

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 油症患者におけるダイオキシン類の曝露量ならびに遺伝的感受性と男児出生割合との関連-

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 カネミ油症患者におけるダイオキシン類の曝露量ならびに遺伝的感受性と次世代・次々世代における男児出生割合との関連について検討した。油症発生後に妊娠・出産となった 59 例(142 妊娠)を対象とし、ダイオキシン類の曝露量として分娩時の血中ダイオキシン類推定濃度を、また遺伝的感受性としてダイオキシン類受容体(AhR)遺伝子多型(130bp C/T 一塩基多型)を解析した。その結果、油症患者より出生した女系の次々世代では、男児出生割合が 0.38 と低下する傾向が示された。また、母体の分娩時血中ダイオキシン類推定濃度、なかでも 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高い場合には次世代の男児出生割合が低下することが示された。一方、母体の AhR 遺伝子多型と次世代および次々世代の男児出生割合との間に明らかな傾向はみられなかった。これらの成績から、カネミ油症発生後に油症患者より出生した女系の次世代、次々世代では男児出生割合が低下する継代的な健康影響が生じている可能性があること、この機序には母体が曝露したダイオキシン類の量的な問題が関与していることが示唆された。

A . 研究目的

ダイオキシン類などの化学物質曝露が次世代の健康にどのような影響をいかに及ぼすのかという継代的な健康影響とその発現機序に世界的な関心が高まっている。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¹⁾、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²⁾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、油症患者で観察された次世代、次々世代における男児出生割合の低下をきたす機序を明らかにするこ

とを目的として、油症患者におけるダイオキシン類の曝露量ならびに遺伝的感受性と男児出生割合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)を対象とした。

調査方法：

アンケート調査：対象群 59 例(142 妊娠)の妊娠・分娩情報(経妊経産回数、分娩時年齢、分娩日、分娩時妊娠週数、魚介類摂取回数)と出生児の性別を得た。

ダイオキシン類曝露量の解析：対象群 59 例より血液を採取し、大量試料注入装置(アイスティサイエンス製 LVI-S200)付

き高分解能ガスクロマトグラフ / 高分解能質量分析計 (Agilent 6890 / Micromass AutoSpec Premier、HRGC/HRMS) を用いて、7 種類のポリ塩化ジベンゾパラジオキシン (PCDDs)、10 種類のポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs) および 4 種類の non-ortho ポリ塩化ビフェニル (non-ortho PCBs) を測定した。ダイオキシン類曝露量の指標には、分娩時の血中ダイオキシン類濃度を用い、検査時血中濃度 $\times 2$ [分娩から血液検体採取までの期間 (年) / ダイオキシン類の半減期 (年)] の式を用いて推定した。

遺伝的感受性の解析：対象群 59 例より血液を採取し、リンパ球を分離した後、DNA を抽出し、ダイオキシン類受容体 (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：

～ の調査結果をもとにカネミ油症患者における男児出生割合と母体分娩時の血中ダイオキシン類推定濃度および母体 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、Student t-検定、Mann-Whitney U-検定、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

油症次世代、次々世代における男児出生割合：

油症患者 49 例 (100 妊娠) において出生児 (次世代) の性別のデータが得られた。また次世代 31 例 (49 妊娠) において出生児 (次々世代) の性別のデータが得られた。

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 (表 1)。また、次々世代における男児出生割合は 0.51 と次世代より低下し、なかでも女系 (母親) 曝露では男児出生割合は 0.38 とさらに低下したが、general population の割合と比較して有意な差はなかった。

男児出生割合と母体分娩時血中ダイオキシン類推定濃度との関連：

油症患者 43 例 (90 妊娠) において出生児 (次世代) の性別および母体血中ダイオキシン類濃度のデータが得られた。

油症発生後に女兒を出生した油症患者における分娩時の総ダイオキシン類血中推定濃度、総 PCDFs 血中推定濃度、および 2,3,4,7,8-PeCDF 血中推定濃度は男児を出生した群の値と比して高い値を示したが、有意な差はなかった (表 2)。

