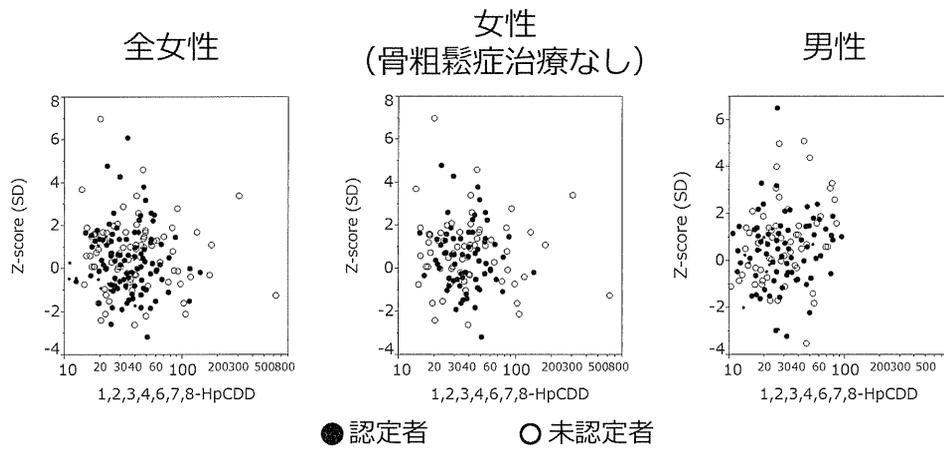


図 1 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD と Z スコアの関連



分担研究報告書

末梢神経伝導速度に対するベンゾピレンの影響

研究分担者 申 敏哲 熊本保健科学大学 リハビリテーション学科 准教授

研究協力者 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 ベンゾピレンの末梢神経伝導速に対する作用を検討するため、後根神経節細胞から細胞内記録を行い、後根電気刺激によって誘発された活動電位を指標にして各神経線維の伝導速度を調べた。その結果 A β 線維の伝導速度が選択的に緩徐化されている事を見いだした。この結果はダイオキシンの作用と同様であった。

A. 研究目的

ダイオキシン類化合物による複合中毒であるカネミ油症患者では、末梢のしびれ感や感覚鈍麻の発生、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。この原因として求心性末梢神経の異常が考えられるため、ダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを経口投与した7日後のラットを用い、後根付き神経節標本から細胞内記録を行い、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ベンゾピレンの神経系に対する作用を検討した。

B. 研究方法

4 週齢の SD 系雄性ラット(九動株, 熊本)を用い、正常ラット群では Corn oil を、ベンゾピレン群ではベンゾピレン 0.3 mg/Kg、30 mg/Kg を経口投与し、7 日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 β , A δ 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。

(倫理面への配慮)

動物の飼育および実験に関しては、熊本保健科学大学動物倫理委員会の許可(登録番号 動 14-016)を得て行った。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

細胞内記録を行い、後根神経節に存在する3種類の細胞から静止膜電位と誘発性の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。正常ラット群の後根神経節細胞から記録を行い、細胞の静止膜電位およびそれぞれの線維の伝導速度を調べた。A β 線維の静止膜電位は -68 ± 1.7 mV でその伝導速度は 20.9 ± 0.6 m/s であった。A δ 線維は静止膜電位が -76 ± 1.8 mV でその伝導速度は 8.7 ± 0.5 m/s であった。また、C 線維の静止膜電位および伝導速度はそれぞれ -75 ± 3.7 mV, $0.8 \pm$

0.8 m/s であった。

次いで、ベンゾピレンを経口投与したラット群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、 0.3 mg/Kg、 30 mg/Kg ベンゾピレンを投与したラット群の静止膜電位には若干の差が見られるものの有意ではなかった(① 0.3 mg/Kg ベンゾピレン: A β , -66 ± 2.6 mV; A δ , -79 ± 1 mV; C, -64 ± 1.4 mV ② 30 mg/Kg ベンゾピレン: A β , -67 ± 0.6 mV; A δ , -75 ± 3.7 mV; C, -69 ± 2.2 mV)。次に伝導速度を計測した。A β 線維の伝導速度では 0.3 mg/Kg ベンゾピレン投与群で 15.8 ± 1 m/s、 30 mg/Kg ベンゾピレン投与群では 13.3 ± 0.1 m/s で有意に正常ラット群より遅かった。A δ 線維の伝導速度では 0.3 mg/Kg ベンゾピレン投与群で 8.3 ± 0.6 m/s、 30 mg/Kg ベンゾピレン投与群では 8.4 ± 0.4 m/s で有意な変化は認められなかった。また、C 線維でも A δ 線維のように 0.3 mg/Kg ベンゾピレン投与群で 0.8 ± 0.4 m/s、 30 mg/Kg ベンゾピレン投与群では 0.9 ± 0.4 m/s で有意な変化は認められなかった。

D. 考察

カネミ油症患者では、末梢のしびれ感や感覚鈍麻の発生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。今回の実験ではベンゾピ

レンを経口投与した7日後のラットを用い、後根付き後根神経節標本から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した。その結果、ベンゾピレン投与ラットの後根神経節の A β 線維で伝導速度が有意に遅い結果を得たが、A δ 線維と C 線維では若干の差は見られたが有意差は無かった。しかし、静止膜電位では群間有意な差を見いだすことは出来なかった。A β 線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感や感覚鈍麻と密接な関係が有る事が知られている。口径の大きな A β 線維は A δ や C 線維と比較して機械的な圧迫によって機能障害を容易に起こすことが知られている。これはカネミ油症患者が訴えるしびれ感や感覚鈍麻と良く一致しており、それらは主に末梢神経の機能異常によって発生している可能性が高いが、今までの多くの研究から末梢神経の異常は脊髄内での可塑的な変化を引き起こす事が知られている。そのため脊髄内でも何らかの変化が惹起されている可能性も考えられる。今後、それぞれの線維のデータを多く得る必要がある。また、濃度依存的作用と投与後の作用の時間的経過を検討する必要がある。

E. 結論

正常ラットとベンゾピレン投与ラットの後根神経節細胞から細胞内記録を行った。その結果、A β 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が、A δ や C 線維には影響を与えなかった。静止膜電位では全ての群で有意な差を見いだすことは出来なかった。今回の結果からベンゾピレン投与は A β 線維の伝導速度の変化を起こし、しびれなどの感覚異常を引き起こす可能性が示唆された。今後、ベンゾピレン投与後、早期における変化と投与後3ヶ月後など、長期に渡って変化が持続するかを調べる必要が有る。さらに脊髄内での可塑的变化に付いても詳細な検討を必要とすると考える。

