

## 総合研究報告書

### 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

【背景】油症は PCB 類、ダイオキシン・ダイオキシン類似化合物（以下、ダイオキシン類）を経口摂取したことにより生じた稀有な事例である。これらの化合物が生体に及ぼす影響については明らかになっていない。

【目的】ダイオキシン類が生体に及ぼす慢性影響を把握し、油症患者に残存する症状を緩和する方法を開発することにある。

#### 【結果の概要】

##### （１）臨床的追跡研究

油症検診における経年的な患者の症状、所見、血液中ダイオキシン類濃度の推移を検証した。多くの患者において油症特有の症状は軽快しているものの、加齢に伴う影響がみられた。血液中ダイオキシン類濃度は緩徐ながら減少し、約 60%の患者で主たる異性体である 2,3,4,7,8-PeCDF の血液中濃度は 50 pg/g lipid 未満であった。ダイオキシン類曝露は甲状腺ホルモンの低下、甲状腺自己抗体の出現、CD8 陽性細胞の低下など、免疫機能異常を惹起する可能性が示された。

##### （２）油症患者の支援と治療研究の推進

血液中ダイオキシン類濃度測定に使用している高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計、SCLV の代替システムにおいても同様の精度、再現性が確認された。油症特有の神経症状を客観的に評価できる安静時機能的 MRI の解析法を確立することができた。コレステリド臨床試験に参加した患者血液中 PCB と 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は、内服前後で変化しなかった。平成 27 年度に実施した桂枝茯苓丸臨床試験では、全身倦怠感や皮膚、呼吸器症状の改善、QOL の向上、血清一酸化窒素の産生増加がみられた。

##### （３）疫学的・基礎的研究

<疫学的研究>平成 27 年度に、地域住民 495 名（平均年齢 62 歳）を対象に断面調査を実施し、心血管病や悪性疾患、生活習慣病などの有病率調査、血液中ダイオキシン類濃度、および疾病マーカーの測定を行った。その結果、血液中 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度は中央値で 10.5 pg/g lipid だった。また、血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の上昇に伴い、肝・胆道系機能マーカーの平均値は有意に上昇したが基準値の範囲内であった。継世代へのダイオキシン類曝露の影響を調べた。正常妊娠における検証では、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、臍帯血への移行はダイオキシン類の TEF 値とは関係なく PCDD 類が最も移行しやすいこと、胎脂が主たる排泄経路であること、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こと、胎児期におけるダイオキシン類曝露は、油症 2 世の卵巣の予備能に影響を及ぼすことが初めて明らかになった。2,3,4,7,8-PeCDF の濃度別、生年別に、半減期と半減期の変化を確認した。その結果、油症発生以降に生まれた患者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は低く、増加している傾向がみられた。また、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が 10 ~ 20 pg/g lipid の患者、多くは直接曝露した患者だが、濃度は平衡状態に低濃度の側から近付いていることが推測された。血液中ダイオキシン類各異性体の濃度変化と症状の変化の相関について解析したところ、男性では 1,2,3,7,8-PeCDF と赤血球数の変化、女性では Total PCDD と総ビリルビンの変化との間に相関係数 0.6 以下の弱い相関がみられた。

<基礎的研究>ダイオキシン類の生体内動態、毒性、次世代への影響、治療薬の探索を行った。ベンゾピレン投与による油症肺傷害モデルマウスを作成した。肺サーファ

クタンタン蛋白 (SP-D) 遺伝子欠損マウスを用いた検証により、SP-D がベンゾピレンに対して肺保護作用を有することが分かった。ベンゾピレン投与ラットを用いて、油症特有の神経障害の機序について行った。ダイオキシンと同様にベンゾピレンも触・圧覚を伝える A 線維の活動電位の伝導速度を選択的に低下することで、感覚の鈍麻等を引き起す可能性が示唆された。PCB 異性体の生体内での代謝を検証した。患者に高濃度で検出される PCB156 の代謝物は検出されず、代謝されにくいこと、生体内で代謝されにくいとされる 2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体のうち、PCB182、PCB188 は代謝されやすいことが分かった。強い毒性を持つ 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の胎児期曝露による影響を検証している。TCDD は胎児の aryl hydrocarbon receptor (AHR) を介して下垂体ホルモン合成が低下させ、成長後に性未成熟等の発育障害を惹起すること、オス胎児の成長ホルモン発現抑制には母体の AHR も寄与すること、出生児脳において双極性 GnRH ニューロンの選択的な減少が生じることが明らかになった。また、TCDD の毒性に拮抗する作用を有する薬剤の開発を行っている。TCDD は AMPK 活性化に基づいてゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 受容体については LH 合成を低下させ、リポ酸はこれに拮抗する可能性が考えられた。TCDD の 4 つの塩素原子をフッ素原子に置換した 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD) を合成した。TFDD には TCDD のような毒性作用はなく、培養細胞において TCDD の AHR 活性作用に拮抗した。そこで、TCDD の母体曝露による胎児の脳下垂体ホルモン合成低下に対する TFDD の拮抗作用を検討した。TCDD により胎児脳下垂体における黄体形成ホルモン (LH)、成長ホルモン (GH) の発現は低下ないし低下傾向を示すが、TFDD を 1 日 1 回 TFDD を経口投与しても回復しなかった。油症の治療につながる生薬を探索している。漢方薬、生薬でスクリーニングを行い、ケイヒの主成分であるシンナムアルデヒドや、紫蘇の成分、ペリルアルデヒドにダイオキシン類の毒性に拮抗し、抗酸化作用があることが明らかになった。

