

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

研究代表者 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 油症は polychlorinated biphenyl (PCB) と polychlorinated dibenzofuran (PCDF) の混合中毒である。2002 年度の全国検診時より PCDF を含めた血液中ダイオキシン類濃度検査が始まり、2004 年、2,3,4,7,8-PCDF に関する項目を追加した新しい診断基準を作成した。また 2012 年 12 月に国からの要請を受け、同居家族認定者に関する条件を追補した。新たに認定されたのは、2012 年度 41 名、2013 年度 4 名、2014 年度 4 名、同居家族認定は 2012 年度 171 名、2013 年度 74 名、2014 年度 14 名(2015 年 1 月末まで)で、全認定患者数は 2,277 名であった。油症患者の症状を把握し、その症状とダイオキシン類濃度や各種検査項目との関連性について解析し、ダイオキシン類が生体へ及ぼす慢性の影響を検討した。また、体内に残存するダイオキシン類の改良測定方法・排泄方法や、様々な症状を緩和する方法を開発するために基礎的研究を行った。油症の諸症状を軽減する目的でアダパレン臨床試験と治頭瘡一方内服試験を行った。認定患者追跡調査実施のための調査ファイルの基盤整備を進めた。2012 年から 2014 年度油症一斉検診を行い、内科、眼科、歯科、皮膚科受診者の情報収集・管理し、所見を把握した。2013 年度受診認定患者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の分布は 2.7~1,792 pg/g lipid と広範囲であるが、約 50% の患者は 50 pg/g lipid 以下であった。また、男性より女性の方が血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高い傾向にあった。骨密度・自己抗体検査・血中 surfactant protein・IL-26・IL-33・heat shock protein (HSP)27・可溶性 EGFR・制御性 T 細胞数など、さらに血清アディポカイン濃度・微量元素濃度についてダイオキシン類濃度との相関を検討した。ダイオキシン類の継世代影響を検討するために、次世代、次々世代の男児出生比率、アレルギー性疾患発症、ダイオキシン類受容体 (AhR) 遺伝子多型と児への健康影響との関連について検討した。油症患者の生体内におけるダイオキシン類の動態を調べるため、ダイオキシン類の体内負荷量変化率と AhR の SNP (一塩基多型) の関係、ダイオキシン類の半減期の変化と体重の変化の関係について解析した。大脳レベルの感覚認知機能の変化に関する研究を行った。基礎的研究では、1) ダイオキシンが大腸上皮細胞に与える影響についての研究、2) 各種 PCB 代謝に関する研究、3) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) による leukotriene B4 蓄積の毒性的意義の検討、4) TCDD による胎児脳下垂体ホルモンへの影響についての検討、5) 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran の *in vivo* 毒性再評価、5) ダイオキシン長期投与による末梢神経伝導速度に対する作用の解析などを行った。また患者代表者からなる油症対策委員会を開催し、研究成果の公表、および次年度の実態調査票の改正点の検討を行った。加えて、医療者向けのパンフレットを油症対策委員会で検討し作成した。

最後に研究を通じて明らかになった様々な事実については患者への広報のため、パンフレットや油症新聞とし、発行している。また論文化したものは、日本語、英語でホームページに掲載している。

A . 研究目的

PCB と PCDF の混合中毒である油症が発生して 46 年が経過した。油症は人類が PCB とダイオキシン類を直接摂取した、人類史上きわめてまれな事例である。ダイオキシン類が人体にこれほど長期間にわたって及ぼす影響については明確になっていない。2002 年度の全国一斉検診にて生体内に微量に存在する PCDF の測定が始まり 13 年が経過した。蓄積したデータを解析し、生体内でのダイオキシン類濃度の推移、油症患者の症状、検診検査項目との関連性について解析・検討を行い、これらの化学物質が油症の症状形成にいかに関与したかを確認する。

また、体内に残存するダイオキシン類の改良測定方法・排泄方法や、様々な症状を緩和する方法について開発するために、ダイオキシン類の患者生体内での半減期、代謝動態に対する解析や、基礎的研究も継続する。

(倫理面に対する配慮)

研究によって知りえた事実については患者のプライバシーに十分配慮しながら、公表可能なものは極力公表する。

B . 研究方法

1. 班長が担当する研究

1 . 班長は、九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター(以下 油症センター)センター長を兼任する。

2 . 班の総括と研究会議開催

3 . 油症検診の実施(各自治体に委託)と検診結果の全国集計

4 . 油症相談員制度

健康の問題を含め、様々な不安を抱く患者の相談を行う。また、患者に対して既往歴、症状、生活習慣の聞き取りまたは文書による調査を行う。

5 . 台湾油症との情報交換

これまでの研究を通じて得た知識を相補的に交換し、互いの患者の健康増進につとめる。また、これからの研究の方向性を議論し、よりよい研究を目指す。

6 . 情報の提供

本研究を通じて得られた知識で、情報公開可能なものについては極力情報公開につとめる。パンフレット、ホームページ、油症新聞の発行、あるいは直接書面で情報を患者に伝達した。また、患者集会で説明をする。