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

カネミ油症患者における異常感覚/認知機能障害と脳機能的結合変化の関連に関する研究

研究分担者 村井 弘之 九州大学脳神経治療学 教授
研究協力者 山下 謙一郎 九州大学神経内科 診療講師

研究要旨 カネミ油症患者に生じる異常感覚を生じる大脳感覚野の機能異常を検出できる安静時機能的 MRI 撮像法が確立された。

A. 研究目的

カネミ油症患者では四肢異常感覚を多く認めるが、末梢神経伝導検査では異常を認めない症例も多い。一方でカネミ油症の原因であるダイオキシンにより認知機能障害が生じることが報告されており、自覚的な異常感覚が大脳感覚野の機能異常により生じている可能性がある。安静時機能的MRIの新規の解析方法を開発し、油症患者の大脳感覚野の結合変化を検出する。さらにカネミ油症患者での認知機能障害の報告を文献的に検索し、本邦での油症患者あるいは健常人との比較検討を行なう。

B. 研究方法

カネミ油症患者での安静時機能的 MRI 撮像法を確立するために、まず九州大学病院を受診したてんかん、認知症患者において安静時機能的 MRI 撮像を行うものとした。アルツハイマー病(AD)患者とてんかん患者において T1 強調画像、T2 強調画像、拡散テンソル画像、resting-fMRI 撮像を同時に行う。カネミ油症患者による異常感覚異常感覚出現軍群と非出現群の脳活動の差異を検出するために、AD 患者において時間見当識良好群と不良群での差異を機能的結合差分法にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学倫理委員会に実施申請を行い、その承諾を得た。

C. 研究結果

AD/てんかん患者の安静時機能的 MRI 撮像において、後部帯状回から両側頭頂葉と前部帯状回への有意な機能的結合ネットワーク、いわゆる Default Mode Network (DMN) の活動を検出することができた。機能的結合差分法を用いるとまた時間見当識不良の AD 患者では、良好群よりも右頭頂側頭移行部との機能的結合が低下していることが判明した。

D. 考察

本研究により当施設での安静時機能的 MRI の撮像パラメーターが妥当であることが確認された。今後カネミ油症において安静時機能的 MRI 撮像を行い、機能的結合差分法を用いることによって、カネミ油症患者の異常感覚が生じる大脳感覚野の病態が明らかになることが期待される。今後さらにカネミ油症患者での認知機能障害の文献的検討を加えていく予定である。

E. 結論

安静時機能的 MRI 撮像と、機能的結合差分法によりカネミ油症患者に生じる異常感覚を生じる大脳感覚野の機能異常を検出できる方法が確立された。

F. 研究発表

なし

G. 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

3. その他

特記事項なし

分担研究報告書

油症患者の血液中ポリ塩化ビフェニール濃度に及ぼすコレステミドの影響に関する研究

研究分担者	戸高 尊	公益財団法人北九州生活科学センター	室長
研究協力者	広瀬勇氣	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員
	上原口奈美	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員
	山本貴光	公益財団法人北九州生活科学センター	主幹
	境 泰史	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員
	本多彰紀	公益財団法人北九州生活科学センター	次長
	福島 直	公益財団法人北九州生活科学センター	理事
	今地政美	公益財団法人北九州生活科学センター	理事長
	梶原淳睦	福岡県保健環境研究所 保健化学部	部長
	平川博仙	福岡県保健環境研究所 生活化学課	専門研究員
	高尾佳子	福岡県保健環境研究所 企画情報管理課	主任技師

研究要旨 コレスチミドによるダイオキシン類やポリ塩化ビフェニールの体外排泄促進が、健常人で認められたため、この報告を基に油症患者で臨床試験が行われた。この試験に参加した油症患者の血液中ダイオキシン類濃度をコレステミド投与前と投与後で比較した結果、2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (pentaCDF) は統計学的に有意に減少したが、その低下率は 1%程度であった。今回、ポリ塩化ビフェニールの異性体分析を行い、コレステミドの影響を検討した結果、ダイオキシン類の結果と同様にコレステミドによる明確な有効性は確認されなかった。

A. 研究目的

油症はポリ塩化ビフェニールおよびダイオキシン類が混入したカネミオイルを摂取して発症した複合中毒である。患者は座瘡様皮疹、面皰、囊腫などの皮膚症状、眼瞼浮腫や眼脂過多などの眼症状、口腔粘膜や皮膚の色素沈着、痰や咳などの呼吸器症状、しびれや頭痛などの神経症状、全身倦怠感などの全身症状など多彩な症状を発症した。油症の発生から 45 年以上経過しているが、いまでも何人かの患者が、ダイオキシン類特有の症状に悩まされている。これら患者の血液中ポリ塩化ビフェニールやダイオキシン類濃度は健常人に比べて高濃度である^{1,2)}。近

年、臨床的に高コレステロール血症の治療薬であるコレステミドが血液中ダイオキシン類濃度を低下させることが報告された^{3,4)}。この情報を基に、油症患者の血液中ダイオキシン類濃度をコレステミドが低下させるか否かについて、臨床試験が行われた。その結果、2,3,4,7,8-pentaCDF は統計学的に有意に減少したが、その変化は僅かであり、コレステミド投与の明確な有効性は得られなかった。油症患者の体内には、ポリ塩化ジベンゾダイオキシン及びポリ塩化ジベンゾフランより高濃度のポリ塩化ビフェニールが残存している。今回、これらポリ塩化ビフェニールの異性体分析を行い、その測

定結果を基にコレステミドの影響を検討した。

B. 研究方法

1. 対象者

この臨床試験は、2008 年 4 月より開始され、油症患者の血液中ダイオキシン類濃度に及ぼすコレステミドの影響について、疫学・統計学的解析が行われた。今回、この試験に参加した油症患者の中で、コレステミドを 1 日 3g の用量で 6 ヶ月間投与し、投与前と投与後の採血を行った 26 名を測定対象とした。

