

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 辻学 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 准教授

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 50 年以上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】

臨床的追跡調査・疫学研究

1) 油症患者の支援と治療研究の推進

①健康実態調査、一斉検診の実施、検診結果を集積した患者データベースを更新した。令和 3 年度全国油症検診の受診者の検診結果をデータベースに入力した。

②油症認定患者の長期死亡リスクについて再評価を行っている。追跡調査期間を 55 年に延長し、油症認定患者の生存・死亡情報を更新した。

(2) 臨床的追跡調査・疫学研究

①2021 年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度を測定した認定患者 1 名と未認定者 92 名について結果集計を行った。認定患者の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 66 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) 濃度は 57 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は平均 8.5 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 13 pg TEQ/g-fat であった。

②ヒト体内で最も高濃度に検出される 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (CB153) とヒトチトクローム P450 (CYP) 2A6 組換え酵素を in vitro 系で反応させ、生成した水酸化 PCB を HRGC/HRMS で分析した。その結果、生成した水酸化 PCB 異性体は 4'-OH-CB101 と推定され、さらに in silico 解析によるドッキング様式のシミュレーション結果を考慮すると、CB153 は脱塩素化を伴う反応で 4'-OH-CB101 に代謝されると推測した。

③新しい分析カラムによる PCB 異性体の分析を行ったところ、条件検討により 20 分の短縮が可能となった。またヘリウムガスの使用量が減少した。

④油症女性患者の閉経年齢と血中ダイオキシン類濃度との関連について追加検討をしている。

⑤カネミ油症患者に対する桂枝茯苓丸の臨床研究を後方視的に有効群と無効群で比較検討したところ、桂枝茯苓丸はカネミ油症患者の倦怠感に有効である可能性が示唆された。

(3) 基礎的研究

- ①ヒト Club 細胞株 NCI-H441 細胞に対して Benzo[a]pyrene (BaP) を投与すると、apoptosis や goblet cell differentiation を認める。これらの変化はヒトリコンビナント SP-D の投与により抑制された。
- ②2,4,6-三塩素置換型 PCB (246 型 PCB) の 1 つの 2,4,6,3',4',5' - hexachlorobiphenyl (PCB119) につき、ラット・ヒト肝ミクロゾーム (Ms) による代謝を解析した。
- ③紫外線照射モデルを用いてメラニン関連遺伝子と AHR の相互作用について検討した。
- ④実験動物を用い、AHR が欠損すると精巢の重量が減量する機序として、線維芽細胞成長因子の機能不全の可能性を示した。また、ダイオキシン誘導性蛋白質である Selenbp1 は癌抑制効果を発揮する可能性を示した。
- ⑤油症患者と健常者の皮膚ガスを採取、成分解析し、採取環境の影響について検討した。
- ⑥ベンゾピレンで AHR シグナルが活性化すると歯根膜細胞およびヒト歯根膜幹細胞株の MMP12 が増加することが分かった。
- ⑦腸上皮細胞を AHR の作用物質で刺激したところ、NRF2 をはじめとする抗酸化遺伝子の発現が誘導されることを確認した。
- ⑧AHR に作用するキヌレイン経路で産生されるキヌレン酸という物質が関節内の軟骨変性を誘導する可能性が示唆された。
- ⑨油症患者の血液細胞を分析したところ、油症患者において制御性 T 細胞の比率・細胞数は、対象者の間に明らかな差は認めなかった。

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 55 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

I. 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。
4. 油症ダイオキシン研究診療センターとの協力体制の充実
油症ダイオキシン研究診療センターを中心に、九州大学病院の各診療科 (医科・歯科) 油症診療ネットワークを構築している。診療科の担当医師について確認を行なった。
5. 死因・次世代調査
ダイオキシンの生体への影響、次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。

II. 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. 各疾患バイオマーカー値の測定および保存血清バンクの充実

基礎研究・臨床研究の結果に基づいて、油症の疾患活動性に相関する有用なバイオマーカーとなりうるかを評価するため、保存血清を保存する。

5. 油症の継世代に及ぼす影響に関する検討を行うため、コホートの作成に取り掛かる。

6. PCB やダイオキシン類の体内動態を明らかにする。

7. 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

I. 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。2016年には、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、

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。今年度は新型コロナウイルス感染症の拡大を防ぐため、WEB 会議・書面会議で行った。

