFR はチロシンキナーゼファミリーに属する ErbB 受容体の一つである。EGFR は様々な悪性腫瘍に高発現しており、EGFR を標的とした分子標的薬の開発が進んでいる。近年、肺腺癌や大腸癌などで EGFR が高発現していることが判明し、EGFR 阻害薬による治療が臨床応用され、腫瘍の縮小や生存期間の延長をもたらした良好な成績を収めている。だが、EGFR 阻害剤の投与により、痤瘡様皮疹や爪囲炎を始めとした皮膚障害が生じ、大きな問題となっている。一方で、痤瘡様皮疹は油症患者においても高頻度に認められる。発症から 40 数年が経過し、発症当初のような激しい症状はみられないものの一部の患者では現在でも痤瘡様皮疹による QOL の低下がみられる。近年、TCDD により誘発された塩素性痤瘡の組織中では EGFR が高発現していることが報告された²⁾。そのため、痤瘡様皮疹を有する油症患者においても EGFR が何らかの変動をきたしていると予想された。一方、種々の疾患において EGFR のアイソフォームが sEGFR という形で血中に存在し、疾患病勢と関連していることが報告されている^{3,4)}。例えば、非肺小細胞癌の検討において、血清中 sEGFR 値が低下していると生存率が低下することが報告されている³⁾。以上より、油症患者血清においても sEGFR が検出され、正常人と比較して差が存在することが予想された。しかし、今回の検討では油症患者でやや sEGFR が正常人と比較して上昇している傾向がみられたものの、有意差はみられなかった。詳細な理由は不明であるが、発症から時間が経過しており、現時点では血清中に EGFR のアイソフォームが分泌されていない可能性が考えられた。今後、油症患者の痤瘡様皮疹組織中における EGFR の発現を検討することが望まれる。

油症患者は現在でもダイオキシン類の

血中濃度が高く、様々な症状を有しているのが現状である。残念ながら、今回の検討では有意な結果が得られなかったが、今後も更なる検討で痤瘡様皮疹の病態解明を行い、油症患者の QOL 向上に繋がるよう役立てていきたい。

謝辞

PCB, PCQ, PCDF のデータを提供して頂いた長崎県環境保健研究センターならびに福岡県保健環境研究所の方々にこの場をかりて御礼申し上げます。

E. 参考文献

1. Aoki, Y. Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters--what we have learned from Yusho disease. *Environ Res*, 2001. **86**(1): p. 2-11.
2. Jing Liu, Chun-mei Zhang, Pieter-Jan coenraads, et al., Abnormal expression of MAPK, EGFR, CK17 and TGk in the skin lesions of chloracne patients exposed to dioxins. *Toxicol. Lett.*, 2011. **25;201**(3): p. 230-4.
3. Eloisa J.L, Rafael S., Andrea C. et al., Analysis of the Prognostic Value of Soluble Epidermal Growth Factor Receptor Plasma Concentration in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Clinical Lung Cancer.*, 2011. **12**(5): p. 320-7.
4. Muller V., Witzel I., Pantel K., et al, Prognostic and predictive impact of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) protein in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer.

