

総括研究報告書

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 やダイオキシン類の経口摂取による混合中毒で、少なくとも 2000 人ほどの住民が被害にあった。ダイオキシン類の生体への慢性影響については十分に解明されていない。油症研究班（以下、油症班）は発生当時より約 50 年にわたり検診を行い、直接曝露した患者、継世代への影響を追跡している。

【研究目的】PCB 類・ダイオキシン類の生体への影響、生体内動態を把握し、ダイオキシン類の毒性を緩和する治療法・対処法を見出すことである。

【研究成果】

油症患者の支援と治療研究の推進

検診データベースに新たな情報を加え更新した。油症相談員、相談支援員制度は充実し、検診やアンケート調査、訪問検診などの補助業務に加え、死因調査の基盤が完成した。高齢化する患者の要望に応え、九州大学、長崎大学、五島中央病院の油症外来は油症ダイオキシン研究診療センター（油症センター）と連携し、順調に運用された。知識の共有、患者の生活の質の向上のため、運動、栄養、漢方セミナーを実施して好評を得た。患者における PCB 異性体の特徴的な代謝蓄積に関与している CYP 分子種を推定し、患者血液中 PCB の鏡像異性体（キラル体）分離定量法を検討した。血液中 PCB・ダイオキシン類の測定精度を保つため、今年度は大量注入装置内の分析カラムの精度・感度について検証して、高度であることが分かった。

臨床的追跡調査・疫学研究

平成 29 年度油症検診受検者は 50 歳以上が全体の 89.7% を占めた。自覚症状では全身倦怠感が 70.8% で最も多く、他覚所見では、肝・胆・脾エコーの有所見率が 72.4% と最も高かった。また、血液中 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は患者で 67 pg/g lipid、未認定者で 14 pg/g lipid、総ダイオキシン類の平均濃度は認定患者で 45 pg TEQ/g lipid、未認定者で 25 pg TEQ/g lipid だった。平成 27 年度に実施した一般住民を対象にした検診結果のうち、今年度はダイオキシン類曝露や酸化ストレスで上昇する糖化反応最終産物（AGEs）と 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度との関連を検証した。年齢・性で補正すると AGEs 量とダイオキシン類濃度との間に関連はなかった。これまで患者全体のダイオキシン類の半減期を検証してきた。今年度は個々の患者について解析した結果、2001～2016 年前半、後半とも半減期が延びていることが明らかになった。患者の眼病変においては、福岡県検診では油症特有の眼症状のうち眼脂過多が多いこと、長崎県検診では平均眼圧は健常人と有意差がないことが分かった。口腔細菌数と病変の関連については、患者に口腔粘膜色素沈着が多くみられたが、認定の有無と口腔乾燥、口腔細菌数、および口腔粘膜色素沈着と口腔乾燥および口腔細菌数との間には有意差はなかった。末梢神経障害と油症との関連について、これまでの国内外の文献的検索を行った。患者の骨・関節病変を評価すべ

く、今年度は運動機能を評価した。その結果、男性では total 06TEQ がファンクショナルリーチと握力と負の相関があることが分かった。平成 30 年度福岡県検診で手掌紅斑の有症率を検証したところ、85.3%の患者に部分的、手掌全体に及ぶ紅斑がみられた。患者の睡眠障害を検証した結果、不眠有症率は高く、様々なダイオキシン類 TEQ との相関がみられた。サイトカイン産生と T 細胞の制御に関わり、アレルギー性疾患に寄与するとされるセマフォリン 7A (Sema7A) について解析したところ、患者と健常人とに有意差を認めなかったが、PCB のみ Sema7A と有意な相関がみられた。Th2 サイトカインである IL-13 濃度は健常人と有意差がなかった。患者において末梢血液中 T 細胞の低下が認められ、PCB の慢性影響が示唆された。継世代への影響については、今年度は 2 世の皮膚・粘膜症状と母体のダイオキシン類濃度を検証した結果、ダイオキシン類の母児移行は少ないが、皮膚・粘膜の色素沈着に関与している可能性が示唆された。

