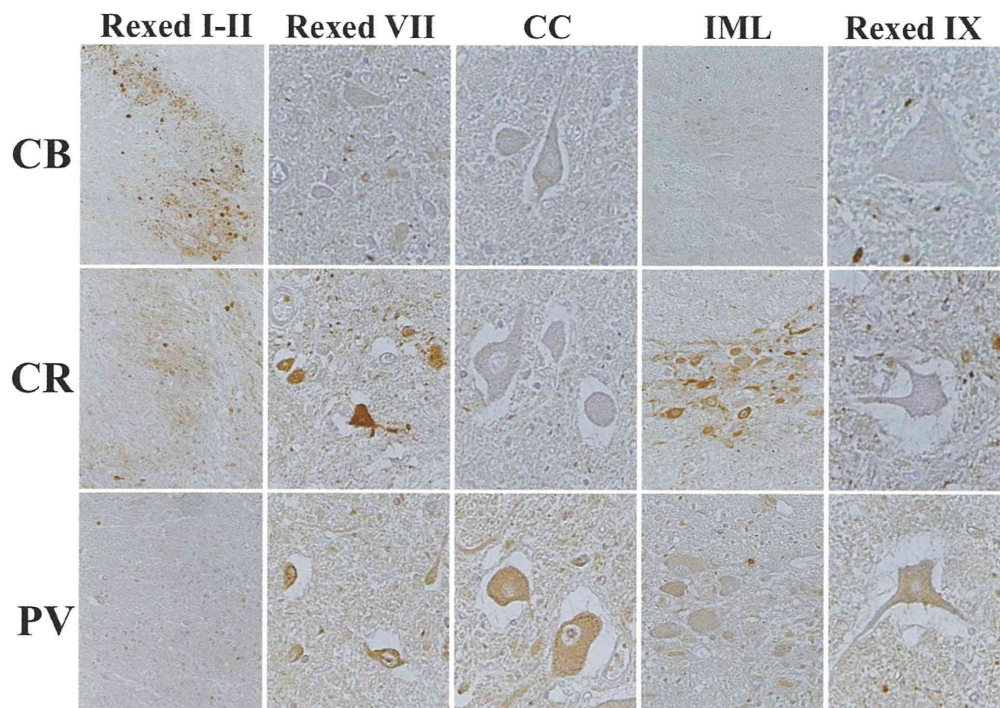
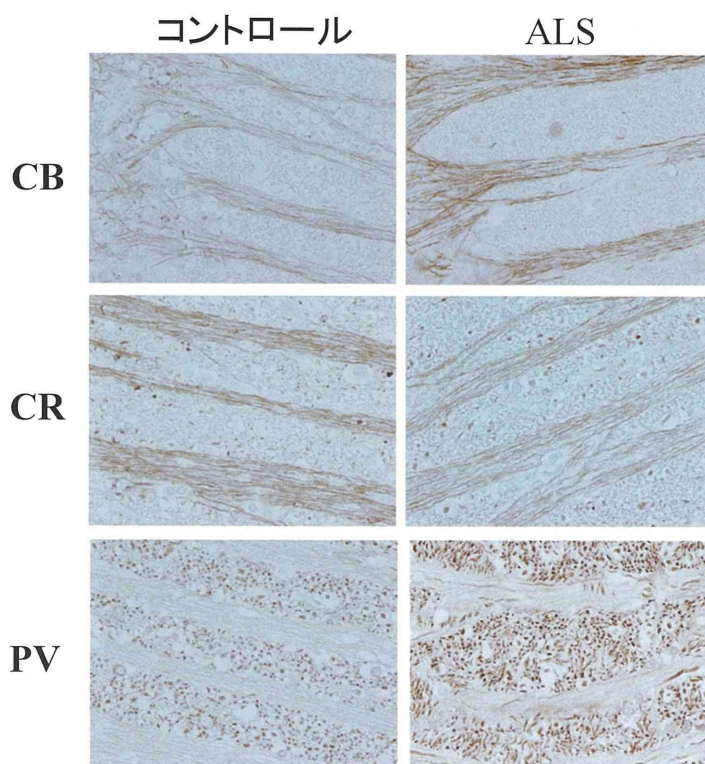


図3



CB: calbindin, CR: calretinin, PV: parvalbumin, CC: クラーク柱, IML: 中間質外側核

図4



Table

コントロール脊髄ニューロンにおける発現

	CB	CR	PV
運動ニューロン (Rexed IX)	-	-	±
クラーク柱ニューロン	-	-	±
中間質外側核ニューロン	-	+	-
小型ニューロン			
Rexed I	+	±	-
Rexed II	+	±	-
Rexed III-VI	-	-	-
Rexed VII	-	+	±
Rexed VIII	-	+	±

CR, calretinin; CB, calbindin; PV, parvalbumin; +, 陽性; ±, 弱陽性; -, 陰性

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
 - 油症患者における AhR 遺伝子多型と児への健康影響（流産、胎児死亡、性別）との関連-

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

研究要旨 油症患者におけるダイオキシン類受容体(AhR)遺伝子多型と児への健康影響（流産、胎児死亡、性別）との関連について検討した。油症発生後に妊娠した油症患者 59 例(142 妊娠)における AhR 遺伝子多型(130bp C/T 一塩基多型)の頻度は、C/C 型が 53 妊娠(37.3%)、C/T 型が 71 妊娠(50.0%)、T/T 型が 18 妊娠(12.7%)であった。油症発生前 10 年間に妊娠した油症患者 50 例(102 妊娠)における AhR 遺伝子多型の頻度(C/C 型 47.1%、C/T 型 46.1%、T/T 型 6.9%)と比較して有意な差はなかった。油症発生後に妊娠した油症患者における児への健康影響としては、人工流産が 15 例(10.6%)、自然流産が 19 例(15.0%)、胎児死亡（自然流産+死産）が 22 例(17.3%)に認められた。油症発生前の発症頻度と比較すると、人工流産は 1.89 倍、自然流産は 1.94 倍、胎児死亡は 1.47 倍増加したが、有意な差はなかった。油症発生後の児への健康影響(人工流産、自然流産、胎児死亡、男児出生)の有無と AhR 遺伝子多型(C/C 型、C/T 型、T/T 型の各遺伝子型の頻度)との関連について検討したが、いずれの健康影響においても明らかな傾向はなかった。

A. 研究目的

ダイオキシン類は主として細胞内受容体であるダイオキシン類受容体(AhR)との結合を介して毒性を発揮すると考えられている。最近、AhR のプロモータ領域(-130bp)には一塩基多型(SNP)が存在し、T/T 型では C/C 型と比較し 1.75 倍のプロモータ活性の亢進が認められることが明らかとなった^{1,2)}。これらのことから AhR 遺伝子多型によりダイオキシン類に対する感受性が異なる可能性が考えられる。

