

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、分析を行っている。

【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。厚生労働省・各自治体と関係関係を構築し、死因調査を開始した。その結果、追跡対象者 1,664 名のうち、2017 年 12 月 31 日時点で生存の確認ができた患者が 922 名、死亡の確認ができた患者が 640 名、生死不明の者が 102 名であった。

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。今年度のダイオキシン類の測定法に関する研究は、油症患者の血液中ダイオキシン類分析においてナローボアカラムが使用出来ないかを検討したところ、感度では従来法と変わりがなかったが、測定時間が 20 分短縮出来ることが明らかとなった。

臨床的追跡調査・疫学研究

全国油症一斉検診の受診者について血液中の PCDF 等（ダイオキシン類）の濃度を継続的に測定した。2018 年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度測定を行った認定患者 195 名と未認定者 125 名について結果集計を行った。認定患者全体（195 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF の平均濃度は 69 pg/g-fat となり、2,3,7,8-TeCDD 毒性等価係数（WHO-2006）を用いて毒性等量（TEQ）に換算した総ダイオキシン類（Total TEQ）の平均濃度は 48 pg TEQ/g-fat であった。これに対して、未認定者（125 名）の 2,3,4,7,8-PeCDF 平均濃度は 13 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 24 pg TEQ/g-fat であった。2015 年に福岡県久山町の環境調査を受診した住民 495 人のうち、心機能障害マーカである血清 NT-proBNP を測定した 455 人において、血中 2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP の関係を横断的に検討した。その結果、2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP との間に明らかな関連は認められなかった。令和元年度油症患者の眼症状の追跡調査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。油症認定患者の水晶体落屑物質の有無を判定し、落屑症候群と血中の PCB 濃度との関連を調査した。油症検診受診者の 4.3%で落屑症候群が認められたが、血中 PCB 濃度は低値であり、血中 PCB が落屑症候群に關与する可能性は低いと考えられた。

PCB、PCDF、dioxin、myelopathy、encephalopathy をキーワードとして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。油症患者におけるダイオキシン類の運動器機能における影響を調査した。男性患者において、ファンクショナルリーチテストおよび握力が total TEQ と負の相関にあることが明らかとなった。平成 31 年度の油症検診において油症患者における口腔粘膜色素沈着を検討した結果では、上顎前歯部においては残存歯数と歯肉色素沈着の程度との間に相関性が認められた。油症発生後に油症患者より出生した児（油症 2 世）の口腔内色素沈着に影響する因子について検討し、1) 色素沈着が重症化するにつれて、男性と喫煙者の割合が増えること、2) 母児血中 PeCDF 濃度との関連では、重症化するにつれて母親血中 PeCDF 濃度が高い値を示すこと、3) 口腔内色素沈着の重症度は喫煙と母親血中 PeCDF 濃度と有意な相関を示すことが分かった。福岡県油症一斉検診受診者について末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の細胞内サイトカインを測定した。血中 PCB 濃度と Th0 細胞および Th2 細胞との間に正の相関を認めた。油症患者の皮膚感覚異常について触覚、温痛覚をそれぞれ Von frey フィラメントと温熱計を用いて評価し、触覚については油症患者で健常コントロールと比較して鈍くなっている傾向にあった。母親のダイオキシン類濃度と子供の症状の關係に着眼して分析したところ、母親の濃度と子供の測定項目のうち骨関連のマーカーの「MMP-3」が關係の強い項目として見つかった。しかし、偶然の可能性も考えられた。

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検討した。その結果、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の有意な上昇がみられ、その閾値上昇はケイヒの投与により有意に抑制された。肺サーファクタント蛋白 (SP-D) は油症肺傷害に対して保護な役割を有することが考得られた。