基礎的研究

ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を感覚刺激による定量的閾値評価と酸化ストレス・抗酸化力の測定方法を用いて検討した結果、ケイヒ等がベンゾピレンにより生じる感覚異常の症状改善に寄与する可能性が示唆された。肺サーファクタント蛋白 SP-D は、ベンゾピレンが培養 Club 細胞に対して誘導するアポトーシスに対して保護作用があることが分かった。ダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体 (AHR) のリガンドとして働き細胞接着に影響がある。オートファジー不全状態であると細胞接着班の分解が抑制され細胞接着が亢進することを示した。AHR を刺激するリガンドでヒト表皮細胞を刺激したところ、オートファジーが誘導された。PCB 異性体の生体内での代謝を検証している。今年度は PCB155 の代謝を動物肝ミクロゾームを用いて検討した結果、PCB155 は代謝されやすく、代謝産物 M1 生成にフェノバルビツール誘導性 CYP2B 酵素が関与していることが分かった。Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 母体曝露による出生時の性未成熟の機構を解明している。Ahr 遺伝子欠損ラットでは精子数の減少がみられ、AHR そのものが思春期における精巣の発達に影響している可能性が示唆され、解析を続けている。ダイオキシン類曝露によって誘導される SeleBP1 の脂質代謝への関与が示唆された。

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。油症研究の目的は、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

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．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．臨床試験の実施

油症患者の様々な症状を軽減するために漢方方剤の臨床試験を施行する。

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。

10．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、油症ニュース、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．油症の継世代に及ぼす影響に関する検討を行う。

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。

C．結果および考察

1.油症患者の支援と治療研究の推進

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の健康状態や近況を把握し、様々な相談を受けるために、2002年に患者の集中する福岡県、長崎県、広島県で油症相談員事業を開始した。さらに、これ以外の自治体に居住する患者の要望に応えるべく、2016年に相談支援員制度を施行した。定期的に研修会を開催し、情報共有に努めている。今年度は相談支援員により死因調査の基盤が完成した。

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、

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 . 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 . 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。

5 . in silico解析による PCB と CYP のドッキングシミュレーション

患者におけるチトクローム P450 (CYP) 依存的な PCB 異性体の代謝能を調査した。ダイオキシン類や PCB に誘導される CYP 分子種は、多くの低塩素化 PCB 異性体に対して、塩素未置換炭素原子がヘム鉄から 6Å 以内に配置される基質結合ポケットを有することが示された。患者における PCB 異性体の特徴的な代謝蓄積に関与している CYP 分子種を推定した。さらに、患者血液中 PCB の鏡像異性体(キラル体)分離定量

法を検討した。

6 . 血液中ダイオキシン類分析における分析カラムの検討

患者の血液中ダイオキシン類濃度の測定は、大量注入装置を装備したガスクロマトグラフ高分解能質量分析装置を用いて行っている。大量注入装置内の分析カラムに関しては、他のカラムを検討することもなく、現在まで同じカラムを用いて分析を行ってきた。今年度は、現在使用しているカラムと固定相の極性が類似したカラムを選択して、ダイオキシン類異性体の S/N 比の改善に関して検討を行った。その結果、従来使用していたカラムと比較して、低ブリードであること；各異性体のピーク強度が向上していること；すべての異性体で高い S/N 比が得られていることから、従来よりも高精度・高感度な分析を行うことが可能となった。

II. 臨床的追跡調査・疫学研究

1 . 油症検診の追跡調査

1) 油症検診データを用いた基礎的解析
平成 29 年度に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 639 名で 50 歳以上が全体の 89.7%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 70.8%であった。他覚所見では、肝・胆・脾エコーの有所見率が 72.4%と最も高かった。