これまでの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³⁾、母親が 20 歳未満で曝露した場合、女系の 2 世、3 世では男児の出生割合が有意に低いこと⁴⁾が明らかとなった。しかしながら、これら油症曝露による次世代への健康影響の

発現機序は明らかとなっていない。

そこで、本研究では、油症患者における AhR 遺伝子多型と児への健康影響（流産、胎児死亡、性別）との関連について検討した。

B. 研究方法

○調査対象：カネミ油症発生後に妊娠・出産となった油症患者 59 例(142 妊娠)を対象とし、コントロール(対照)には油症発生前 10 年間に妊娠した油症患者 50 例(102 妊娠)を用いた。

○調査方法：

①アンケート調査：対象群 59 例と対照群 50 例の妊娠・分娩情報(経妊産回数、分娩時年齢、分娩日、分娩時妊娠週数、魚介類摂取回数)と児の健康情報(流産・早産・胎児死亡、出生児の性別)を得た。

②ダイオキシン類受容体(AhR)遺伝子多型の解析:対象群 59 例と対照群 50 例より血液を採取し、リンパ球を分離した後、DNA を抽出し、AhR プロモータ領域(-130bp)の C/T 一塩基多型(SNP)を解析した。

○解析方法:

①、②の調査結果をもとにカネミ油症患者における児への健康影響(人工流産、自然流産、胎児死亡、男児出生割合)と母体 AhR 遺伝子多型との関連について解析した。統計学的解析には、 χ^2 検定を用いた。

(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 20-58)および九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会(許可番号 451-00)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

カネミ油症発生後の油症患者における児への健康影響としては、人工流産が 15 例(10.6%)、自然流産が 19 例(15.0%)、胎児死亡(自然流産+死産)が 22 例(17.3%)に認められた(表 1)。油症発生前の発症頻度と比較すると、人工流産は 1.89 倍、自然流産は 1.94 倍、胎児死亡は 1.47 倍増加したが、有意な差はなかった。また、油症発生から 10 年間、発生から 10-20 年、発生から 20 年以降の 3 つの時期に分類し、児への健康影響について検討すると、各時期における人工流産、自然流産、胎児死亡の発症頻度は油症発生前の頻度と比べて有意な差はなかった。

カネミ油症発生後に油症患者から出生した児における男児出生割合は 0.55 で、general population の割合 0.514 と比較して有意な差はなかった。油症発生から 10 年間、発生から 10-20 年、発生から 20 年以

降の 3 つの時期における男児出生割合も、general population の割合と比較して有意な差はなかった。

カネミ油症発生後に妊娠した油症患者 142 妊娠における AhR 遺伝子多型の頻度は、C/C 型が 53 例(37.3%)、C/T 型が 71 例(50.0%)、T/T 型が 18 例(12.7%)に認められた(図 1)。油症発生前の頻度(C/C 型 47.1%、C/T 型 46.1%、T/T 型 6.9%)と比較して有意な差はなかった($p=0.173$)。

各 AhR 遺伝子型における児への健康影響の発生頻度を検討すると、各々の AhR 遺伝子型において人工流産、自然流産、胎児死亡の発症頻度や男児出生割合は油症発生前の頻度と比べて有意な差はなかった(表 2)。

油症発生後に妊娠した油症患者における人工流産、自然流産、胎児死亡の発症の有無と AhR 遺伝子多型との関連について検討すると、人工流産、自然流産、胎児死亡を発症した各々の群において各遺伝子型の頻度は発症しなかった群の頻度と比較して有意な差はなかった(図 2)。また、出生児が男児であった群における各遺伝子型の頻度は女児であった群の頻度と比較して有意な差はなかった。

D. 考察

健常者の女性 130 人における AhR 遺伝子多型(130bp C/T 一塩基多型)の頻度は、C/C 型が 57 例(46.9%)、C/T 型が 61 例(46.9%)、T/T 型が 12 例(9.2%)であることが報告されている¹⁾。T/T 型では C/C 型に比し、AhR mRNA、蛋白量もそれぞれ 1.75、2 倍発現亢進すること、さらに AhR 下流における IL1 β 及び IL24 発現も亢進することが報告されている²⁾。また、油症患者における AhR 遺伝子多型と IL24 血中濃度との関連に関する検討では、T/T 型における IL24 血中濃度は 180.9 ± 43.2 pg/mL で C/C 型の 59.1 ± 15.8 pg/mL と比して有意に高値であることが示されている²⁾。これら

の成績から AhR 遺伝子多型によりダイオキシン類に対する感受性が異なる可能性が考えられる。

今回の検討では、油症発生後に妊娠した油症患者 59 例(142 妊娠)においては、AhR 遺伝子多型の頻度は油症発生前の頻度と有意な差はないこと、児への健康影響(人工流産、自然流産、胎児死亡、男児出生)の有無と AhR 遺伝子多型との間に明らかな傾向はみられないことが示された。このように母体の AhR を介する遺伝的感受性と児の健康影響との関連は観察されなかった。しかしながら、今回の検討では、油症患者より出生した児の健康影響として、流産や胎児死亡の頻度の増加や男児出生割合の低下が観察できなかつたので、今後さらに症例数を増やして AhR 遺伝子多型と流産、胎児死亡の頻度や男児出生割合との関連を検討していく必要があると考えられた。

E. 結論

カネミ油症発生後に妊娠した油症患者 59 例(142 妊娠)における観察では、母体 AhR 遺伝子多型と人工流産、自然流産、胎児死亡の頻度や男児出生割合との間に明らかな傾向はみられなかった。

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

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) Li D, et al. Inhibition of AHR transcription by NF1C is affected by a single-nucleotide polymorphism, and is involved in suppression of human uterine endometrial cancer. *Oncogene* 32(41):4950-4959, 2013.
- 2) Liu G, et al. Aryl hydrocarbon receptor SNP -130 C/T associates with dioxins susceptibility through regulating its receptor activity and downstream effectors including interleukin 24. *Toxicol Lett* 232(2):384-392, 2015.
- 3) 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):626-630, 2008.
- 4) Tsukimori K, et al. Sex ratio in two generations of the Yusho cohort. *Epidemiology* 23(2):349-350, 2012.