7 . 検診体制の見直し

患者の症状の変遷と高齢化にあわせて検診科目、検診項目を見直す。

8 . 臨床試験の解析

油症患者の様々な症状を軽減するために臨床試験を施行したが、現在その結果を解析中である。

9 . 油症対策委員会の開催

患者代表者からなる油症対策委員会を開催し、研究成果の公表および次年度の実態調査票の改正点の検討、医療者向けのパンフレット案の検討を行う。

九州大学油症治療研究班と長崎油症研究班が行う調査、治療および研究

1 . 検診を実施し、油症患者の皮膚科、眼科、内科、歯科症状について詳細な診察を行い、年次的な推移を検討する。血液検査、尿検査、骨密度検査、神経学的検査を行う。検査結果は他覚的統計手法などを用いて、統計学的に解析し、経年変化の傾向について調査する。

2 . 油症患者体内に残存する PCBs, PCQ や PCDF を含めたダイオキシン類を把握するために、血中濃度分析を行う。患者の症状、検査結果と血中ダイオキシン類濃度との相関について分析、検討する。

3 . 油症の次世代に及ぼす影響に関する検討を行う。

4 . 油症原因物質などの体外排泄促進に関する研究を行う。

5 . 油症発症機構に関する基礎的研究を行う。

C . 結果および考察

1 . 油症相談員制度

高齢化や社会的偏見により検診を受診していない患者の健康状態や近況を把握し、高齢化に伴い健康に対する不安を抱く認定患者の健

康相談を行うために、2002年に油症相談員事業を開始し、継続している。

2. 情報の提示

パンフレットの更新作成、ホームページ、あるいは直接書面にて研究内容を患者に伝達した。さらに患者への情報提供のために、油症新聞を定期的に発行した。また、これまでの研究内容をひろく知らしめることを目的として、

油症の検診と治療の手引きは、
<http://www.kyudai-derm.org/yusho/index.html> に、

油症の現況と治療の手引きは、
<http://www.kyudai-derm.org/member/index.html> に、

カネミ油症の手引きは、
<http://www.kyudai-derm.org/kanemi/index.html> に、

油症研究 30年の歩み は、
http://www.kyudai-derm.org/yusho_kenkyu/index.html に

油症研究 II 治療と研究の最前線は、
http://www.kyudai-derm.org/yusho_kenkyu/index02.html に、

1年おきに福岡医学雑誌の特集号として発行している油症研究報告集は
http://www.kyudai-derm.org/fukuoka_acta_medica/index.html に

厚生労働省科学研究費補助金による研究結果は
<http://www.kyudai-derm.org/kakenhoukoku/index.html> にそれぞれ掲載している。

3. 油症認定患者追跡調査およびデータベースの構築

研究班申請手順に従い、油症検診データ、油症患者実態調査データを許可を得て入手した。現在、データファイルの照合、油症相談員担当地区での認定患者現状調査を終了し、その結果をもとに相談員情報に基づいた油症認定患者の一元化ファイルを作成した。油症一斉検診受診者の検診電子データの維持管理及び「全国油症検診集計結果」報告を継続的に実

施している。

4. 患者の実態把握と情報発信に関する研究
カネミ油症患者の意見を伺いつつ、2012-2014年度の健康実態調査票及びカネミ油症に関する啓発パンフレット案の作成を行った。カネミ油症に関する研究と連動して、患者の実態把握と情報発信を行うことが重要と考えられた。

5. 台湾油症追跡研究の最新の知見および死因追跡調査

日本油症、台湾油症それぞれ事件発生から44年、33年経過し、死因追跡調査が進んできた。今年度、台湾油症30年後の死亡調査結果が報告された。その結果、両油症事例は、ほぼ同じ食用油にダイオキシン類が混入して患者発生を見たにもかかわらず、悪性新生物死亡など、両事例の死因追跡調査の結果は必ずしも同じでないことが観察された。

6. 地域住民における血中ダイオキシン類濃度と疾病および疾病マーカーに関する疫学調査

ダイオキシン類は細胞に酸化ストレスを与えるため、様々な病態を引き起こすと考えられている。しかしながら、ダイオキシン類による人体影響の実態は未だ不明な点が多い。本研究は、地域住民において血中ダイオキシン類濃度と様々な疾患や疾病マーカーとの関連を検討する。本年度は、次年度に疫学調査を施行するための準備として、研究計画の立案や調査場所の選定、リサーチアシスタントの教育などを行った。

7. 油症患者の臨床症状を軽減するための臨床試験

1) アダパレン臨床試験の概要

油症患者15名を対象に、尋常性痤瘡に有効であるアダパレン(ディフェリングル®)外用の効果を検討した。15名全員が12週間の外用を終了し、重大な有害事象は発生しなかった。他覚的皮膚症状重症度では、面疱は重症例ではほとんど改善を認めなかったが、中等症、

軽症では1段階程度の改善が認められた。瘡様皮疹は3例では開始時から症状を認めなかったが、多くの症例で1段階から2段階の改善を認めた。いずれも増悪した例はなかった。全般改善度では悪化した例はなく、6例で不変、その他は軽快あるいはかなり軽快と判断された。満足度はすべての質問項目で比較的高く、一定の効果を実感したことが推察された。