2) 油症患者血液中の PCDF 類実態調査
平成 29 年度に血液中ダイオキシン類濃度を測定した油症認定患者 148 名と未認定者 135 名についてデータ解析を行った。2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は認定患者で 67 pg/g lipid、未認定者で 14 pg/g lipid であった。総ダイオキシン類 (Total TEQ) の平均濃度は認定患者で 45 pg TEQ/g lipid、未認定者で 25 pg TEQ/g lipid であった。平成 13~29 年の 17 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数は累計で1,043名となり、これは油症認定患者全体（総数2,327名、平成29年度時点）の約45%にあたる。血中ダイオキシン類の測定歴がある認定患者の2,3,4,7,8-PeCDF濃度の平均値は100 pg/g lipidであり、濃度分布は2.6~1,800 pg/g lipidと広範囲であるが、約60%の患者は50 pg/g lipid未満であった。平成25~29年に同居家族認定者149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27 pg/g lipidで一般人に近い値であった。

2. 油症患者における眼科的所見

1) 福岡県検診における眼科的所見

平成30年度福岡県油症検診を受診した、212名（患者186名・未認定者26名）の眼科所見を検討した。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。他覚所見として慢性期の油症患者において診断的価値が高い眼症状である眼瞼結膜色素沈着と瞼板腺チーズ様分泌物を認めるものも少数みられた。患者の眼科領域における臨床所見は徐々に軽くなっていた。

2) 長崎県検診を受診した患者における眼圧

長崎県油症検診の3地区において平成30年度油症検診の眼科部門を受診し、眼圧の測定が可能であった患者89名を対象にした。患者の平均眼圧は正常範囲内であり、血中PCB濃度やCB比との関連は認められなかった。

3. 油症患者における口腔細菌数に関する検討

平成30年度の長崎県油症検診において、口腔粘膜色素沈着、口腔内細菌数、口腔乾燥症、義歯装着状態について検討を行った。今回の結果では、口腔粘膜色素沈着は認定者において有意に多くその発現が認められた。義歯装着患者の歯槽部・歯肉部においては有歯部においては色素

沈着がみられたが、無歯部においては見られなかった。今回調査した症例においては認定の有無と口腔乾燥、口腔細菌数との間には相関性がみられず、口腔粘膜色素沈着と口腔乾燥および口腔細菌数との間にも有意差はみられなかった。今後さらに症例数を増やして検討する必要があると思われた。

4. 油症患者における運動機能評価

今年度も、平成28年度福岡県検診における運動機能の評価（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、4m歩行に要する時間、手指筋力および足趾把持力）の結果を解析した。男性においては、total 06 TEQがファンクショナルリーチおよび握力と負に関連した。女性においては、ダイオキシン類濃度と運動機能との間に明らかな関連を認めなかった。

5. 油症患者における手掌紅斑の検証

手掌紅斑は末梢血管拡張を反映し、慢性肝疾患などの全身疾患患者にみられる皮膚所見である。近年の油症検診において、多くの油症患者に手掌紅斑がみられることに気付いた。そこで、平成30年度福岡県油症検診を受けた163名[認定者143名(男性68名、女性75名)、未認定者19名(男性4名、女性15名)]を対象に、手掌紅斑の有症率を調べた。その結果、手掌紅斑は認定患者の86.0%に部分的、もしくは手掌全体にみられた。中でも、男性の有症率が高かった。

6. ダイオキシン類により高濃度曝露された油症患者における不眠：全国横断調査結果報告

ダイオキシン類による健康被害である患者140名を対象としたパイロット研究では、不眠は高率に認められ、ダイオキシン類の血中濃度が高いことは睡眠の質の低下に影響を及ぼしていた。本研究は患者全体を対象として不眠とダイオキシン類の毒性との関連性を検証した。対象は