糖尿病治療薬メトホルミンは、油症のみならず IL-1 が病態形成に関わる炎症性疾患の治療に有用である可能性が示唆された。活性酸素を抑える 5-アミノサリチル酸ならびに代謝産物のアセチル 5-アミノサリチル酸の濃度を盲腸と直腸粘膜内で測定した。PCB 異性体の生体内での代謝を検証している。今年度は、ヒト肝 Ms およびこれまでに PCB 代謝に關与することが報告されている 4 種類のヒトチトクロム P450 (CYP) CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6 および CYP3A4、を用いて、PCB155 の代謝を調べた。Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 母体曝露による出生時の性未成熟の機構の解明では、AHR は周産期に脳下垂体-精巢系を制御し、性ステロイド合成に關与することで、脳の性分化に重要な働きを果たすこと、AHR が欠損すると思春期特異的な testosterone の減少、およびその後の持続的な精子数の減少が引き起こされた。ダイオキシン類曝露によって誘導される SeIenBP1 は酸化ストレス軽減に寄与している可能性が示唆された。

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薬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。

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. 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. 油症患者の死因に関する研究

油症認定患者の生存情報および死亡情報をアップデートし、死亡リスクの再評価を行うことを目的として、油症認定患者を対象とした50年間の追跡調査を実施した。その結果、追跡対象者1,664名のうち、2017年12月31日時点で生存の確認ができた患者が922名(55.4%)、死亡の確認ができた患者が640名(38.5%)、生死不明の者が102名(6.1%)であった。なお、追跡調査はさらに継続中である。

6. 油症患者の血液中ダイオキシン類分析におけるナローボアカラムの検討

近年、世界各地でヘリウムガスの需要が高まり、日本への供給が制限されている。ヘリウムガスをキャリアーガスとして用いる測定では、その対策として極力消費量を抑える、もしくは代替ガスへの変更などの対策が必要になっている。高分解能質量分析装置によるダイオキシン類の分析に関しては、代替ガスによる分析は不可能とされる。今回、昨年検討した分析カラムよりも内径の細いナローボアカラムを用いて分析条件を確立した上で、ダイオキシン類異性体の分離およびS/N比の改善に関して検討を行った。その結果、感度面における大きな改善は見られなかったが、分析時間が40分程度となり、測定時間が20分短縮可能となった。今後もヘリウムガスの供給が制限された場合、本法はヘリウムガスの消費を抑制できるので非常時の対策として有効であると考えられた。

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

2018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616名で、50歳以上が全体の90%を占めていた。自覚症状では全身倦怠感の訴えが最も多く、他覚所見では肝・胆・脾エコーの有所見率が高かった。

2) 油症患者血液中のPCDF類実態調査

全国油症一斉検診の受診者について血液中のPCDF等(ダイオキシン類)の濃度を継続的に測定している。2018年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度測定を行った認定患者195名と未認定者125名について結果集計を行った。油症認定患者195名の内訳は、油症検診結果に基づく認定者(検診認定者)が171名、同居家族の条件による認定者(同居認定者)が24名であった。認定患者全体(195名)の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は69 pg/g-fatとなり、2,3,7,8-TeCDD毒性等価係数(WHO-2006)を用いて毒性等量(TEQ)に換算した総ダイオキシン類(Total TEQ)の平均濃度は48 pg TEQ/g-fatであった。このうち同居認定者(24名)の2,3,4,7,8-PeCDFの平均濃度は18 pg/g-fatであり、Total TEQの平均濃度は28 pg TEQ/g-fatであった。これに対して、未認定者(125名)の2,3,4,7,8-PeCDF平均濃度は13 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は24 pg TEQ/g-fatであった。2018年度に実施した血液中ダイオキシン類濃度の分析精度管理の解析を行った。その結果、当所を含む国内6機関の定量値は概ね一致しており、各機関で血液中ダイオキシン類の濃度測定が適切に実施されていることが分かった。

このほか、油症患者におけるチトクロームP450(CYP)依存的なPCB異性体の代謝能の調査及び生成される水酸化PCBを

予測するため、in silico解析によるPCBとCYPのドッキングシミュレーションを実施した。その結果、PCBの骨格構造における水酸化標的部位を解析することにより、生成される水酸化PCBとその代謝経路に關与するCYP分子種を推定することができた。また、油症患者血液中の2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl(PCB183)鏡像異性体(キラル体)を分析し、そのキラル選択的蓄積性を評価した。現在、2019年度に行われた全国油症一斉検診の受診者のうち228名について血液中ダイオキシン類濃度測定を行っている。

