

課題名 5C-1251 ダイオキシン類曝露による継世代健康影響と遺伝的感受性要因との関連に関する研究

課題代表者名 和氣 徳夫（国立大学法人 九州大学 環境発達医学研究センター研究推進部門ゲノム疫学分野 特任教授）

研究実施期間 平成24～26年度

累計予算額 62,970千円（うち26年度20,628千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード ダイオキシン類、AhR-130bpC/T SNP、NF1C、IL1 β 、IL24、油症

研究体制

- (1)ダイオキシン類曝露による継世代健康影響及び血中ダイオキシン類濃度との関連に関する研究（地方独立行政法人福岡市立病院機構福岡市こども病院・感染センター）
- (2)ダイオキシン類の曝露量と継世代移行量の評価に関する研究（福岡県保健環境研究所）
- (3)ダイオキシン類曝露による継世代的健康影響の発症機序に關与するゲノム研究（国立大学法人 九州大学）

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

化学物質の胎児期曝露による影響に世界的な関心が高まっている。我が国においても環境省の「子どもの健康と環境に関する全国調査:エコチル調査」が平成22年度に始動し、化学物質曝露等が子どもの健康に与える影響を明らかにする目的でコホート調査をすすめている。一方、高濃度の化学物質に曝露した群において次世代への健康影響を観察することは、化学物質曝露による次世代への健康影響を明らかにするうえで重要な基礎資料となる。

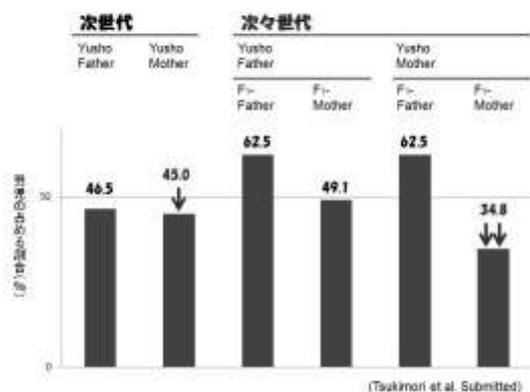
申請者らはpolychlorinated biphenyls(PCBs) およびダイオキシン類の曝露によるカネミ油症患者の治療法開発および発症機序の解明に向けた研究をすすめている(九州大学油症ダイオキシン研究センター)。胎児期に油症に曝露した例では、児の出生体重は母体血中ダイオキシン類濃度に有意な負の相関を示し、この胎児発育抑制効果は男児に特異的であることを明らかにした。また、次世代、次々世代において男児出生率が有意に低いことが分かった。一方、油症患者より出生した児の血中ダイオキシン類濃度は正常健常人と比して有意な差を認めないことから、これら次世代への健康影響の発現は、高濃度のダイオキシン類の母児間移送によるものとは異なる機序が推察される。

ダイオキシン類はAhRを介して諸種の作用を示すことが知られている。申請者らはAhRのプロモータ領域を明らかとし、この領域内の-130SNP C/T遺伝子多型によって1.5倍以上の有意なプロモータ活性の亢進を認めることを明らかにした。一方、ラットを用いた実験では、PCBなどの化学物質曝露により次世代、次々世代の雄雌出生率の減少をきたし、この機序にはエピジェネティクス変化が関与することが報告されている。これらの成績から、ダイオキシン類曝露による次世代への健康影響の発現機序には、AhRを介する細胞内シグナル伝達機構の個体差(遺伝子多型)やエピジェネティクス変化による遺伝的感受性が関わっていることが推察される。