2. 血液中ポリ塩化ビフェニール濃度の測定

血液中ダイオキシン類の抽出・精製は、血液を高速溶媒抽出装置で抽出した後、硫酸処理を行い、硝酸銀シリカゲルと活性炭を連結したカラムで分画を行う。その際、ポリ塩化ビフェニール画分とダイオキシン類画分に分離され、各画分を濃縮した後、ダイオキシン類画分は測定に供し、ポリ塩化ビフェニール画分は -20°C で冷凍保存する。この保存した画分は必要に応じて、再精製を行った後、各異性体の濃度を測定する。今回、血液中ポリ塩化ビフェニール濃度の測定は、油症患者の血液中ダイオキシン類濃度に及ぼすコレステミドの影響を検討した時に得られたポリ塩化ビフェニール画分を用いて行った。保存していた 26 名のコレステミド投与前と投与後のポリ塩化ビフェニール画分を再精製し、異性体分析を行った。測定はガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置を用いて行い⁴⁾、解析には Wilcoxon signed-rank test を用いた。

(倫理面への配慮)

油症患者の血液中ダイオキシン類濃度に及ぼすコレステミドの影響について、この試験計画は九州大学倫理委員会によ

り承認を得て行われた。今回、油症患者の血液中ポリ塩化ビフェニールの異性体分析を行うに際し、データの解析は個人情報特定されないよう、匿名化データとして解析を行った。

C. 研究結果

臨床試験を行った油症患者 26 名の投与前と投与後の血液中ポリ塩化ビフェニールの各異性体濃度を比較した (表 1)。血液中ポリ塩化ビフェニールの投与前および投与後の平均総濃度は、それぞれ 957 および 975 ng/g lipid で、コレステミドによる顕著な減少効果は認められなかった。投与前の triCBs, tetraCBs, pentaCBs, hexaCBs, heptaCBs, octaCBs および nonaCBs の濃度は、それぞれ 1.8、20、31、402、414、79 および 7.8 ng/g lipid で、投与後は、それぞれ 1.9、20、33、412、420、79 および 7.6 ng/g lipid を示し、投与後の濃度は、ほとんど投与前と同じであった。さらに、各異性体濃度を投与前と投与後で比較した結果、統計学的に有意な濃度低下を示す異性体は確認されなかった。

D. 考察

油症は 2,3,4,7,8-pentaCDF を主としたダイオキシン類とポリ塩化ビフェニールの複合中毒である。1968 年にきわめて高濃度であったと推定される血液中 2,3,4,7,8-pentaCDF 濃度は経年的に減少しているが、47 年経過した現在でも、油症患者の血液中には、一般健常人の 10 倍以上の濃度が検出されている^{1,2)}。コレステミドは消化管から吸収されない高分子化合物で、コレステロールなどの脂肪に吸着して、便として対外に排泄させる。同時に、その脂肪に溶け込んだダイオキシン類やポリ塩化ビフェニールも体外排泄されることが期待され、その効果が健常人で認められたため、油症患者で臨床

試験が行われた。今回、ポリ塩化ビフェニールの異性体分析を行い、コレステミドの影響を検討した結果、コレステミドによる排泄促進効果は確認されなかった。本試験は油症患者にコレステミドを1日3gの用量で6ヶ月間投与した。コレステミドによる腹部膨満感や便秘などの副作用を考慮すると、6ヶ月以上の長期服用は困難であると考えられる。

E. 結論

コレステミドによる血液中ダイオキシン類やポリ塩化ビフェニールの体外排泄促進効果が、健常人で認められたため、この情報を基に油症患者で臨床試験が行われた。この試験を行った油症患者26名の血液中ポリ塩化ビフェニール濃度をコレステミド投与前と投与後で比較した結果、ダイオキシン類の場合と同様にコレステミドによる明確な有効性は確認されなかった。

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

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 参考文献

1. Todaka T, *et al.* Concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated

dibenzofurans, and non-*ortho* and mono-*ortho* polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. *Chemosphere* 2007; 66: 1983-1989.

2. Todaka T, *et al.* Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients over 35 years after the incident. *Chemosphere* 2009; 74: 902-909.
3. Sakurai K, *et al.* Pilot study to reduce dioxins in the human body. *Intern Med.* 2004; 43: 792-795
4. Sakurai K, *et al.* Colestimide reduces blood polychlorinated biphenyls (PCB) levels. *Intern Med.* 2006; 45: 327-328.