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 とダイオキシンおよびダイオキシン類似化合物 (以下、ダイオキシン類) の混合中毒である油症が発生して 50 年が経過した。ダイオキシン類は人類への影響が懸念される、環境汚染物資でもある。患者生体内に長期間残存するダイオキシン類がどのような影響を及ぼしているかについては明らかでない。本研究の目的は、ダイオキシン類が生体に及ぼす慢性影響を把握し、患者に残存する症状を緩和する方法を開発することにある。

(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. 班の総括と研究班会議開催
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・相談支援員制度  
2002 年に患者が集中する長崎県、福岡県、広島県に油症相談員を配置した。また、その他の自治体に居住する患者の要望にも応えるべく、2016 年に油症相談支援員制度を施行した。相談員、相談支援員は、健康の問題を含めた様々な患者の相談を受ける。また、患者に対して既往歴、症状、生活習慣等の聞き取りまたは文書による調査を行う。
5. 死因・次世代調査  
ダイオキシンの生体への影響、継世代への

影響を検証する。

#### 6. 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。

#### 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. 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。

#### 9. 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、あるいは書面で公表し、油症対策委員会で患者代表者に説明を行う。

### 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 PCB、PCQ やダイオキシン類の生体内動態を把握するために、血中濃度分析を行う。患者の症状、検査結果にいかにかに寄与しているかについても分析、検討する。

3. 九州大学大学院医学研究院附属総合コホートセンターが一般住民対象に行う環境調査に協力し、一般対照群と患者の疾患、症状、血液中ダイオキシン類濃度を比較し、ダイオキシン類の慢性影響を明確にする。

4. 油症が継世代に及ぼす影響について検討する。

5. PCB やダイオキシン類の体内動態を明らかにする。

6. 基礎的研究を行い、PCB やダイオキシン類の慢性毒性の機序の解明、およびダイオキシン類の毒性を緩和しうる薬剤の探索を行う。

#### 7. 臨床試験の実施

油症患者の様々な症状を軽減するための臨床試験を施行する。

### C. 結果および考察

#### 1. 油症相談員・相談支援員制度

高齢化や社会的偏見により検診を受診していない患者を含め、認定患者の健康相談を行っている。また、定期的に九州大学油症センターにおいて相談支援員を対象にした勉強会を開催し、情報共有に努めている。

#### 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](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](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](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. 患者の実態把握と情報発信に関する研究

今年度の油症研究班の成果を患者団体に公表し、意見、要望を伺った。また、意見を基に次年度の健康実態調査票の改善を行った。

### 4. 臨床的追跡研究

#### 4 - 1. 油症患者検診結果

2014年から2016年度、それぞれ実施された油症検診受診者の傾向把握のため、検診票を収集し集計を行った。検診受診者は703名、644名、653名で、50歳以上は84.8%、86.5%、88.4%と高齢化が進んでいた。自覚症状で最も訴えが多かったのは全身倦怠感で約70%を占めた。また、他覚所見では、いずれの年度も肝・胆・脾エコーの有所見率が約70%と最も高かった。

#### 4 - 2. 福岡県検診における眼科的所見

1) 平成27年度福岡県検診における眼科受診者245名(患者201名・未認定者44名)を対象に眼科的所見を検討した。自覚症状では眼脂過多を訴える者が多かったが、その程度は軽い者がほとんどであった。他覚所見として慢性期の特徴的眼症状である眼瞼結膜色素沈着は明らかではなかった。全ての検査を施行し、除外項目に該当しなかった127名の所見を解析したところ、2014年に発表されたドライアイ診断基準におけるドライアイ確定例が65名(51.2%)、ドライアイ疑い例が3名(2.4%)だった。ドライアイは高齢の影響もあるため、油症との関連性についてはさらなる解析が必要である。

2) 平成28年度福岡県検診では223名、平成29年度は239名を対象に、眼科的所見を検討した。いずれの年度においても

自覚症状では眼脂過多を訴えるものが多かったが、その程度は軽かった。他覚所見として眼瞼結膜色素沈着と瞼板腺チーズ様分泌物が少数にみられた。

#### 4 - 3. 長崎県検診における眼科的所見

##### 1) マイボーム腺欠損の2年間の変化

マイボーム腺機能異常は油症に特異的な病態である。平成27年度、長崎県検診受診者を対象にマイボーム腺欠損の経時的変化を評価し、血中PeCDF濃度がマイボーム腺欠損の進行に影響するかどうか検討した結果、患者血液中PeCDF濃度はマイボーム腺欠損の2年間の変化には関与しなかった。