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

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見られた。

2) 長崎県検診を受診した患者における落屑症候群

今回の長崎県油症検診受診者の落屑症候群の有病率は4.3%であった。落屑症候群のある症例の血中PCB濃度は低値であった。

3. 油症患者における歯肉色素沈着と残存歯に関する検討

油症患者において口腔粘膜色素沈着は現在でも多くみられる症状のひとつである。今回、平成31年度の長崎県油症検診において、特に上下顎前歯部について口腔粘膜色素沈着および残存歯数について重点的に精査し解析を行った。残存歯数に関しては上顎が平均4歯、下顎が平均5歯で、比較的残存歯が多かった。歯肉色素沈着に関しては、上顎では色素沈着がみられた者が61名でみられなかった者が88名であった。下顎では色素沈着のみられた者が84名で、みられなかった者が

65名であった。今回の結果では、上顎前歯部においては残存歯数と歯肉色素沈着の程度との間に相関性が認められた。今後さらに症例数を増やし他の因子との相関についても検討する必要があると思われる。

4．油症患者におけるダイオキシン類の運動器機能への影響

油症患者におけるダイオキシン類の運動器機能における影響を調査した。ファンクショナルリーチテスト、歩行速度、握力、足趾把持力を計測し、ダイオキシン類の被曝指標である total TEQ との関連性を評価した。特に、男性患者において、ファンクショナルリーチテストおよび握力が total TEQ と負の相関にあることが明らかとなった

5．油症における末梢血 CD4 陽性 T 細胞亜集団に関する検討

2019年度福岡県油症一斉検診受診者220例について末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の細胞内サイトカインを測定し、血中 PCB 濃度との関連について検討した。血中 PCB 濃度と Th0 細胞および Th2 細胞との間に正の相関を認めたと、Th1 細胞との間に相関をみなかった。Th0 細胞および Th2 細胞は PCB 高濃度群では PCB 低濃度群に比べ上昇を認めた。Th1 細胞は両群間に差をみなかった。油症において Th0 細胞および Th2 細胞に対する PCB の慢性的影響が示唆された。

6．長崎県油症認定患者における皮膚感覚異常の検討

Dioxin 類化合物による神経障害は感覚障害が主で、末梢神経障害によるものと考えられている。油症の発生から50年経過しているが感覚異常のある油症患者が多くいる。今後の治療介入戦略を探索する目的に、2019年度は油症患者の皮膚感覚異常について触覚、温痛覚をそれぞれ Von frey フィラメントと温熱計を用いて評価した。その結果、触覚については油症患者で健常コントロールと比較して鈍

くなっている傾向にあった。

7．カネミ油症患者における中枢神経障害に関する文献的研究

カネミ油症患者に生じる中枢神経障害の報告は近年減少している。文献を考察したところ、PCB、PCDF、dioxin による中毒症状の発生減少とともに中枢神経障害そのものが評価されていない可能性も考えられた。

8．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係の検討

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。2019年度は、2015年に福岡県久山町の環境調査を受診した住民495人のうち、心機能障害マーカーである血清 NT-proBNP を測定した455人において、血中 2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP の関係を横断的に検討した。その結果、2,3,4,7,8-PentaCDF 濃度と血清 NT-proBNP との間に明らかな関連は認められなかった。

9．油症曝露による継世代健康影響に関する研究

油症曝露による継世代健康影響に関する研究 油症2世の口腔内色素沈着に影響する因子の検討-

油症発生後に油症患者より出生した児（油症2世）の口腔内色素沈着に影響する因子について検討した。対象は油症2世144例とし、油症検診で得られた歯科検診票データをもとに、口腔内色素沈着所見を - / ±、+、++、+++ の4群に分類し、臨床的特徴（年齢、性別、油症認定状況、油症曝露状況、油症発生から出生までの期間、喫煙状況）や母児血中 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzo furan (PeCDF) 濃度との関連について検討した。その結果、1) 臨床的な特徴としては、色素沈着が重症化するにつれて、男