そこで、本研究では、油症患者を対象としてダイオキシン類曝露における次世代、次々世代の健康影響と遺伝的感受性要因との関連について明らかにすることを目的とする。

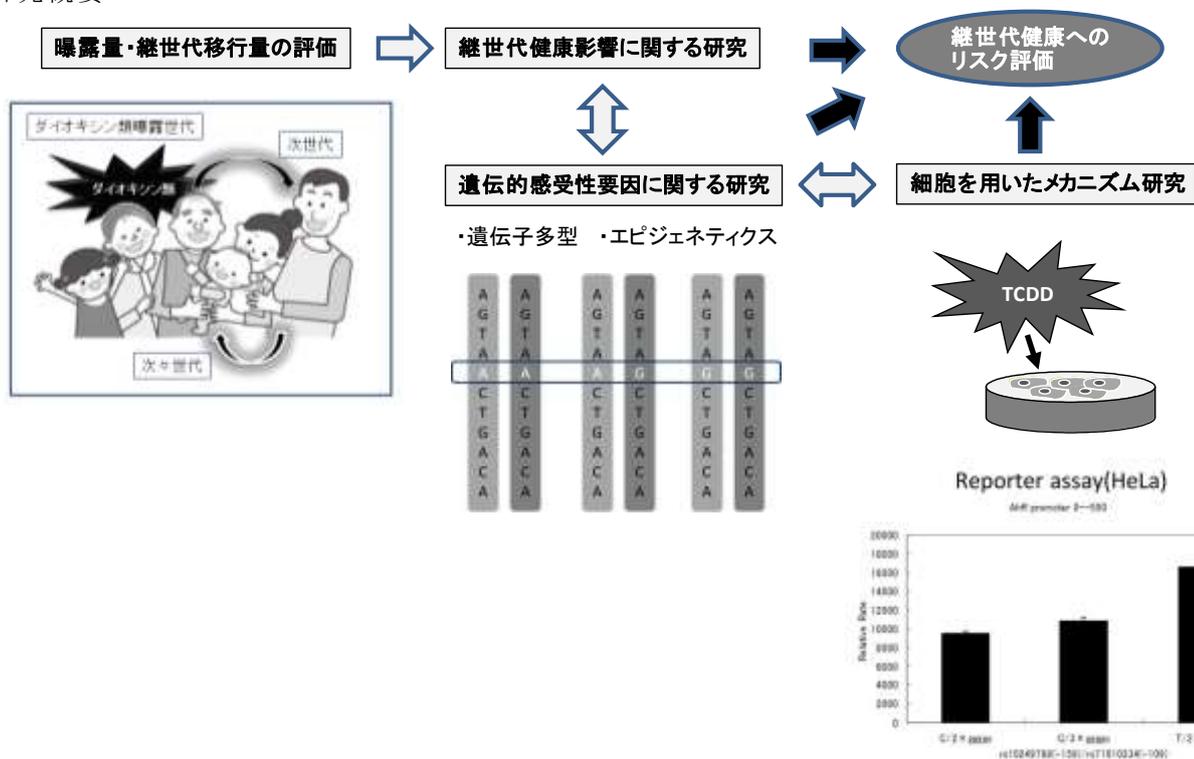
胎児期油症曝露例の次世代、次々世代の男児出生率

胎児期油症曝露では男児の出生が減少する



< 参考図 2 >

研究概要



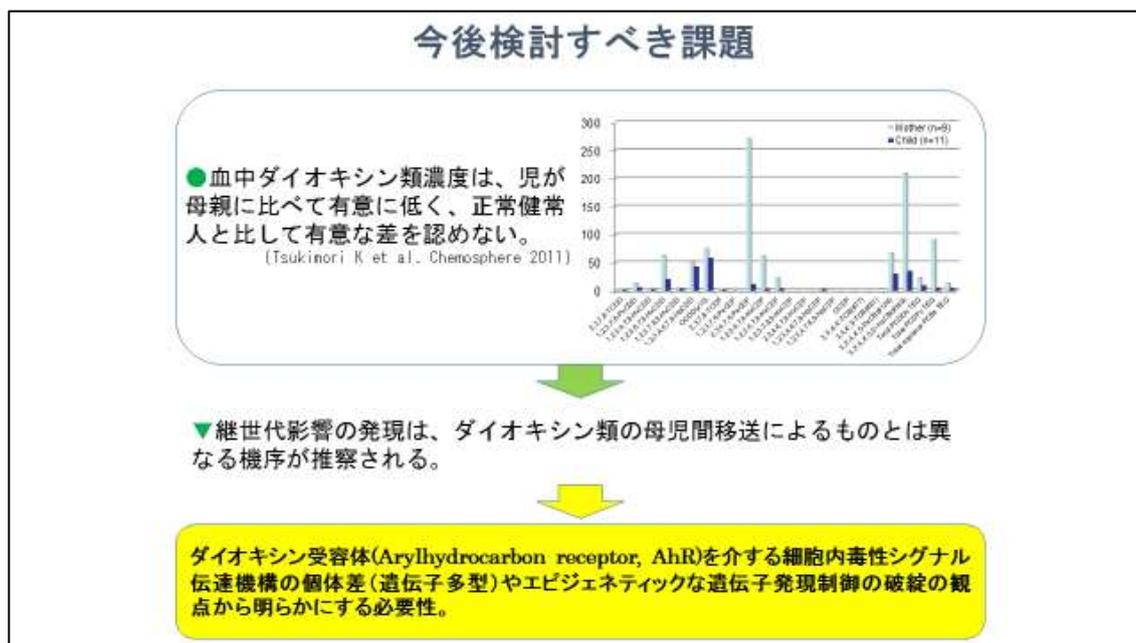


図2

2. 研究開発目的

本研究では、ダイオキシン類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機序を明らかにすることを目的とする。この主旨に沿って、ヒトがダイオキシン類に曝露した事例である油症患者を対象として、油症曝露世代、次世代、次々世代の3世代にわたる健康影響を明らかにする。ついで、これら実態調査により明らかとなった継代的な健康影響の機序について、血中ダイオキシン類濃度、ダイオキシン受容体(Arylhydrocarbon receptor, AhR)を介する細胞内毒性シグナル伝達機構の個体差をゲノム多様性及びエピジェネティックな遺伝子発現制御の破綻の観点から明らかにする。

3. 研究開発の方法 ※3.についてはサブテーマごとに記載すること。

(1)ダイオキシン類曝露による継世代健康影響及び血中ダイオキシン類濃度との関連に関する研究

ダイオキシン類曝露による曝露世代、次世代、次々世代にわたる継世代影響については、国際的にもわが国においてもほとんど検討がなされていない。今回の高濃度のダイオキシン類に曝露した油症患者より出生した児における検討では、皮膚色素沈着を発症した群では母体血中ダイオキシン類濃度が高く、母体の高濃度のダイオキシン類曝露による児の健康影響のひとつとして皮膚色素沈着が示された。また、母体が高濃度のダイオキシン類に曝露した場合には、次々世代、なかでも女系(母親)曝露においては男児出生割合が低下する可能性が示唆された。一方、油症患者より出生した児の気管支喘息の発症頻度は一般頻度よりも高く、母体の血中ダイオキシン類濃度は児の気管支喘息の発症リスクに影響を及ぼさないことから、ダイオキシン類曝露による児の気管支喘息の発症機序には曝露した量的な問題ばかりでなく、ダイオキシン類に対する感受性が関与している可能性があることが考えられた。

(2)ダイオキシン類の曝露量と継世代移行量の評価に関する研究

妊産婦から母体及び胎児関連試料(母体血、母体脂肪、母乳、胎盤、さい帯、さい帯血(さい帯動脈血(A血)及びさい帯静脈血(V血))、羊水、胎脂、胎便、新生児尿の10種)の採取を行った。このうち今回は、羊水、胎脂、胎便、新生児尿のダイオキシン類濃度を測定し、各検体間濃度を比較解析した。また、カネミ油症患者の母親と油症発症後に生まれた子のうち血中ダイオキシン、PCB類濃度を測定した記録のある母親34人、子54人の血中ダイオキシン、PCB濃度を母乳摂取状況と比較し解析した。

(3)ダイオキシン類曝露による継代的健康影響の発症機序に関与するゲノム研究

九州大学病院油症ダイオキシン診療研究センターで管理・登録している油症曝露患者1420名のなかで、油症発症後に児を得た油症曝露世代437名とその次世代572名、次々世代346名を対象として、アンケート調査による健康実態調査を行う。これら油症患者のうち九州大学病院で検診を行っている曝露世代200名・次世代200名・次々世代100名を対象に、ダイオキシン類血中濃度、ダイオキシンAhR関連遺伝子多型、細胞増殖・ホルモン受容体関連遺伝子などに関してエピジェネティックな変化を解析し、健康影響との関連について検討する。

4. 結果及び考察 ※4. のうち、結果についてはサブテーマごとに記載すること。

(1)ダイオキシン類曝露による継世代健康影響及び血中ダイオキシン類濃度との関連に関する研究

アンケート調査を施行したカネミ油症女性患者737例のうち581例(78.8%)より回答を得、カネミ油症発生後に妊娠・出産となった油症患者は206例であった。この206例のうち64例(117妊娠)においては母体血中ダイオキシン類濃度を測定し、59例(142妊娠)においては母体ダイオキシン類受容体(AhR)遺伝子多型を解析した。また、27例においては次々世代(49例)の健康情報が得られた。

① 次世代への健康影響と母体血中ダイオキシン類濃度との関連

油症患者より出生した児(次世代)のなかで、皮膚色素沈着を発症した群では母体血中ダイオキシン類濃度が高く、母体の高濃度のダイオキシン類曝露による児の健康影響のひとつとして皮膚色素沈着が示された。また、母体の血中ダイオキシン類濃度は児の気管支喘息およびアトピー性皮膚炎の発症リスクに影響を及ぼさないが、母体の血中ダイオキシン類濃度が高いと児のアレルギー性鼻炎の発症リスクは低下する傾向があることが分かった。一方、油症患者より出生した児の気管支喘息の発症頻度は一般頻度よりも高く、母体の血中ダイオキシン類濃度は児の気管支喘息の発症リスクに影響を及ぼさないことから、ダイオキシン類曝露による児の気管支喘息の発症機序には曝露した量的な問題ばかりでなく、ダイオキシン類に対する感受性が関与している可能性があることが考えられた。

② 次世代への健康影響と母体AhR遺伝子多型および母体血中ダイオキシン類濃度との関連

油症発生後の人工流産、自然流産、胎児死亡の頻度は油症発生前10年間に妊娠した油症患者における頻度と比較すると有意な差はなく、母体血中ダイオキシン類濃度や母体AhR遺伝子多型との間に明らかな関連はなかった。

③ 次々世代への健康影響と母体AhR遺伝子多型および母体血中ダイオキシン類濃度との関連

次々世代における男児出生割合は0.51と次世代の割合(0.55)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(0.514)と比較して有意な差はなかった。また、母体AhR遺伝子多型と次世代・次々世代の男児出生割合との間においても明らかな傾向はみられなかったが、母体の血中ダイオキシン類濃度が高い場合には男児出生割合が低下する傾向があった。

このように高濃度のダイオキシン類に曝露した油症患者より出生した児で観察された健康影響のなかには、母体のダイオキシン類曝露量と関連するものと関連しないものが存在すること、さらに次々世代にも影響、すなわち継代的な影響があるものがあることが示された。今後、ダイオキシン類の量的な問題ばかりでなく、児への健康影響と遺伝的感受性(遺伝子多型やエピジェネティックな変化)との関連について検討することが必要であると考えられた。

(2)ダイオキシン類の曝露量と継世代移行量の評価に関する研究

生体試料(母体血、母体脂肪、胎盤、さい帯血、胎脂、胎便)中の分析結果についてダイオキシン類濃度(Total TEQ)の比較を行ったところ母体血、胎盤、母体脂肪、胎脂、さい帯血、胎便の順に低くなる傾向が認められた。さらにこれら生体試料と母体血のダイオキシン類濃度間に良好な正の相関($r^2=0.8322\sim0.9399$)が認められた。母体内でのダイオキシン類の胎児への透過は、胎盤部位で一定の抑制がなされ、胎児へ移行する毒性量は軽減されることが示唆された。

カネミ油症患者母子間の血中PCDF、PCB濃度の明確な関連は認められなかった。しかし、母子間の血液中PCDF濃度の関係より母乳摂取が影響する可能性がある。

(3)ダイオキシン類曝露による継代的健康影響の発症機序に関するゲノム研究

化学物質の胎児期曝露による影響に世界的な関心が高まっている。我が国においても環境省の「子どもの健康と環境に関する全国調査:エコチル調査」が平成22年度に始動し、化学物質曝露等が子どもの健康に与える影響を明らかにする目的でコホート調査をすすめている。一方、高濃度の化学物質に曝露した群において次世代への健康影響を観察することは、化学物質曝露による次世代への健康影響を明らかにするうえで重要な基礎資料となる。