##### 2) 加齢黄斑変性の有無についての検証

平成28年度長崎県検診を受診した195名を対象に、酸化ストレス等が原因になるとされる加齢黄斑変性の有無について検証した。その結果、検診受診者195人中2人(1.0%)に加齢黄斑変性を認めしたが、黄斑形態異常の有無と血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度との間に統計学的関連はなかった。

##### 3) 加齢黄斑変性の経時的推移についての検証

平成28年、29年度連続して黄斑形態の評価を行い、血中PeCDF濃度を測定した患者143人(男性72人、女性71人)を対象に、黄斑疾患の進行について調査した。その結果、平成29年度に新たに黄斑疾患を生じた受診者はおらず、黄斑疾患が進行した受診者もいなかった。

#### 4 - 4. 長崎県油症検診受検者における口腔内症状に関する研究

##### 1) 口腔乾燥に関する検証

平成27年度長崎県検診において認定者と未認定者の中で、問診において口腔乾燥を訴えた者について口腔乾燥を測定し分析した。口腔乾燥の訴えは43名にみられ、高齢者に多く、女性に多かった。一方測定値に関しては24.4から30.4とばらつきがみられ、測定値と性別、年齢、認定の有無との間に相関はみられなかつ

た。

## 2) 口腔カンジダの発現に関する研究

平成 28 年度長崎県検診において 77 名(認定者 48 名、未認定者 29 名)を対象に、舌を測定部位とし、カンジダディテクターを用いてカンジダの検出を行った。認定の有無によりカンジダの発現率に有意差がみられなかったが、高齢者および女性の発現率が高かった。また、口腔乾燥感を訴えた患者や義歯装着の患者でもカンジダの高い発現率がみられる傾向にあった。

## 3) 口腔細菌数に関する検討

高齢者にみられる歯性感染症や誤嚥性肺炎には口腔内細菌叢が関与している。そこで平成 29 年度長崎県検診において細菌数計測器を用いて口腔細菌数を調べた。その結果、細菌数は  $5.21 \times 10^5$  から  $6.23 \times 10^7$  とばらつきはみられが、認定の有無による有意な差はみられなかった。

## 4 - 5 . 油症患者における骨・関節症状

### 1) 油症患者における骨密度の解析

2010 年度全国油症検診の受検者の骨密度を測定し、ダイオキシン類濃度との関連について検討した。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。男性においては、ダイオキシン類濃度と骨密度の間に明らかな関連は認めなかった。

### 2) 油症患者におけるロコモティブシンドロームの合併

平成 28 年度福岡県検診において、ロコチェック質問票を用いてロコモティブシンドローム(ロコモ)の合併を調査した。ロコチェック質問票を用いた問診、ファンクショナルリーチテスト、4 m 歩行に要する時間を計測した。その結果、51% の受診者にロコモの合併が疑われた。ロコチェック該当数、ファンクショナルリーチおよび 4 m 歩行時間とダイオキシン類濃度との間には、明らかな関連を認め

なかった。

## 4 - 6 . 油症患者血液中の PCDF 類実態調査

平成 27 - 29 年度においても、検診受診者の血液中ダイオキシン類濃度の解析を行った。平成 26 年度は、未認定者 155 名と認定患者 249 名を測定した。認定患者の平均総 TEQ (WHO2005) は 61 pg TEQ/g lipid、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均は 99 pg/g lipid (2.7 ~ 1,792) だった。約 57% の患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 50 pg/g lipid 未満であった。平成 27 年度は、未認定者 116 名と認定患者 104 名を測定した。認定患者の平均総 TEQ (WHO2005) は 64 pg TEQ/g lipid、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均は 94 pg/g lipid (2.8 - 1,800) だった。約 57% の患者は 50 pg/g lipid 未満であった。平成 25 ~ 27 年に受診した同居家族認定者 88 名の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均値は 29 pg/g lipid で一般人に近い値であった。平成 28 年度の測定対象患者の平均総 TEQ (WHO2005) は 44 pg TEQ/g lipid、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均値は 49 pg/g lipid だった。平成 13 ~ 28 年の間に 1,023 名の認定患者がダイオキシン類濃度を測定され、これは認定患者総数 2,295 名(平成 28 年 12 月 31 日現在)の約 45% に相当した。また血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均は 110 pg/g lipid (2.8 - 1,800) で、約 60% の患者は 50 pg/g lipid 未満だった。