表1 油症患者の血液中ポリ塩化ビフェニール濃度に及ぼすコレステミドの影響

IUPAC#	Concentration (pg/g lipid)										p Values
	Before the clinical trial					After the clinical trial					
	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	
TriCB-28	1644	1449	866	324	3809	1837	1866	1226	5	6187	0.025
TriCB-29	20	12	18	5	72	20	5	23	5	99	0.845
TriCB-37	128	5	245	5	847	73	5	165	5	698	0.112
TeteraCB-44	348	248	523	5	2841	415	324	415	107	2261	0.034
TeteraCB-47/48	525	359	437	117	1769	640	471	715	121	3659	0.049
TeteraCB-49	295	179	409	44	1679	344	216	576	5	3070	0.101
TeteraCB-52/69	956	780	836	294	4572	1060	860	745	368	3896	0.052
TeteraCB-56/60	442	306	344	5	1412	489	284	577	104	3010	0.889
TeteraCB-63	116	117	65	5	280	140	118	69	5	360	0.382
TeteraCB-66	2118	1520	1507	586	5853	2181	1536	1691	613	8475	0.551
TeteraCB-70	362	130	807	13	3375	418	143	1308	55	6817	0.280
TeteraCB-71	37	11	56	5	238	126	5	490	5	2524	0.586
TeteraCB-74	14823	12720	9202	3830	41089	14505	11875	9068	2973	35194	0.770
PentaCB-85	247	139	335	5	1592	205	138	218	5	1086	0.657
PentaCB-87	812	797	448	5	1716	747	697	442	5	2059	0.183
PentaCB-92	719	571	482	5	2402	752	669	455	5	2264	0.412
PentaCB-93/95/9	727	637	439	5	1964	1003	746	1165	326	6428	0.258
PentaCB-99	23623	19114	17453	4240	90685	24873	23328	16634	4308	82151	0.182
PentaCB-101	1931	1534	1234	5	5667	2337	1959	1481	600	6915	0.174
PentaCB-107/108	963	785	707	5	3340	961	819	584	5	2435	0.166
PentaCB-110	339	242	325	5	1451	332	298	268	5	1428	0.638
PentaCB-117	1911	1466	1813	435	7951	1722	1306	1642	5	6579	0.280
HexaCB-128	925	685	660	5	3099	949	678	775	5	3899	0.443
HexaCB-130	7065	5603	5780	2080	25122	7238	5886	5578	1913	25258	0.568
HexaCB-132	399	326	252	5	1125	445	397	282	5	1134	0.143
HexaCB-134	25	5	50	5	183	35	5	47	5	168	0.203
HexaCB-135	419	342	318	5	1577	485	330	403	5	1587	0.382
HexaCB-137	10565	7132	9066	2996	41244	10646	7786	8734	2336	39991	0.889
HexaCB-138	96984	89163	52967	25546	240863	97685	84306	53897	23381	244647	0.990
HexaCB-139/149	635	452	619	15	2404	615	292	696	5	2303	0.568
HexaCB-141	328	255	246	5	1044	340	282	287	5	1169	0.716
HexaCB-146	32968	34220	16346	11603	83149	35211	31688	16262	9839	68936	0.086
HexaCB-147	724	567	463	5	1678	768	622	519	5	1806	0.527
HexaCB-151	1329	981	880	428	3402	1349	1008	1098	5	4265	0.258
HexaCB-153	200929	184176	106109	73832	516088	206380	180663	109234	59314	458743	0.501
HexaCB-163/164	48797	47157	25168	17426	113577	49567	47872	22738	15767	88552	0.694
HexaCB-165	ND					ND					
HeptaCB-170	69704	60801	39523	16403	194289	69053	62645	37071	9946	142922	0.829
HeptaCB-172	9947	9273	5381	2768	27207	10156	10553	5277	5	20365	0.354
HeptaCB-177	15845	14513	9212	4504	39642	16359	14681	9932	2598	40496	0.424
HeptaCB-178	15885	13134	11788	5	56211	17209	13068	11123	3710	42945	0.012
HeptaCB-179	281	182	296	5	1110	357	202	384	5	1463	0.005
HeptaCB-180	205779	201272	136971	50473	703408	203297	188508	121684	32744	490934	0.970
HeptaCB-181	553	292	671	5	2776	581	296	716	5	2806	0.264
HeptaCB-182/187	76063	60684	61028	14834	270253	81845	61046	63293	14093	238587	0.019
HeptaCB-183	16843	14980	12005	4733	45012	17864	15557	13292	3756	55788	0.182
HeptaCB-191	3078	2922	2008	5	8667	2907	2762	1688	805	7561	0.280
OctaCB-194	31774	32293	22776	5	116675	32519	32465	19427	8258	84219	0.304
OctaCB-195	7832	6835	5594	5	26180	7929	7156	4776	1879	19564	0.381
OctaCB-196/203	17107	15138	11346	5	55263	16821	15312	9331	4346	38617	0.869
OctaCB-198/201	14771	12536	11520	5	56995	14368	11829	8673	4251	34263	0.534
OctaCB-200	659	485	607	5	2350	705	593	609	5	2449	0.083
OctaCB-202	5432	3893	4532	5	22569	5298	3892	3307	1509	12550	0.258
OctaCB-205	977	898	633	5	2795	969	912	456	289	1949	0.770
NonaCB-206	5049	4561	2829	1502	14874	4891	4639	2446	5	10726	0.657
NonaCB-207	922	755	572	5	2501	911	792	522	5	1905	0.326
NonaCB-208	1877	1731	1209	5	6338	1827	1723	953	5	4559	0.778
DecaCB-209	1857	1598	890	893	5115	1900	1946	730	837	4005	0.200
Total TrCBs	1792	1471	999	334	3921	1931	1917	1198	708	6225	0.182
Total TeCBs	20023	17013	11246	6548	50619	20318	16713	11351	5981	43194	0.424
Total PeCBs	31271	26027	19945	7137	102693	32932	31001	19076	7680	93210	0.228
Total HxCBs	402098	373141	196792	152976	892316	411718	358344	198664	131539	769040	0.675
Total HpCBs	413979	401285	265364	105126	1341206	419627	378119	250647	80774	971840	0.620
Total OcCBs	78553	77549	55605	35	281931	78608	77101	44919	21477	186948	0.409
Total NoCBs	7849	6439	4416	2355	23712	7629	7224	3832	15	17159	0.869
Total DeCBs	1857	1598	890	893	5115	1900	1946	730	837	4005	0.200
Total PCBs	957422	871523	520304	320807	2642555	974664	806289	495089	286088	2006817	0.585

ND: less than the determination limit.

SD: standard deviation.

CB: chlorinated biphenyl.

分担研究報告書

油症曝露による継世代健康影響に関する研究

研究分担者 月森 清巳 福岡市立こども病院周産期センター長
研究協力者 加藤 聖子 九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学 教授
研究協力者 諸隈 誠一 九州大学環境発達医学研究センター 特任准教授

研究要旨 ヒト胎児期におけるダイオキシン類の経胎盤移行と排泄に関する検討を行った。正常妊娠を対象として、分娩時と産褥期に9つの試料を採取し、ダイオキシン類濃度を測定した。その結果、ダイオキシン類の胎盤を介する胎児への移行の特徴は、臍帯血ダイオキシン類濃度は母体血濃度の約40%であること、TEF値が高い異性体は胎盤に移行しやすいが、臍帯血への移行はTEF値とは関係なくPCDDsがPCDFsやCo-PCBsよりも移行しやすいことが分かった。さらに、胎児におけるダイオキシン類の排泄経路としては、胎脂、胎便、羊水中への排泄が認められたが、胎脂には最も高濃度のダイオキシン類が含まれることが明らかとなった。

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期の影響が危惧されている。カネミ油症患者より出生した児の健康影響の観察から、油症発生から10年以内の妊娠では流産、早産、胎児死亡の発症頻度が増加すること、母体血中ダイオキシン類濃度が出生体重と有意に負の相関を認めること、色素沈着(Black baby)の発症において母体血中ダイオキシン類濃度の上昇が発症リスクを増加させることなどが明らかとなった^{1,2,3)}。しかしながら、ダイオキシン類の胎児への移行や排泄に関しては不明な点が多い。そこで、本研究では、一般正常妊婦において母体胎児間のダイオキシン類の移行動態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

正常妊娠16例を対象として、分娩(帝王切開)時と産褥期に次に示す9つの試料を採取した。

・採取試料：

- 1) 母体血、皮下脂肪、母乳
 - 2) 胎盤、臍帯、臍帯血
 - 3) 胎脂、胎便、羊水
- 1) は、母体曝露状態の評価、2) は、経胎盤移行の評価、3) は、胎児排泄の評価に用いた。