申請者らはpolychlorinated biphenyls(PCBs) およびダイオキシン類の曝露によるカネミ油症患者の治療法開発および発症機序の解明に向けた研究をすすめている(九州大学油症ダイオキシン研究センター)。胎児期に油症に曝露した例では、児の出征体重は母体血中ダイオキシン類濃度の有意に負の相関を示し、この胎児発育抑制効果は男児に特異的であることを明らかにした。また、次世代、次々世代において男児出生率が有意に低いことが分かった。一方、油症患者より出生した児の血中ダイオキシン類濃度は正常健常人と比して有意な差を認めないことから、これら次世代への健康影響の発現は、高濃度のダイオキシン類の母児間移送によるものとは異なる機序が推察される。

ダイオキシン類はAhRを介して様々な機能を示すことが知られている。申請者らはAhR遺伝子内DNA多型がAhR機能に影響を及ぼし継代的健康影響に関与するのではないかと考えた。

①AhR-130bp C/T SNPがプロモータ活性に及ぼす影響について

まずAhRプロモータ領域を決定するため、1精子受精・雄核発生全奇胎DNAを用い、様々なAhRプロモータ欠失変異体を作成し、ルシフェラーゼリポータに組み込んだ。1精子受精・雄核発生全奇胎は全ての対立遺伝子間でホモ結合を形成しているためSNP解析に有用である。ルシフェラーゼアッセイの結果、AhRプロモータは転写開始点から-452bpの領域に存在することが判明した。本領域内にはマイナーアリの頻度が高い2種類のDNA多型が存在した(-59bpのGGGGCリピート数変化、-130bp C/T多型)。全奇胎DNAを用い予想される9種類のハプロタイプの頻度を調べた結果、-130bp C Xリピート数2(18.0%)、-130bp T Xリピート数2(24.0%)、-130bp C Xリピート数3(52.0%)のハプロタイプが日本人には高頻度に出現することが判明した。それぞれのハプロタイプを有するAhRプロモータをルシフェラーゼリポータに組み込み、AhRプロモータ活性を解析した。その結果、-59bp DNA多型に関係なく-130bp C/T SNPのみがプロモータ活性の変化に関与していた。C/CよりT/Tで転写活性が1.75倍亢進していた。

AhRプロモータ領域-59bp領域には転写因子SP1が結合する領域が存在し、SP1によりAhR転写が制御されている。一方、-130bp近傍にはNF1転写因子結合サイトが存在する。NF1にはNF1A、NF1B、NF1C及びNF1Xのサブタイプが存在する。NF1C及びNF1Xは転写抑制因子として機能する。AhR-130bp C/Cプロモータでは転写が抑制されることから申請者らはNF1Cに着目し、-130bp C/T SNPによるAhRプロモータ活性の制御機構について解析を進めた。

HeLa細胞(SNP-13bp C/C)及びTYK-nu(SNP-130T/T)からDNAを抽出し、NF1C抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った。NF1Cと-130bp領域のDNAは特異的に結合し、T/TよりC/Cの方がNF1C結合親和性が高いことが判明した。さらにElectrophoretic mobility shift assayを行った。-130bpCプローブはTプローブに比し複合体形成能が高く、さらにNF1C抗体によりスーパーシフトすることからNF1Cと-130bp領域との特異的結合が証明された。3倍量のcompetitor存在下において、NF1CはTプローブに比し、Cプローブで結合能が亢進していた。さらにHec116細胞(SNP-130bp C/T)を用いてFlag-NF1Cを遺伝子導入した。NF1C抗体を用いてクロマチン免疫沈降し、複合体中に含まれるSNP-130bp領域をPCRにより増幅した。PCR産物をサブクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、複合体に含まれる-130bpDNA領域はTアリルよりもCアリルの方が有意に高率であった。これらの結果から、-130bpC/CはT/Tと比較し高率にNF1Cと結合しAhRプロモータ活性が抑制されるが、T/TはNF1C結合親和性が低く、AhRプロモータ活性が有意に抑制されないことが判明した。

②NF1CによるAhR発現抑制の分子機構

NF1Cを強制発現させるためflagをタグした安定型NF1CcDNA変異体をアデノウィルスベクターに組み込んだ。さらにNF1Cノックダウンの為にSiRNAを用いた。HEK293細胞へ遺伝子導入しAhR mRNA及び蛋白発現変化をreal time PCR及びウェスタンブロット法で解析した。

NF1Cの過剰発現によりAhRプロモータ活性がいかに変化するかを解析する為、-130bpC/C及びT/T遺伝子多型を有するAhRプロモータをルシフェラーゼ・リポータベクターに組み込み、ルシフェラーゼ活性を解析した。HeLa細胞でNF1Cを過剰発現すると-130bpC/C遺伝子型ではAhRプロモータ活性が有意に抑制されたが、T/T遺伝子型では抑制を認めなかった。同様にNF1CをノックダウンしAhRプロモータ活性の変化を解析した。-130bpC/C遺伝子型ではAhRプロモータ活性の有意な亢進が示され、-130bp T/T遺伝子型では有意な変化は観察されなかった。以上より、SNP-130bpがCアリルの場合、Tアリルの場合より強くNF1Cと結合し、AhR転写活性を負に制御すること、及びSNP-130bpがCアリルの場合、NF1Cの強制発現はAhRプロモータ活性を抑制し、NF1Cの発現抑制はAhRプロモータ活性を有意に上昇させることが判明した。

③ -130bp C/T SNPの子宮内膜癌進展への関与

-130bpC/T SNPが子宮内膜癌進展にいかに関与するかを明らかにするため、正常健康人130例及び内膜癌患者121例から血液を採取し、DNAを抽出した。ケース及びコントロール間で-130bp C/T SNPの遺伝子型頻度に有意差は無かった。しかしT/T遺伝子型はC/C及びC/Tに比し、進行癌患者において有意に高頻度に出現した。さらに子宮体癌組織では、正常子宮内膜に比しAhR発現量が有意に高く、NF1C発現は有意に抑制されていた。AhR高発現、NF1C低発現は未分化子宮内膜癌において顕著であった。

AhR高発現、NF1C低発現が内膜癌の進展にいかに関与するかを解析するためHHUA及びHEC6内膜癌細胞にSiRNAを投与しAhRをノックダウンした。親細胞ではAhR高発現に伴いNF1C発現が抑制され、ビメンチン、SNAILなどの間葉系マーカーの高発現さらにはE-カドヘリン等の上皮系マーカーの低発現が観察された。AhRノックダウンに伴い、NF1C高発現、間葉系マーカーの発現抑制、上皮系マーカーの発現誘導が観察されAhRによる上皮間葉系移行(EMT)が明らかになった。EMTにより癌細胞の増殖、運動能、浸潤能も亢進していた。

④ダイオキシン類高濃度曝露により出現する病態に関与するAhR下流シグナルの解析

ヒト絨毛細胞の培養系を用い、TCDD非存在下におけるSNP-130 C/C及びT/T型におけるAhR mRNA及び蛋白

発現レベルを解析した。T/T型ではC/C型と比較し、mRNA発現量が1.7倍、蛋白発現量が2倍高値であった。ARNT発現量は両遺伝子間で変化を認めなかったが、AhR下流に存在し解毒に関与するCYP1A1発現はC/C型に比しT/T型で有意に高値が示された。