## 4 - 7 . 油症患者における甲状腺機能の研究

### 1) 甲状腺機能について

平成 27 年度福岡県検診を受診した 239 人について甲状腺機能検査を行い、血中 PCB 濃度との関連について検討した。同居家族認定を含む認定患者において未認定者と比ベトリヨ - ドサイロニンの有意の低下を認めた。また、血中 PCB 濃度とトリヨ - ドサイロニンの間に有意な負の相関がみられ、血中 PCB 高濃度群におい

て低濃度群に比ベトリヨ - ドサイロニンの有意の低下を認めた。PCBのトリヨ - ドサイロニンに対する慢性的影響が示唆された。

#### 2) 甲状腺自己抗体に関する研究

平成28年度福岡県検診を受診した228名について甲状腺自己抗体検査を行い、血中PCB濃度との関連について検討した。認定患者は未認定者に比し、抗甲状腺マイクロゾーム抗体および抗サイログロブリン抗体は多い傾向があったが、出現頻度に差はなかった。抗サイログロブリン抗体は血中PCB高濃度群において低濃度群に比較し有意に高頻度に認められた。抗甲状腺マイクロゾーム抗体、抗サイログロブリン抗体あるいはTSH刺激性レセプター抗体のいずれか1項目以上の異常を認めるものは、PCB高濃度群においてPCB低濃度群に比較し有意に高頻度であった。PCBの抗サイログロブリン抗体に対する慢性的影響が示唆された。

#### 4 - 8 .油症における末梢血リンパ球亜集団に関する研究

2017年度福岡県検診を受診した239名において末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中PCB濃度との関連について検討した。同居家族を含む患者では対照者に比較しCD8陽性細胞の有意の低下を認め、油症におけるCD8陽性細胞に対する慢性的影響が示唆された。CD4陽性細胞は対照者に比較し患者に高い傾向を認めたが、差をみなかった。血中PCB濃度とCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞の間に相関をみなかった。また、CD4陽性細胞およびCD8陽性細胞は血中PCB濃度1.5ppb未満のPCB低濃度群と血中PCB濃度1.5ppb以上のPCB高濃度群の間に差をみなかった。

#### 4 - 9 .油症患者の免疫機能の検証

長崎県検診を受診した患者を対象に、ダイオキシン類曝露が免疫機能に及ぼす影響を検証した。

##### 1) 末梢血リンパ球分画の検討

平成27年度、長崎県油症検診受検者(認定患者53名、未認定者14名)におけるリンパ球サブセットの割合の変化を解析した。その結果、認定患者においてCD3、8陽性細胞の低下、NK細胞の相対割合が上昇しており、血中PCQ濃度と制御性T細胞(Treg)数に有意な相関がみられた。これを基に、平成28年度、NK細胞数に影響を与えるサイトカインIL-12と、NK細胞が産生するIFN- $\gamma$ について認定患者(31名)と健常人(31名)で比較した。その結果、IL-12に有意差はないものの増加傾向がみられ、IFN- $\gamma$ は患者で有意に低値だった( $p=0.0056$ )。なお、ダイオキシン濃度との間に相関は認めなかった。

##### 2) soluble CD27の検討

以前の検討にて、認定患者ではTreg細胞が活性化している可能性が示唆された。そこでTreg細胞が発現している血清中CD27濃度について検証した結果、患者と健常人との間に有意な差はなかった。

##### 3) soluble CD26/DPP-4の検討

CD26/DPP-4(dipeptil peptidase-4)はCD4陽性T細胞に発現し、強力な血管内皮細胞間遊走能を有する。関節リウマチなどの自己免疫性疾患や移植片対宿主病などの病態に関与するとされる。そこで、油症患者において血清中soluble CD26/DPP-4を測定したところ、患者で $992.8 \pm 56.66$  ng/ml、健常人で $800.7 \pm 58.40$  ng/mlであり、2群間に有意な差を認めた( $p=0.0215$ )。しかし、患者血清中のsCD27/DPP-4値とPCB、PCQ、PCDF値との間に相関は認められなかった。

##### 4) 油症認定患者における血清Ah受容体転写活性の検討

糖尿病性神経症を有する患者において、血清Ah受容体転写活性が上昇しているという報告がある。油症患者では足趾のしびれを有することがある。そこで、今回、我々は血清中のAh受容体転写活性を測定し、正常人との比較検討を行う予定であったが、実験手技の問題もあり、測

定不能であった

#### 5) セマフォリン3Aの検討

平成29年度、神経軸索ガイダンスなど生体内で様々な情報伝達を担うタンパク質であるセマフォリンのうち、脊椎動物の表皮神経系発達の調節に関わるセマフォリン3A (Sema3A)について認定患者(30名)と健常人(30名)で比較、検討した。その結果、患者では血清中Sema3Aは有意に高値で( $p=0.00357$ )、PCQ濃度との間に有意な相関を認めた。