ダイオキシン類濃度は、次の21種類の測定をおこなった。

- 1) ポリ塩化ジベンゾ - パラ - ジオキシン (PCDDs) 7種類
- 2) ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs) 10種類
- 3) コプラナーPCB (coplanar PCBs) 4種類

各試料におけるダイオキシン類濃度の比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究については、福岡市立こども病院倫理委員会(承認番号62)、九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会(承認番号21-31)の承認を得た後、実施した。

本研究を開始する前に対象者全員よりインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

総ダイオキシン類 (Total dioxins) 濃度の平均値は、母体血 15.9(100%)、皮下脂肪 8.8(56%)、母乳 5.4(34%)、胎盤 12.8(81%)、臍帯 10.6(67%)、臍帯血 6.1(38%)、胎脂 8.2(51%)、胎便 3.2(20%)、羊水 2.0(13%) pg-TEQ/g lipid であった (括弧内は母体血を 100%とした場合の割合)。

PCDDs 濃度の平均値は、母体血 8.3(100%)、皮下脂肪 4.3(51%)、母乳 2.3(27%)、胎盤 8.6(103%)、臍帯 5.1(61%)、臍帯血 4.0(49%)、胎脂 4.1(49%)、胎便 1.5(18%)、羊水 0.6(7%) pg-TEQ/g lipid であった。PCDFs 濃度の平均値は、母体血 3.4(100%)、皮下脂肪 2.0(58%)、母乳 1.1(33%)、胎盤 3.4(101%)、臍帯 3.7(108%)、臍帯血 1.0(29%)、胎脂 1.7(50%)、胎便 0.9(25%)、羊水 0.2(6%) pg-TEQ/g lipid であった。Coplanar PCBs の平均値は、母体血 4.1(100%)、皮下脂肪 2.6(63%)、母乳 2.0(49%)、胎盤 0.8(20%)、臍帯 1.9(46%)、臍帯血 1.1(26%)、胎脂 2.4(58%)、胎便 0.8(19%)、羊水 1.2(29%) pg-TEQ/g lipid であった。

PCDDs、PCDFs、coplanar PCBs の胎盤／母体血濃度比は各々 0.53、0.30、0.17、臍帯血／母体血濃度比は各々 0.41、0.21、0.18 であった。異性体の種類毎の胎盤／母体血濃度比は、0.14-1.56 で、臍帯血／母体血濃度比は、0.13-0.71 であった。

以上のように、臍帯血ダイオキシン類濃度は母体血の約 40% でダイオキシン類濃度は母体血>胎盤>臍帯>臍帯血の順であった。また、ダイオキシン類異性体により母児間移行は異なっており、母体血から臍帯血への移行は PCDDs > PCDFs であり、TEF 値が高い異性体は、胎盤>母体血>臍帯血の順であった。

胎児では胎脂、胎便、羊水中にダイオキシン類を排泄しており、ダイオキシン類濃度は、胎脂>臍帯血>胎便>羊水の順であった。

D. 考察

本研究において、胎児の血中ダイオキシン類濃度は母体濃度の約 40% と少なかった。物質の胎盤移行に関わる因子として、ダイオキシン受容体との親和性、分子量、血清蛋白との結合、脂溶性、イオン化、トランスポーター等が考えられる。異性体の種類別にみると、TEF 値が高い 2,3,4,7,8-PentaCDF と 1,2,3,7,8-PentaCDD の胎盤／母体血濃度比は高かった。血清蛋白との結合率が高く、脂溶性の指標であるオクタノール/水分配係数が高い OctaCDD の胎盤／母体血濃度比は低く、臍帯血／母体血濃度比は高かった。以上により、ダイオキシン類の母児間の移送には胎盤のバリア機能が存在し、この胎盤を介する移送にはダイオキシン類の物理化学的な特性による passive diffusion が関与することが考えられた。

胎児におけるダイオキシン類の排泄経路のうち、胎脂に最も高濃度のダイオキシン類が含まれていた。ダイオキシン類排泄に関する報告では、油症患者において皮脂腺中に高濃度のダイオキシン類が検出されている⁴⁾。また、正常健康人においても皮脂腺中ダイオキシン類濃度は血中濃度とほぼ同レベルであることが報告されている⁴⁾。高濃度のダイオキシン (TCDD) に曝露されたウクライナ大統領におけるダイオキシン排泄の解析からも尿に比較して極めて高濃度のダイオキシンが皮脂から分泌されたことが報告されている⁵⁾。以上の報告から、ダイオキシン類の主たる排泄は皮脂から行われ、胎児においては、多くは胎脂に排泄されていることが示唆された。

E. 結論

正常妊娠 16 例を対象として、ダイオキシン類の胎盤を介する胎児への移行と排泄について検討した。

ダイオキシン類の胎盤を介する胎児への移行の特徴は、

- 1) 臍帯血ダイオキシン類濃度は母体血濃度の約 40% であること、
- 2) TEF 値が高い異性体は胎盤に移行しやすいが、臍帯血への移行は TEF 値とは関係なく PCDDs が PCDFs や Co-PCBs よりも移行しやすいことが分かった。

胎児におけるダイオキシン類の排泄経路としては、胎脂、胎便、羊水中への排泄が認められたが、胎脂には最も高濃度のダイオキシン類が含まれることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsukimori K, Uchi H, Furue M.
Response to: Letter to the Editor: Blood levels of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in Yusho mothers and their descendants: Association with fetal Yusho disease.
Chemosphere. 2015 Aug;133:105.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 参考文献

1. Tsukimori K, et al. Long-term effects of polychlorinated biphenyls and dioxins on pregnancy outcomes in women affected by the Yusho incident. *Environ Health Perspect.* 116(5):626-30. 2008
2. Tsukimori K, et al. Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease. *Environ Int.* 38(1):79-86. 2012
3. Tsukimori K, et al. Blood levels of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in Yusho mothers and their descendants: association with fetal Yusho disease. *Chemosphere.* 90(5):1581-8. 2013
4. Iida T, et al. Recent trend of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and their related compounds in the blood and sebum of Yusho and Yu Cheng patients. *Chemosphere.* 38(5):981-93. 1999
5. Sorg O, et al. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) poisoning in Victor Yushchenko: identification and measurement of TCDD metabolites. *Lancet.* 3;374(9696):1179-85. 2009