4. ダイオキシン毒性を軽減するための食事・運動・漢方セミナーや講演会の実施

新型コロナウイルス感染症の状況から、オンラインセミナーを行った。具体的には、漢方セミナー（漢方薬による治療について）の動画を油症ダイオキシン研究診療センターの HP に令和 4 年 3 月 16 日に公開した。

5. 油症対策委員会の開催

厚生労働省、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。加えて油症次世代の健康状況の調査の中間報告・調査状況、令和 5 年度の調査計画・方法について検討を行なった。

6. 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 55 年間の追跡調査を実施した。

7. 油症 2 世、3 世を対象とした次世代の健康調査

次世代の調査対象者 421 人に個人票・次世代調査票・同意書を送付した。これら全てを回収できた人数は 290 人であった。さらに、検診を受診し、医師による問診・血液検査まで完了した人数は、183 人であった。今後は、これらのデータに基づき、健康状態に関する統計学的解析を進める。

8. 油症患者の血液中ダイオキシン類分析におけるガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析装置の検討

ガスクロマトグラフィ/高分解能質量分析装置による測定は、装置が簡素化され再現性が高いこと、測定時間が短縮されたことが優れていたが、ダイオキシン類各異性体の S/N 比が従来方と比較して、相対的に低下しており、更なる条件検討が必要と考えられる。

II. 臨床的追跡調査・疫学研究

1. 油症検診の追跡調査

1) 油症検診データ管理システムの改修
検診票の変更については、これまで生化学検査や免疫学的検査等の検査項目について追加や削除など軽微な変更があり、その都度対応している。

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。2021 年度の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。2021 年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度を測定した認定患者 1 名と未認定者 92 名について結果集計を行った。認定患者の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 66 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) 濃度は 57 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は平均 8.5 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 13 pg TEQ/g-fat であった。2021 年度に実施した血液中 PCB 分析精度管理について、データ解析を行った結果、当所を含む国内 5 機関の定量値は概ね一致しており、各機関で血液中 PCB の定量分析が適切に実施されていることが分かった

2. 油症患者における眼科的所見

1) 福岡県・長崎県検診における眼科的所見

本年度は新型コロナウイルス感染症の影響で眼科的診察を行うことが難しかった。

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

本年度は新型コロナウイルス感染症の影響で歯科診察を行うことが難しかった。

4. 油症における末梢血 T 細胞に関する検討

油症患者における制御性 T 細胞の比率・細胞数について検討したが、対象者との有意な差は認めなかった。今後はダイオキシン類の濃度との相関を検討する予定である。

5. 油症患者における皮膚ガス分析

皮膚ガスの成分は、採取環境に依存する可能性があり、追加解析を行なっている。

6. カネミ油症患者における中枢・末梢神経障害の文献的考察と他の中毒性疾患による神経障害との差異の研究

油症患者における末梢神経障害は、パターン化した解析によって評価できる可能性が示唆された。

8. 油症曝露による継世代健康影響に関する研究

油症曝露による女性特有の健康影響に関して検討した。前回は、自然閉経の年齢を検討し、PeCDF 濃度との間には有意な相関は認めなかったため、PCB・PCQ との相関を検討中である。

III. 基礎的研究

1. ダイオキシン類による気道上皮傷害における肺サーファクタント蛋白に関する検討

ヒト Club 細胞株 NCI-H441 細胞に Benzo[a]pyrene (BaP) を投与し、ヒトリコンビナント SP-D の投与によって CYP1A1 の発現が抑制されるか検討したが、明らかな抑制効果は認められなかった。

2. 感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対する β -NMN の効果検討

ベンゾピレンを投与したラットにおける自発行動に対する効果を評価した。ベンゾピレン投与は末梢神経と中枢神経内で AHR を活性化させ、その毒性により神経系が影響を受けることで自発運動量が低下した可能性が示唆された。