一方、各々の分娩時ダイオキシン類血中推定濃度と児の性別のデータから ROC 曲線 (Receiver Operatorating Characteristic curve) を描き、左上隅から最も近い点をカットオフ値として求めると、各々のカットオフ値 (AUC : Area Under the Curve) は、総ダイオキシン類では 614 TEQ pg/g lipid (0.590)、総 PCDDs では 212 TEQ pg/g lipid (0.553)、総 PCDFs では 274 TEQ pg/g lipid (0.591)、総 non-ortho PCBs では 38 TEQ pg/g lipid (0.560)、2,3,4,7,8-PeCDF では 252 TEQ pg/g lipid (0.592) であった。各々のカットオフ値以上の群とカットオフ値未満の群との間で男児出生割合を比較すると、総ダイオキシン類血中推定濃度、総 PCDFs 血中推定濃度および 2,3,4,7,8-PeCDF 血中推定濃度におけるカットオフ値以上の群ではカットオフ値未満の群と比較して男児出生割合が有意に低値を示した (表 3)。

男児出生割合と母体-130bpAhR 遺伝子多型との関連：

油症患者 49 例(100 妊娠)において出生児(次世代)の性別および母体 AhR 遺伝子多型のデータが得られた。また次世代 31 例(49 妊娠)において出生児(次々世代)の性別および母体 AhR 遺伝子多型のデータが得られた。

各 AhR 遺伝子型(C/C、C/T、T/T)における次世代および次々世代の男児出生割合を検討すると、各々の AhR 遺伝子型において男児出生割合は次世代、次々世代ともに general population の割合と比べて有意な差はなかった(表 4)。また、次世代および次々世代の性別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(図 1)。

D . 考察

これまでの油症曝露による次世代、次々世代への健康影響の観察から、母親が 20 歳未満で油症に曝露した場合、出生した児(次世代)の男児出生割合は 0.450 で一般集団の割合(0.514)と比較して低い傾向($p=0.06$)を示すこと、さらにこの次世代が母親となった場合には出生児(次々世代)の男児出生割合は 0.348 と一般集団と比較して有意に低値を示すことを報告した²⁾。今回の検討でも、女系油症曝露では次々世代における男児出生割合は 0.38 と低下していたが、統計学的に有意差はなかった。今回統計学的に有意差がでなかった要因としては、母親が 20 歳以上で油症に曝露した症例も対象としたこと、また油症女性患者 216 例を対象とした過去の報告²⁾に比較して症例数が少なかったことが挙げられる。また、今回の検討では、母体の分娩時血中ダイオキシン類推定濃度、なかでも 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高い場合には次世代の男児出生割合が低下することが示された。一方、母体の AhR 遺伝子多型と次

世代および次々世代の男児出生割合との間に明らかな傾向はみられなかった。これらの成績から、カネミ油症発生後に油症患者より出生した女系の次世代、次々世代では男児出生割合が低下する継代的な健康影響が生じている可能性があること、この機序には母体が曝露したダイオキシン類の量的な問題が関与していることが示唆された。

児の性の決定には受精時の母体の性ホルモン状態が影響を及ぼすことが報告されている³⁾。すなわち、受精時に母体の高エストロゲン状態、高アンドロゲン状態では男児が増加する。ダイオキシン類は抗エストロゲン作用や抗アンドロゲン作用を有することが知られている⁴⁾。油症女性患者においては、2,3,4,7,8-PeCDF 血中濃度が高い症例では、血中エストロゲン濃度が低下していることが報告されている⁵⁾。これらの報告から、女性が高濃度のダイオキシン類に曝露した場合には、血中エストロゲン濃度が低下し、妊娠時には女児が生まれやすい母体の性ホルモン状態となり、その結果次世代の男児の出生割合が低下することが示唆された。

一方、油症患者より出生した児におけるダイオキシン類の血中総ダイオキシン類濃度は油症患者(母親)の約 13% で、正常健康人の値と有意な差はないこと、なかでも、油症患者(母親)における 2,3,4,7,8-PeCDF の血中濃度は正常健康人の値の約 30 倍の高値を示したが、児の血中濃度は母親の約 4% で、正常健康人の値と有意な差はないことが報告されている⁶⁾。このことから、女系の油症次世代においては、血中ダイオキシン類濃度が正常にも関わらず、出産した次々世代の男児の出生割合が低下していることが推察される。ラットを用いた動物実験では、TCDD 曝露により次世代の雌においても血中エストロゲン濃度の低下、卵胞刺激ホルモン(FSH)濃度の上昇をきたすことが報告されている⁷⁾。また、ラット