分担研究報告書

生薬及び漢方方剤スクリーニングの概要

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

研究要旨 HaCaT 細胞を用いて、AhR 活性化の指標であるベンゾピレン (BaP) 誘導性 CYP1A1 発現に及ぼす生薬の影響を検討した。

A. 研究目的

ダイオキシン類はアрил炭化水素受容体 (AhR) を介して毒性を発揮することが知られており、AhR を阻害することでダイオキシン類中毒の症状が緩和できる可能性があると考えられる。本研究では、ヒトケラチノサイト細胞株である HaCaT 細胞を用いて、AhR 活性化の指標であるベンゾピレン (BaP) 誘導性 CYP1A1 発現に及ぼす生薬の影響を検討した。

B. 研究方法

生薬 (川芎、蒼朮、甘草、当帰、黄連、桂皮、黄芩、連翹、芍薬、独活) 及び漢方方剤 (柴胡桂枝湯、桂枝茯苓丸、十全大補湯、桂枝加芍薬湯、女神散) は株式会社ツムラより購入した。HaCaT 細胞は FBS 添加 DMEM 培地で培養し、BaP および 100 μ g/ml に調整した各種生薬で 5 時間処理したあと RNA を抽出し、BaP 誘導 CYP1A1 発現に及ぼす各種生薬の影響を real time RT-PCR により検討した。

C. 研究結果

今回検討した 10 種類の生薬のなかで、桂皮、黄芩、連翹、芍薬、独活、黄連に有意な BaP 誘導 CYP1A1 に対する抑制作用が認められた。このなかでは桂皮に最も強い作用が認められた (図 1)。桂皮を含む 5 種類の漢方方剤を同様に検討した結果、桂枝茯苓丸が最も強い抑制効果があった (図 2)。

D. 考察

油症はダイオキシン類の経口摂取によって発生した慢性ダイオキシン中毒である。これまでに体内に摂取されたダイオキシン類を排泄させるため、陰イオン交換樹脂や食物繊維などの効果が検討されてきたが、臨床症状の改善は認められなかった。一方、油症の皮膚症状、呼吸器症状、神経症状、全身倦怠感に対して、それぞれ荊芥連翹湯、麦門冬湯、牛車腎気丸、補中益気湯の効果を検討した臨床試験では、麦門冬湯に呼吸器症状の改善効果が認められた。レスベラロールやクルクミン、ケルセチンなど様々な植物ポリフェノールに AhR を阻害する作用があることが知られており、麦門冬湯に含まれる何らかの成分が気道上皮の AhR に作用し、呼吸器症状の改善につながった可能性が考えられる。この試験の前後で患者の血中ダイオキシン類濃度に差はなかったことから、ダイオキシン類の排泄促進に拘泥するより、AhR 阻害作用を有する植物由来成分により症状の緩和を目指すほうが、油症の治療として現実的と考えられる。今回最も強い AhR 抑制効果があった桂枝茯苓丸は代表的な駆瘀血剤で、広く日常診療に用いられる漢方方剤の一つである。桂枝茯苓丸に慢性ダイオキシン中毒の症状を緩和する効果があると考え、現在油症患者を対象とした医師主導臨床研究を実施している。

E. 結論

桂皮、及び桂皮を含む漢方方剤に強い AhR

阻害作用があった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakahara T, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Takahara M, Tsuji G, Uchi H, Yan X, Hachisuka J, Chiba T, Esaki H, Kido-Nakahara M, Furue M. Antioxidant *Opuntia ficus-indica* Extract Activates AHR-NRF2 Signaling and Upregulates Filaggrin and Loricrin Expression in Human Keratinocytes. *J Med Food* 2015;18:1143-9.

Mitoma C, Mine Y, Utani A, Imafuku S, Muto M, Akimoto T, Kanekura T, Furue M, Uchi H. Current skin symptoms of Yusho patients exposed to high levels of 2,3,4,7,8-pentachlorinated dibenzofuran and polychlorinated biphenyls in 1968. *Chemosphere* 2015;137:45-51.

Wu Z, Uchi H, Morino-Koga S, Shi W, Furue M. Z-ligustilide ameliorated ultraviolet B-induced oxidative stress and inflammatory cytokine production in human keratinocytes through upregulation of Nrf2/HO-1 and suppression of NF- κ B pathway. *Exp Dermatol* 2015;24:703-8.

Takei K, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Uchi H, Takahara M, Tsuji G, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Furue M. Antioxidant soybean tar Glyteer rescues T-helper-mediated downregulation of filaggrin expression via aryl hydrocarbon receptor. *J Dermatol* 2015;42:171-80.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