3. 皮膚の慢性炎症におけるエンドセリン-1 と AHR の相互作用

紫外線照射により、メラニン産生酵素の誘導を認めたが、それに対する AHR リガンドの影響は見られなかった

4. 膠原病の皮疹形成機序における AHR の役割に関する研究

抗酸化作用を有する薬剤 GSK 2795039 がヒト表皮角化細胞において、AHR を活性化させ、膠原病の治療薬であるヒドロキシクロロキンの効果を増強させる可能性が示唆された。

5. PCB 異性体の蓄積パターン、代謝経路について

PCB 異性体のヒトチトクローム P450 (CYP) 分子種による分解過程を研究し、

油症患者におけるPCB異性体の特徴的な蓄積パターンに影響を与える要因を解析した。PCB119の分解経路を検討したところ、PCB119はラットおよびヒト肝において、比較的容易に3-OH体へと代謝されること、また、CYP2B1およびヒトCYP2B6が強く関与することが示唆された。

6. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析：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

AHR が欠損すると精巣重量が低下する機序として、線維芽細胞成長因子の機能不全に伴うシグナル伝達経路の不活性化が関与する可能性が示唆された。

7.

ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質1 (SELENBP1)：ヒト由来細胞を用いた検討

ダイオキシン誘導性の Selenbp1 の昨日解析を行っている。今回は、がん由来細胞を用いて行い、Selenbp1 はがん抑制的な働きを持つ可能性が考えられた。

8. Ah リガンドの消化管上皮に対する作用

腸上皮細胞に AHR リガンドを投与し、NRF2 の核内移行を確認した。AHR が活性酸素に対して防御的に働くことが腸管でも想定される。

9. ヒト歯根膜細胞における AhR シグナルの活性化に関する研究

ヒト歯根膜細胞・ヒト歯根膜幹細胞株に対して、ベンゾピレンを投与して解析を行なった。ベンゾピレンは、MMP12 の発現を増加させる可能性が示唆された。

また、ベンゾピレンを投与したヒト歯根膜幹細胞では、Tenascin-C の発現を抑制することで歯槽骨修復能を低下させる可能性が示唆された。

10. 油症患者の関節症状に関する研究 —キヌレニン経路の関節炎への影響—

油症患者の関節症状に関する研究では、キヌレン酸という物質が関節内の軟骨破壊を誘導する可能性が示唆された。

D. 結論

環境汚染物質であるダイオキシン類が環境、生物に与える影響は国内外で検証されている。油症は住民が高濃度の PCB/ダイオキシン類を経口摂取した世界的にも稀な事件である。生体内で代謝されにくく、生体内に長期間残存するダイオキシン類がヒトに及ぼす慢性影響を検証した疫学研究は油症研究の他にない。油症班では、血液中にごく微量に存在するダイオキシン類各異性体濃度を精確かつ再現性をもって分析している。この油症研究により、患者のみならず、人類にとって有益な知見が得られると期待される。特に、今年度からは、油症2世・3世における健康調査を開始し、ダイオキシン類の世代に渡る慢性影響についての研究に着手した。このダイオキシン類による継世代の健康状況の解析を行う研究は、人類のダイオキシン類の影響を解明するために非常に重要な研究結果となりうる可能性が高い。

基礎的研究においては、ダイオキシン類の受容体である AHR の働きに着目し、培養細胞・動物実験を用いた実験を継続して行っている。最近では、九州大学病院油症ダイオキシンセンターの研究業績に基づき、AHR の働きを調節して疾患を治療するというコンセプトに基づいた新しい薬剤（治療用 AHR 調節薬：Therapeutic AHR-Modulating Agent, TAMA）が開発された。現在、Tapinarof という化合物を含む外用薬が、炎症性皮膚疾患の治療薬として臨床試験が行われている。米国では2022年5月に使用が認可された。さらに最近では、Tapinarof が IL-37 という抗炎症作用を発揮するサイトカインの産生を誘導することを明らかとした。IL-37

によって油症の症状が寛解するか、検討していく方針である。T

E. 健康危険情報

なし。

F. 謝辞

本研究を行うにあたり、研究分担者・協力者の先生方に厚く御礼を申し上げます。