やマウスでは、ダイオキシン類などの環境ホルモンの曝露により卵巣のエストロゲン受容体のエピジェネティックな変化をきたし、継世代的な生殖機能の障害を引き起こすことが報告されている⁸⁾。これらの成績から、油症患者より出生した次世代では、胎児期に母体から移行するダイオキシン類曝露を受けることにより性ホルモン異常やエピジェネティックな遺伝子発現制御の破綻をきたし、この次世代が妊娠する時には女兒が生まれやすい性ホルモン状態となり、その結果次々世代の男児の出生割合が低下することが示唆された。

今後、このカネミ油症曝露による男児出生割合が低下する機序を明らかにするとともに、カネミ油症発症後に油症患者から出生した次世代のみならず、その次々世代においても健康状態を注意深く見守ることが重要であると考えられた。

E . 結論

カネミ油症発生後に油症患者より出生した女系の次世代、次々世代では男児出生割合が低下する継世代的な健康影響が生じている可能性があること、この機序には母体が曝露したダイオキシン類の量的な問題が関与していることが示唆された。

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) 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.
- 2) Tsukimori K, et al. Sex ratio in two generations of the Yusho cohort. *Epidemiology* 23(2):349-350, 2012.
- 3) James WH. Evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels around the time of conception. *J Endocrinol* 198(1); 3-15, 2008.
- 4) Ulbrich B, Stahlmann R. Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data. *Arch Toxicol.* 78(5):252-268, 2004.
- 5) 辻博、池田正春 . 油症における性腺機能の検討 . 福岡医学雑誌 98(5);166-169, 2007.
- 6) Tsukimori K, et al. Comparison of the concentrations of polychlorinated biphenyls and dioxins in mothers affected by the Yusho incident and their children. *Chemosphere.* 84(7):928-935, 2011.
- 7) Myllymäki SA, et al. In utero and lactational exposure to TCDD; steroidogenic outcomes differ in male and female rat pups. *Toxicol Sci.* 88(2):534-544, 2005.
- 8) Zama AM and Uzumcu M. Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: an ovarian perspective. *Front Neuroendocrinol* 31(4):420-439, 2010.

表 1 油症次世代、次々世代における男児出生割合

男児出生割合	油症次世代				油症次々世代	
	総数	発生から10年間	発生から10-20年	発生から20年以降	総数	女系曝露
%(n/N)	0.55(55/100)	0.60(35/58)	0.45(13/29)	0.54(7/13)	0.51(25/49)	0.38(6/16)
OR(95%CI)	1.16(0.66-2.01)	1.44(0.69-3.00)	0.77(0.27-2.16)	1.10(0.24-5.15)	0.98(0.45-2.17)	0.57(0.14-2.32)
p value	p=0.671	p=0.455	p=0.793	p=1.000	p=1.000	p=0.722

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 油症患者から出生した児の性別と母体分娩時血中ダイオキシン類推定濃度(TEQ pg/g lipid)との関連

ダイオキシン類	男児 (n=51)	女児 (n=39)
Total TEQ (TEQ pg/g lipid)		
Mean	985.1	1447.5
SD	1261.7	1819.2
p value	0.179	
Total PCDDs (TEQ pg/g lipid)		
Mean	299.6	351.8
SD	285.8	309.3
p value	0.414	
Total PCDFs (TEQ pg/g lipid)		
Mean	588.6	979.2
SD	1008.3	1501.0
p value	0.166	
Total non-ortho PCBs (TEQ pg/g lipid)		
Mean	45.0	54.4
SD	33.7	37.6
p value	0.219	
2,3,4,7,8-PeCDF (TEQ pg/g lipid)		
Mean	519.2	864.3
SD	901.3	1334.2
p value	0.169	

表 3 母体ダイオキシン類曝露量と男児出生割合との関連

ダイオキシン類	血中濃度 (TEQ pg/g lipid)	男児出生割合 (Male/Female)
Total TEQ		
	> 614	0.446(21/26)
	< 614	0.698(30/13)
	p value	0.020
Total PCDDs		
	> 212	0.510(26/25)
	< 212	0.641(25/14)
	p value	0.284
Total PCDFs		
	> 274	0.429(18/24)
	< 274	0.688(33/15)
	p value	0.019
Total non-ortho PCBs		
	> 38	0.488(21/22)
	< 38	0.638(30/17)
	p value	0.202
2,3,4,7,8-PeCDF		
	> 252	0.429(18/24)
	< 252	0.688(33/15)
	p value	0.019