表 1 油症患者における児への健康影響の発生頻度

健康影響	油症発生前 10年間	油症発生前後			
		総数	発生から10年間	発生から10-20年	発生から20年以降
人工流産	5.9%(6/102)	10.6%(15/142)	13.6%(11/81)	10.0%(4/40)	0%(0/21)
	Ref	1.89(0.71-5.05)	2.51(0.89-7.12)	1.78(0.47-6.67)	NA
		p=0.250	p=0.122	p=0.468	p=1.000
自然流産	8.3%(8/96)	15.0%(19/127)	12.9%(9/70)	13.9%(5/36)	23.8%(5/21)
	Ref	1.94(0.81-4.63)	1.62(0.59-4.44)	1.77(0.54-5.83)	3.44(0.99-11.85)
		p=0.151	p=0.438	p=0.340	p=0.056
胎児死亡	12.5%(12/96)	17.3%(22/127)	15.7%(11/70)	13.9%(5/36)	28.6%(6/21)
	Ref	1.47(0.69-3.14)	1.31(0.54-3.16)	1.13(0.37-3.47)	2.80(0.91-8.61)
		p=0.352	p=0.651	p=0.779	p=0.091
男児出生割合*	0.50(40/80)	0.55(55/100)	0.60(35/58)	0.45(13/29)	0.54(7/13)
	0.95(0.51-1.76)	1.16(0.66-2.01)	1.44(0.69-3.00)	0.77(0.27-2.16)	1.10(0.24-5.15)
	p=1.000	p=0.671	p=0.455	p=0.793	p=1.000

Data are shown as %(n/N) and OR (95%CI) .

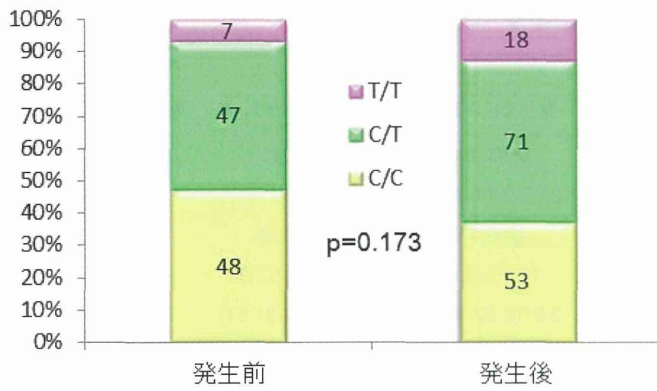
*Data are shown as sex ratio (proportion of male births) (n/N) and OR (95%CI) against an expected sex ratio of 0.514.

表 2 各遺伝子型における児への健康影響の発生頻度

健康影響	AhR SNP	油症発生前 10年間	油症発生前後			
			総数	発生から10年間	発生から10-20年	発生から20年以降
人工流産	C/C	8.3%(4/48)	11.3%(6/53)	20.0%(6/30)	0%(0/16)	0%(0/7)
		Ref	1.40(0.37-5.31)	2.75(0.71-10.71)	NA	NA
			p=0.744	p=0.171	p=0.565	p=1.000
	C/T	4.3%(2/47)	12.7%(9/71)	11.1%(5/45)	19.0%(4/21)	0%(0/5)
		Ref	3.27(0.67-15.85)	2.81(0.52-15.31)	5.29(0.89-31.61)	NA
			p=0.196	p=0.262	p=0.068	p=1.000
T/T	0%(0/7)	0%(0/18)	0%(0/6)	0%(0/3)	0%(0/9)	
	Ref	NA	NA	NA	NA	
		p=1.000	p=1.000	p=1.000	p=1.000	
自然流産	C/C	6.8%(3/44)	10.6%(5/47)	4.2%(1/24)	12.5%(2/16)	28.6%(2/7)
		Ref	1.63(0.37-7.25)	0.59(0.06-6.05)	1.95(0.30-12.91)	5.47(0.73-41.03)
			p=0.715	p=1.000	p=0.602	p=0.133
	C/T	11.1%(5/45)	19.4%(12/62)	20.0%(8/40)	17.6%(3/17)	20.0%(1/5)
		Ref	1.92(0.62-5.90)	2.00(0.60-6.71)	1.71(0.36-8.12)	2.00(0.19-21.62)
			p=0.294	p=0.367	p=0.673	p=0.487
T/T	0%(0/7)	11.1%(2/18)	0%(0/6)	0%(0/3)	22.2%(2/9)	
	Ref	NA	NA	NA	NA	
		p=1.000	p=1.000	p=1.000	p=0.475	
胎児死亡	C/C	13.6%(6/44)	14.9%(7/47)	12.5%(3/24)	12.5%(2/16)	28.6%(2/7)
		Ref	1.11(0.34-3.60)	0.90(0.21-3.99)	0.90(0.16-5.02)	2.53(0.40-16.15)
			p=1.000	p=1.000	p=1.000	p=0.300
	C/T	13.3%(6/45)	19.4%(12/62)	20.0%(8/40)	17.6%(3/17)	20.0%(1/5)
		Ref	1.56(0.537-4.53)	1.63(0.51-5.17)	1.39(0.31-6.33)	1.63(0.15-17.10)
			p=0.447	p=0.560	p=0.696	p=0.546
T/T	0%(0/7)	16.7%(3/18)	0%(0/6)	0%(0/3)	33.3%(3/9)	
	Ref	NA	NA	NA	NA	
		p=0.534	p=1.000	p=1.000	p=0.213	
男児出生割合	C/C	0.53(18/34)	0.51(20/39)	0.52(11/21)	0.46(6/13)	0.60(3/5)
		1.06(0.41-2.76)	0.99(0.41-2.42)	1.04(0.31-3.49)	0.81(0.17-3.78)	1.42(0.12-17.37)
		p=1.000	p=1.000	p=1.000	p=1.000	p=1.000
	C/T	0.49(19/39)	0.57(27/47)	0.65(20/31)	0.46(6/13)	0.33(1/3)
		0.90(0.37-2.18)	1.28(0.57-2.88)	1.72(0.62-4.76)	0.81(0.17-3.78)	0.47(0.02-12.81)
			p=1.000	p=0.679	p=0.440	p=1.000
T/T	0.43(3/7)	0.57(8/14)	0.67(4/6)	0.33(1/3)	0.60(3/5)	
	0.71(0.09-5.83)	1.26(0.28-5.59)	1.89(0.18-19.50)	0.47(0.02-12.81)	1.42(0.12-17.37)	
		p=0.999	p=1.000	p=0.992	p=0.950	p=1.000

Data are shown as %(n/N) and OR (95%CI) .

*Data are shown as sex ratio (proportion of male births) (n/N) and OR (95%CI) against an expected sex ratio of 0.514.