日本在住の認定患者で、これまでダイオキシン血中濃度測定が行われた 899 名（男性 46.3%、年齢の中央値（IQR）: 66（58-78）歳）を解析対象とした。不眠に関する症状とダイオキシン類 21 異性体の血中濃度から算出した毒性等量（toxic equivalent quantity: TEQ）の総和との関連性を検討した。その結果、入眠困難もしくは睡眠維持困難を有する者（difficulty initiating and/or maintaining sleep: DIMS）は 753 名（53.4%）であった。レストレスレッグス症候群/Willis-Ekbom 病が疑われる者（RLS/WED 群）と RLS/WED とは判定されないものの下肢を動かしたい衝動感を訴える者（LMR 群）はそれぞれ 76 名（9.1%）と 299 名（36.0%）であった。総 TEQ を四分位で 4 群にカテゴリー化（Q1-Q4: < 20 (reference), 20 - 35, 35 - 62, 62 pg-TEQ/g lipid）すると、DIMS 群に対する Q2-4 の調整済みオッズ比（95%CI）は、それぞれ 1.89（1.23 - 2.89）、1.62（1.02 - 2.57）、及び 2.09（1.24 - 3.53）で、RLS/WED 群と LMR 群の調整済みオッズ比は、それぞれ 1.74（1.04-2.91）、2.35（1.71-3.24）であった。患者における不眠の有症状率は高率であり、総 TEQ が最も高いダイオキシン類の毒性が高度な群だけでなく、一般住民でも確認される総 TEQ レベルにおいても不眠と関連していた。生体に取り込まれるダイオキシン類が睡眠・覚醒障害に与える影響について、今後も基礎・臨床の両面での研究が必要と考えられる。

7 . 油症における末梢血リンパ球亜集団に関する検討

平成 30 年度福岡県油症一斉検診受診者 216 名につ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。血中 PCB 濃度と T 細胞を示す CD3 陽性細胞の総リンパ球に対する比率の間に負の相関を認めた。油症患者では対照者に比較し CD3 陽性細胞の比率および絶対数の低下を認めたが、B 細胞を示

す CD20 陽性細胞の比率および絶対数は油症患者と対照者の間に差をみなかった。油症患者において T 細胞の低下が認められ、T 細胞の低下に PCB の慢性的影響が示唆された。

8 . 患者の免疫機能の評価

1) 長崎県油症認定患者におけるセマフォリン 7A (Sema7A) の検討

平成 29 年度は患者における血清セマフォリン 3A(Sema3A)の変化を検討した。その結果、認定患者では Sema3A が高値であることが判明した。Sema3A は神経系への影響のみならず、免疫調節機構への関与も報告されており、患者へ何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。平成 30 年度はサイトカイン産生と T 細胞の制御に関わり、アレルギー性疾患に寄与するとされるセマフォリン 7A(Sema7A)について解析し認定患者（N=31）と健常人（N=31）で比較、検討した。その結果、患者と健常人とに統計上の有意差を認めなかった（ $p=0.833$ ）。Sema7A と PCB、PCQ、PCDF を比較したところ、PCB のみ Sema7A と有意な相関を認めた。

2) 油症認定患者における soluble IL-13 の検討

以前の検討にて、患者において、血清 IL-33 値や IL-35 値が優位に高値であることを確認した。これらのサイトカインは Treg 細胞を活性化、あるいは維持するサイトカインであり、認定患者では T 細胞系の免疫が活性化している可能性がある。今回、主に Th2 細胞から分泌される血清 IL-13 について、健常人との比較を行った。その結果、血清中 IL-13 値は油症患者 419.3 ± 338.7 (pg/ml, mean \pm SD)、健常人 366.6 ± 66.07 (pg/ml, mean \pm SD) であり、2 群間に有意な差を認めなかった（ $p=0.3864$ ）。

9 . カネミ油症患者における末梢神経障害に関する文献的研究

患者に生じる末梢神経障害の報告は近年

減少している。PCB、PCDF、ダイオキシンによる中毒症状の発生減少とともに末梢神経障害が評価されていない可能性も考え、2009年以降の文献を考察した。その結果、PCB、PCDF、ダイオキシンによる neuropathy の報告は2009年以降日本からのものではなく、世界的にも減少傾向であった。