2) 治頭瘡一方内服試験

2013年に行った治頭瘡一方の内服試験は終了し、現在結果を解析中である。

8. 油症患者検診結果

2011年度の油症検診は、559名が受診し、認定者357名(63.9%)、未認定者202名(36.1%)であった。2012年度の福岡県における油症一斉検診時に歯科を受診した油症認定患者を対象に、辺縁性歯周炎罹患率ならびに口腔内色素沈着発現率を調べた結果、いずれも健常者に対して高い割合を示した。辺縁性歯周炎罹患率ならびに口腔内色素沈着発現率とも、女性に比べて男性で、また、高齢者より若い世代で高い値を示した。2012年度長崎県地区における検診を受診した187名中9名に顎関節症の症状が認められた。顎関節の症状として、疼痛、開口障害および顎関節雑音が認められた。発生率は4.8%で、一般の顎関節症の発症と比較しほぼ同程度の発生率であった。皮膚科検診では油症特有の症状が残存している受診者が確認された。眼科検診では、自覚症状では眼脂過多を訴えるものが多かったが、その程度は軽く、油症の影響とは考えにくかった。油症検診受診者における網膜血管の高血圧性変化及び動脈硬化性変化を評価したところ、年齢が上がると有意に網膜細動脈硬化性変化が進むという結果が得られた。また認定患者において血清中性脂肪濃度が、未認定患者において高血圧症の有無が有意に関連した。

2012年度の油症一斉検診は、664名が受診し、認定者は415名(62.5%)、未認定者は249名(37.5%)、性別では、男性は311名(46.8%)、女性は353名(53.2%)であった。年齢階級別

では、70~79歳(24.1%)が一番多く、次いで、60~69歳(21.7%)、50~59歳(21.5%)の順で、50歳以上は全体の81.6%であった。自覚症状で最も訴えが多かったのは全身倦怠感で7割以上であった。他覚所見では、肝・胆・脾エコーの有所見率が最も高かった。2013年度の福岡県における油症一斉検診で眼科の受診者は276名で、自覚症状では眼脂過多を訴えるものが多かった。

2013年度の検診受診者は746名で、50歳以上が全体の8割以上であった。自覚症状で最も訴えが多かったのは全身倦怠感で7割以上であった。他覚所見では、肝・胆・脾エコーの有所見率が最も高かった。眼科受診者は255名であり、前年度よりも21名少なかった。

9. 油症検診受診者におけるマイボーム腺欠損についての研究

1) マイボーム腺欠損の程度と年齢、及び血中PeCDF濃度

2013年度の長崎県における油症一斉検診で眼科を受診した132名について、マイボーム腺の欠損の程度をマイボスコアとして13段階にスコアリングした。マイボスコアと年齢及び血中PeCDF濃度の相関を重回帰分析で検討した。その結果、油症患者におけるマイボーム腺欠損の程度には年齢が関与するが、血中PeCDF濃度は関与しなかった。

2) マイボーム腺欠損の変化

マイボーム腺機能異常は油症に特異的な病態である。マイボーム腺欠損の経時的変化を評価し、マイボーム腺欠損の進行が血中PeCDF濃度に影響されるか検討した。その結果、油症検診受診者において血中PeCDF濃度はマイボーム腺欠損の1年間の変化に関与しなかった。

10. 油症患者における口腔内症状に関する研究

1) 唾液の性状に関する研究

油症地区における唾液の性状について検討するために、2012年度長崎県地区における検診の際に唾液を採取し分析可能であった症例についてメタボローム解析を行った。121種の

代謝産物が同定され、対照と比較して平均して2倍以上の値を示したものが38産物、うち4倍以上の値を示したものが11産物みられた。高い値を示した代謝産物のなかにはアミノ酸が多く含まれており、唾液腺細胞におけるプロテアーゼ活性の上昇との因果関係が示唆された。

2) 油症患者における口腔乾燥症に関する研究

油症の歯科検診において口腔乾燥症を訴える患者はしばしば認められる。しかしながら、実際には口腔乾燥があまり認められないにもかかわらず、口腔乾燥感を訴える場合もみられる。そこで、今回、口腔乾燥状態を客観的に調べるため口腔水分計を用いて研究を行った。長崎県地区における油症の認定者と未認定者を対象に、歯科検診時に任意に選んだ患者について測定し検討を行った。今回の結果では、測定値は23.1から31.2とばらつきはみられたが、平均値に関しては地域間や認定者未認定者間に有意な差は認められなかった。

1.1 油症患者における骨密度の解析

2010年度全国油症一斉検診の受診者489名において骨密度を測定し、ダイオキシン類濃度との関連について検討した。女性の36%、男性の4%にYAM%70未満の骨密度低下を認め、骨粗鬆症と判定された。末梢血ダイオキシン類濃度と骨密度との関連を男女別に解析すると、居住地およびbody mass indexで調整した場合、女性において1,2,3,4,6,7,8-HpCDDと骨密度(Zスコア)との間に負の関連を認めた。

1.2 カネミ油症検診者の体重減少と成長ホルモン・骨密度の関係、及びCK・アルドラーゼの経年変化について

身長、体重、橈骨遠位端の骨密度と踵の骨密度を測定し、骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ、血清骨型アルカリフォスファターゼ、尿中血清型コラーゲン架橋N-テロペプチドと血液PCB濃度、血液PCQ濃度との関係を検討した。カネミ油症検診者において、男性では低身長、低体重を認めた。PCBは踵骨

強度を低下させる可能性があるが、ソマトメジンCや成長ホルモンの関与は明らかではなかった。また、ソマトメジンCは閉経後女性の前腕骨骨密度と正の相関関係をしめしている。