AhR SNP	発生前	発生後	計
T/T	7(6.9%)	18(12.7%)	25(10.2%)
C/T	47(46.1%)	71(50.0%)	118(48.4%)
C/C	48(47.1%)	53(37.3%)	101(41.4%)
計	102(100%)	142(100%)	244(100%)

図 1 油症患者における AhR 遺伝子多型の頻度 (妊娠あたり)

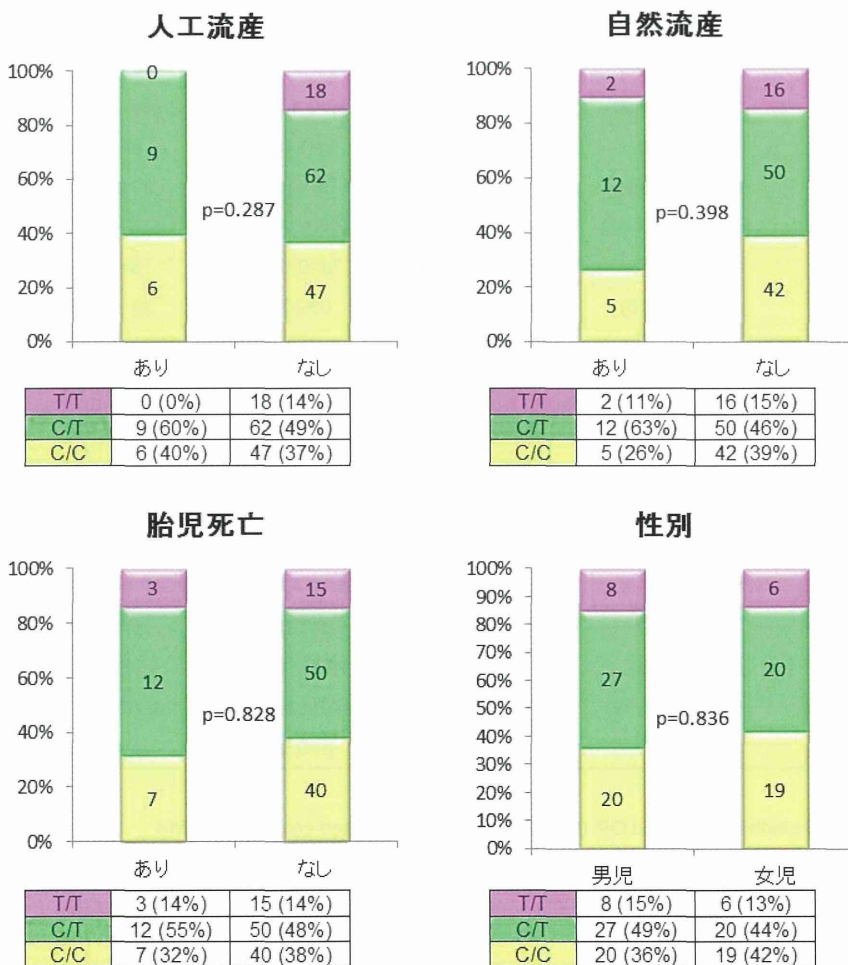


図 2 油症患者における児への健康影響と AhR 遺伝子多型の頻度

分担研究報告書

カネミ油症患者のダイオキシン類の半減期の変化と体重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 ダイオキシン類は徐々に排出され、濃度は低下していくものと考えられているが、その排出経路や濃度の変化に関して不明な点も多い。半減期の変化と体重の変動の関係を確認した。体重が減少すると、半減期が伸びる可能性があることが示された。まだ、傾向として弱いものであり、今後、追加の測定結果を用いて、より安定した結果を得ることが必要である。

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、ダイオキシン類の半減期の変化と体重の変化の関係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、2001 年～2013 年の間に 5 回以上ダイオキシン類濃度の測定を実施し、最初の測定から最後の測定までの間が

5 年以上の患者で、平均血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度が 200 pg/g lipid 以上で、IgE 抗体検査、骨密度検査を 1 回以上行ったことがある患者、53 名を対象とした。表 1 に性別・年齢別の分布を示す。

また、体重として、200kg を超える異常値が含まれている場合があったので、当該測定結果を除いて計算を行った。

B. 2. 分析手法

半減期は、濃度の対数の変化率の逆数であるため、半減期と濃度の対数の変化率とみなして評価が可能である。さらに、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

また、体重の変化は、体重の対数を目的変数とする線形回帰式で求めた。

$$\log_2 W_{it} = b_i - a_i t$$

t : 測定年度

C. 研究結果

C. 1. 体重変化の分布

図 1 に体重変化の分布を示す。体重の変化率の数値は、半減期の逆数の負である。つまり、 -0.01 は、100 年で体重が半分になることを示す。多くの患者は、変化率が 0 の近辺に集中している。また、若干負の傾向が強く、全体としては、体重が減少していることを示す。

C. 2. 半減期の変化（濃度の二階微分の変化）

図 2 に濃度の対数の二階微分の係数を示す。全体的な分布は、0 から少しだけ正の側に移動した正規分布に近い分布をしている。

C. 3. 体重の変化と半減期の変化の関係

図 3 に体重変化と濃度の対数の二階微分の散布図を示す。右上（体重が増加、濃度の 2 階微分が正）の領域に外れ値と考えられる患者がいるが、おおむね、体重が減少している患者は、濃度の二階微分が大きくなる傾向を示している。

D. 考察

本研究における対象患者において、体重の変動は、0 の前後に分布していた。若干体重減少する患者のほうが多かったが、大きな傾向は見られなかった。

濃度の二階微分では、全体的な傾向としては、0 から正に少しずれた位置性を中心とする正規分布に近い形であった。本研究における対象患者は、一般人よりも高い濃度を有する患者であるため、濃度は一般人に近づいていく傾向を示している。つまり、濃度は減少していく傾向を示している。この状

況で、二階微分が正であるとは、半減期が長くなる状況を示している。また、1 名であるが、全体から離れている患者がいた。

濃度の半減期の変化と体重の変動の図(図 3)では、右上（体重が増加、濃度の二階微分が正）に非常に大きな濃度の二階微分の値を示す患者がいた。この患者の濃度変化と二次関数による推定を図 4 に示す。濃度変化を見ると、2002 年から 2006 年まで減少しているのに対して、2010 年では一転して濃度が増加している。本研究で用いた、二次関数への近似では、今回のように離れている一点が偶然の影響をうけると、二次の係数が大きく影響を受ける。偶然の誤差を大きく拾ってしまった可能性が高い。

この右上に存在する患者を外れ値として除くと、体重が減少している患者は濃度の二階微分が大きくなる傾向がみられた。言い換えると、体重が減少している患者は、半減期が長くなる傾向がみられた。