性と喫煙者の割合が増えてくること、
2) 母児血中 PeCDF 濃度との関連では、重症化するにつれて母親血中 PeCDF 濃度が高い値を示すこと、3) 重回帰分析では、口腔内色素沈着の重症度は喫煙 (偏回帰係数 0.6431, $p < 0.0001$) と母親血中 PeCDF 濃度 (偏回帰係数 0.0003, $p = 0.0027$) と有意な相関を示すことが分かった。これらの成績から、油症 2 世の口腔内色素沈着に影響する因子として、母親の血中 PeCDF 濃度および喫煙があげられる。しかしながら母親の血中 PeCDF 濃度の偏回帰係数は極めて低いので、色素沈着に影響するのかどうかさらなる評価が求められる。今後次世代研究をすすめていくうえには、コホート研究が必要であると考えられる。

母親の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と子供の症状の関係に関する研究

母親が摂取したダイオキシン類は、胎盤や母乳を通して、子供に移行するが、子供は摂取したとしても成長後に体重が増加するため成長後の濃度は一般人と同等のレベルまで低下すると考えられる。そこで本研究では、母親のダイオキシン類濃度と子供の症状の関係に着眼して分析を行った。母親の濃度と子供の測定項目のうち骨関連のマーカーの「MMP-3」が関係の強い項目として見つかった。しかし、同系統の他項目と比較して突出していることから、偶然の可能性も考えられた。

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 SP-D の役割

肺サーファクタント蛋白 (SP-D) ノックアウトマウスに Benzo[a]pyrene (BaP) を経気道的に投与すると、細気管支領域で PAS 陽性細胞の著明な増加が観察され、BaP による気道傷害が野生型マウスに比して増悪しており、油症肺傷害における SP-D の保護的役割が考察された

2. Myelin proteins を用いたベンゾピレン投与ラットでの生薬の効果検討

ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果、感覚刺激による定量的閾値評価法、酸化ストレス・抗酸化力の測定法、Western blot 法を用いて検討した。酸化ストレス度に関しては、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で有意な酸化ストレス状態の改善が見られた。また、Western blot 法を用いた myelin basic protein (MBP)、cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1)、myelin-associated glycoprotein (MAG) の発現検討では、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒの投与群で MAG の発現低下の抑制、CYP1A1 の発現増加の抑制がみられた。しかし、MBP の発現に関しては群間有意な差はみられなかった。本研究の結果から、ベンゾピレン投与はその毒性が触・圧覚を伝える A 線維に作用し、脱髄を起こすことで、感覚異常等を発生させた可能性が示唆された。また、その作用は抗酸化作用と AHR 活性化の阻害作用があるケイヒの投与により抑制されることで感覚異常が改善される可能性が示唆された。

3. オートファジーによる酸化ストレスの制御機構

これまでの研究で、糖尿病の治療薬であるメトホルミンは、表皮細胞における芳香族炭化水素受容体を活性化し、さらにオートファジーを誘導することが明らかとなった。そこで、今回は、表皮細胞における酸化ストレスによる炎症をメトホルミンがどのような機序で制御するかについて研究を行なった。その結果、メトホルミンは炎症性サイトカインである IL-17A・TNF- α による酸化ストレスによって誘導されるインフラマソームの活性化を抑制し、最終的に IL-1 の産生を抑制することで、炎症を抑制する働きがあることが明らかとなった。メトホルミンは、油症のみならず IL-1 が病態形成に関わる炎症性疾患の治療に有用である可

能性が示唆された。

4. 2,4,6-三塩素置換PCB異性体PCB155のヒト肝チトクロムP450分子種による代謝
本年度は、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、ヒト肝ミクロゾーム(Ms)およびヒトチトクロムP450 (CYP)分子種による代謝を調べた。まず、ヒト肝Msでは、ラットやモルモットと同様に、代謝物M1(3-OH体)が1種類生成され、その生成活性は0.292 nmol/hr/mg proteinであった。次に、4種類のヒトCYP分子種(1A2、2A6、2B6、3A4)での検討結果、CYP2B6のみがM1を生成し、その活性は0.702 pmol/hr/pmolであった。以上の結果から、PCB155は、ヒト肝Msによっても容易に3-OH体へと代謝されること、また、今回検討したヒトCYPのうち、CYP2B6のみが、3-OH体への強い代謝活性を有していることが明らかになった。

5. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxinによる出生児の性未成熟の機構解析：脳の性分化と生殖腺の発達に対する芳香族炭化水素受容体の寄与