ダイオキシン類曝露を原因とする病態形成に関与するAhR下流シグナルを同定するため、マイクロアレイ法による大容量遺伝子発現変化解析を行った。3個体のC/C型絨毛間質細胞及び3個体のT/T型細胞を混合し0.1%(W/V) DMSO処理及び10nM TCDD処理を行った。TCDD処理に伴い発現上昇した遺伝子群はC/C型で221個、T/T型で211個存在した。一方、81遺伝子(C/C型)及び233遺伝子(T/T型)は有意に発現抑制した。1.5倍を有意な発現変化の指標とした。TCDD存在下、C/C型及びT/T型の両方で共通に、発現変化した24遺伝子に注目した。そのうち14遺伝子発現はT/T型で、9遺伝子発現はC/C型で亢進していた。マイクロアレイ法よりTCDD応答性発現変化が示された遺伝子群のうち様々な病態形成に関与することが知られているIL24、EDNRB、SERPINB2、FAM43A、TIPRRARP、及びNPTX1についてはReal-time RT-PCRによりマイクロアレイ法で示された発現変化の再確認を行った。TCDD処理により、これら6種類の遺伝子mRNAレベルは有意に亢進していることが示された。さらにSERPINB2はT/T型でC/C型と比較し有意に発現の低値を示したが残り5種類の遺伝子mRNAレベルはいずれもT/T型で、有意に高値が示された。ウェスタンブロット法を用いT/T型におけるTCDD処理に伴うIL24の有意な発現亢進及びSERPINB2の有意な発現抑制を確認した。EDNRBは主にメラノサイトに発現し、その増殖や分化に関与する。絨毛間質細胞での発現レベルは低く有意な変化を検出することは出来なかった。

ダイオキシン類高濃度被曝例として油症患者に着目した。2011年油症患者一斉検診時に採血し32例のC/C型及び32例のT/T型についてIL24血中濃度及び各種ダイオキシン類濃度の測定を行った。遺伝子解析は九州大学倫理審査委員会の了承及び油症患者に対する説明と合意のもとに実施した。IL24血中濃度はT/T型で 180.9 ± 43.2 pg/m、C/C型で 59.1 ± 15.8 pg/mとT/Tで有意に高値であることが示された。PCDD、PCB、PCDF及びTEQ濃度とIL24血中濃度には有意な正の相関は示されなかった。マイクロアレイ法の感度が低いこと及びIL1 β がIL24発現調節をしていることから、IL1 β 遺伝子発現をヒト絨毛間質細胞をTCDD処理し、Real-time RT-PCR法にて解析した。T/T型でTCDD応答性IL1 β 遺伝子発現は有意に亢進していた。しかしC/C型油症患者での血中ダイオキシン類濃度はT/T型に比較し高値であったためT/T型油症患者におけるIL1 β 血中濃度はC/C型と比較し有意な低値を認めた。CC型における高い血中ダイオキシン類濃度がCC型油症患者におけるIL1 β 血中濃度の亢進に関与していると示唆された。以上の結果から、血中ダイオキシン類が高濃度ではないダイオキシン類曝露次世代及び次々世代に発生する健康影響はAhR-130bp SNP及びAhR下流のIL1 β 及びIL24シグナル伝達が発症に関与することが強く示唆された。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

ダイオキシン類曝露による曝露世代、次世代、次々世代にわたる継世代影響については、国際的にもわが国においてもほとんど検討がなされていない。今回の検討では、皮膚色素沈着を発症した群では母体血中ダイオキシン類濃度が高く、母体の高濃度のダイオキシン類曝露による児の健康影響のひとつとして皮膚色素沈着が示された。また、母体が高濃度のダイオキシン類に曝露した場合には、次々世代、なかでも女系(母親)曝露においては男児出生割合が低下する可能性が示唆された。一方、油症患者より出生した児の気管支喘息の発症頻度は一般頻度よりも高く、母体の血中ダイオキシン類濃度は児の気管支喘息の発症リスクに影響を及ぼさないことから、ダイオキシン類曝露による児の気管支喘息の発症機序には曝露した量的な問題ばかりでなく、ダイオキシン類に対する感受性が関与している可能性があることが考えられた。

AhR-130bpにはC/T SNPが存在する。T/T型ではC/C型と比較し1.75倍のプロモータ活性の亢進が認められる。AhR転写及び蛋白発現もそれぞれ1.75、2倍亢進する。T/T型ではNF1C転写抑制因子の結合サイトが消失するためである。

ダイオキシン類高濃度曝露に伴い出現する健康影響に関与するAhR下流シグナルを明らかにするためヒト絨毛間質細胞を用いTCDD存在下及び非存在下での遺伝子発現変化をC/C型、T/T型細胞別にマイクロアレイ法による解析を行った。マイクロアレイ法によりTCDD応答性発現変化を示したIL24、EDNRB、SERPINB2、FAM43A、TIPRRARP及びNPTX1は様々な病態形成に関与することが知られているためReal-time RT-PCRにより発現変化の再確認を行った。

ダイオキシン類高濃度被曝例として油症患者に着目した。2011年油症患者一斉検診時に採血した32例のC/C型及び32例のT/T型油症患者についてIL24血中濃度及び各種ダイオキシン類濃度の測定を行った。遺伝子解析は九州大学倫理審査委員会の了承及び油症患者に対する説明と合意のもとに実施した。IL24血中濃度はT/T型で 180.9 ± 43.2 pg/m、C/C型で 59.1 ± 15.8 pg/mとT/T型で有意に高値であることが示された。PCDD、PCB、PCDF及びTEQ濃度とIL24血中濃度には有意な正の相関は示されなかった。マイクロアレイ法の感度が低

いこと及びIL1 β がIL24発現調節をしていることからIL1 β 遺伝子発現をヒト絨毛間質細胞をTCDD処理しReal-time RT PCRにて解析した。T/T型でTCDD応答性IL1 β 遺伝子発現は有意に亢進していた。しかしC/C型油症患者での血中ダイオキシン類濃度はT/T型に比し高値であったためT/T型油症患者におけるIL1 β 血中濃度はC/C型と比較し有意差は低値を認めた。以上の結果から、血中ダイオキシン類が高濃度ではないダイオキシン類曝露次世代及び次々世代に発生する健康影響はAhR-130bp C/T SNP及びAhR下流のIL1 β 及びIL24により発症が誘導されることが強く示唆された。

(2) 環境政策への貢献

高濃度のダイオキシン類に曝露した油症患者より出生した児で観察された健康影響のなかには、母体のダイオキシン類曝露量と関連するものと関連しないものが存在すること、さらに次々世代にも影響、すなわち継世代的な影響があるものがあることが示された。今後さらなる調査によって、継世代健康影響と曝露評価、遺伝的感受性との関連で十分なデータが得られれば、環境政策上意義のある結果が得られると考えられる。

本研究によりヒトにおけるダイオキシン類への個体感受性にAhR-130bp C/T SNPが深く関与することが明らかとなった。AhR T/T型ではC/C型と比較しプロモータ活性は1.75倍、AhR mRNA、蛋白量はそれぞれ1.75倍、2倍に発現亢進する。発現亢進したAhR蛋白は下流のIL1 β 及びIL24発現を亢進する。油症患者血清を用い、ELIZA法でIL24血中濃度を測定した結果、T/T型油症患者では180.9 \pm 43.2pg/mlとC/C型(59.1 \pm 15.8pg/ml)と約3倍の高値が示された。さらにPCDD,PCB,PCDF及びTEQ濃度とIL24血中濃度には有意な正の相関がなく、AhRによるIL1 β の活性化とは異なるシグナルによりIL24発現亢進を示すことが明らかになった。これらのことからAhR/IL24シグナルはダイオキシン類への個体感受性に深く関与しT/T型一般健常人におけるダイオキシン類摂取量に対する安全基準の設定が必要であることを示唆する。さらにダイオキシン類曝露に伴い発生する病態の早期予知にIL24血中濃度が有効なバイオマーカーとして活用できる可能性がある。個体別のダイオキシン類摂取のリスク評価や摂取量の耐用量設定は日本の将来を担うこどもの安全な環境の提供に極めて重大な意義を有し、環境政策の立案に反映されねばならないことである。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

- ① AhR-130bp T/T型はC/C型と比較しダイオキシン類に対する感受性が有意に高く、病態発生の高リスク群である。
- ② AhR下流のIL24血中濃度はT/T型油症患者でC/C型と比較し有意に高値であり、油症病態の形成に深く関与している。このため、IL24血中濃度はダイオキシン類曝露に伴う病態を早期に予知するバイオマーカーとして活用出来る。
- ③ AhR T/T型一般健常人に配慮した個体別のダイオキシン類摂取のリスク評価や摂取量の耐用量設定が安全な環境を創造するために不可欠である。
- ④ ダイオキシン類血中濃度が高値ではないダイオキシン類次世代及び次々世代油症患者での病態発症予知にIL24血中濃度が有効なバイオマーカーとして活用出来る。