体重の変動と濃度の変動に関しては多くの研究で指摘されているが、半減期の変動と体重の変動に関して報告はない。体重変動と半減期の変化の間に直接の関係があるとは考えにくい。たとえば、ダイオキシン類を高濃度で蓄積することができる器官が体内に存在し、年齢が高くなったり、痩せたりすると、ダイオキシン類を維持する能力が低下し、流れ出すと仮定すると、今回の現象の説明が可能である。たとえば、脂肪組織中に蓄積されるなどの可能性があるのではないだろうか。

我々は正常対照群と油症群の症状の比較も行ってきたが、体重や身長などの個人の身体的データの比較も行う必要があると判断した。油症実態調査データと以前に我々が実施した対照群調査データを分析することにし、現在統合作業を行っている。

2007年以降は、ダイオキシン類の測定が3年おきとなっている。2014年の測定結果を加え、測定期間が長い患者を対象とすることで、より安定した結果が得られるもの考えられる。

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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 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

なし

2. 学会発表

赤羽学、松本伸哉、神奈川芳行、吉村健清、今村知明 カネミ油症患者と一般成人の健康調査結果の比較 第 73 回日本公衆衛生学会総会 2014 年 11 月 5-7 日 宇都宮東武ホテルグランデ（栃木）

表 1 対象患者

年齢(2010 年時点)	男性	女性	総計
50～59		1	1
60～69	1	6	7
70～79	8	23	31
80～89	2	12	14
総計	11	42	53