図 1

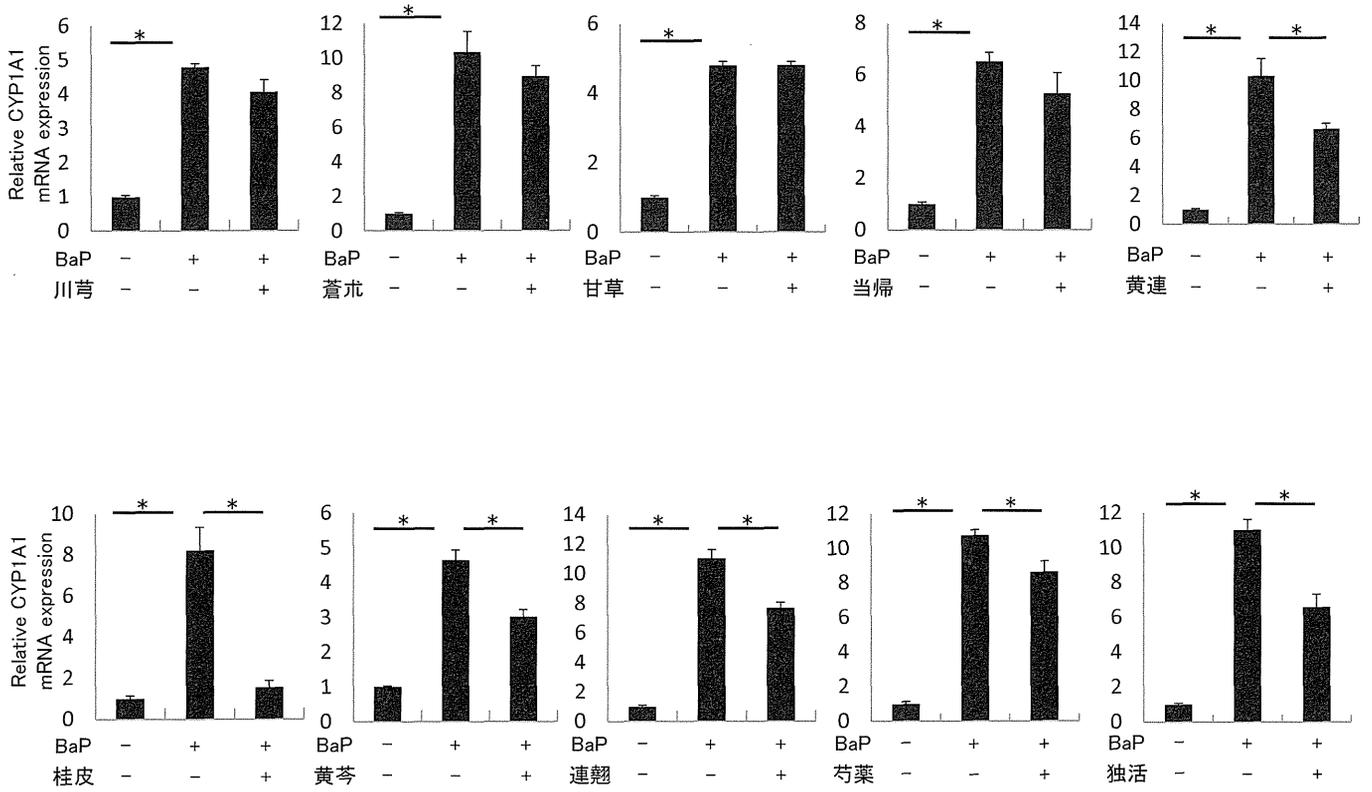
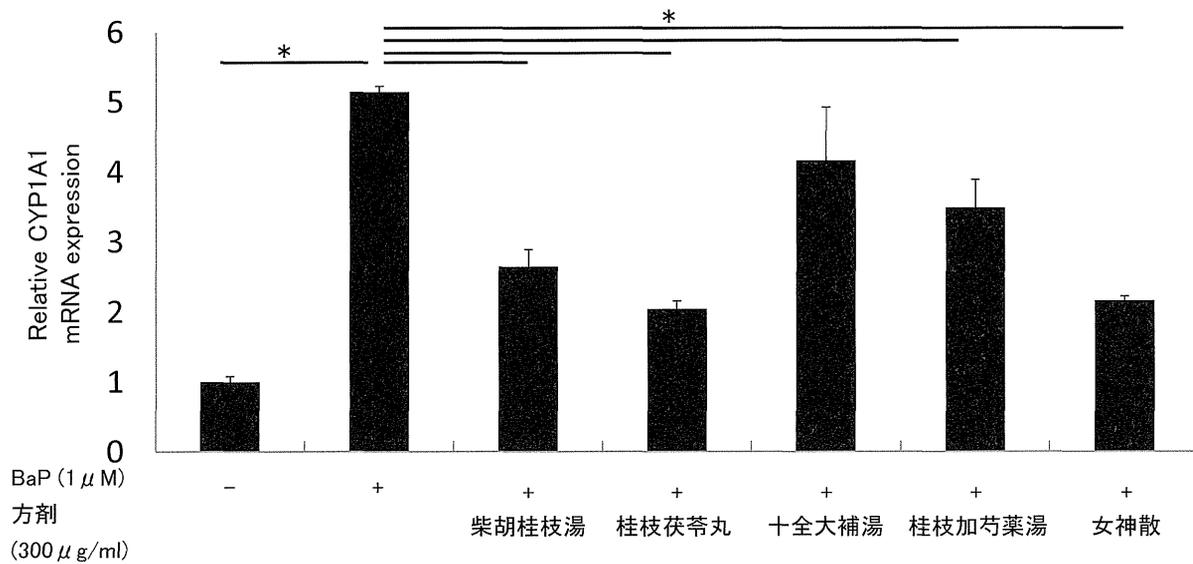


図2



分担研究報告書

カネミ油症患者のダイオキシン類異性体ごとの濃度の変化（半減期）の変化に関する研究

研究分担者 赤羽 学 奈良県立医科大学 健康政策医学講座 准教授
 研究協力者 松本 伸哉 奈良県立医科大学 健康政策医学講座 博士研究員
 今村 知明 奈良県立医科大学 健康政策医学講座 教授
 神奈川芳行 奈良県立医科大学 健康政策医学講座 非常勤講師

研究要旨 体内のダイオキシン類は、徐々に排出される一方、食事などから継続的に摂取しているため、その濃度は変化している。濃度の変化率は、「半減期」として評価されてきた。今回、ダイオキシン類の異性体ごとの濃度の変化率（半減期）の変化を確認することを目的とした。濃度の変化率（半減期）の変化は、濃度の対数の二階微分として評価できる。もっとも単純な二階微分を有する二次方程式に近似して、二階微分の係数を評価した。その結果、1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD は、二階微分は負であった。このことは、濃度は上昇から減少に変化しているか、半減期が短くなっていることを示唆する。

A. 研究目的

これまで、平成 14 年度以降に油症検診の際にダイオキシン類濃度の計測をしている。我々は、測定されたダイオキシン類濃度データを用いて、ダイオキシン類の半減期に関する研究を行っており、平成 20 年度の研究では各患者の半減期が異なることを示した[1]。平成 21 年度の研究では半減期と症状の関係を明らかにし [2]、平成 23 年度の研究では即時的な影響と体内負荷量の変動を分離した[3]。平成 24 年度の研究では、ダイオキシン類の半減期の変化を求め、一般人より高濃度のダイオキシン類は、半減期が長くなる傾向にあるのに対して、一般人よりも濃度が低いダイオキシン類では、半減期が短くなる傾向にあることを示した[4]。

本研究では、ダイオキシン類の各異性体の半減期の変化を確認することを目的とした。

B. 研究方法

B. 1. 対象患者

油症一斉検診を受診している患者のうち、3 期間(2002~2006、2007~2010、2011~2014) のそれぞれで、1 回以上ダイオキシン類を計測し、体重・身長を計測している患者を対象とした。表 1 に性と 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度別の分布を示す。