6. 研究成果の主な発表状況(別添.報告書作成要領参照)

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) G. Liu, K. Asanoma, T. Takao, K. Tsukimori, H. Uchi, M. Furue, K. Kato, N. Wake: Toxicology Letters, 232 (2015) 384-392
 “Aryl hydrocarbon receptor SNP -130 C/T associates with dioxins susceptibility through regulating its receptor activity and downstream effectors including interleukin 24”
- 2) K. Tsukimori, H. Uchi, S. Tokunaga, F. Yasukawa, T. Chiba, J. Kajiwara, T. Hirata, M. Furue: Chemosphere, 90, 1581-1588 (2013)
 “Blood levels of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in yusho mothers and their descendants: Association with fetal yusho disease”

(2) 主な口頭発表(学会等)

学会発表: 第37回日本分子生物学会(ポスター:2P-0219)

7. 研究者略歴

課題代表者：和氣 徳夫

北海道大学医学部医学科卒業、医学博士、現在、九州大学環境発達医学研究センター特任教授

研究分担者

1)：月森 清巳

宮崎医科大学卒業、九州大学病院助手、講師、准教授、現在、福岡市立こども病院周産期センター長

2)：平田 輝明

グラスゴー大学医学部卒業、MPH、現在、福岡県保健環境研究所所長

3)：古江 増隆

東京大学医学部卒業、現在、九州大学大学院皮膚科学分野教授

4)：内 博史

九州大学医学部卒業、現在、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

5)：福嶋 恒太郎

九州大学医学部卒業、九州大学医学部助手、助教、現在、九州大学病院周産期母子医療センター講師

6)：浅野間 和夫

九州大学医学部卒業、現在、地域医療学講座特任准教授

7)：劉 格

長崎大学医歯薬学総合研究科卒業、現在九州大学環境発達医学研究センター特別研究員

5C-1251 ダイオキシン類曝露による継世代健康影響と遺伝的感受性要因との関連に関する研究

(1) ダイオキシン類曝露による継世代健康影響および血中ダイオキシン類濃度との関連に関する研究

地方独立行政法人 福岡市立病院機構 福岡市立こども病院・感染症センター

産科 科長 月森清巳

<研究協力者>

九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野	教授	古江 増隆
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	内 博史
九州大学環境発達医学研究センター研究推進部門ゲノム疫学分野	特任教授	和氣 徳夫

平成24～26年度累計予算額：4,506千円

(うち平成26年度：1,502千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

ダイオキシン類曝露による次世代への健康影響を明らかにすることを目的として、カネミ油症発症後に児を得た油症曝露世代とその後世代を対象として、ダイオキシン類曝露による世代別の健康影響と母体血中ダイオキシン類濃度との関連について解析した。また、ダイオキシン類曝露による世代別の健康影響と母体ダイオキシン類受容体(AhR)遺伝子多型との関連について検討した。カネミ油症患者より出生した児(次世代)のなかで、皮膚色素沈着を発症した群では母体血中ダイオキシン類濃度が高く、母体の高濃度のダイオキシン類曝露による児の健康影響のひとつとして皮膚色素沈着が示された。また、母体の血中ダイオキシン類濃度は児の気管支喘息およびアトピー性皮膚炎の発症リスクに影響を及ぼさないが、母体の血中ダイオキシン類濃度が高いと児のアレルギー性鼻炎の発症リスクは低下する傾向があることが分かった。一方、油症患者より出生した児の気管支喘息の発症頻度は一般頻度よりも高く、母体の血中ダイオキシン類濃度は児の気管支喘息の発症リスクに影響を及ぼさないことから、ダイオキシン類曝露による児の気管支喘息の発症機序には曝露した量的な問題ばかりでなく、ダイオキシン類に対する感受性が関与している可能性があることが考えられた。油症発生後の人工流産、自然流産、胎児死亡の頻度は油症発生前10年間に妊娠した油症患者における頻度と比較すると有意な差はなく、母体血中ダイオキシン類濃度や母体AhR遺伝子多型との間に明らかな関連はなかった。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。また、母体AhR遺伝子多型と次世代・次々世代の男児出生割合との間においても明らかな傾向はみられなかったが、母体の

血中ダイオキシン類濃度が高い場合には男児出生割合が低下する傾向があった。このように高濃度のダイオキシン類に曝露した油症患者より出生した児で観察された健康影響のなかには、母体のダイオキシン類曝露量と関連するものと関連しないものが存在すること、さらに次々世代にも影響、すなわち継世代的な影響があるものがあることが示された。

[キーワード]

カネミ油症、ダイオキシン類、児健康影響、ダイオキシン受容体、遺伝子多型

1. はじめに

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世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。わが国においても環境省の「子どもの健康と環境に関する全国調査：エコチル調査」が平成22年度に始動し、化学物質曝露等が子どもの健康に与える影響を明らかにする目的でコホート調査をすすめている。

ヒトが高濃度のダイオキシン類、なかでも2,3,4,7,8-5塩化ジベンゾフラン(PeCDF)に曝露した事例であるカネミ油症患者における観察から、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⁾、児の出生体重は母体血中ダイオキシン類濃度と有意に負の相関を示すこと²⁾、母親が20歳未満で油症に曝露した場合、女系の2世、3世では男児の出生割合が有意に低いこと³⁾が明らかとなった。このように高濃度のダイオキシン類に曝露した事例において、ダイオキシン類曝露と児の健康影響との関連を検討することは、ダイオキシン類曝露による次世代への健康影響とその発現機序を明らかにするうえで極めて有用な知見をもたらすと考えられる。一方、ダイオキシン類の母児間移行に関する観察から、母体から児へのダイオキシン類の移行はダイオキシン受容体(AhR)との親和性とは関係なく、ポリ塩化ジベンゾパラジオキシン(PCDDs)、なかでも八塩化ジベンゾパラジオキシン(OCDD)が移行しやすいこと⁴⁾、カネミ油症患者ではダイオキシン類の児への移行量は少なく、児の血中ダイオキシン類濃度は正常健常人と比して有意な差は認められないこと⁵⁾も明らかになった。これらの成績から、高濃度のダイオキシン類曝露による児への健康影響の発現機序には、胎盤を介して児に移行したダイオキシン類の量的な問題ばかりでなく、ダイオキシン類に対する遺伝的感受性(遺伝子多型やエピジェネティックな変化など)が関与する可能性が考えられる。

2. 研究開発目的

カネミ油症発症後に児を得た油症曝露世代とその後世代を対象として、ダイオキシン類曝露による世代別の健康影響の発生状況と母体血中ダイオキシン類濃度との関連の観察を介して、母体ダイオキシン類曝露による次世代への健康影響を明らかにすることを目的とした。さらに、ダイオキシン類曝露による世代別の健康影響と母体ダイオキシン類受容体遺伝子多型との関連の観察を介して、次世代への健康影響と母体遺伝的感受性との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究開発方法

九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センターに登録されているカネミ油症女性患者737例を対象として妊娠・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）と児の健康情報（流産・胎児死亡、皮膚色素沈着[black baby]、アレルギー疾患[気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アトピー性鼻炎]、代謝内分泌疾患[甲状腺機能低下症、糖尿病]、生殖機能[出生児の性別]）に関するアンケート調査を施行した。581例(78.8%)より回答を得、カネミ油症発生後に妊娠・出産となった油症患者は206例であった。

この206例のうち油症一斉検診時に血液を採取できた64例（117妊娠）においては、カネミ油症患者より出生した児への健康影響（色素沈着、アレルギー疾患、代謝内分泌疾患）と母体分娩時の血中ダイオキシン類推定濃度との関連について解析した。

また、この206例のうち59例（142妊娠）においては、児への健康影響（流産・胎児死亡、男児出生割合）と母体ダイオキシン類受容体（AhR）遺伝子多型との関連について解析した。