図 1 体重変化の分布

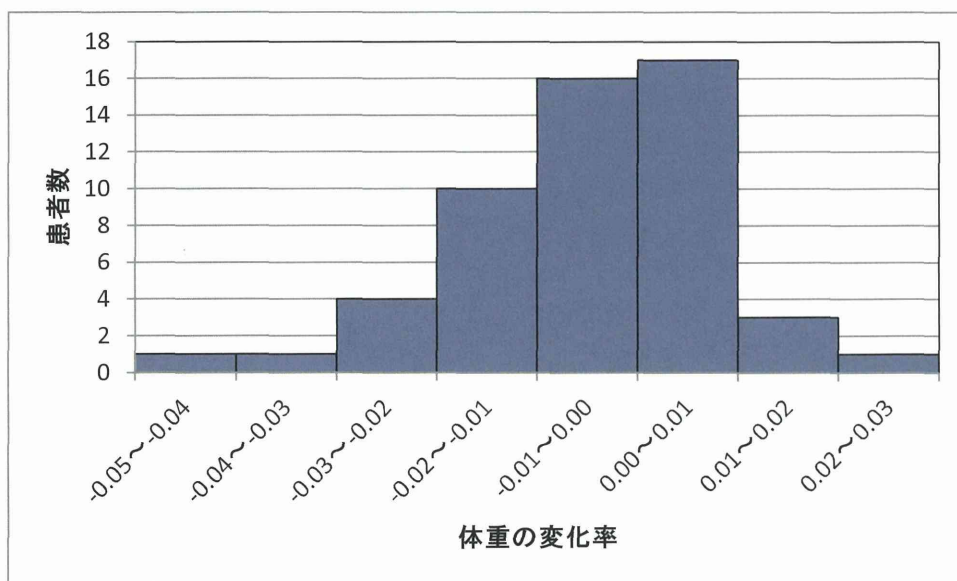


図 2 濃度の二階微分結果の分布

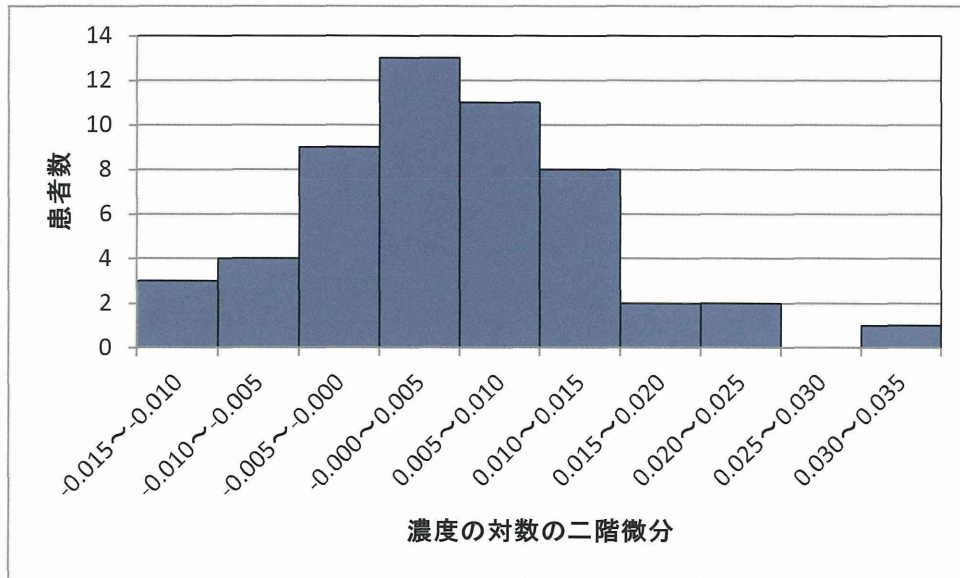


図 3 体重の変動と濃度の二階微分結果の分布

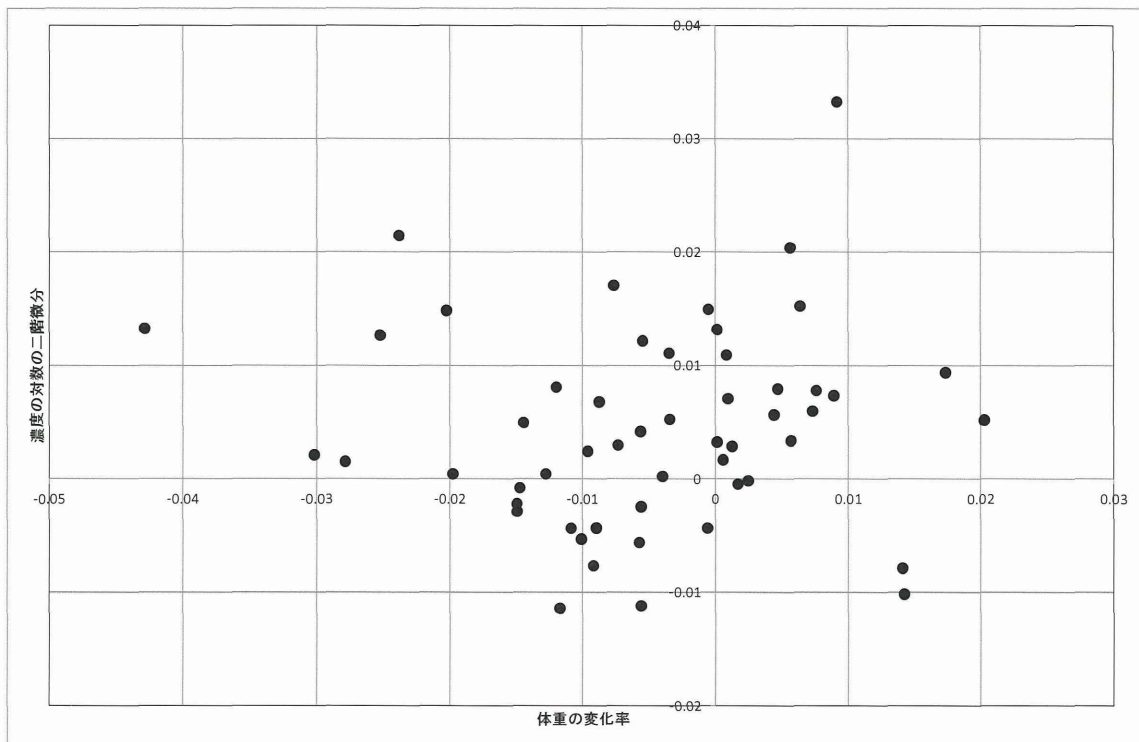
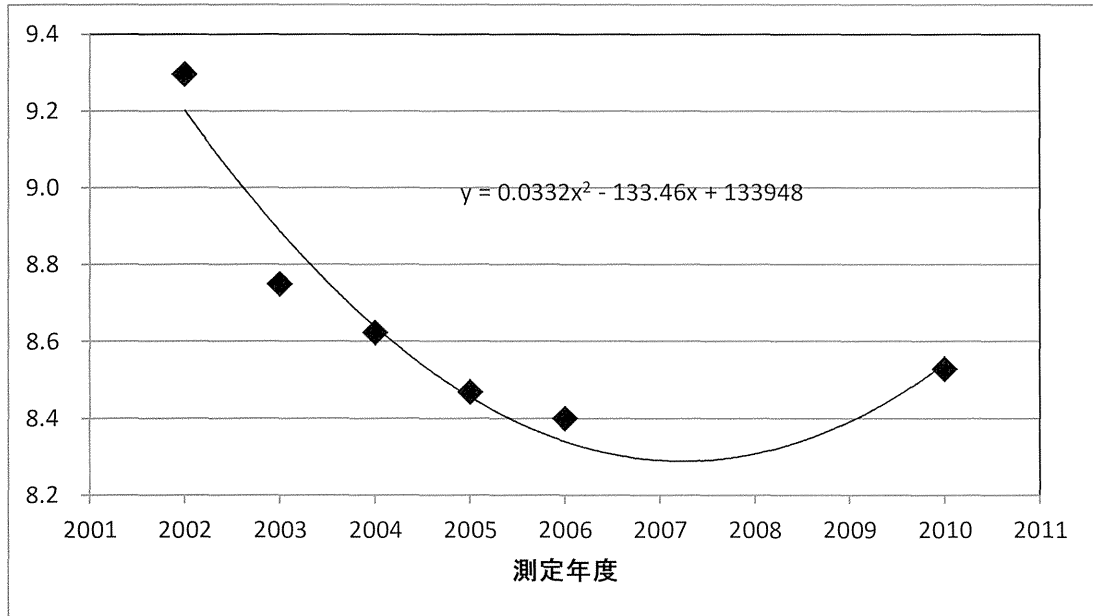


図 4 外れ値と考えられる患者の濃度の推移



分担研究報告書

ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルにおける surfactant protein についての検討

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
研究協力者	濱田 直樹	九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野	助教
	坪内 和哉	九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野	

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。麻酔と投与方法を改良し、以前より再現性が向上しており、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。同モデルにおいて surfactant protein の発現が亢進しており病態への関与が示唆された。

A. 研究目的

油症患者には、慢性的な咳、痰等の呼吸器症状が未だ認められるが、そのメカニズムはよくわかっていない。油症の主な原因物質と考えられている PCDFs をげっ歯類に投与すると、電子顕微鏡にて細気管支領域の Club (Clara) 細胞に壊死が認められることから、Club 細胞の傷害が原因のひとつと考えられているが詳細は不明である。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。これまでの検討で、マウスの肺に直接ダイオキシン類を投与することにより、気道分泌物の増加を示すモデルを作成することができたが、個体間によるばらつきが大きく、再現性が高い動物実験モデルができたとはいえなかった。よって、病態解析に使用可能なレベルの動物実験モデルを確立させることを目的とした。

肺サーファクタントは、肺胞表面を覆って肺胞の虚脱を防ぎ、呼吸を円滑に進行させている物質で、リン脂質と 4 種類の特異蛋白 Surfactant Protein (SP)-A、SP-B、SP-C、SP-D からなる。SP-B と SP-C は疎水性であるが、SP-A と SP-D は親水性であり、サーファクタントとしての役割の他に、気道-肺胞系における生体防御作用などの

機能も併せ持つ^{1) 2)}。また実際の臨床においても、血中の SP-A、SP-D 値は間質性肺炎・肺線維症や肺胞蛋白症の病勢を反映するマーカーとして活用されており、近年は慢性閉塞性肺疾患や気管支喘息における役割についても研究が進んでいる^{3) 4)}。昨年、我々は油症患者血中の SP-A、SP-D の濃度を測定し、油症患者の呼吸器症状、ダイオキシン類の濃度との関連を統計学的に解析した結果、SP-D 濃度と咳嗽、喀痰といった症状、また SP-A 濃度と一部のダイオキシン類の濃度に有意な関連が認められたことを報告した⁵⁾。今回、この動物モデルにおける surfactant protein の発現について検討した。

B. 研究方法

マウスに塩酸ケタミン、塩酸キシララジンにて全身麻酔をかけ、経気管的に Benzo[a]pyrene (BaP) を投与し、投与 5 日後に肺組織を回収し解析した。

具体的には、C57BL/6 マウス、雌、8-10 週齢に、塩酸ケタミン 80 mg/kg+塩酸キシララジン 10 mg/kg を腹腔内投与して、自発呼吸が持続する程度に全身麻酔をかけた。その後、マウスを仰臥位に固定して、頸部を小切開し、気管を露出させた。Tricaprylin で溶解した BaP を、1 匹あたり 500 μ g (50 μ l) を、24G

針にて経気管的に投与した。コントロール（対照）群には Tricaprylin を 50 μ l 投与した。投与 5 日後に肺組織を取り出して、HE 染色、Alcian blue-PAS (AB-PAS) 染色にて組織学的に評価した。またサーファクタントプロテイン (SP-A, SP-C, SP-D) について免疫組織学的に検討した。