### 5. 油症患者の支援と治療研究の推進

#### 5-1. Deans Switch型SiIFlowを用いた血中ダイオキシン類測定におけるソルベントカット大量注入法の開発

平成29年度、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計にSCLVの代替システムとしてDeans Switch型SiIFlowを装着し、その正確性と再現性について、従来システムと比較検討した。その結果、血中ダイオキシン類測定においてDeans Switch型SiIFlowは、SCLVと同様の機構で正確に作動することが確認され、標準物質及びコントロール試料の繰り返し測定では再現性の良い定量値が得られた。SiIFlowは従来法と比べてデッドボリュームが非常に小さく、かつコンタミネーションの影響も少ないという利点がある。また、装置の取り扱いも容易であり、SCLVの代替として有用であることが示された。

#### 5-2. 油症患者の臨床症状を軽減するための臨床試験

##### 1) 桂枝茯苓丸内服臨床試験

平成27年7月から九州大学病院、長崎県五島中央病院の油症外来で桂枝茯苓丸内服による臨床試験を実施した。52名の参加が得られ、3ヵ月間、7.5gの桂枝茯苓丸を内服した後、全身倦怠感、皮膚症状などにおいて統計学的に有意に改善がみられた。また、血管拡張作用を及ぼす一酸化窒素の血清濃度の上昇がみられ、症状改善の機序の一端を担うと考えられ

た。

#### 2) 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

コレステミドによるダイオキシン類やポリ塩化ビフェニール(PCB)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-pentachlorodibenzo-furan (PeCDF)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。さらにPCBの異性体分析も行ったが、明確な有効性は確認されなかった。

#### 5-3. 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

油症患者では四肢異常感覚を多く認めるが、現在では自覚的異常感覚を有する症例は減少している。症状が軽減している患者では、大脳皮質感覚野の神経結合変化により自覚的異常感覚が減少している可能性がある。このような機能的結合変化を検出するため、安静時機能的MRI新規解析法を確立した。

### 6. 疫学的・基礎的研究

#### 6-1. 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

平成27年度に、福岡県久山町に在住する地域住民495人(平均年齢62歳)を対象に断面調査を実施し、血中ダイオキシン類濃度測定のための採血、心血管病や悪性疾患、生活習慣病などの有病率調査および様々な疾病マーカー測定を行った。平成28年11月30日に全検体(495検体)のダイオキシン類測定を終了した。2,3,4,7,8-PeCDFの濃度は中央値で10.5 pg/g lipidであった。平成29年度、血中ダイオキシン類濃度と疾患の有病率および各疾患バイオマーカー値との

関係を検討した。その結果、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の上昇に伴い、肝・胆道系機能マーカーの平均値は有意に上昇したが基準値の範囲内であった。

## 6 - 2 . 油症曝露による継世代健康影響に関する研究

油症の継世代影響を把握するため、以下の研究を行った。

### 1 ) 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

平成 27 年度、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、ダイオキシン類の胎盤を介する胎児への移行を検証した。その結果、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。また、胎脂、胎便、羊水の中で、胎脂に最も高濃度のダイオキシン類が含まれており、主たる排泄経路であることが明らかとなった。

### 2 ) 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

平成 28 年度、油症発生後に妊娠・出産した 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、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、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、とくに 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。以上より、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示唆された。

### 3 ) 油症 2 世の卵巣機能と油症曝露との関連

平成 29 年度、油症 2 世 33 例を対象とし、卵巣の予備能の指標として血中抗ミューラー管ホルモン (AMH) 濃度を測定した。さらに、健常女性から得られた年齢別平均の血中 AMH 濃度に対する標準偏差値 (z-score) を求め、単回帰分析を用いて解析した。その結果、油症 2 世の血中 AMH 濃度 (z-score) の中央値 (範囲) は、-0.88 (-2.13-5.56) であった。さらに、1) 油症発生から出生までの期間と正の相関を示すこと、2) 油症 2 世の血中 PCDF 濃度と有意な相関はないが、母親の血中 PCDF 濃度と有意な負の相関を示すこと、3) 油症発生から出生までの期間の影響を取り除いた出生時の母親推定血中 PCDF 濃度においても有意な負の相関を示すことが分かった。以上より、胎児期における油症曝露が油症 2 世の卵巣の予備能に影響を及ぼすことが示唆された。

## 6 - 3 . PCB/ダイオキシン類の生体内動態に関する研究

### 1 ) 油症患者のダイオキシン類異性体ごとの半減期の変化に関する研究

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した。

### 2 ) 低濃度患者における 2,3,4,7,8-PeCDF の半減期と半減期の変化に関する研究

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。2,3,4,7,8-PeCDF の濃度別、生年別に、半減期と半減期の変化を確認した。その結果、油症発生以降に生まれた患者 (いわゆる



「二世患者」)では、血中で 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が低く、増加している傾向がみられた。2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が 10~20 pg/g lipid の患者の多くが油症発生以前に生まれている、いわゆる「一世患者」だが、二階微分は負の患者が多く、平衡状態に低濃度の側から近付いていることが推測された。