さらに、油症発生後に妊娠・出産となった油症患者27例（31妊娠）においては、次々世代（49例）における男児出生割合と油症患者のAhR遺伝子多型との関連について解析した。

血中ダイオキシン類濃度の測定には、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。ダイオキシン類受容体遺伝子多型を測定は、採取した血液からリンパ球を分離した後、DNAを抽出し、AhRプロモータ領域(-130bp)のC/T一塩基多型(-130bpAhR遺伝子多型)を解析した。

分娩時の血中ダイオキシン類濃度は、検査時血中濃度 $\times 2^{\frac{[分娩から血液検体採取までの期間(年)]}{ダイオキシン類の半減期(年)}}$ の式を用いて推定した¹⁾。統計学的解析には、Student t-検定、Mann-Whitney U-検定、 χ^2 検定、変量効果ロジスティックモデル(Random effects logistic model)を用いた。

4. 結果及び考察

(1) 次世代への健康影響と母体血中ダイオキシン類濃度との関連

油症発生後に妊娠・出産となった油症患者64例および出生した児117例の臨床像を表(1)-1に示す。血液採取時の母体年齢(mean \pm SD)は、53.0 \pm 9.1歳（範囲；32 - 70歳）で、出産から血液採取までの期間(mean \pm SD)は、24.8 \pm 9.6年（範囲；0 - 38年）であった。出産時期は油症発生から5年以内(1968 - 1972年)が29例(24.8%)、油症発生後6-10年(1973 - 1977年)が19例(16.2%)、油症発生後11-20年(1973 - 1977年)が32例(27.4%)、油症発生後20年以降(1988 - 2006年)が37例(31.6%)であった。出生児117例のうち66例(56.4%)は男児で、出産時妊娠週数(mean \pm SD)は39.1 \pm 1.1週、出生体重(mean \pm SD)は3051 \pm 376gであった。

カネミ油症発生後に油症患者64例より出生した児117例のなかで、皮膚色素沈着は10例(8.5%)、気管支喘息は11例(9.4%)、アトピー性皮膚炎は16例(13.7%)、アレルギー性鼻炎は11例(9.4%)、甲状腺機能低下症は1例(0.8%)、糖尿病は1例(0.8%)に認められた。

表(1)-1 カネミ油症患者64例の臨床像(TSUKIMORI et al. Chemosphere 2013⁶⁾より引用)

Characteristics	
<i>Mothers (n = 64)</i>	
Maternal age at exposure (years)	15.8 ± 8.3 (0–29) ^a
Prenatal	3 (4.7) ^c
0–10	17 (26.6)
11–20	21 (32.8)
21–29	23 (35.9)
Age at blood sampling (years)	53.0 ± 9.1 (32–70) ^a
Date of blood sampling (years)	2006 (2002–2008) ^b
Frequency of seafood consumption every day	10 (15.6) ^c
3–4 times/week	26 (40.6)
1–2 times/week	25 (39.1)
1–2 times/month	3 (4.7)
Almost never	0 (0)
Number of pregnancies	117
1	24 (37.5) ^c
2	31 (48.4)
3	6 (9.4)
4	2 (3.1)
5	1 (1.6)
Date of delivery (year)	1981 (1968–2006) ^b
1968–1972	29 (24.8) ^c
1973–1977	19 (16.2)
1978–1987	32 (27.4)
1988–2006	37 (31.6)
Age at delivery (years)	27.8 ± 4.1 (18–37) ^a
Interval between delivery and blood sampling (years)	24.8 ± 9.6 (0–38) ^a
Smokers during pregnancy	6 (5.1) ^c
<i>Descendants (n = 117)</i>	
Gestational age at birth (weeks)	39.1 ± 1.1 (32–42) ^a
Birth weight (g)	3051 ± 376 (1900–3980) ^a
Descendant gender	
Male/female	66 (56.4)/51 (43.6) ^c
Number of black babies	10 (8.5)
1968–1972 (year)	8 (80)
1973–1977 (year)	1 (10)
1978–1987 (year)	0 (0)
1988–2006 (year)	1 (10)
Number of breast-fed	68 (58.1)

^a Mean ± SD (range).

^b Median (range).

^c Number (%).

① 児の皮膚色素沈着

児に皮膚色素沈着を認めた群（色素沈着群）と皮膚色素沈着を認めなかった群（非沈着群）における血中ダイオキシン類の分娩時血中推定濃度を表(1)-2に示す。色素沈着群における母体分娩時のtotal PCDDs、total PCDFs、total coplanar PCBsおよびtotal dioxinsの平均血中TEQ濃度は各々736.5、1923.9、57.6、2719.7 TEQ pg/g lipidであった。一方、非沈着群における母体分娩時のtotal PCDDs、total PCDFs、total coplanar PCBsおよびtotal dioxinsの平均血中TEQ濃度は各々243.0、460.7、31.8、761.7 TEQ pg/g lipidで、これら母体分娩時血中ダイオキシン類濃度は色素沈着群の方が非着色群に比して有意に高い値を示した。異性体毎の検討では、21種類の異性体のうち13異性体(2,3,7,8-TetraCDD、1,2,3,7,8-PentaCDD、1,2,3,4,7,8-HexaCDD、1,2,3,6,7,8-HexaCDD、1,2,3,7,8,9-HexaCDD、1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD、OctaCDD、2,3,4,7,8-PentaCDF、1,2,3,4,7,8-HexaCDF、1,2,3,6,7,8-HexaCDF、1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF、3,3',4,4',5-PentaCB(#126)、3,3',4,4',5,5'-HexaCB(#169))が50%以上の症例で検出され、これら13異性体すべてにおいて色素沈着群の方が非着色群に比して有意に高い値を示した。

母児双方の血中ダイオキシン類濃度を測定した24例における児の皮膚色素沈着の有無と母体分娩時の血中ダイオキシン類濃度および児の現在の血中ダイオキシン類濃度との関連を表(1)-3に示す。母体分娩時のtotal PCDDs、total PCDFs、total coplanar PCBsおよびtotal dioxinsの血中濃度は色素沈着群と非沈着群の両群間に有意な差はなかった。異性体毎の検討では、21種類の異性体のうち13異性体が50%以上の症例で検出され、このなかで1,2,3,6,7,8-HexaCDDのみ色素沈着群の値(50.4 TEQ pg/g lipid)が非着色群の値(21.0 TEQ pg/g lipid)に比して高い傾向(p=0.07)を示した。

一方、児の現在のtotal PCDDs、total PCDFs、total coplanar PCBsおよびtotal dioxinsの血中濃度においても色素沈着群と非沈着群の両群間に有意な差はなかった。異性体毎の検討では、21種類の異性体のうち8異性体が50%以上の症例で検出され、このなかで1,2,3,6,7,8-HexaCDDのみ色素沈着群の値(2.30 TEQ pg/g lipid)が非着色群の値(1.06 TEQ pg/g lipid)に比して有意(p=0.04)に高値を示した。

児の皮膚色素沈着は油症患者より出生した児に特異的に認められる症状で、胎児油症とも称されている。今回の検討から皮膚色素沈着を発症した群では母体の分娩時血中ダイオキシン類濃度が高いことが分かった。このように母体の高濃度のダイオキシン類曝露による児の健康影響のひとつとして皮膚色素沈着が示された。

表(1)-2 児の皮膚色素沈着群と非沈着群における母体の分娩時血中ダイオキシン類推定濃度 (TSUKIMORI et al. Chemosphere 2013⁶⁾より引用)