（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

組織学的には、BaP 投与群ではコントロール群と比較して、HE 染色にて細気管支上皮細胞の増殖や細気管支の肥厚、周囲組織への炎症細胞の浸潤を認め、AB-PAS 染色では、やや太い気管支から細気管支の気道上皮細胞に PAS 陽性細胞を認めた (図 1)。

免疫組織学的には、BaP 投与群ではコントロール群と比較して、SP-D は細気管支上皮細胞や II 型肺胞上皮細胞に高発現を認めた (図 2)。SP-A は主に増殖した細気管支上皮細胞で発現の亢進が認められた (図 3)。SP-C はコントロール群、BaP 投与群とも細気管支上皮細胞での発現は認められなかったが、II 型肺胞上皮細胞での発現が認められ、BaP 投与群では、II 型肺胞上皮細胞における発現の亢進が認められた (図 4)。

D. 考察

油症患者の主な呼吸器症状は慢性気管支炎様の咳や痰であり、気道分泌物の増加に由来すると考えられている。今回の研究にてマウスに 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が、これらはムチン類の増加、すなわち気道分泌物の増加を表していると考えられ、このモデルは動物実験モデルとして有用と考えられる。ただこれまでの我々の検討では、動物疾患モデルとして確立するためには、個体間でのばらつ

きが大きいのが問題であった。この理由として、Tricaprylin で溶解した BaP は粘度が高く、マウスの気道に投与する際、または投与した後に容易に窒息すること、多数のマウスに同じ量を投与するのは、手技的に難度が高いことなどが挙げられていた。そこで今回、i) 麻酔薬を呼吸抑制が少ない薬剤に変更、ii) 投与量や麻酔時間を段階的に調整、iii) 投与経路を目視で確認しやすい気管切開後の経気管投与とする、等の改善を加え、徐々に病変の再現性が向上してきているところである。今後も更に再現性を高めるための取り組みと検討を行っていく必要があると考えている。

また、昨年、我々は油症患者血中の SP-A、SP-D の濃度を測定し、油症患者の呼吸器症状、ダイオキシン類の濃度との関連を統計学的に解析した結果、SP-D 濃度と咳嗽、喀痰といった症状、また SP-A 濃度と一部のダイオキシン類の濃度に有意な関連が認められたことを報告した⁵⁾。そこで今回改めてこの動物実験モデルを用いて、免疫組織学的に surfactant protein の発現を検討したが、SP-D、SP-A、SP-C ともコントロール群と比べて BaP 投与群で発現の亢進が認められた。近年、surfactant protein と呼吸器疾患との関連が注目されており、喫煙者や慢性閉塞性肺疾患患者では、血中や喀痰中の SP-A が有意に上昇していたという報告や⁶⁾、近年の慢性閉塞性肺疾患大規模コホート研究にて血中 SP-D 値の高い群は肺機能の低下が大きかったという報告がある⁸⁾。煙草は燃焼によりダイオキシン類が発生するが、喫煙は本邦における慢性閉塞性肺疾患の原因のほとんどを占めていることから、ダイオキシン類による肺傷害と油症患者における肺傷害、および喫煙による肺傷害には、同じようなプロセスが働いている可能性も考えられた。今後の非常に興味深い検討課題と考えている。

E. 結論

マウスに BaP 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。同モデルでは肺組織における surfactant protein の発現が亢進しており、病態への関与が考えられた。

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) Mason RJ, *et al.* Surfactant protein A and Sufactant protein D in health and disease. *Am J Physiol* 1998; 275:L1-L13.
- 2) Kishore U, *et al.* Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 2006; 43: 1293-1315.
- 3) Vestbo J, *et al.* Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points (ECLIPSE). *Eur Respir J* 2008; 31: 869-873.
- 4) Lomas DA, *et al.* Serum surfactant protein is steroid sensitive and associated with exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2009; 34: 95-102.
- 5) 中西洋一, 他. 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 25 年度総括・分担報告書: 81-86.
- 6) Nomori A, *et al.* Serum surfactant protein A levels in healthy individuals are increased in smokers. *Lung* 1998; 176: 355-361.
- 7) Mazur W, *et al.* Elevation of surfactant protein A in plasma and sputum in cigarette smokers. *Eur Respir J* 2011; 38: 277-284.
- 8) Coxson HO, *et al.* The presence and progression of emphysema in COPD as determined by CT scanning and biomarker expression: a prospective analysis from the ECLIPSE study. *Lancet Respir Med.* 2013; 1(2):129-36.
- 9) 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.

図 1 Benzo[a]pyrene 投与群

x200

a) HE 染色

b) AB-PAS 染色

→ : PAS 陽性細胞

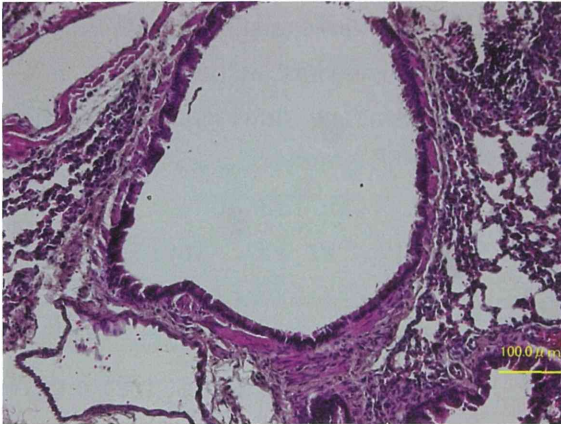


図 2 免疫組織科学染色 (SP-D)

x200

a) コントロール群

b) Benzo[a]pyrene 投与群

→ : 細気管支 ▲ : II 型肺胞上皮

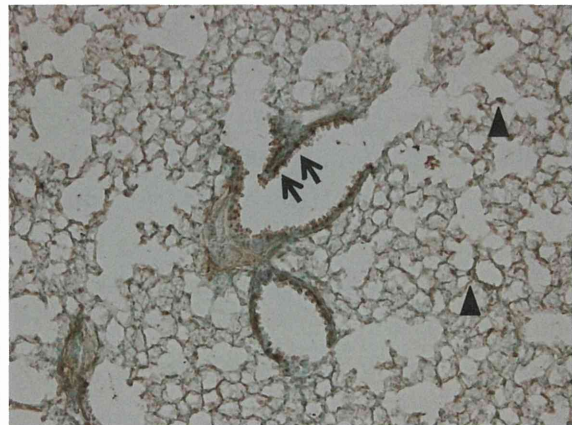
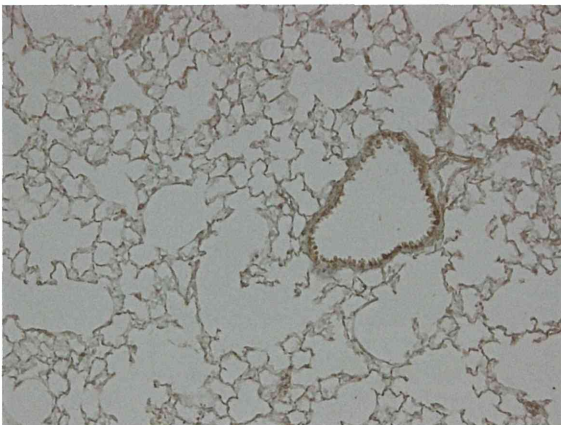