10. 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の関心の検討

血中ダイオキシン類濃度と糖化反応最終生成物 (AGEs) の関連についての研究

平成30年度は、平成27年度に地域一般住民を対象に実施した断面調査の成績を用いて、血中ダイオキシン類濃度と酸化ストレスや高血糖、不健康な生活習慣により上昇すると考えられている糖化反応最終生成物 (Advanced Glycation Endproducts: AGEs) との関連について検討した。AGEs蓄積量はAGE Readerを用いてAGEs皮膚蛍光 (Advanced Glycation Endproducts Auto Fluorescence: AGEs-AF) 値を測定し評価した。血中ダイオキシン類濃度を測定した地域住民495人のうち489人がAFを測定し、その集団におけるAFの平均値は2.20 (標準偏差0.46) であった。血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度の上昇に伴い、AGEs-AFの粗平均値は有意に上昇した (傾向性P値 <0.0001)。しかし性別、年齢、BMI、収縮期血圧、中性脂肪、HbA1c、eGFR、喫煙習慣、飲酒習慣、運動習慣を調整した検討では、その有意な関連は消失した (傾向性P値=0.07)。地域一般住民における血中ダイオキシン類濃度と糖化反応最終生成物 (AGEs) の蓄積との間に明らかな関連は認められなかった。

11. 油症患者における患者ごとの2,3,4,7,8-PeCDF半減期の変化に関する研究

これまでにダイオキシン類の排出速度が変化し、排出が遅くなってきていること

を報告してきたが、患者全体として排出が遅くなってきていることしか示すことができていなかった。今年度は、個々の患者における半減期の変化を検証した。2001~2016年を前後半に分割し、前半と後半で示した半減期を比較した。個々の患者から得られた半減期は、体重の変動の影響や、摂取の影響により誤差を含む。このため、分布のばらつきがみられたが、全体的には、半減期が延びている傾向がみられた。

12. 油症曝露による継世代健康影響に関する研究

油症2世における皮膚・粘膜症状とダイオキシン類曝露状況との関連

油症発生後に油症患者より出生した児 (油症2世) の皮膚・粘膜症状とダイオキシン類曝露状況との関連について検討した。対象は油症2世170名で、油症検診票データをもとに皮膚・粘膜症状の有症割合について検討した。ついで、皮膚・粘膜症状と油症2世およびその母親の血中2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) 濃度との関連について解析した。油症2世の皮膚・粘膜症状としては、口腔内色素沈着の有所見率 (58.3%) が最も高かった。油症2世およびその母親の血中PeCDF濃度の平均値は、各々9.6、103.5 pg/g lipidであった。皮膚・粘膜症状と血中PeCDF濃度との関連を検討すると、油症2世の血中PeCDF濃度は、症状がある群と症状がない群との間には有意な差はなかった。一方、かつての皮膚色素沈着、口腔内の色素沈着を認める油症2世では、母親の血中PeCDF濃度は症状がない群と比較して有意に高かった。以上、油症2世では、母親からのダイオキシン類の移行は少ないが、胎児期における高濃度のダイオキシン類曝露が皮膚・粘膜の色素沈着に影響を及ぼすことが示唆された。

III. 基礎的研究

1. ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルにおける肺サーファクタント蛋白に関する検討

マウスの肺に経気管的に芳香族炭化水素受容体 (AHR) 作動性物質である Benzo[a]pyren (BaP) を投与し、気道分泌物の増加を示すモデルを作成している。Club 細胞は、肺サーファクタント蛋白などの肺の恒常性を維持する因子を産生している。今年度は、BaP による Club 細胞傷害における肺サーファクタント蛋白 (SP-D) に役割に着目して *in vitro* での研究を行った。ヒト Club 細胞株 NCI-H441 細胞に BaP を投与すると apoptosis が誘導され、ヒトリコンビナント SP-D の投与により抑制された。油症肺傷害において SP-D が保護的役割を担っていることが考察された。