B. 2. 対象異性体

次の 8 種類のダイオキシン類異性体を対象とした。

2, 3, 7, 8-TCDD
 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD
 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD
 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF
 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF
 3, 3, 4, 4, 5-PeCB (126)
 3, 3, 4, 4-TCB (77)
 3, 4, 4, 5-TCB (81)
 3, 3, 4, 4, 5, 5-HxCB (169)

各異性体が測定限界値以下のべ回数を表 2 に示す。濃度が測定限界以下になった場合には、測定限界値とみなして計算を行った。対数をとるので、0 とすることができない。

B. 3. 解析手法

半減期は、濃度の対数の変化率の逆数であるため、半減期の変化は、濃度の対数の変化率の変化と考えることができる。つまり、濃度の対数に対する二階微分を評価することで、半減期の変化を評価することができる。二階微分が正である状況を図 1 に示す。二階微分が正である場合には、濃度の減少率が徐々に減少している。つまり、半減期が伸びている状況である。また、摂取量が増加し、濃度が減少から増加に転じた場合にも、二階微分は正となる。二階微分が負の状況を図 2 に示す。二階微分が負であるとは、濃度の減少率が増えている。つまり、半減期が短くなっている。または、濃度が増加から減少に転じていることが考えられる。一般人は、食事などからのダイオキシン類の摂取で濃度が上昇する。しかし、環境中のダイオキシン類濃度が減少しており、ある時点から濃度の減少していく。このような場合には、二階微分は負となる。

二階微分を有するもっとも単純な式（二次方程式＝放物線）に、各患者の濃度の対数を目的変数として係数を求めることで、その二階微分値を評価する。すなわち、半減期の変化を評価することができる。

$$\log_2 C_{it} = c_i + b_i t + a_i t^2$$

t : 測定年度

回帰式の評価は、各係数が「0」とすべきか、つまり、その変数を使用する価値があるかの検定を実施している。二階微分の項が 0 であるかの検定のために、統計ツールの R では、統計量として T 値を求めている。つまり、T 検定を行っている。T 値の絶対値が、1.96 以下だと、P 値は 5% を超える。係数は「0」が適切であると考えられる。絶対値が 1.96 を超える場合には、その係数が値を持つべきであるとみなす。T 値の符号は、係数の符号と一致する。この T 値を評価することで、二階微分が価値を持つか

と、その正負を判定した。油症特有の異性体である 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の濃度別のグラフを作成し、濃度別の状況を確認した。

C. 研究結果

図 3 に各異性体の濃度別の 2 次の係数の T 値の分布を示す。横軸は、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の濃度による区分を示す。縦軸は二次の係数の T 値を示す。各折れ線は、各異性体を示す。多くの異性体の T 値は、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF が低濃度 (10-20 pg/g) の患者では負であり、高濃度 (50-200 pg/g) の患者では正となる傾向がみられた。

1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF は、全濃度において、正の値となっていた。

1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD と OCDD は、全濃度において負となっていた。

D. 考察

ダイオキシン類は、食事にも含まれており、継続的に摂取している。一般人は、継続的な暴露によって、平衡状態に濃度の低い側から近づいていく。油症患者は、米ぬか油に含まれた 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF によって、高濃度の暴露があった。このような場合には、平衡状態よりも高濃度となっており、高濃度の側から平衡状態に近づいていく。また、環境中のダイオキシン類の濃度は、ダイオキシン類の規制により、年々減少しており、平衡状態の濃度が減少している。

図 4 に 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の濃度変化を示す。2, 3, 4, 7, 8-PeCDF のような油症患者特有の異性体の場合には、二階微分の係数は、高濃度の患者では正となる。つまり、濃度の変化率は、徐々に緩やかになる。言い換えると半減期は長くなる。逆に、一般人の二階微分は負となる。つまり、濃度の増加から減少に変化しているか、半減期が短くなっている。低濃度で T 値が負となっており、高

濃度で正となっている他の多くの異性体も、油症患者特有に高濃度の特有の状況であると考えられる。

図 5 に OCDD の濃度変化を示す。OCDD のように油症患者特有に濃度が低い異性体の場合には、一般人よりもさらに濃度が低い方から平衡状態に近づく。このため、一般人、油症患者ともに、二階微分は負である。

今回の結果において、3, 3, 4, 4-TCB は、すべての濃度域で、2 次の係数は正であった。2, 3, 4, 7, 8-PeCDF とは異なり、低濃度の患者においても、正になっている。この異性体は、濃度が低く、検出限界に近く、安定的に計測結果が得られない。3, 3, 4, 4-TCB は、表 2 にあるように 2/3 が検出限界の最低値であった。図 6 に示すように、検出限界近くの濃度で減少を続けた場合には、検出限界を下回った場合には、半減期が伸びているような測定結果となる。また、3, 4, 4, 5-TCB は、測定限界以下の測定結果が多い。しかし、多すぎるために、解析結果として不安定になり、T 値は 0 に近かったものと考えられる。

1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD は、OCDD と同様に、二階微分は負の係数となっていた。しかし、この異性体は、OCDD とは異なり、油症患者特有に濃度が低いわけではない。つまり、濃度の低い側から近づいて行っているわけではない。一つの可能性として、環境中の濃度の減少が加速していることが考えられる。しかし、高濃度の患者にとって、環境からの摂取は、濃度の変化（半減期）への影響は小さいと考えられる。環境からの影響の可能性は少ない。もう一つの可能性としては、個人の排泄半減期が短くなっていることが考えられる。2, 3, 4, 7, 8-PeCDF と正負が逆であり、ダイオキシン類全体の傾向ではなく、異性体固有の状況であると考えられる。半減期が伸びるのは、老化が要因として発生することが考えられる。しかし、

半減期が短くなることは考えにくい。今後、更に、研究を深める必要がある。

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：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 20 年度総括・分担研究報告書：2009 年 3 月
- 2) 油症患者の血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の半減期と症状の関係に関する研究：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
- 3) カネミ油症患者の症状と 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の半減期に関する研究：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
- 4) カネミ油症患者のダイオキシン類の体内負荷量変化率の変化に関する研究：平成 24 年度総括・分担研究報告書

F. 研究発表

1. 論文発表

Shinya Matsumoto, Manabu Akahane, Yoshiyuki Kanagawa, Jumboku Kajiwara, Chikage Mitoma, Hiroshi Uchi, Masutaka Furue and Tomoaki Imamura. Unexpectedly long half-lives of blood 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) levels in Yusho patients Environmental Health. Sep 17;14 (1):76. 2015.