Variables	Half life ^{a,b} (years)		TEF ^c		Black baby (n = 10)			Non-black baby (n = 107)			Odds ratio ^d	(95% CI)	p Value ^e
					% >DL			TEQ concentration					
	Mean	SD	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median					
Total levels													
Total PCDDs	7 ^a	736.5	526.5	647.0	100	243.0	275.9	139.0	21.5	(1.48-310.9)	0.03		
Total PCDFs	7.7 ^a	1923.9	2273.8	1313.1	100	460.7	985.3	141.6	3.46	(1.07-11.2)	0.04		
Total coplanar PCBs	14.6 ^a	57.6	36.4	45.6	100	31.8	29.7	27.1	24.0	(1.25-463.6)	0.04		
Total PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs TEQ	7.7 ^a	2719.7	2706.8	1969.1	100	761.7	1164.0	410.8	7.54	(1.27-44.9)	0.03		
Congener levels													
PCDDs													
2,3,7,8-TetraCDD	6.2 ^b	87.2	66.8	96.9	70	33.6	47.1	14.0	6.55	(1.00-42.8)	0.05		
1,2,3,7,8-PentaCDD	8.6 ^b	213.7	153.1	180.9	100	75.0	78.4	52.4	28.4	(1.48-544.0)	0.03		
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	8.4 ^b	5.4	3.7	5.4	70	2.8	3.5	1.6	7.83	(0.86-70.9)	0.07		
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	13.1 ^b	41.1	34.0	33.8	100	15.2	16.9	10.0	28.6	(1.67-489.9)	0.02		
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	8.5 ^b	9.0	5.0	8.4	79	4.2	4.8	2.2	10.7	(0.94-122.3)	0.06		
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	6.6 ^b	21.8	13.6	19.7	100	9.3	10.2	5.5	17.4	(1.24-242.8)	0.03		
OctaCDD	5.6 ^b	19.2	13.7	16.6	100	7.5	9.2	3.6	21.1	(1.64-271.7)	0.02		
PCDFs													
2,3,7,8-TetraCDF	0.4 ^b	NA	NA	NA	40	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.9 ^b	NA	NA	NA	30	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
2,3,4,7,8-PentaCDF	7.7 ^a	1728.4	2032.4	1191.4	100	404.9	805.8	122.8	3.27	(1.06-10.0)	0.04		
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	5.1 ^a	689.9	988.9	355.4	90	153.6	350.9	28.5	3.31	(1.09-10.1)	0.04		
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	5.1 ^a	254.1	307.2	167.7	100	66.8	117.5	18.6	4.83	(1.13-20.6)	0.03		
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	1.1 ^b	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	2.4 ^b	NA	NA	NA	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	3.5 ^a	41.2	39.2	27.2	70	11.1	17.9	2.6	4.93	(1.09-22.2)	0.04		
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	3.2 ^b	NA	NA	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
OctaCDF	0.2 ^b	NA	NA	NA	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
Coplanar PCBs													
3,3',4,4'-TetraCB(#77)	14.6 ^a	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
3,4,4',5'-TetraCB(#81)	14.6 ^a	NA	NA	NA	20	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
3,3',4,4',5'-PentaCB(#126)	14.6 ^a	32.5	19.3	27.0	100	20.3	20.4	13.9	14.9	(0.90-246.6)	0.06		
3,3',4,4',5',5'-HexaCB(#169)	14.6 ^a	25.1	20.1	23.2	100	11.5	13.6	7.2	9.74	(1.25-75.9)	0.03		

^a Half-life data are from Masuda (2001).

^b Half-life data are from Liem and Thierlein (1997).

^c WHO 2005 toxic equivalent factor values (Van den Berg et al. 2006).

^d Odds ratio for a 10-fold increase in blood lipid level adjusted for age at delivery, gestational age at birth, birth weight, descendant sex, and consumption of fish (times per week).

^e Calculations were performed when the detection rate in the sample was >50%. DL, detection limit; NA, not applicable; CDD, chlorinated dibenzo-p-dioxins; CDF, chlorinated dibenzofurans; CB, chlorinated biphenyls.

表(1)-3 児の皮膚色素沈着の有無と母児双方の血中ダイオキシン類濃度との関連 (TSUKIMORI et al. Chemosphere 2013⁶⁾より引用)

Variables	TEF ^a														
	Maternal estimated blood TEQ concentrations (pg TEQ g ⁻¹ lipid) at delivery					Descendant current blood TEQ (pg TEQ g ⁻¹ lipid) concentrations									
	Black baby (n = 5)		Non-black baby (n = 19)		p Value ^b	Black baby (n = 5)		Non-black baby (n = 19)		p Value ^b					
	% >DL ^c	TEQ concentration	% >DL	TEQ concentration		% >DL	TEQ concentration	% >DL	TEQ concentration						
	Mean	(Range)		Mean	(Range)		Mean	(Range)		Mean	(Range)				
Total levels															
Total PCDDs	100	1015.2	(354.1-1775.5)	100	468.7	(16.1-960.4)	0.23	100	9.11	(6.03-12.1)	100	5.52	(1.59-13.4)	0.09	
Total PCDFs	100	2330.7	(119.0-7155.5)	100	1048.5	(8.01-4232.2)	0.48	100	6.81	(1.59-18.5)	100	3.51	(0.89-10.7)	0.34	
Total coplanar PCBs	100	72.5	(31.0-108.3)	100	62.2	(9.53-139.4)	0.47	100	3.73	(2.68-6.14)	100	2.92	(0.86-6.67)	0.46	
Total PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs TEQ	100	3415.4	(526.4-8926.9)	100	1670.0	(38.3-5246.2)	0.34	100	19.7	(10.3-30.9)	100	12.0	(3.34-30.5)	0.15	
Congener levels															
PCDDs															
2,3,7,8-TetraCDD	1	80	123.4	(35.0-169.4)	84	75.7	(1.91-186.2)	0.44	40	NA	11	NA	NA	NA	
1,2,3,7,8-PentaCDD	1	80	289.8	(101.4-516.7)	100	143.9	(6.05-279.1)	0.25	100	5.17	(3.01-7.12)	95	3.29	(0.50-8.13)	0.26
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	0.1	100	7.69	(2.30-10.58)	95	5.38	(0.27-13.1)	0.42	20	NA	11	NA	NA	NA	
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	0.1	100	50.4	(16.1-122.9)	100	21.0	(2.40-46.8)	0.07	100	2.30	(1.52-3.53)	100	1.06	(0.27-2.51)	0.04
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	0.1	100	11.48	(5.85-20.1)	100	6.63	(0.68-13.3)	0.30	80	0.24	(0.10-0.30)	21	NA	NA	NA
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0.01	100	29.9	(17.0-45.5)	100	18.8	(1.24-44.1)	0.32	100	0.30	(0.18-0.62)	100	0.22	(0.08-0.36)	0.23
OctaCDD	0.0003	100	28.5	(15.7-31.3)	100	14.8	(0.51-37.9)	0.25	100	0.13	(0.09-0.18)	100	0.11	(0.04-0.21)	0.34
PCDFs															
2,3,7,8-TetraCDF	0.1	40	NA		47	0.36		NA	40	NA	26	NA	NA	NA	
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.03	40	NA		47	0.05		NA	80	0.02	(0.02-0.06)	11	NA	NA	
2,3,4,7,8-PentaCDF	0.3	100	2092.7	(94.7-6397.5)	100	935.5	(5.46-3968.8)	0.50	100	5.53	(1.10-16.0)	100	2.73	(0.41-7.98)	0.48
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	0.1	100	915.9	(37.4-3166.5)	100	361.9	(1.09-1468.7)	0.42	80	0.46	(0.10-1.43)	53	0.23	(0.10-1.03)	0.73
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	0.1	100	347.4	(39.2-1033.4)	100	156.6	(1.24-584.2)	0.37	80	0.37	(0.10-0.70)	42	NA	NA	NA
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	0.1	0	NA		16	NA		NA	0	NA	0	NA	NA	NA	
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	0.1	0	NA		0	NA		NA	0	NA	0	NA	NA	NA	
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	0.01	80	67.3	(18.5-124.3)	74	28.3	(0.28-112.0)	0.32	0	NA	37	NA	NA	NA	
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	0.01	0	NA		0	NA		NA	0	NA	0	NA	NA	NA	
OctaCDF	0.003	0	NA		0	NA		NA	0	NA	0	NA	NA	NA	
Coplanar PCBs															
3,3',4,4'-TetraCB(#77)	0.0003	0	NA		0	NA		NA	0	NA	0	NA	NA	NA	
3,4,4',5'-TetraCB(#81)	0.0001	20	NA		11	NA		NA	20	NA	5	NA	NA	NA	
3,3',4,4',5'-PentaCB(#126)	0.1	100	41.5	(17.6-69.9)	100	40.6	(7.96-94.2)	0.54	80	2.38	(0.50-4.48)	89	1.99	(0.50-5.35)	0.91
3,3',4,4',5,5'-HexaCB(#169)	0.03	100	31.0	(6.71-68.3)	100	21.6	(1.16-56.8)	0.66	100	1.35	(0.68-2.18)	100	0.93	(0.33-2.21)	0.29

^a WHO 2005 toxic equivalent factor values (Van den Berg et al., 2006).