Anticancer Res, 2006. Mar-Apr: **26**(2B): p. 179-87

F. 研究発表

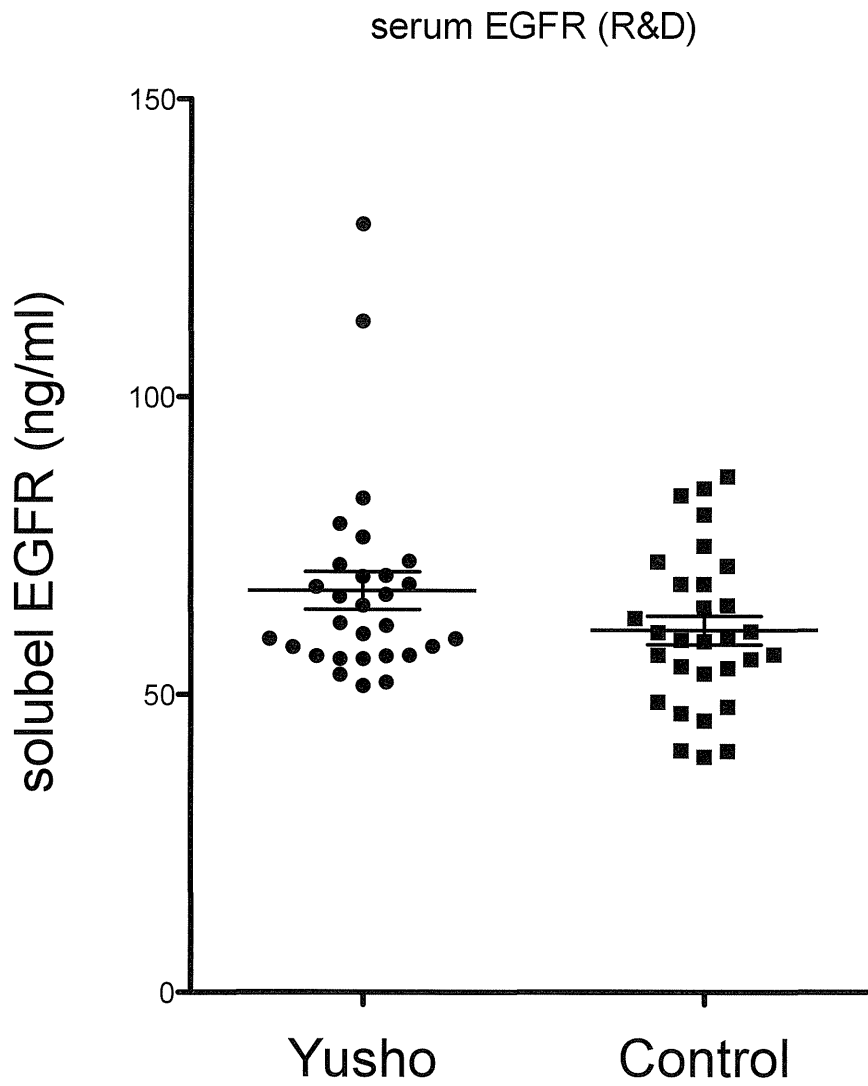
1. 論文発表

Kuwatsuka Y, Shimizu K, Akiyama Y, Koike Y, Ogawa F, Furue M, Utani A: Yusho patients show increased serum IL-17, IL-23, IL-1beta, and TNFalpha levels more than 40 years after accidental polychlorinated biphenyl poisoning. *J Immunotoxicol* 11(3): 246-249, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 油症認定患者、健常人血清におけるsEGFR値の比較



分担研究報告書

長崎県油症認定患者における末梢血リンパ球分画、Treg 細胞の検討

研究分担者 宇谷厚志 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 教授
研究協力者 峯 嘉子 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教

研究要旨 以前我々は、長崎県油症認定患者血清において、Treg 細胞由来のサイトカインである IL-10 IL-35 値の上昇を見出した。今回我々は、平成26年長崎県油症検診(五島 玉之浦地区)受診者の末梢血中 Treg 細胞に関して検討を行った。その結果、油症認定患者 53 名(本人認定 45 名、家族認定 8 名)、未認定患者 3 名において血清中 Treg 細胞数はそれぞれ $51.93 \pm 25.4/\mu\text{l}$ 、 $62.49 \pm 25.79/\mu\text{l}$ 、 $58.89 \pm 19.48/\mu\text{l}$ で有意差はなかった。また各種採血項目と Treg 値の関連について検討を行ったところ、血中の中性脂肪値が高い人ほど Treg 細胞数が有意に高いという相関が見られた。

A. 研究目的

油症発生から 40 年以上が経過し、激的な皮膚症状、眼症状を呈する患者は減少傾向にあるが、依然として油症患者血中には高濃度のダイオキシンが残留している状態である。油症の原因であるカネミオイルには Polychlorinated biphenyls (PCB), Polychlorinated quarterphenyls (PCQ) 及び Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) を含む dioxin 類が混在している事がわかっている¹⁾。ダイオキシンレセプターとして知られる Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) は 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) や PCB などのダイオキシン類のレセプターとして、肺や肝臓をはじめとして幅広く発現が報告され²⁾、T 細胞においては Th17 細胞、Treg 細胞(制御性 T 細胞)に多く発現しているが、Th1 細胞、Th2 細胞にはほとんど発現が見られないことが明らかにされた^{3,4)}。我々のグループは油症患者において、Treg 細胞から産生されるサイトカインである CTLA4、IL-10、IL-35 が血清中で上昇していることを示してきた。(しかしながら、これらの

免疫異常があるものの、油症患者の炎症性疾患、アレルギー疾患の罹患率は健常人と同程度である。)

Treg 細胞(制御性 T 細胞)は免疫応答の抑制的制御を司る T 細胞の一種であり、免疫応答機構の過剰な免疫応答を抑制するためのブレーキの役割を果たす。油症患者の免疫機能についてさらに検討を進めるべく、今回我々は、血清中の Treg 細胞に注目し、油症患者における血清 Treg 細胞数や、血清中の各種項目との関連について検討を行った。

B. 研究方法

①対象：2014 年 7 月に施行された長崎県油症検診五島玉之浦地区受診者のうち、同意を得られた受診者 56 名を対象とした。油症患者中、認定患者 53 名(家族認定 8 名)、未認定患者 3 名であった。検診時に採血を行い、分離し、血球を取り出した。

②Treg 細胞数の測定：分離した血球からフローサイトメトリーを用いて Treg 細胞数を測定した。

③各種採血数値との相関：平成25年

度の油症患者データベースを元に同一患者のそれぞれの採血各種項目(血算、生化学)と Treg 細胞数の相関を測定した。

④統計的処理:測定した Treg 値の統計的処理に、年齢や性別との関連については Mann-Whitney の U 検定を、各種項目と Treg 細胞数の相関には Spearman の順位相関係数の検定を使用した。