図 3 免疫組織科学染色 (SP-A) x400

a) コントロール群

b) Benzo[a]pyrene 投与群

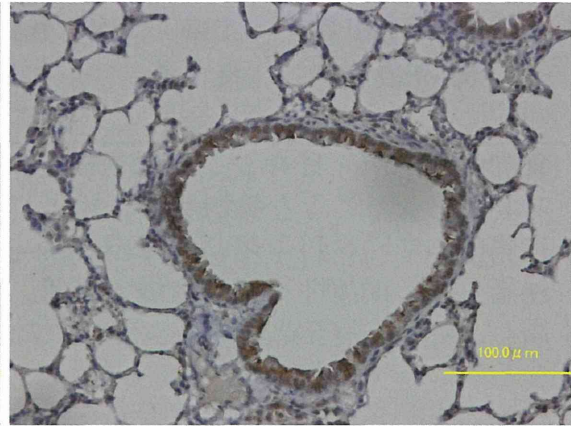
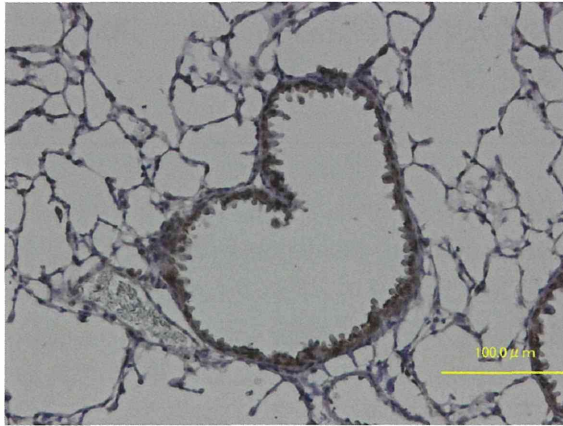
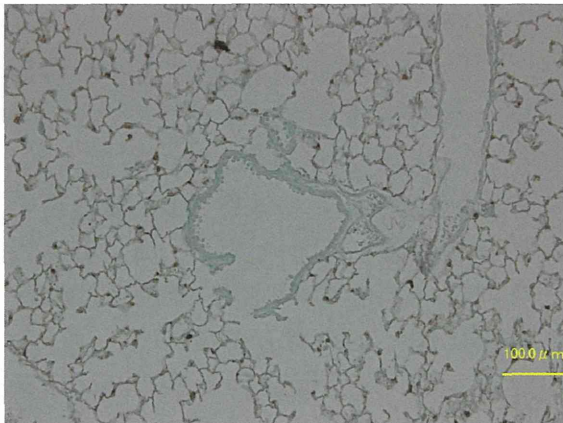


図 4 免疫組織科学染色 (SP-C) x200

a) コントロール群

b) Benzo[a]pyrene 投与群

→: II 型肺胞上皮



分担研究報告書

ダイオキシンが大腸上皮細胞に与える影響

研究分担者 江崎 幹宏 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 ダイオキシンが誘導する酸化ストレスが遺伝子突然変異を誘導する要因となることを検討するために、潰瘍性大腸炎合併大腸癌ならびに散发性大腸癌の切除材料を用いて activation-induced cytidine deaminase (AID) の発現を評価した。潰瘍性大腸炎合併大腸癌、散发性大腸癌のいずれも AID 陽性率は高く、両者で差を認めなかったが、潰瘍性大腸炎炎症部粘膜では炎症が高度になるにつれて AID 陽性率が上昇した。以上から、慢性炎症により誘導される酸化ストレスは遺伝子突然変異を誘導する一因となることが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシンが大腸癌発生のリスクか否かは未だ不明である。一方、活性酸素種による酸化ストレスは体細胞レベルでの癌原遺伝子や癌抑制遺伝子の突然変異を誘導し、発癌に至る経路が推測されている。Activation-induced cytidine deaminase (AID) はこれらの体細胞突然変異への関与が示唆されており、AID の発現は炎症関連発癌の過程で Th2 型サイトカイン (IL-4, IL-13) によって増強されることが報告されている。このような背景から、潰瘍性大腸炎における発癌に AID が関与する可能性が推測される。そこで、潰瘍性大腸炎発癌における AID の関与を検討した。

B. 研究方法

潰瘍性大腸炎合併大腸癌ならびに散发性大腸癌に対する外科的切除で得られた切除材料を検討に用いた。大腸癌、炎症部、非炎症部のパラフィン包埋された大腸切片を用いて Hematoxylin & eosin 染色を行い、腫瘍部分に対しては組織学的悪性度を評価した。また、炎症部については組織学的炎症度を評価した。次に連続切片を用いて AID と p53 の免疫組

織化学染色を行った。AID は細胞質の染色強度をもとに陰性、弱陽性、強陽性の 3 群に分類した。腫瘍組織における p53 染色性については、10%以上の陽性細胞を認めた場合に陽性として判定した。

これらの組織学的所見と免疫組織化学染色所見の関連を検討した。

C. 研究結果

AID の染色性は、潰瘍性大腸炎合併大腸癌と散发性大腸癌のいずれにおいても高く、2 群間で差を認めなかった。しかし、非炎症粘膜部における AID 陽性率と比較すると有意に高かった。一方、潰瘍性大腸炎の炎症部粘膜の AID 染色性は非炎症部粘膜に比べて有意に高かった。さらに、炎症部粘膜の AID 染色性は腫瘍部の AID 染色性と比較して明らかな差を認めなかった。

次に、潰瘍性大腸炎における組織学的炎症度と AID 染色性の関連を検討したところ、組織学的炎症高度群で、AID 強陽性率が有意に高かった。

また、腫瘍組織における AID と p53 の染色性の関連を検討したが、両者の染色性に明らかな関連を認めなかった。ただし、p53 陰性例の多くは AID 陰性であったのに対