1.3 油症における免疫機能に関する研究

2012年度福岡県油症検診を受診し、免疫機能検査に同意が得られた251例について抗核抗体を構成する特異自己抗体を測定し、血中PCB濃度および血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度との関連について検討した。抗セントロメア抗体を油症患者3例、観察者1例の計4例と最も多く認め、次いで抗DNA抗体を油症患者2例に認めた。抗セントロメア抗体と血中PCB濃度あるいは血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度との関連については、血中PCB低濃度群に比べ高濃度群において抗セントロメア抗体の出現を有意に高頻度に認めた。2013年度は276例について検討し、抗SS-A/Ro抗体は血中PCB高濃度油症患者において血中PCB低濃度患者と出現頻度に差をみなかったが、抗SS-B/La抗体は血中PCB高濃度油症患者のみに認められ、低濃度患者にみられなかった。2014年度は252例について検討し、抗Scl-70抗体は同居家族を含む油症患者194例中5例(2.6%)、未認定患者46例中3例(6.5%)に、抗RNAポリメラーゼ抗体は同居家族を含む油症患者4例(2.1%)、未認定患者1例(2.2%)に認め、ともに出現率に差をみなかった。

1.4 油症曝露による継世代健康影響に関する研究

1) 次世代、次々世代の男児出生比率

カネミ油症発生後に油症患者より出生した次世代、次々世代の男児の占める割合(男児出生比率)について検討した。対象は油症発生後に児を得た油症患者437例(次世代572例、次々世代344例)とした。油症患者、なかでも20歳未満で油症に曝露した患者が母親となった場合には、出生した児(次世代)の男児出生比率(男児数を男児数と女児数の和で除したものは)0.450と低い傾向($p=0.06$)を示し、さらにこの次世代が母親となった場合の児(次々

世代)の男児出生比率は0.348と一般集団の値(0.514)と比較して有意に低値(p=0.02)を示した。一方、油症に曝露した患者が父親となった場合には、次世代、次々世代の男児出生比率は一般集団と比較して差異はなかった。

2) 油症患者から出生した児のアレルギー性疾患発症に関する検討

カネミ油症発生後に油症患者(母体)から出生した児のアレルギー性疾患(気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アトピー性鼻炎)の発症と母体血中ダイオキシン類濃度との関連について検討した。油症発生後に油症患者64例より出生した児117例のなかで、気管支喘息は11例(9.4%)、アトピー性皮膚炎は16例(13.7%)、アレルギー性鼻炎は11例(9.4%)に認められた。母体の血中ダイオキシン類濃度と児の気管支喘息およびアトピー性皮膚炎の発症との関連はなかったが、母体の血中ダイオキシン類濃度が10倍増加すると児のアレルギー性鼻炎の発症リスクは0.37倍に低下する傾向(p=0.080)を示した。油症患者から出生した児では一般健常人と比較して気管支喘息有病率が高く、逆にアレルギー性鼻炎有病率は低い傾向にあることが示された。

3) 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

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。

15. 油症患者血液中のPCDF類実態調査

2011年度は、未認定者202名、油症認定患者のうち初回及び過去3年以内に測定歴の無い認定患者76名の血液中ダイオキシン類濃度を測定した。油症認定患者の平均Total TEQ(WHO2005)は73 pg/g lipid、2,3,4,7,8-PeCDF濃度の平均は110 pg/g lipidであった。

2012年度は、未認定者249名、認定患者139名の血液中ダイオキシン類濃度を測定した。油症認定患者の平均総TEQ(WHO2005)は68 pgTEQ/g lipid、2,3,4,7,8-PeCDF濃度の平均は110 pg/g lipidであった。

2013年度は、未認定者165名、認定患者219名の血液中ダイオキシン類濃度を測定した。油症認定患者の平均総TEQ(WHO2005)は53 pg TEQ/g lipid、2,3,4,7,8-PeCDF濃度の平均は83 pg/g lipidであった。今回から同居家族認定者51名が検診を受診したが、同居家族認定者の血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度の平均値は31 pg/g lipidで認定患者全体の平均値より低く、一般人とほぼ同じ値であった。2001年から2013年の13年間に血液中ダイオキシン類検査を実施した油症認定患者の実数は854名で前年度と比べ103名増加し、油症認定患者2,251名(平成25年12月末現在)の約37.9%の血液中ダイオキシン類濃度を測定した。内訳は男性403名、女性451名、平均年齢は65.1歳、血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度の平均は124 pg/g lipidであった。検診受診認定患者の血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度の分布は2.7~1,792 pg/g lipidと広範囲であるが、約55%の患者は50 pg/g lipid以下であった。また、男性より女性の方が血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度が高い傾向にあった。

16. 油症患者血液中PCB等追跡調査における分析法の改良およびその評価に関する研究

1) PCB 代謝物の分析法の改良

油症認定患者は体内のダイオキシン、PCB 濃度が高いため PCB 代謝活性が変化していると推察されている。PCB の代謝物である水酸化 (OH)PCB を測定するため血液中ダイオキシン及び PCB 類一斉分析法の精製工程を検討し、OH-PCB 類を同時に測定できる分析法を開発した。本分析法を用いて、平成 22 年度油症一斉検診の油症認定患者(総数 230 名)の一部(180 名)の血液中 OH-PCB 濃度を測定した結果、油症認定患者の血液中総 OH-PCB 濃度は一般人の約 4 倍であり、最も濃度の高い OH-PCB 異性体は 4-OH-CB187 であることが明らかになった。さらに、油症認定患者の血液中 OH-PCB とダイオキシン、PCB 類濃度との関連を解析したところ、OH-PCB と PCB 濃度には正の関係が認められたが、OH-PCB と PCDD/DF の濃度には有意な関係は認められなかった。