C. 研究結果

長崎県の油症検診受診者 56 名において、認定患者 45 名、未認定患者 3 名および家族認定 8 名の平均年齢は各々 67.84 ± 12.44 歳、 73.00 ± 4.359 歳および 63.63 ± 11.24 歳で有意差はなかった。それぞれの群における血清中 Treg 細胞数は認定患者(N) $51.93 \pm 25.4/\mu\text{l}$ 、未認定患者(Mi) $58.89 \pm 19.48/\mu\text{l}$ 、家族認定(Family) $62.49 \pm 25.79/\mu\text{l}$ であった(図 1)。性別と Treg 細胞数の相関をみたところ Treg 数は男性で $57.55 \pm 25.21/\mu\text{l}$ 、女性で $48.65 \pm 23.72/\mu\text{l}$ であり、やや男性で高値であったが、有意差はなかった(図 2)。年齢と Treg 細胞値の相関は認めなかった(図 3)。中性脂肪値と Treg 細胞数の関係は、中性脂肪値が高い人ほど、Treg 細胞数が高い傾向がみられ、統計上の有意差を認めた($r=0.2881$, $p=0.0313$)。(図 4)。総コレステロール値と Treg 細胞数の相関はみられなかった。つづいて赤血球、ヘマトクリット、総蛋白、腎機能(クレアチニン値)、尿酸、HbA1c と Treg 細胞値に関し検討を行ったが相関は認められなかった(図 6-11)。

D. 考察

ダイオキシンレセプターである Ahr は免疫系において重要な役割を担っている。Ahr が Th17 細胞や Treg 細胞の分化、

Th1/Th2 細胞の分化バランスを調整していることが以下のように報告されている。In vitro で TCDD は Treg と Th17 細胞の分化を促進している⁵⁾。Ahr はダイオキシンと結合したのち、免疫抑制をおこすことが知られており、とくに Treg や Th17 細胞の分化に重要である⁶⁾⁷⁾。

今回の研究で、油症患者は健常人と比較し、有意ではないものの Treg 細胞数が低値であった。これまでの Treg 細胞由来サイトカインの高値であることから考えると矛盾した結果と言える。その理由として、①油症患者に比べ、健常人のサンプル数が少なかったこと、②健常人が油症検診を受診した人であり、カネミ油を当時摂取していた可能性のある人である、ことが考えられる。健常人の選定としてカネミ油を摂取していない人を選ぶべきであったと考える。

一方、血清中性脂肪値が高い人ほど Treg 細胞数が有意に高いという結果から、中性脂肪が高い人ほど Ahr を介した Treg 細胞への分化が誘導されている可能性が示された。血清中性脂肪の高値が脂肪肝の発症リスクであることを考慮すると、脂肪肝による肝臓での Ahr の発現上昇や、血清中性脂肪が Ahr による Treg 細胞の分化を直接誘導している可能性がある。

免疫応答は様々な疾患の発症リスクと関連するものであり、今後も油症患者における Treg 細胞や Th17 細胞の働きについてさらなる検討が必要であると考ええる。

E. 結論

油症患者は現在でもダイオキシン類の血中濃度が高く、様々な症状を有しているのが現状である。油症患者における Treg 細胞に関する更なる検討が、油症患者の QOL 向上、病態解明に繋がるよう役立てていきたい。

謝辞

血算、生化学検査結果のデータを提供して頂いた長崎県環境保健研究センターの方々にこの場をかりて御礼申し上げます。

F. 参考文献

- 1) Aoki Y: Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters --what we have learned from Yusho disease. *Environ Res.* 86(1): 2-11, 2001
- 2) Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA: Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol.* 44(5): 911-917, 1993
- 3) Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T: Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(28): 9721-9726, 2008
- 4) Kramer JM, Gaffen SL: Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol.* 78(6): 1083-1093, 2007
- 5) Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y and Kishimoto T: Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th 17 cells. *Proc. Nati Acad. Sci. USA* 105:9721
- 6) Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, et al : Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453:106, 2008

- 7) Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Buringham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cell *J immurol* 185(6):3190-3198, 2010

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 認定（本人）、未認定、家族患者（認定）Treg細胞数の比較