### 3) 油症患者におけるダイオキシン類異性体の濃度変化と症状の変化に関する研究

ダイオキシン類の個々の異性体が患者のどのような症状を引き起こしているかを判別するために、ダイオキシン類各異性体の濃度の変化と症状の変化の相関係数を求めた。その結果、男性では 1,2,3,7,8-PeCDF と赤血球数の変化、女性では Total PCDD と総ビリルビンの変化との間に相関係数 0.6 以下の弱い相関がみられた。

## 6-4. 油症発症機構の解明と治療法開発にむけての基礎的検討

### 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

マウスにベンゾピレンを経気管的に投与することにより、気道分泌物が増加し、その肺組織では肺サーファクタント蛋白 (SP-D) の発現が亢進する。平成 27 年度、28 年度はこのマウス作成にあたった。平成 29 年度、SP-D ノックアウトマウスにベンゾピレンを経気道的に投与し、SP-D の作用を検証した。その結果、SP-D ノックアウトマウスの細気管支領域で PAS 陽性細胞が著明に増加しており、気道傷害は野生型マウスに比して増悪した。以上より、ベンゾピレン誘発性の肺傷害に対して SP-D の保護的役割が考察された。

### 2) ベンゾピレンの末梢神経に及ぼす影響の解明

#### 末梢神経伝導速度に対するベンゾピレンの影響

ベンゾピレンを経口投与したラットの後

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、AB 線維の伝導速度が選択的に緩徐化しており、ダイオキシンの作用と同様であった。

#### ベンゾピレンの末梢神経および脊髄感覚系シナプス伝達に及ぼす作用の検証

ベンゾピレンを経口投与したラットの後根付き神経節細胞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と比較検討した。また、脊髄後角におけるシナプス応答の可塑的な変化についても検討した。その結果、ベンゾピレンは選択的に末梢感覚神経である A $\beta$  線維に作用して伝導速度の緩徐化を惹起し、しびれなどの感覚異常を引き起こした可能性が示唆された。

#### ベンゾピレンが求心性末梢神経と行動変化に及ぼす影響についての検証

ベンゾピレンを経口投与したラットを用いて、ベンゾピレンが求心性末梢神経と行動変化に及ぼす影響を行動学的手法、電気生理学的手法、分子生物学的手法で正常ラットと比較検討した。その結果、ベンゾピレンは触・圧覚を伝える A 線維の髄鞘に影響を及ぼし、活動電位の伝導速度を低下させることで感覚の鈍麻等を引き起こした可能性が示唆された。

### 3) 胃癌発生における activation-induced cytidine deaminase の関与についての研究

胃癌の発生には遺伝子編集酵素群の一つである activation-induced cytidine deaminase (AID) 発現が関与するとされる。AID は酸化ストレスによる DNA 損傷との関連も示唆されている。また、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) や、ダイオキシンなどの環境ホルモンも発症因子として挙げられる。

そこで、内視鏡治療により切除した胃癌の切除材料 101 病変 (*H. pylori* 陽性胃癌 84 病変、*H. pylori* 除菌後胃癌 17 病変) を用いて AID や p53 の免疫組織化

学染色を実施した。その結果、AID 高発現群において粘膜下層浸潤癌が有意に多かったが、腫瘍径、分化度、脈管浸潤の頻度については AID 発現との関連は認めなかった。AID 発現は早期浸潤癌の指標となる可能性が推測された。

#### 4) PCB 代謝に関する研究

各 PCB 異性体の生体内代謝について動物肝ミクロゾーム (Ms) を用いて検証した。

##### 2,3,3',4,4',5-六塩素化ビフェニル (PCB156) の代謝

PCB156 は、PCB153、PCB180 および PCB138 とともに高蓄積性であり、患者の血中で健常者の約 3.9 倍の高濃度で検出される。平成 27 年度、PCB156 の代謝についてラットおよびモルモット肝 Ms を用いて検証した。その結果、いずれの Ms においても代謝物は全く生成されず、PCB156 がヒト組織中において高濃度で検出される事実を反映した結果だった。

##### 2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体の動物肝 Ms による代謝

2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体は生体内で非常に代謝されにくいと報告されている。そこで、その異性体 PCB182、PCB188 の生体内代謝を検証した。

平成 28 年度は PCB182 の代謝についてラット、モルモットおよびヒト肝 Ms を用いて検証した結果、いずれも 1 種類の代謝物 M-1 (3'-OH 体) を生成した。また、その活性の強さは、ラット (フェノバルビタール (PB) 前処理) >> モルモット (PB 前処理) > モルモット (未処理、MC 前処理) > ヒトの順であった。特に、PB 前処理ラット肝 Ms により、他の七塩素化 PCB (PCB187、PCB183、PCB180) と比べ、10~50 倍高い活性で代謝された。また、代謝酵素として PB 誘導性の CYP2B 酵素 (ラット CYP2B1、モルモット CYP2B18、ヒト CYP2B6) の関与が示唆された。