2) PCB 測定における検体保存期間の影響についての解析

血液中ダイオキシン、PCB 類濃度分析において採血から分析までの血液保存期間の影響を確認するため、コレステラミンなど治療研究時の脂肪やダイオキシン類濃度の測定値を用いて解析した。その結果、16 カ月程度の 4 以下の冷蔵保存では血液中脂肪やダイオキシン類濃度は変化せずに測定できていると考えられた。

1.7. 油症患者における免疫制御に関する研究(1)

1) 抑制性サイトカイン IL-35 の検討

AhR を発現する、制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) から産生され、抑制性サイトカインとして機能している IL-35 に関して検討を行った。その結果、油症認定患者 26 名、健常人 26 名において血清中 IL-35 はそれぞれ 76.0 ± 15.7 pg/ml、 51.0 ± 16.2 pg/ml と、有意差 ($p < 0.01$) をもって油症患者で高値を認められた。

2) 血中 Heat shock protein 27 の検討

高 PCB 血症を示すカネミ油症患者は PCB による酸化ストレスの影響を受けているが、酸化ストレスは Heat shock protein (Hsp) に誘導

をかけると考えられている。油症認定患者 39 名、健常人 39 名において血清 Hsp27 値は油症認定患者で 2.58 ± 0.91 ng/ml、対照群では 6.49 ± 2.14 ng/ml の値を示し有意差を認めなかった。

3) IL-26 の検討

Th17 細胞は新規のヘルパー T 細胞サブセットの一つで、その分化に Aryl hydrocarbon receptor (AhR) が関与している。Th17 細胞と深い関わりをもつサイトカインの一つである IL-26 に関して検討を行った結果、油症認定患者 29 名、健常人 28 名において血清中 IL-26 はそれぞれ 34.08 ± 30.45 pg/ml、 67.9 ± 59.7 pg/ml であり、有意差をもって油症認定患者血清中での IL-26 の減少がみられた。

4) 油症患者における IL-33 の検討

IL-1 family に属する IL-33 に関して検討を行った結果、油症認定患者 31 名、健常人 31 名において血清中 IL-33 はそれぞれ 8.758 ± 1.174 pg/ml、 6.774 ± 0.721 pg/ml であり、油症患者でやや高値であったが、有意差は認めなかった ($p = 0.155$)。

5) soluble EGFR の検討

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報告された。油症患者血清中では可溶性 EGFR (soluble EGFR) 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。

6) 末梢血リンパ球分画、Treg 細胞の検討

2014 年度長崎県油症検診(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結果、油症認定患者 53 名(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。

18. 油症患者における免疫制御に関する研究(2)

1) 油症患者における血清アディポカイン濃度に関する研究

油症患者 232 名および健常者 96 名を対象に、アディポカインである RBP4, resistin, PAI-1, IGF-1, IL-6, TNF- α の血清濃度を ELISA 法で測定した。油症患者の血清 RBP4 濃度は、健常者に較べ有意に上昇していた。一方他のアディポカイン濃度は油症患者と健常人とに差はなかった。ダイオキシン類によってアディポカインの産生バランスが障害され、油症患者の耐糖能異常に関与し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。

2) 油症患者における血清微量金属濃度に関する研究

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。

19. 油症患者における血中 Surfactant protein に関する検討

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, B, C, D からなり、中でも SP-A と SP-D は、気道-肺胞系における生体防御作用などの機能ももっており注目されている。これまでの検討で、Benzo[a]pyrene 投与マウスモデルにて SP-D がクララ細胞や Ⅱ 型肺胞上皮細胞で高発現していること示した。今回、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。

20. PCBs/ダイオキシン類の油症患者生体内動態に関する研究

1) カネミ油症患者のダイオキシン類の体内負荷量変化率と AhR の SNP の関係に関する研究

2011 年度に油症患者を対象に AhR の SNP (一塩基多型) に関する調査が実施された。ダイオキシン類は AhR と結合し、チトクローム P450 などの解毒酵素を産生することが知られている。その SNP と半減期の関係を確認した。T/T 型は人数が少なく、状況が確認できなかった。C/C 型と C/T 型間の比較では、C/T 型の患者の方が半減期が長いという結果であった。両型間での半減期の差が SNP によるものかは今後の検討が必要である。

2) 油症患者における AhR 遺伝子多型に関する研究

平成 23 年度に油症患者を対象に AhR の SNP (一塩基多型) に関する調査が実施された。ダイオキシン類は AhR と結合し、チトクローム P450 などの解毒酵素を産生することが知られている。本研究で SNPs と疾患の関係を調査したところ、T/T 型の女性の年齢分布が、男性や他の遺伝子型と異なっていた。さらに、T/T 型の女性では重篤な疾患の人数が少なかった。T/T 型の女性の年齢分布が異なるのは、既に死亡しているのではないかと推測された。

3) 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

ダイオキシン類の半減期の変化と体重の変動の関係を確認したところ、患者の体重が減少すると、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。