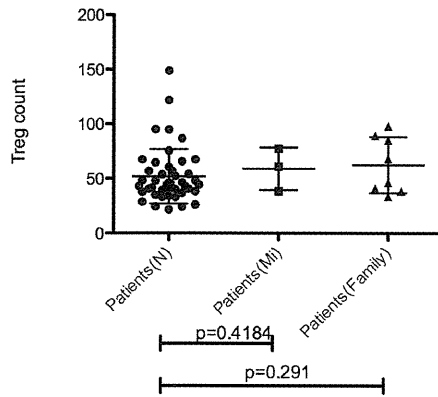


図2 性別とTreg値の相関

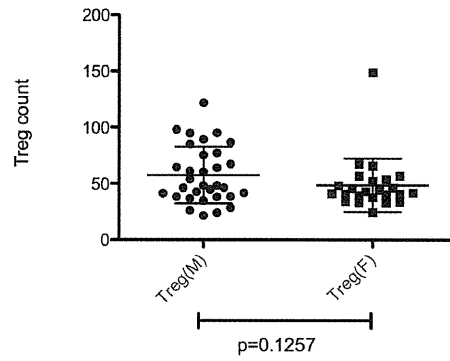


図3 年齢とTreg値の相関

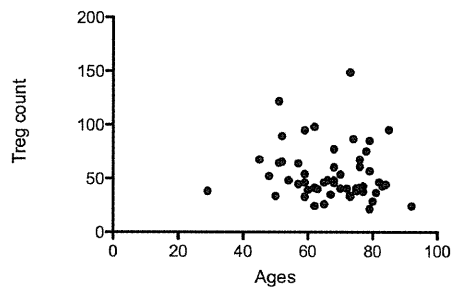


図4 中性脂肪とTreg細胞の関係

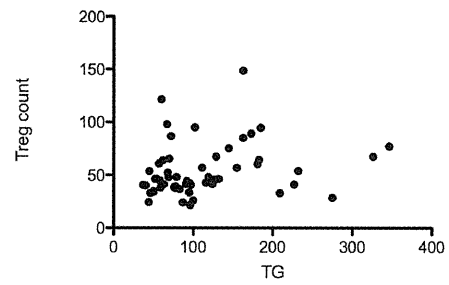


図5 総コレステロール値とTreg細胞の関係

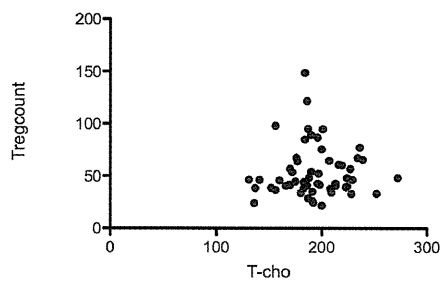


図6 RBCとTreg細胞数の関係

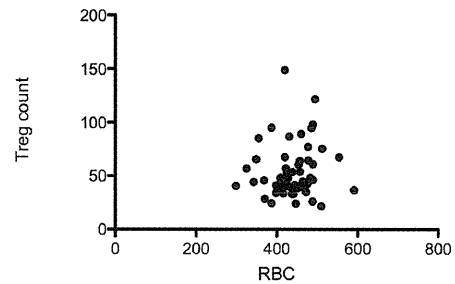


図 7 Hct と Treg 細胞数の関係

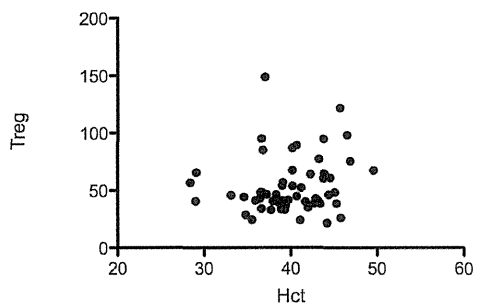


図 8 総蛋白と Treg 細胞数の関係

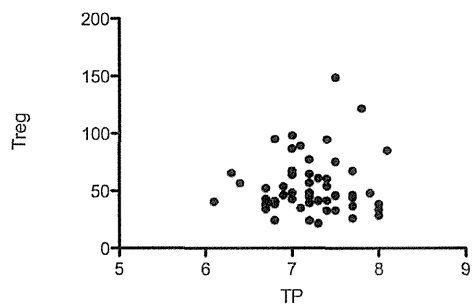


図 9 腎機能 (Cre) と Treg 細胞数の関係

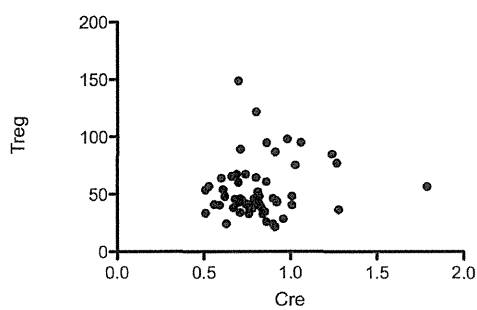


図 10 尿酸 (UA) と Treg 細胞数の関係

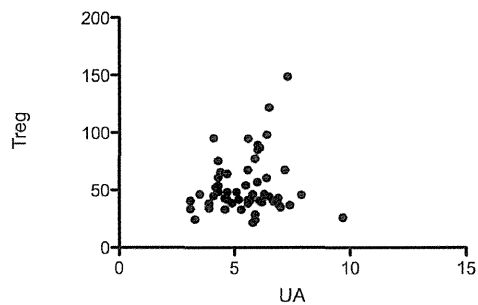
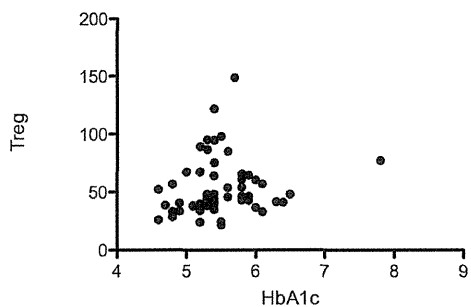