平成 29 年度は、PCB188 のラット肝 Ms による代謝を調べた。その結果、PB 前処

理ラット肝 Ms でのみ、2 種類の代謝物 M1 および M2 が生成された。GC-MS による分析の結果、両代謝物はいずれも一水酸化体だった。また、主代謝物の M1 は、フラグメントイオン 407 [M<sup>+</sup>-15] が比較的多いことから、4-水酸化体であることが示唆された。さらに、代謝酵素として PB 誘導性の CYP2B 酵素 (ラット CYP2B1) の関与が示唆された。2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する CB188 は、CB182 同様に、比較的代謝され易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とその機構解析

これまでの研究にて、妊娠中のラットがダイオキシンに曝露することにより出生児に性未成熟等の発育障害が生じること、またその一端が、胎児脳下垂体の luteinizing hormone (LH) および growth hormone (GH) の発現低下に起因することを明らかにした。平成 27 - 29 年度はこの機序について解明した。

##### aryl hydrocarbon receptor 欠損ラットを用いた検討

ダイオキシンの毒性発現に重要である aryl hydrocarbon receptor (AHR) 遺伝子欠損ラットを用いて、ダイオキシン類曝露による胎児脳下垂体ホルモンの低下とそれに付随する発育障害に対する AHR の寄与を母体と胎児の遺伝子型の両面から検討した。その結果、1) TCDD は胎児の AHR を介して LH/GH 合成が低下し、成長後に性未成熟等の発育障害を惹起すること、ならびに 2) 雄胎児の GH 発現抑制には母体の AHR も寄与することが明らかになった。

##### TCDD の子育て能力への影響およびその機構解析

プロラクチンは育児に必須のホルモンである。妊娠ラットが TCDD に曝露すると、育児期の母ラットのプロラクチンは低下し、育児行動は抑制された。母ラットにプロラクチンを補給すると育児行動

障害は回復し、出生児の低体重や学習記憶障害も改善、ないし改善傾向を示した。AHR欠損ラットでは、育児能への影響は全く観察されなかった。以上より、TCDD が AHR を介して育児母のプロラクチンを低下させ、育児抑制、ひいては児の発育障害を惹起するという新たな機構が見出された。

#### TCDD母体曝露が児のゴナドトロピン放出ホルモン神経に与える影響

これまでに、TCDD曝露によって出生児に見られる性未成熟の一端は、出生後の成長過程で定着する視床下部 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) の発現低下に起因することを見出した。そこで妊娠期の母体にTCDDを曝露し、胎生期から離乳期にかけての雄児脳を検証した結果、双極性 GnRH ニューロンの選択的な減少が見いだされた。

#### 6) TCDD母体曝露による性未成熟に拮抗する創薬に関する研究

妊娠ラットへのTCDD曝露による母体、胎児への影響を軽減する方法を探索している。

#### TCDDによる性未成熟に対するリポ酸とチアミンの保護効果とその機構

TCDD は胎児視床下部において、TCA 回路の必須補酵素である  $\alpha$ -lipoic acid (LA) と共に ATP を減少させる。平成 27 年度は、エネルギー産生停滞と LH 低下に対する LA の寄与を検証した。その結果、TCDD はエネルギー減少を通じた AMPK 活性化に基づいてゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 受容体ひいては LH 合成を低下させ、LA はこれに拮抗する可能性が考えられた。なお、TCDD は LA の合成に関わる酵素の発現変動以外の作用を通して LA を減少させ、児の障害を惹起する可能性が示唆された。

2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD)のダイオキシンに対する拮抗作用  
平成 28 年、29 年度はダイオキシン類、TCDD の毒性機構に拮抗する創薬を行った。TCDD の 4 つの塩素原子をフッ素原

子に置換した 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD) を合成し、その生体毒性ならびにダイオキシンに対する拮抗作用を検討した。その結果、TFDD 投与により TCDD によって起こる肝肥大、胸腺萎縮、体重増加抑制ならびに CYP1A1 活性誘導はみられなかった。さらに、ヒト乳がん細胞株である T47D 細胞に対して、TCDD と TFDD 併用処理すると TCDD 依存的な CYP1A1 発現誘導が抑制された。平成 29 年度は、TCDD 母体曝露による胎児の脳下垂体ホルモン合成低下に対する TFDD の拮抗作用を検討した。TCDD により胎児脳下垂体における黄体形成ホルモン、成長ホルモンの発現は低下ないし低下傾向を示すが、TFDD を 1 日 1 回 TFDD を経口投与しても改善はみられなかった。TCDD による胎児数の減少に対しても TFDD による改善は認められなかった。以上より、少なくとも 1 日 1 回の併用処理では、TFDD は TCDD 依存的な胎児のホルモン合成障害に対して改善効果を示さないことが示唆された。