21. 大脳レベルの感覚認知機能の変化に関する研究

PCB, PCDF, dioxin による神経障害は感覚神経障害が主であり、末梢神経障害によるもの

と考えられている。油症患者では、末梢神経障害の客観的指標であるアキレス腱反射の低下を認める人数は経時的に減少する一方、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%と増加しており客観的感覚障害と自覚的感覚障害に乖離がある。この一因として大脳レベルの感覚認知機能の変化が考えられる。

1) 大脳認知機能の客観的評価法の開発

手触り(テクスチャー)弁別課題を用いて得られた脳磁界反応を記録することにより、大脳レベルの感覚認知機能に関わる脳活動を客観的に評価する方法を試みた。方法：対象は健康成人11名。テクスチャーを実験的に再現した刺激を用いて右母指を刺激し、テクスチャー弁別課題に伴う刺激誘発脳磁界を計測。得られた脳磁波形について解析し、電流源を推定して脳MRI上に重畳した。結果：両大脳半球に低周波(5 Hz以下)の刺激誘発脳磁界を認めた。刺激の弁別をしている時は、していない時に比べて、右頭頂部に強い脳活動を認め、これがテクスチャー弁別に参与している脳活動であると考えられた。電流源は右大脳半球の二次体性感覚野(SII)、側頭頭頂接合部(TPJ)に同定された。結論：脳磁図によって、テクスチャー弁別に関わる脳活動を同定することができた。

2) 大脳感覚認知機能の標準化解析法の開発
大脳レベルの感覚認知機能に関わる脳活動を客観的に捉え、解析する方法の標準化を行った。方法：対象は健康成人10名。テクスチャーを実験的に再現した刺激を用いて右母指を刺激し、テクスチャー弁別課題に伴う刺激誘発脳磁界を同定した。MNE法による電流源推定を行い、MRIから抽出した脳表上に重畳した。ソフトウェア(FreeSurfer)を用いて、個々人の脳表を標準脳表に形態変換し、活動部位を比較した。共通する活動部位を関心領域とし、その時系列信号を詳細に解析した。結果：刺激によって低周波(5 Hz以下)の脳磁界が誘発された。脳表の標準化を行い比較したところ、右大脳半球の二次体性感覚野(SII)に共通した活動部位を認めた。SIIの活動は、刺激の弁別をしている時はしていない時に比べ

て増大していた。結論：脳磁図による計測、MNE法とFreeSurferを用いた解析手法によって、健康者に共通するテクスチャー弁別に関わる脳領域を同定することができた。今回確立した解析手法は、油症患者と健康者の比較に有用であり、油症患者における異常感覚の病態解明への寄与が期待される。

2.2 油症発症機構とPCB/ダイオキシン類に関する基礎的検討

1) ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルの作成とその解析

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。麦門冬湯により油症患者の呼吸器症状が改善した報告を受けて、同モデルにおける麦門冬湯の効果を検討したが、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数の低下を認めたものの、効果は限定的であった。また、同モデルにおいてsurfactant proteinの発現は亢進しており病態への関与が示唆された。

2) PCB代謝に関する研究

PCB149代謝に關与する新たなチトクロムP450分子種の解明

PCBの代謝(水酸化反応)には、チトクロムP450のCYP1A、CYP2BおよびCYP2A酵素が関与することが知られている。CYP3A酵素の誘導剤(DEX)および阻害剤(KCZ)を用いてPCB149の代謝に及ぼす影響を調べた。DEX前処理ラット肝ミクロゾーム(Ms)を用いて、PCB149代謝を調べたところ、未処理Msに比べ、5-OH体の顕著な増加と4,5-diOH体の新たな生成が観察された。さらに、これら代謝物の増加は、CYP3A1タンパクの顕著な増加とよく一致した。また、阻害剤KCZを添加したところ、5-OH体と4,5-diOH体の生成が強く阻害された。これらの結果から、ラットにおけるPCB149代謝には、CYP2B1とともに、CYP3A1が関与することが示唆された。

PCB101代謝に關与する新たなチトクロムP450分子種の解明

PCB52、PCB101およびPCB149は、phenobarbital(PB)誘導性チトクロム

P450(CYP2B)により代謝され、主に meta 位が水酸化される。一方、PB は CYP2B 酵素以外にも CYP3A 酵素も誘導することが知られている。PCB101 代謝における CYP3A 酵素の関与を明らかにするため、CYP3A 誘導剤 (DEX: dexamethasone) と CYP3A 阻害剤 (KCZ: ketoconazole) の効果を調べた。PCB101 は、主に 3'-OH 体へと代謝されるが、その他 4'-OH 体と 3',4'-diOH 体も生成される。その結果、DEX 前処理ラット肝 Ms では、3'-OH 体が未処理ラット肝 Ms の 18 倍に増加し、新たに 3',4'-diOH 体の生成も見られた。次に、KCZ を添加したところ、25 μM で 3'-OH 体の生成が約 40% までに阻害された。以上の結果から、PCB101 の 3' 位水酸化において、ラット CYP2B1 だけではなくラット CYP3A1 も強く関与することが明らかになった。

2,2',3,3',4,4',5-七塩素化ビフェニル (PCB170) の動物肝ミクロゾームによる代謝
PCB170 は、PCB153、PCB180 および PCB138 とともに高残留性の PCB 異性体として知られている。PCB170 が代謝されるか否かについて、ラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム (Ms) を用いて調べた。その結果、ラットおよびヒト肝 Ms では、代謝物は全く生成されなかった。一方、モルモット肝 Ms では、phenobarbital 前処理の場合のみ、代謝物が極微量検出された。以上の結果から、PCB170 は非常に代謝されにくいことが明らかになった。また、既報を総合すると、PCB170 代謝物の化学構造は、5'-OH 体であり、モルモット肝での生成には CYP2B18 が関与していることが示唆された。

3) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) によるロイコトリエン B4 (LTB4) 蓄積の毒性学的意義の検討

肝 LTB4 蓄積機構についての検討

これまでの研究で、ラットへの (TCDD; 60 mg/kg) の経口投与が、尿・糞および組織中のメタボロームプロファイルを大きく変動させることを見出した。それらの中で肝臓のロイコトリエン B4 (LTB4) 増加に着目し、その発現機構ならびに毒性との関連性を検討した。

LTB4 の合成および代謝酵素の発現に及ぼす TCDD の影響を解析した結果、アラキドン酸を LTA4 に変換する 5-lipoxygenase (5-LOX) の誘導と、LTA4 を LTC4 に変換する LTC4 synthase の減少が観察され、これらは代表的な急性毒性である肝肥大の発現とほぼ関連した。一方、LTB4 代謝酵素である cytochrome P450 4F1 には有意な変化は観察されなかった。肝と同様な変動は肺においては観察されず、TCDD による影響は肝臓に特異性が高いことが示唆された。リガンド親和性が異なる AhR を有する二系統のマウス (C57BL/6J: 高親和性、DBA/2J: 低親和性) への TCDD 曝露による 5-LOX 発現変動を解析したところ、C57BL/6J マウスでより低用量より誘導が観察された。以上の成果から、TCDD は肝臓において AhR 依存的な 5-lipoxygenase の誘導、ならびに LTC4 synthase の減少を介して LTB4 を蓄積させ、これが肝障害の発現あるいは増悪に寄与する可能性が見出された。

さらに、LTB4 作用のマーカーである myeloperoxidase (MPO) 活性は TCDD 曝露により有意に増加し、LTB4 の肝への蓄積を支持した。続いて、LTB4 を充填した浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込むことで LTB4 を持続的に処理し、ダイオキシンと同様の毒性が生じるか否かを解析した結果、LTB4 持続注入により、肝 MPO 活性が TCDD 曝露時と同程度にまで増加し、肝において LTB4 作用が生じていることが確認された。しかし、TCDD において認められる肝肥大、胸腺萎縮ならびに体重増加抑制は LTB4 処理では出現しなかった。

LTB4 受容体 (BLT1) 遺伝子改変動物での検討

LTB4 受容体 (BLT1) 遺伝子欠損マウスへ TCDD 投与したところ、野生型マウスと同様に LTB4 合成酵素である 5-lipoxygenase の誘導が惹起し、LTB4 合成が増加していることが示唆された。しかし、野生型マウスへの TCDD 投与で見られる顕著な好中球浸潤ならびに炎症および肝障害マーカーの増大は、BLT1 欠損によって大きく抑制された。さらに、AhR の遺伝子欠損ラットを用いて、LTB4 合成酵素である 5-lipoxygenase 誘導状況を検討した結果、

野生型ラットで見られる TCDD 依存的な 5-lipoxygenase の誘導は、AhR 遺伝子欠損によって完全に消失した。以上の結果から、ダイオキシンは AhR を介する 5-lipoxygenase 誘導によって LTB4 を肝臓に蓄積させ、これが好中球浸潤による炎症亢進ひいては肝毒性を規定する一つの要因であるとの新規機構が明らかになった。

4) 油症原因物質

2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran(PenCDF) の in vivo 毒性再評価

今までに妊娠ラットへの

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)により、周産期児の脳下垂体

lutinizing hormone (LH) が低下し、これを起点として精巢の性ホルモン合成系低下ならびに成長後の交尾行動障害が惹起されることを実証した。これを受けて、油症原因物質である 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) が TCDD と同様に LH 低下を起点として交尾行動障害を惹起しうるかを検証すると共に、上記の胎児障害や急性毒性に対する 50% 効果量 (ED₅₀) および TCDD に対する相対毒性強度 (ReIE-P/T) を算出し、両種の毒性強度を正確に評価した。PenCDF

(1-1,000 mg/kg) または TCDD (0.05-60 mg/kg) 母体曝露により、胎児脳下垂体 LH および精巢・性ホルモン合成系の用量依存的な低下が観察され、この低下と合致して出生雄児の交尾行動障害が惹起された。このことから、PenCDF も TCDD と同様に胎児脳下垂体 LH 低下を起点として児の性成熟を障害することが示唆された。両ダイオキシンによる障害の ED₅₀ を基に ReIE-P/T を算出したところ、ReIE-P/T=0.016-0.06 となり、ダイオキシン毒性の評価に汎用されている毒性等価係数での PenCDF 毒性 (TEF=0.3) よりもかなり低いことが判明した。一方、急性毒性である消耗症に対しても、TCDD および PenCDF 間で予想以上の毒性差が認められたものの (ReIE-P/T=0.058-0.145)、胎児毒性に比較すると TEF に近い傾向を示した。以上の成果から、今回の指標で見ると、PenCDF も TCDD

と共通した in vivo 毒性を示すが、毒性によっては TEF との乖離が大きいことが明らかになった。

5) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)による胎児脳下垂体ホルモンへの影響:機構解析および改善方策についての検討