図 11 HbA1c と Treg 細胞数の関係



分担研究報告書

油症患者における血清微量金属濃度に関する研究

研究分担者 内 博史 九州大学大学院医学研究院皮膚科学 准教授
今福 信一 福岡大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 慢性ダイオキシン類中毒である油症患者 39 名および健常者 39 名を対象に、血清マグネシウム、鉄、銅、亜鉛、カルシウム、リチウム濃度をキレート試薬を用いたメタロアッセイで測定したところ、油症患者の血清銅濃度は、健常者に較べて有意に低下していた。銅は superoxide dismutase の活性中心に存在し、活性酸素の処理に重要な元素であることから、油症患者の酸化ストレス状態を増悪させている可能性があると考えられ、今後さらに検討を行う予定である。

A. 研究目的

ダイオキシン類は AhR による CYP1A1 などの誘導を介して、生体内で活性酸素種を発生させることが知られている。生体内で発生した活性酸素を分解する抗酸化酵素には、微量元素を含むものが多くあることから、油症患者血清中の微量金属濃度を測定し、ダイオキシン類の酸化ストレス状態に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

油症認定患者 39 名(平均年齢 63.4 ± 14.7)、健常者 39 名(平均年齢 64.1 ± 12.9)について血清マグネシウム、鉄、銅、亜鉛、カルシウム、リチウム濃度をメタロアッセイ(メタロジェニクス社)で測定し、血中濃度との相関を検討した。解析には Mann-Whitney U test, Spearman's correlation test を行った。(倫理面への配慮)
データの解析は個人情報特定されないよう、連結不可能な匿名化データとして行った。

C. 研究結果

油症患者の血中濃度(pg/g lipid)は、健常者より有意に高値であった 182.4 ± 208.1 vs 13.2 ± 6.9)。油症患者と健常者との血

清微量元素濃度の比較を表 1 に示す。血清銅のみ油症患者で有意に低下していた。しかし血中 2,3,4,7,8-PCDF 濃度との有意な相関を認めなかった。

D. 考察

一般に、生体含有量が鉄以下の元素を微量元素と称するため、厳密には今回測定したなかでは、マグネシウムとカルシウムは必須ミネラルではあるが、微量元素の定義には入らない。またリチウムは生体での機能が明らかではない。今回、油症患者で血清濃度の有意な低下が認められた銅は、ヘモグロビン合成経路において必要であるほか、同タンパク質は cytochrome c oxidase、superoxide dismutase などの重要な抗酸化酵素に含まれる。PCB やダイオキシン類は AhR による CYP1A1 などの誘導を介して生体内で活性酸素種を発生させることが知られている。油症患者でも酸化ストレスマーカーである尿中 8-isoprostane の上昇が報告されている¹⁾。活性酸素には細胞傷害性があり、発癌や生活習慣病との関連が示唆されている。血清銅の低下は、油症患者の参加ストレス状態を増悪させている可能性があり、今後さらなる検討が必要と考えられる。

E. 結論

油症患者で有意な血清銅濃度の低下が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Liu G, Asanoma K, Takao T, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Kato K, Wake N. Aryl hydrocarbon receptor SNP -130 C/T associates with dioxins susceptibility through regulating its receptor activity and downstream effectors including interleukin 24. *Toxicol Lett.* [Epub ahead of print]

2. Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Yamada H. 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran is far less potent than 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in disrupting the pituitary-gonad axis of the rat fetus. *Toxicol Appl Pharmacol.* 281:48-57, 2014.

3. Wu Z, Uchi H, Morino-Koga S, Shi W, Furue M. Resveratrol inhibition of human keratinocyte proliferation via SIRT1/ARNT/ERK dependent downregulation of aquaporin 3. *J Dermatol Sci.* 75:16-23, 2014.

4. Wu Z, Uchi H, Morino-Koga S, Nakamura-Satomura A, Kita K, Shi W, Furue M. Z-Ligustilide inhibits benzo(a)pyrene-induced CYP1A1 upregulation in cultured human keratinocytes via ROS-dependent Nrf2 activation. *Exp Dermatol.* 23:260-5, 2014.

G. 文献

1) Shimizu K, et al. *Toxicol Ind Health* 2003;19:37-9.