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。我々はこれまでに、本障害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。さらに最近、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。2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)による出生児の性未成熟の機構解析を目指して、芳香族炭化水素受容体(AHR)欠損ラットで検討を行った。その結果、TCDD母体暴露していないAHR欠損雄ラットでは、脳の性分化が起こる周産期におい

て、AHR欠損により脳下垂体のLHのmRNA発現の低下、さらに、それを起点とした性ステロイド合成系タンパク質、および、性ステロイドであるtestosteroneの低下およびその傾向を示すことが明らかになった。このことから、AHRが脳下垂体LH遺伝子のエンハンサー配列であるxenobiotic responsive element(XRE)配列に直接結合し、転写を制御している可能性が考えられた。そこで、LH遺伝子に対してAHRがAHR依存的にLHの転写に有意な影響があるのか否かを検証するため、抗AHR抗体を用いたクロマチン免疫沈降法(ChIP)にて解析を行った。その結果、WTとAHRヘテロ欠損雄胎児間でAHRのLHのXRE配列への結合能に有意な差は見られなかった。次に、GD18において脳下垂体のLH産生細胞への分化に関与する因子、GATA2、Pitx1およびProp1の発現の有意な低下を認めた。AHRは胎児期の脳下垂体に作用しLH産生細胞への分化に重要な役割を示す可能性が浮上した。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。AHR欠損により、思春期の血中testosteroneの減少が明らかになった。さらに、この結果に付随して、AHR欠損により、精子数の減少も明らかとなった。すなわち、AHRは精巣の性ホルモン分泌や機能維持に関与する可能性が示唆された。出生2日目(PND2)の雄では、AHR欠損により著しく血中testosterone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週齢および8週齢では、AHR欠損雄ラットで、testosterone濃度が野生型ラットに比べ著しく低かった。しかし、13週齢および20週齢では、野生型と遜色ないレベルであった。AHR欠損により、生殖器官に形態学的な影響がおよぶか否かを検討するため、精子形成が始まる思春期である8週齢雄ラットの精巣ならびに精巣上体管をHE染色により、

観察した。野生型と比較して、欠損型は精巣上体管内の精子数の減少傾向が観察され、AHR 欠損による精子数減少が想定された。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 testosterone の減少、およびその後の持続的な精子数の減少が引き起こされたことから、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。

6. 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：脂質代謝との関連性の検討

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予備的に行った。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。昨年度までの検討において SelenBP1-KO マウスの腎臓では、脂肪酸の水酸化に関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することが示唆された。また、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。本年度の検討により、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (Ppara)の発現レベルの有意な低下が示唆された。これは、先に行ったマイクロアレイの結果を支持した。一方、Ppara-beta (Pparb)および Ppara-gamma (Pparg)の発現レベルには影響がなかった。また、昨年度までの検討から 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-alpha (Rxra)の発現の低下が示唆されている。従って、Ppara および Rxra の発現低下を通じた Cyp4a の低下が示唆された。一方、cyclooxygenase 1 (Cox1), Cox2 および 3 種の lipoygenase レベルは変動しなかった。これに符合して、ロイコトリエン類の増加が推定された。より精度をあげるために、例数を増やしてメタボロミクス解析を行った結果も、それを支持した。また、抗酸化酵素の発現解析を行ったところ、superoxide dismutase 1 (Sod1)および Sod2 の発現が有意に低下していた。これらのことから、SelenBP1 は酸化ストレス軽減に寄与している可能性が示唆された。

7. ドラッグデリバリーシステムと腸粘膜内アミノアセチル酸濃度の研究

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、消化器症状として下痢や過敏性腸炎症状が報告されてきた。ダイオキシン類の生体への毒性には活性酸素が中心的な役割を果たすと考えられている。5-アミノサリチル酸は活性酸素の産生抑制や活性酸素による細胞傷害の抑制に働くことが知られている。今回、ドラッグデリバリーシステムの相違による盲腸と直腸粘膜内での 5-アミノサリチル酸ならびに代謝産物のアセチル 5-アミ

ノサリチル酸の濃度の違いを明らかにした。

D．結論

以上、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、疫学・臨床医学・基礎医学の観点から多面的に明らかになりつつある。これらの結果を踏まえて、将来的に、油症の症状を緩和する新しい治療薬の発見・開発につなげたいと考えている。

E．健康危険情報

なし。