今までの研究で、

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)曝露により、胎児脳下垂体の黄体形成ホルモン (LH) 低下を起点として性ホルモン合成が障害され、成長後の性未成熟が固着されること、さらに、TCDD 曝露母体にクエン酸回路の必須補酵素である α -リポ酸 (LA) を補給することで、胎児視床下部におけるクエン酸回路の停滞および ATP 減少のみならず、上記の LH 低下も回復することが明らかになっている。しかし、LA による LH 低下の回復機構は不明である。そこで本研究では、LA と同様にクエン酸回路の必須補酵素である thiamine を用いて、LA による回復機構におけるエネルギー産生低下の寄与を検討した。その結果、TCDD による ATP 産生低下は、胎児視床下部および全脳において認められたが、TCDD 曝露母体への thiamine の補給によって LA 同様に改善することが明らかになった。しかし、胎児 LH ならびに性ホルモン合成系に対しては、thiamine 補給は部分的な回復効果を示すに止まった。これらの結果から、胎児 LH 低下に対する LA の回復機構は、ATP 増加と LA 特異的機能の複合的な作用に基づくことが示唆された。さらに、胎児脳の LA 低下の機構解析のため、合成ならびに利用に関わる酵素の発現水準を検討した結果、いずれの発現にも影響を認めなかった。従って、少なくとも TCDD はこれらの酵素の変動以外によって LA を減少させ、LH 低下を惹起することが示された。

6) ダイオキシンが大腸上皮細胞に与える影響

ダイオキシンが大腸上皮細胞に与える影響を研究するための基礎実験を行った。1) 大腸

癌の化学予防効果を有するスリダクは、ヒト結腸癌由来細胞株 HCT-116 の増殖を抑制すること、細胞周期の G0/G1 期へ拘束されること、さらにこれらの作用が Wnt/ カテニン系への影響を介することが確認できた。2) HCT-116 ならびに MUTYH 関連ポリポーシスモデルを用いて大腸癌に対する化学予防効果を有する celecoxib と 2,5-dimethyl-celecoxib (DMC) の腫瘍抑制効果を検討した。両薬剤は Wnt/ カテニン系を介した細胞増殖抑制とアポトーシス亢進により腫瘍抑制効果を発揮した。さらには MUTYH 関連ポリポーシスモデルにおいて腫瘍数ならびに腫瘍径が抑制されることを確認した。3) 潰瘍性大腸炎合併大腸癌ならびに散発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、散発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。

7) ダイオキシンによる末梢神経伝達機能、および脊髄後角シナプス応答に対する作用機序の解析

1) ダイオキシンの慢性投与によって、ラット末梢神経のなかで触覚などの情報を伝える Ab 線維の伝導速度は減弱したが、脊髄内膠様質でのシナプス応答には顕著な変化が見られなかった。2) ダイオキシンを単回投与したラットの Ab 線維では伝導速度の有意な低下が見られた。この低下は長期投与を行ったラットと有意な差は見られなかった。さらに、Ab および C 線維の伝導速度について比較したが有意な差は見られなかった。3) ダイオキシンの経口投与によって、ラット末梢神経の太い有髄線維の伝導速度が選択的に抑制された。また、その作用は長期に渡り回復はあまり見られなかった。しかし、脊髄内での可塑性な変化は見いだし得なかった。

23. 油症対策委員会の開催

2010 年度から患者代表者からなる油症対策委員会を開催し、研究成果の公表および次年度の実態調査票の改正点の検討を行った。加えて、医療者向けのパンフレットを油症対策委員会で検討し作成した。

D. 結論

検診結果では、全科とも患者の高齢化に伴い、油症特有の症状に加齢による影響が伴っていた。血中ダイオキシン類濃度測定が開始してから 14 年経過し、結果の蓄積、解析が進んでいる。2012 年度から 2014 年度は、ダイオキシン類濃度と骨密度・自己抗体検査・血中 Surfactant Protein・IL-26・IL-33 などサイトカイン・HSP27・制御性 T 細胞数、および血清アディポカイン濃度・微量金属濃度との相関について検討を行った。

ダイオキシン類の継世代への影響を検討するために、次世代、次々世代の男児出生比率についての解析、次世代のアレルギー性疾患発症、AhR 遺伝子多型と児への健康影響との関連について検討した。油症患者の生体内におけるダイオキシン類の動態を調べるため、ダイオキシン類の体内負荷量変化率と AhR の SNP (一塩基多型) の関係、ダイオキシン類の半減期の変化と体重の変化の関係についても解析を進めている。

基礎的研究では、ダイオキシンが大腸上皮細胞に与える影響、2) 各種 PCB 代謝、3) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による leukotriene B4 蓄積の毒性学的意義の検討、4) 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran の *in vivo* 毒性再評価、5) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による胎児脳下垂体ホルモンへの影響についての検討、6) ダイオキシン長期投与による末梢神経伝導速度に対する作用の解析などについて、知見が集積してきている。

このように、継続的に油症患者の臨床症状を把握しダイオキシン類濃度との関連を分析・評価、また基礎研究でダイオキシンが生体に及ぼす影響・作用機序を研究することにより、総合的にダイオキシン類(短期・長期)

暴露による影響の解明、また新しい治療薬の
発見・開発につながると考える。

E . 健康危険情報

なし。