2. ベンゾピレン投与ラットに対する感覚評価を用いたケイヒの効果検討

ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果をも 3 種類の感覚刺激による定量的閾値評価と酸化ストレス・抗酸化力の測定方法を用いて検討した。その結果、5Hz、250Hz の電気刺激周波数において、各群有意な閾値の変化はみられなかった。2000Hz の電気刺激周波数ではベンゾピレン投与群で感覚閾値上昇がみられたが、その閾値上昇はケイヒの投与により抑制傾向にあった。また、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で抗酸化力の上昇傾向がみられた。本研究の結果から、ケイヒ等がダイオキシン類化合物による複合中毒でみられる感覚異常の症状改善に寄与する可能性が示唆された。

3. ダイオキシン類で亢進する細胞接着とオートファジーに関する研究

ダイオキシン類が生体に様々な影響を及ぼすことが知られているが、どのようなメカニズムで生体に影響するかはまだ不明な点が多い。ダイオキシン類は Ah 受容体のリガンドとして働き細胞接着に影響がある。Ah 受容体から Src や FAK の活性

化を引き起こすことがメカニズムとして知られている。今回我々はオートファジーが細胞接着班を取り込み Src や FAK の分解に働くことを示した。その結果オートファジー不全状態であると細胞接着班の分解が抑制され細胞接着が亢進することを示した。今後類似する両者の関連を明らかにしたい。

4. オートファジーによる酸化ストレスの調節機構に関する研究

これまでの研究で、ダイオキシン類の受容体である芳香族炭化水素受容体 (Aryl Hydrocarbon Receptor: 以下、AHR) が酸化ストレスを調節する因子であることを報告してきた。今回、酸化ストレスを調節機構として重要とされるオートファジーの活性化について AHR が関与するかを検討した。AHR を刺激するリガンドでヒト表皮細胞を刺激したところ、オートファジーが誘導されることが明らかとなった。現在は、AHR を介して誘導されたオートファジーが酸化ストレスをどのように調節するかを検討している。

5. 2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体の動物肝ミクロゾームによる代謝

今年度は、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体の 1 つである 2,2',4,4',6,6'-hexachlorobiphenyl (PCB155) につき、ラットおよびモルモット肝ミクロゾーム (Ms) による代謝を調べた。まず、ラット肝では phenobarbital (PB) および dexamethazone 前処理でのみ、代謝物 M1 が生成され、代謝活性はそれぞれ 1.256 および 0.105 nmol/hr/mg protein であった。モルモット肝では、M1 は PB 前処理でのみ検出され、その活性は 0.030 nmol/hr/mg protein と低かった。次に、GC-MS の結果、M1 はそのメチル化体が分子量 388 [M⁺] であることから、一水酸化体であると推定された。なお、水酸化の位置は、構造的に *meta* 位 (3 位) しかないこと、およびフラグメントイ

オン 345 [M⁺-43]が比較的多かったことから、3位と考えられた。以上の結果から、PCB155は、PCB182やPCB188と同様に、代謝され易いこと、M1の生成活性は、モルモットに比べ、ラットで著しく高いこと、M1の生成にはPB誘導性のCYP2B酵素が関与していることが明らかとなった。

6.2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxinによる出生児の性未成熟の機構解析：芳香族炭化水素受容体欠損ラットでの検討