表 1 血清微量元素濃度の比較

	油症	健常者	p 値
Mg (mg/ml)	2.23 ± 0.42	2.38 ± 0.38	0.15
Zn (μg/ml)	94.7 ± 27.2	109.0 ± 41.8	0.11
Cu (μg/ml)	68.2 ± 29.1	88.2 ± 46.0	0.04
Fe (μg/ml)	84.4 ± 28.8	79.1 ± 26.5	0.28
Ca (mg/ml)	6.66 ± 1.34	7.16 ± 1.49	0.16
Li (mM)	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.05	0.23

分担研究報告書

大脳認知機能の客観的評価法の開発および感覚系ニューロン関連蛋白発現変化の検討

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
 林 信太郎 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

研究要旨 目的：①油症認定患者では約 6 割に自覚的感覚障害が存在するが末梢神経伝導速度検査や神経学的診察で客観的な末梢神経障害を示すものは 2 割程度であり、この主観的認知と客観的認知が乖離している。この原因として末梢神経伝導検査やベッドサイドにおける末梢神経検査では感知できない、もっと高次の脳機能が障害されている可能性が否定できない。そこで、触覚刺激を用いた脳磁界反応を計測し、主観的意識下での誘発脳磁界と非意識下での誘発脳磁界との相違を抽出し、一般の末梢神経伝導速度検査では検出できない高次脳機能障害を抽出できるか否かを検討する。②油症患者組織における感覚伝導路の病理学的変化について現時点で未解明であるが、今後患者の高齢化に従い剖検例が増加することは予想される。そこで、感覚伝導路の病理変化の検出に有用なマーカー蛋白について検討した。**方法：**①点字にプラスチック製 2×4 ピンで構成されたピエゾ型触覚刺激装置を用いた。規則的触覚刺激と不規則的触覚刺激を作成し、この 2 種の刺激を刺激間隔 1.2～1.6 秒の間隔で各刺激約 100 回ずつランダムオーダーで右示指に与えた。主観・注意状態の影響を検討するために、この 2 種類の刺激を弁別するようにタスクを与えた注意下刺激セットと、タスクを与えない環境下での非注意下刺激セットを行い、全頭型脳磁図で計測。204-ch のグラジオメーターの波形について解析した。計測結果は MRI 皮質上に電流源が平面分布すると仮定した最小ノルム法を用いて誘発電流源を推定した。②正常コントロールと疾患コントロールの剖検標本を用いて、ヒトの中樞神経系ニューロンで発現が確認されているカルシウム結合蛋白 (CaBP)、カルビンディン (CB)、カルレチニン (CR)、パルプアルブミン (PV) に対する一次抗体を用いて免疫染色を施行した。**結果：**①非注意下では規則的触覚刺激と不規則的触覚刺激で差を認めなかったが、注意下では右側半球において規則的触覚刺激と不規則的触覚刺激の反応の振幅に有意差を認め、不規則触覚刺激の反応の方が振幅が高く、その電流源は右半球の二次体性感覚野に推定された。②脊髄剖検標本では Rexed I-II 層の後角ニューロンにおいて CB と CR が免疫陽性であった。脳幹 (延髄) においては、CaBP のいずれもが内側毛帯で免疫陽性であり CB と CR は横走線維、PV は縦走線維に局在が分かれて存在した。一方、脊髄後索においては何れの CaBP も免疫陰性であった。**結論：**触覚刺激を弁別するという能動的なタスクを与えた時に、一次体性感覚野では差が出ないが、右半球の二次体性感覚野における脳磁界反応に差が認められた。これは弁別という能動的な意識の影響を客観的に抽出できる可能性を示唆しており、感覚認知の高次脳機能レベルでの評価に有用であると考えられた。以前の我々の研究で電気生理学的に後索-内側毛帯系の波形を検出し得る方法を確立したが、CaBP に着目すると患者剖検組織の内側毛帯における病理変化を検出できること、同時に生前の患者に施行した電気生理学的異常所見と剖検病理所見との比較検討が可能になる事が示唆された。

A. 研究目的

油症患者における末梢神経障害は感覚神経障害が主であるが、筋萎縮や筋線維萎縮を認めることがある末梢運動神経障害と異なり、その評価は患者の主観に頼る部分が多い。客観的な末梢感覚神経障害の評価方法として、神経診察と神経伝導速度検査があるが、我々のこれまでの報告で、客観的末梢神経障害検査の一つとしてのアキレス腱反射の低下を認める人数は発症時 34.8%、33 年後 17.4%と減少し、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⁾。一方、患者の主観が入る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、33 年後には 59.4%と約 6 割に増加していた。この主観的認知と客観的認知が乖離には末梢神経伝導検査やベッドサイドにおける末梢神経診察では評価しきれない、皮膚レベル、脊髄レベル、あるいはもっと高次の脳機能が障害されている可能性が否定できない。そこで、我々は末梢神経障害の高次脳機能客観的評価法として、末梢神経刺激として従来の末梢神経電気刺激では無く、指皮下の触覚受容体を刺激することが可能なピエゾ型非磁性触覚刺激装置を用い、記録として骨や脳脊髄液といった容積伝導の影響を受けやすく歪の多い「脳電場」では無く、容積伝導の影響を受けない「脳磁場」を測定する試み、皮膚刺激による脳における生理学的変化を検出することが可能であることを報告した⁶⁾。一方、患者の脊髄感覚伝導路における病理変化は未解明である。我々が過去に行った病理学的研究で、カルシウム結合蛋白が (CaBP) ヒト脊髄の後角ニューロン (後角先端～膠様質) や後角先端～後根間の髄内線維など、感覚経路と関連のある領域にユニークな分布を呈する事を見出している (一部のデータを 2009 年日本神経学会学術集会で発表)。現在油症患者の高齢化が進んでいるので、今後剖検例が増えることは予想される。油症による被害は直接被曝した患者のみでなく、2 世、3 世にも及んでいる可能性が示唆さ