表 4 母体-130bpAhR 遺伝型における男児出生割合

AhR SNP	男児出生割合	次世代				油症次々世代	
		総数	発生から10年間	発生から10-20年	発生から20年以降	総数	女系曝露
C/C	%(n/N)	0.51(20/39)	0.52(11/21)	0.46(6/13)	0.60(3/5)	0.44(12/27)	0.40(4/10)
	OR(95%CI)	0.99(0.41-2.42)	1.04(0.31-3.49)	0.81(0.17-3.78)	1.42(0.12-17.37)	0.76(0.26-2.21)	0.63(0.11-3.71)
	p value	p=1.000	p=1.000	p=1.000	p=1.000	p=0.786	p=1.000
C/T	%(n/N)	0.57(27/47)	0.65(20/31)	0.46(6/13)	0.33(1/3)	0.56(9/16)	0.40(2/5)
	OR(95%CI)	1.28(0.57-2.88)	1.72(0.62-4.76)	0.81(0.17-3.78)	0.47(0.02-12.81)	1.22(0.30-4.89)	0.63(0.05-7.72)
	p value	p=0.679	p=0.440	p=1.000	p=0.950	p=1.000	p=0.996
T/T	%(n/N)	0.57(8/14)	0.67(4/6)	0.33(1/3)	0.60(3/5)	0.67(4/6)	0(0/1)
	OR(95%CI)	1.26(0.28-5.59)	1.89(0.18-19.50)	0.47(0.02-12.81)	1.42(0.12-17.37)	1.89(0.18-19.50)	NA
	p value	p=1.000	p=0.992	p=0.950	p=1.000	p=0.992	p=0.500

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

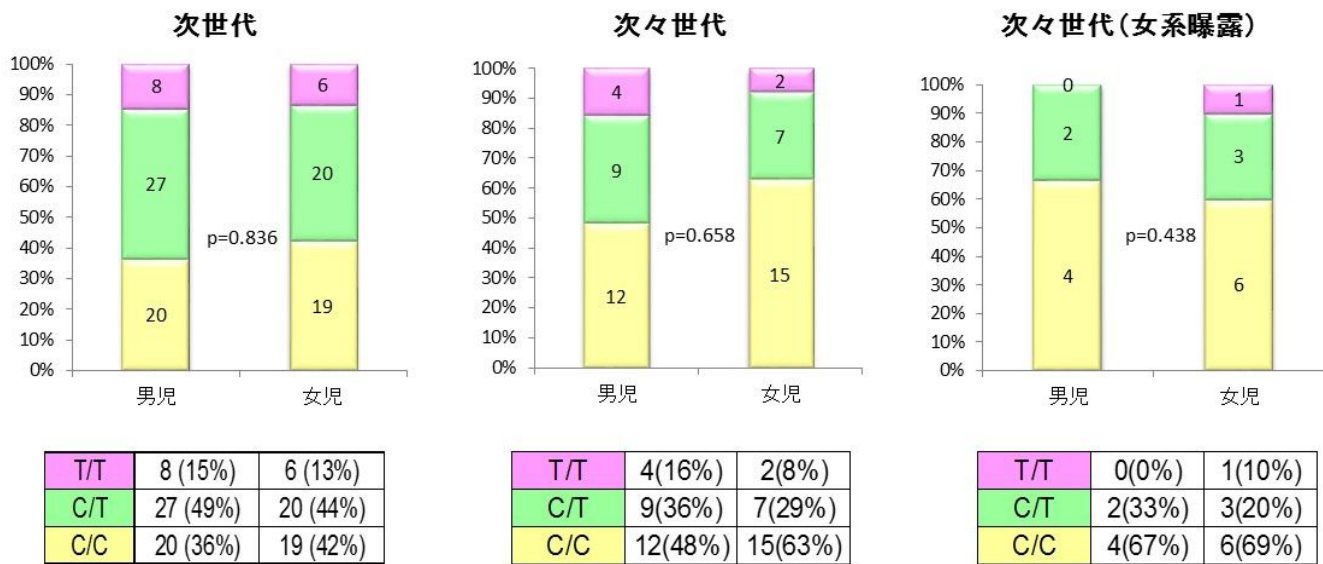


図 1 次世代、次々世代の性別と母体-130bpAhR 遺伝子多型の頻度