妊娠ラットへの2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)の低用量曝露は、出生児に性未成熟を惹起する。これまでの研究により、これが出生前後の性ホルモン合成抑制に起因することを突き止めてきた。さらに、芳香族炭化水素受容体 (AHR)欠損ラットを用いた解析から、上位制御因子の黄体形成ホルモン (LH)の調節にAHRが関与する事実も突き止めつつある。今年度の研究では、発達過程における精巣と性ホルモン合成へのAHRの関与を、AHR欠損ラットを用いて明らかにすることを目的とした。まず、AHR欠損により脳の性分化の時期である周産期の脳下垂体におけるLHβのmRNA発現が低下、精巣の性ステロイド合成系タンパク質である、steroidogenic acute regulatory protein (StAR)ならびにcytochrome P450 17 (CYP17)が減少傾向を示すことを確認した。このことから、AHRは周産期に脳下垂体-精巣系を制御し、性ステロイド合成に関与することで、脳の性分化に重要な働きを果たす可能性が示唆された。次いで、AHRの生殖腺への影響を検証すべく、成長後の精子形成や生殖器官の成熟に重要なテストステロンの血中濃度へのAHR欠損の影響を調べた。その結果、出生2日目 (PND2)の雄では、AHR欠損により著しく血中テストステロン濃度が低いものの、4週齢では、野生型と同レベルになっていた。一方、思春期に当

たる6週齢では、AHR欠損雄ラットで、テストステロン濃度が野生型ラットに比べ著しく低かった。これに合致して、精巣でのCYP17タンパク質発現レベルが有意に低下していた。そこで、テストステロンの合成、分泌を担うライディッヒ細胞に着目し、AHR欠損により、形態学的な変化が現れるか否かを8週齢を用いて検討したが、ライディッヒ細胞に明らかな形態学的変化は見られなかった。一方、第8週、11週、20週において、AHR欠損では精巣中の精子数が著しく少なかった。以上の結果から、1) AHRは周産期に脳下垂体-精巣系を制御し、性ステロイド合成に関与することで、脳の性分化に重要な働きを果たすこと、ならびに2) 思春期特異的なテストステロンの減少とこれに伴う精子数の減少から、AHRには思春期における重要な働きがあることが強く示唆された。

7. ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質1 (SelenBP1)の腎臓における役割：SelenBP1欠損マウスでの検討

これまでに、ダイオキシンが肝臓のセレン結合性タンパク質1 (SelenBP1)を誘導することを明らかにしてきた。また、SelenBP1の遺伝子欠損マウスを作成して、ダイオキシン毒性発現、あるいは毒性軽減への寄与について検討を行って来たが、SelenBP1と相同性の高いもう一つの分子種SelenBP2が発現しているため、その誘導の意義について理解することが難しかった。SelenBP2の発現は腎臓において低いことが報告されているため、ダイオキシン誘導性SelenBP1の腎臓における役割を明らかにすることを目的として、ダイオキシン非投与条件下で、野生型のC57BLマウスとSelenBP1欠損マウスの腎臓を用いたメタボロミクス解析を行った。その結果、脂質代謝関連因子の変動が確認され、SelenBP1の脂質代謝への寄与が推定された。次に、DNAマイクロアレイ解析を行った。多数の遺伝子に発現変動が認められたが、その中で、変動

が示唆された脂質代謝関連因子に着目し、更に、リアルタイム RT-PCR にて発現変動を解析した。SelenBP1-K0 マウスの腎臓では、脂肪酸の ω および ω -1 水酸化に關与することが知られている cytochrome P450 4a (Cyp4a)サブファミリーのうち、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現が有意に低下した。ペルオキシゾームでの分岐脂肪酸の不飽和化を触媒する acyl-CoA oxidase3 (Acox3)の発現も有意に低下した。マイクロアレイでは変動が示唆されていたものの、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor- α (Ppara)および Ppar- γ coactivator-1 β (Ppargc-1b)の発現レベルには影響がなかった。しかし、Ppara とヘテロオリゴマーを形成して遺伝子発現を促進させる retinoid-X-receptor- α (Rxra)の発現は低下していた。また、carnitine palmitoyltransferase 1a (Cpt1a)や Cyp2e1 についても検討したが、発現変動は確認されなかった。以上の結果から、1) メタボロミクス解析より、TCDD 誘導性の SelenBP1 は、脂質代謝に関連した機能を有する可能性が示唆された。2) マイクロアレイ解析の結果もこれを支持し、脂質酸化酵素に発現低下が確認されたこと、これらの遺伝子の発現に關与する Rxra も低下したことから、SelenBP1 が脂質代謝を促進的に調節している可能性が示唆された。