れているので、患者剖検標本を適切に解析する方法を確立することにより類似症状に苦しむ患者子孫に恩恵をもたらせる可能性が出てくる。

今回の研究では①これまでに確立した脳磁図の測定刺激法と解析法を発展させ、より実際の感覚刺激に近い触覚振動を用いて体性感覚誘発磁界を測定し、触覚の認知機能に刺激パラメーターによる差が出るのか確認した。②剖検組織を用いて感覚系ニューロン・伝導路 (特に後索-内側毛帯系) を検討する際に有用なマーカー蛋白を同定する事を目的とした。

B. 研究方法

① 脳磁図を用いた高次脳機能評価：疾患のない成人を対象とした。刺激として、規則的触覚振動刺激と不規則触覚振動刺激の 2 種類の刺激を手触りの感覚を作成できるピエゾ型触覚刺激装置 (KGS 製) を用いて作成。2.4 mm の等間隔で配列され、点字様に構成され先端が丸みを帯びたプラスチック製 2×4 ピンで、各ピンの直径は 1.3 mm で 0.7 mm 突出・後退動作する。触覚の強さは 1 ピンあたり 0.15～0.18 N。規則的触覚刺激として 10Hz、持続 1.5 秒の等間隔の刺激、不規則的触覚刺激として 1.5 秒の間に 150 個の不規則間隔をもった刺激を作成した。この 2 種類の刺激を刺激間隔 1.2～1.6 秒の間隔で各刺激約 100 回ずつランダムオーダーで右手指に与えた。主観・注意状態の影響を検討するために、この 2 種類の刺激を弁別するようにタスクを与えた注意下刺激セットと、タスクを与えない環境下での非注意下刺激セットを行った。誘発脳磁界の測定には 306-ch 全頭型 MEG (Elekta, Neuromag) を用いたが、そのうち 204-ch のグラジオメーターの波形について解析した。計測結果は MRI 皮質上に電流源が平面分布すると仮定した最小ノルム法を用いて誘発電流源を推定した。

② 非神経疾患患者 (正常コントロール) 7

例のホルマリン固定，パラフィン包埋 5 μ m 厚の脊髓と脳幹（延髄）の水平断切片を用いてカルシウム結合蛋白であるカルビンディン (CB)，カルレチニン (CR)，パルブアルブミン (PV) への一次抗体を用いて免疫染色 (ABC 法) を施行した。脊髓灰白質は Rexed の分類に従い I-X 層に分け，各領域に含まれる免疫陽性ニューロンの局在・分布を評価した。疾患コントロールとして感覚系は障害されないとされる筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 5 例の剖検組織を用いた。

(倫理面での配慮)

個人情報とは原則的に検証の対象としていないが，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

① 規則的触覚刺激，不規則的触覚刺激，注意下刺激，非注意下刺激とも刺激後 1~2 秒に両側側頭部に反応性のゆっくりした低周波反応を認めた。これら 4 種の反応の結果を比較すると，非注意下では規則的触覚刺激と不規則的触覚刺激で差を認めなかったが，注意下では右側半球において規則的触覚刺激と不規則的触覚刺激の反応の振幅に有意差を認め，不規則触覚刺激の反応の方が振幅が高かった (図 1)，その電流源は右半球の 2 次体性感覚野に推定された (図 2)。

② 剖検例の免疫染色

脊髓 (図 3, Table) : CB の染色性は脊髓後角の Rexed I-II 層の小型ニューロンに認められたが，他の領域やクラーク柱，中間質外側核のニューロン，大型運動ニューロンには認めなかった。CR の染色性は CB と同様に，Rexed I-II 層に認めたが，染色強度は CB よりも弱かった。更に Rexed VII 層と VIII 層の小型ニューロン，中間質外側核ニューロンに明確な染色性がみられたが，クラーク柱ニューロン，大型運動ニューロンにはなかった。PV の染色性は Rexed VII 層と VIII 層の小型

ニューロン，クラーク柱ニューロン，大型運動ニューロンに認められたが何れも染色強度は弱かった。ALS 症例の検討では Rexed の I, II 層における小型ニューロンの染色性は，CB, CR とともにコントロールと比較して著変なく保たれていた。脊髓後索はコントロール，ALS とともに陽性所見はなかった。

脳幹 (延髄) (図 4) : 延髄を走行する神経線維において何れのカルシウム結合蛋白も内側毛帯に選択的な局在を示した。さらに CB と CR は (脊髓の長軸を基準として) 横走線維に，PV は縦走線維に局在が分かれて存在した。