#### 7) 油症の治療法開発にむけて

ダイオキシン類の毒性の大半は aryl hydrocarbon receptor (AHR) を介して発揮される。AHR 活性を抑制する薬剤、植物成分は油症の症状の軽減につながる可能性があり、培養ヒト細胞を用いて探索している。

#### 生薬及び漢方方剤スクリーニングの概要

平成 27 年度は、ヒト培養表皮細胞、HaCaT 細胞を用いて、Ahr 活性化の指標であるベンゾピレン誘導性 CYP1A1 発現に及ぼす生薬の影響を検討した。その結果、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。

#### 桂皮およびシンナムアルデヒドの効果について

平成 28 年度もヒト培養表皮細胞を用いて検証し、漢方方剤の一つ、桂枝茯苓丸に強い AHR 活性抑制、さらに抗酸化機構の主たる転写因子 NRF2 を介した抗酸化作用

があることを示した。さらに、この作用に寄与する成分が生薬の一つ、桂皮に含まれるシンナムアルデヒドであることを明らかにした。

#### ペリルアルデヒドの効果について

平成 29 年度は、ヒト表皮細胞を用いて紫蘇の成分であるペリルアルデヒドの作用を検証した。その結果、ペリルアルデヒドにも強い抗酸化作用のほか AHR 抑制による抗炎症効果があることが示された。

#### 7. 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

臨床的追跡研究を行った。多くの患者において油症特有の症状は軽快しているものの、自覚症状、眼科、歯科、骨・関節所見においては加齢に伴う影響が加わっていた。平成 13～28 年の間に 1,023 名の認定患者がダイオキシン類濃度を測定され、これは認定患者総数 2,295 名(平成 28 年 12 月 31 日現在)の約 45%に相当した。血液中ダイオキシン類濃度の平均値は健常人のそれより高いが、緩徐に低下しつつあり、約 60%の患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は 50 pg/g lipid 未満だった。患者の甲状腺ホルモン低下、甲状腺自己抗体陽性率の上昇がみられた。また、患者血清、血球を用いた検証にて免疫機能の変化がみられ、今後も引き続き検証が必要である。油症患者の支援と治療研究の推進を行った。桂枝茯苓丸の臨床試験にて、自覚症状や生活の質の改善がみられた。コレステミドの内服前後において血液中 PCB、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度に差はみられなかった。微量な血液中ダイオキシン類濃度を測定することができる、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計の代替機においても測定精度、再現

性がとれた。患者の神経系機能的結合変化を検出するため、安静時機能的 MRI 新規解析法を確立した。

疫学的研究を行った。平成 27 年度に、福岡県久山町に在住する地域住民 495 人(平均年齢 62 歳)を対象に断面調査を実施した。血液中 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度は中央値で 10.5 pg/g lipid だった。さらに、血中ダイオキシン類濃度と疾患の有病率および各疾患バイオマーカー値との関係を検討しているところである。ダイオキシン類曝露の継世代に与える影響を検証している。正常妊娠を対象にした検証にて、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、PCDD 類は臍帯血へ移行しやすいこと、胎脂に最も高濃度のダイオキシン類が含まれており、主たる排泄経路であることが明らかとなった。また、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していた。さらに、胎児期における油症曝露が油症 2 世の卵巣の予備能に影響を及ぼすことが初めて示された。ダイオキシン類の半減期、その変化に関する検証を行った。また、ダイオキシン類各異性体の濃度の変化と症状の変化の相関係数を求めた結果、男性では 1,2,3,7,8-PeCDF と赤血球数の変化、女性では Total PCDD と総ビリルビンの変化との間に弱い相関がみられた。

油症発症機構の解明と治療法開発にむけての基礎的検討を行った。油症肺傷害モデルマウスを用いた検証にて、SP-D がベンゾピレンに対する肺保護作用を有することが明らかになった。ベンゾピレンは、触・圧覚を伝える A 線維の髄鞘に影響を及ぼし、活動電位の伝導速度を低下させることで感覚の鈍麻等を引き起こす可能性が分かった。酸化ストレスによる DNA 損傷との関連が報告される AID は、早期浸潤癌の指標となる可能性が推測された。PCB の生体内代謝を検討した。患者体内に高濃度で残存する PCB156 は代謝されにくく、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する CB188 と CB182 はともに

代謝されやすかった。妊娠中 TCDD 曝露が胎児に与える影響について継続して研究した。TCDD は胎児の AHR を介して LH/GH 合成を低下させ、成長後に性未成熟等の発育障害を惹起すること、オス胎児の GH 発現抑制には母体の AHR も寄与すること、TCDD は AHR を介して育児母のプロラクチンを低下させ、育児抑制、ひいては児の発育障害を惹起すること、さらに TCDD は胎児脳の双極性 GnRH ニューロンの選択的な減少を生じることが明らかになった。

以上のように、ダイオキシン類が生体に及ぼす影響、それを阻害する治療薬の研究により、新たな知見が得られつつある。

#### **E . 健康危険情報**

なし。