D . 結論

< 油症患者の支援と治療研究の推進 >

油症相談員、相談支援制度は充実し、検診やアンケート調査、訪問検診などの補助業務に加え、死因調査の基盤作りが完成した。今年度も福岡、長崎、広島にて知識の共有、患者の生活の質の向上のため、運動、栄養、漢方セミナーを実施して好評を得た。患者における PCB 異性体の特徴的な代謝蓄積に關与している CYP 分子種を推定し、患者血液中 PCB の鏡像異性体 (キラル体) 分離定量法を検討し

た。また、血液中 PCB・ダイオキシン類の測定精度を保つため、大量注入装置内の分析カラムの精度・感度について検証した。

< 臨床的追跡調査・疫学研究 >

全国油症検診結果については、今年度は平成 29 年度油症検診結果を解析した。受検者の高齢化は進み、例年通り全身倦怠感と、肝・胆・脾エコーの有所見率が高かった。患者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度分布は広範囲だったが、約 60%の患者は 50 pg/g lipid 未満であった。患者における眼病変においては、福岡県検診では眼脂過多が多いこと、長崎県検診では平均眼圧は健常人と有意差がないことが分かった。口腔細菌数と病変の關連については、口腔粘膜色素沈着は認定者において有意に多くみられたが、口腔細菌数と口腔粘膜所見との間に關連はみられなかった。患者の運動機能を評価した結果、男性では total O6TEQ とファンクショナルリーチおよび握力との間に負の關連があることが分かった。患者の症状を東洋医学的に検証した。今年度の福岡県検診にて 8 割以上の患者に手掌紅斑がみられた。患者の不眠有症率は高く、様々なダイオキシン類 TEQ との關連がみられた。患者の免疫機能については、T細胞の制御に關わり、アレルギー性疾患に寄与するとされる Sema7a は患者では高値ではないが PCB 濃度と關連していること、血清 IL-13 濃度は健常人と有意差がないことが分かった。また、患者において末梢血液中の T細胞の低下に PCB の慢性的影響が示唆された。一般住民を対象にした検診結果の解析においては、年齢・性で補正すると AGEs 量と 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度との間に關連はなかった。2001 ~ 2016 年を前半、後半に分けて解析した結果、個々の患者の 2,3,4,7,8-PeCDF 半減期も延びていることが明らかになった。継世代への影響については、ダイオキシン類の母体曝露による児への移行は少ないが、2 世における皮膚・粘膜の色素沈着に關与している可能性が示唆された。

< 基礎的研究 >

ベンゾピレンを用いて神経障害、肺傷害を検証した。SP-D はベンゾピレンによる培養 Club 細胞のアポトーシスに対して保護的役割を果たした。ケイヒ等がベンゾピレンにより生じる感覚異常の症状改善に寄与する可能性が示唆された。オートファジーに関する研究においては、オートファジー不全状態であると細胞接着班の分解が抑制され細胞接着が亢進すること、AHR を刺激するリガンドでヒト表皮細胞を刺激したところ、オートファジーが誘導されることを明らかにした。

2,4,6-三酸化置換ベンゼンを有する PCB 異性体、PCB155 は代謝されやすく、代謝産物 M1 生成にフェノバルビツール誘導性 CYP2B 酵素が関与していることが分かった。TCDD 母体曝露による出生時の性未成熟の機構については、*Ahr* 遺伝子欠損ラットでは精子数の減少がみられ、AHR そのものが思春期における精巣の発達に影響している可能性が示唆された。ダイオキシン誘導性蛋白、SeleBP1 の脂質代謝への関与が示唆された。

このように、ダイオキシン類の慢性影響、生体内動態、毒性機構、次世代への影響について明らかになりつつある。将来的に、油症の症状を緩和する新しい治療薬の発見・開発につなげたい。

E . 健康危険情報

なし。