D. 考察

①我々はこれまで，二次体性感覚野 (SII) と一次体性感覚野 (SI) の干渉を解析し，指内の狭い領域内に触覚刺激あるいは形態刺激を与えることが可能であり，感覚認知の微細な差を非侵襲的に評価できる可能性を示してきた。今回，触覚刺激を弁別するという能動的なタスクを与えた時に，一次感覚野では差が出ないが，右半球の二次体性感覚野における脳磁界反応に差が認められた。これは弁別という能動的な意識の影響を客観的に抽出できる可能性を示唆している。右半球はサルの実験においても刺激弁別に関与すると推定されており⁷⁾，今回の結果はそれに類似する二次体性感覚野の働きが人間でも生じていると推定された。これは感覚認知の高次脳機能レベルでの評価に有用であると考えられた。

②今回の免疫組織化学的検討で CB は脊髓灰白質後角 (Rexed I, II 層) ニューロンに選択的に局在した。また CR も脊髓灰白質後角の中では Rexed I, II 層のニューロンに局在することが分かった。疾患コントロールとして ALS 標本を用いたが，脊髓後角ニューロンの染色性はコントロールと同様に保たれていた。脊髓後索については全ての検体で免疫陰性であった。延髄内側毛帯にはコントロールや ALS 症例ともに CB, CR, PV の何れもが存在したが，興味深い事に内側毛帯の構造の中で

横走線維はCBとCR、縦走線維はPVによって選択的にラベルされた。カルシウム結合蛋白の種類により内側毛帯で局在が分かれる事はヒトでは過去に報告のない所見であり、今後油症患者の内側毛帯の変化を免疫組織学的に鋭敏に検出できる可能性がある。

脊髄後索はCB、CR、PVの何れも陽性所見はなかった。ラット脊髄の研究ではカルシウム結合蛋白の1つである calmodulin が後索と側索に発現していることが報告されているので⁸⁾、今後ヒト脊髄組織における同蛋白の分布を検討する予定である。

以上より油症患者の剖検組織検索に際してCB、CR、PVに着目すると脳幹内側毛帯の病理変化を検出可能となること、同時に我々が昨年度の研究で確立した電気生理学的手法から得られる異常所見との対比が可能となる可能性が示唆された。今後 in situ hybridization による解析も予定している。

E. 結論

①触覚刺激を弁別するという能動的なタスクを与え、その磁界反応を測定することにより、弁別という能動的な意識の影響を客観的に抽出できる可能性が示唆され、感覚認知の高次脳機能レベルでの評価に有用であると考えられた。

②患者組織を用いた免疫組織学的解析に際して、CB、CR、PVは脳幹の内側毛帯のマーカーとして使用できる。

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) 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 23 年度 総括・分担研究報告書, 2012

7) Jiang W, et al: J Neurophysiol. 77:1656-62, 1997

8) Kovacs B, et al. Brain Res Mol Brain Res 102: 28-34, 2002

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

图1

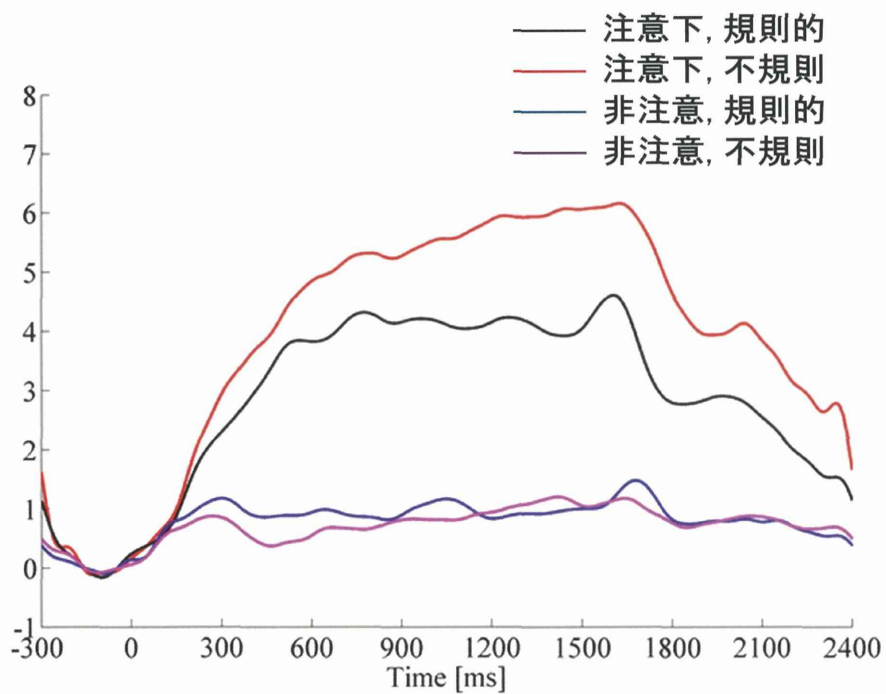


图2