^b Statistical comparisons were made with a random effects model adjusted for age at delivery, gestational age at birth, birth weight, descendant sex, and consumption of fish (times per week) for mothers; age at sampling, sex and duration of breast feeding in infancy (years) for descendants.

^c Calculations were performed when the detection rate in the sample was >50%. DL, detection limit; NA, not applicable; CDD, chlorinated dibenzo-p-dioxins; CDF, chlorinated dibenzofurans; CB, chlorinated biphenyls.

② 児のアレルギー疾患

児のアレルギー疾患（気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎）の有無と母体の分娩時血中ダイオキシン類推定濃度との関連を表(1)-4に示す。気管支喘息およびアトピー性皮膚炎を発症した群における母体分娩時のtotal dioxins、total PCDDs、total PCDFsおよびtotal coplanar PCBsの血中濃度は非発症群の値と比較して低い値を示すが、両群間に有意な差はなかった。一方、アレルギー性鼻炎を発症した群における母体分娩時のtotal PCDFsおよびtotal coplanar PCBsの血中濃度は非発症群の値と比較して低い傾向(各々p=0.063、p=0.089)を示した。

表(1)-4 児アレルギー疾患の有無と母体の分娩時血中ダイオキシン類推定濃度の関連

アレルギー性疾患	発症	症例数	有病率 (%)	母体血中濃度(TEQ pg/g-lipid)							
				Total TEQ		Total PCDDs		Total PCDFs		Total coplanar PCBs	
				Median (Range)	p	Median (Range)	p	Median (Range)	p	Median (Range)	p
気管支喘息	あり	11	9.4%	254.1 (13.9-1367.4)	0.544	151.1 (7.4-556.6)	0.852	46.0 (3.0-1050.4)	0.262	23.2 (2.7-105.6)	0.563
	なし	106		466.0 (10.6-8926.9)		162.2 (5.5-1775.5)		181.5 (2.3-7155.5)		29.1 (2.4-184.2)	
アトピー性皮膚炎	あり	16	13.7%	331.1 (13.9-2886.0)	0.152	110.2 (7.4-494.5)	0.161	74.9 (3.0-2356.2)	0.152	24.2 (2.7-40.4)	0.179
	なし	101		482.2 (10.6-8926.9)		169.9 (5.5-1775.5)		178.3 (2.3-7155.5)		29.8 (2.4-184.2)	
アレルギー性鼻炎	あり	11	9.4%	68.4 (13.9-1293.5)	0.130	32.5 (7.4-797.0)	0.218	28.9 (3.0-1050.4)	0.063	11.2 (2.7-74.2)	0.089
	なし	106		475.5 (10.6-8926.9)		162.2 (5.5-1775.5)		196.2 (2.3-7155.5)		30.1 (2.4-184.2)	

Statistical comparisons of dioxin concentrations between the two groups were made with the Mann-Whitney U-test.

母体分娩時血中推定濃度が10倍上昇した場合の児にアレルギー疾患が発症するオッズ比を表(1)-5に示す。母体分娩時のtotal dioxins、total PCDDs、total PCDFsおよびtotal coplanar PCBsの血中濃度が10倍上昇した場合の気管支喘息およびアトピー性皮膚炎が発症するオッズ比は、すべて1未満であったが統計学的に有意差はなかった。一方、アレルギー性鼻炎が発症するオッズ比は、total dioxinsでは0.37、total PCDFsでは0.43、total coplanar PCBsでは0.20と低い傾向(各々p=0.080、p=0.075、p=0.073)を示した。

表(1)-5 母体血中濃度が10倍上昇した場合の児アレルギー疾患の発症リスク

アレルギー性疾患	発症リスク							
	Total TEQ		Total PCDDs		Total PCDFs		Total coplanar PCBs	
	OR (95%CI)	p	Median (Range)	p	Median (Range)	p	Median (Range)	p
気管支喘息	0.76 (0.28-2.11)	0.599	0.98 (0.32-3.05)	0.977	0.65 (0.28-1.52)	0.321	0.85 (0.17-4.14)	0.840
アトピー性皮膚炎	0.59 (0.24-1.48)	0.261	0.54 (0.19-1.49)	0.232	0.63 (0.30-1.34)	0.234	0.49 (0.12-2.00)	0.318
アレルギー性鼻炎	0.37 (0.12-1.13)	0.080	0.37 (0.11-1.27)	0.114	0.43 (0.17-1.09)	0.075	0.20 (0.04-1.16)	0.073

OR for 10-fold increase in lipid blood level (95% CI) adjusted for gestational age, maternal age at delivery, parity, smoking status during pregnancy, gender, birth weight and infant.

一方、児の現在の血中ダイオキシン類濃度(total PCDDs、total PCDFs、total coplanar PCBsおよびtotal dioxins)は全てアレルギー性疾患発症群と非発症群の両群間に有意な差はなかった(表(1)-6)。

表(1)-6 児アレルギー疾患発症と児血中ダイオキシン類濃度との関連

アレルギー疾患	発症	症例数	児血中濃度(TEQ pg/g-lipid)							
			Total TEQ		Total PCDDs		Total PCDFs		Total coplanar PCBs	
			Median (Range)	p	Median (Range)	p	Median (Range)	p	Median (Range)	p
気管支喘息	あり	6	12.3 (7.0-18.4)	0.600	5.3 (3.2-9.0)	0.382	4.2 (1.3-5.0)	0.816	2.6 (2.2-5.6)	0.861
	なし	21	15.0 (2.6-30.4)		6.7 (1.5-14.3)		3.3 (0.7-18.3)		3.1 (0.4-6.9)	
アトピー性皮膚炎	あり	6	11.2 (7.0-20.3)	0.448	5.1 (3.2-13.0)	0.382	3.2 (1.3-5.0)	0.414	2.6 (2.2-5.6)	0.600
	なし	21	15.0 (2.6-30.4)		6.7 (1.5-14.3)		3.8 (0.7-18.3)		3.1 (0.4-6.9)	
アレルギー性鼻炎	あり	5	12.2 (6.7-20.3)	0.417	5.5 (3.6-13.0)	0.618	3.9 (1.4-5.0)	0.901	2.4 (0.7-3.4)	0.151
	なし	22	15.1 (2.6-30.4)		6.8 (1.5-14.3)		3.5 (0.7-18.3)		3.2 (0.4-6.9)	

Statistical comparisons of dioxin concentrations between the two groups were made with the Mann-Whitney U-test.

アレルギー疾患診断・治療ガイドライン2010（日本アレルギー学会）によれば、小児の気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎の有病率は各々5～7%、10～20%、約20%であると報告されている。今回の検討では、油症患者より出生した児の気管支喘息の発症頻度は9.4%、アトピー性皮膚炎は13.7%、アレルギー性鼻炎は9.4%に認められ、一般頻度と比較して気管支喘息の頻度は多く、逆にアレルギー性鼻炎の頻度は少ない傾向であった。また油症患者より出生した児のアレルギー疾患の有無と母体血中ダイオキシン類濃度との関連の観察から、母体の血中ダイオキシン類濃度は児の気管支喘息およびアトピー性皮膚炎の発症リスクに影響を及ぼさないが、母体の血中ダイオキシン類濃度が高いと児のアレルギー性鼻炎の発症リスクは低下する傾向があることが分かった。これらの成績から母体の高濃度のダイオキシン類曝露では児のアレルギー性鼻炎の発症を抑制する可能性があることが考えられた。一方、油症患者より出生した児の気管支喘息の発症頻度は一般頻度よりも高く、母体の血中ダイオキシン類濃度は児の気管支喘息の発症リスクに影響を及ぼさないことから、ダイオキシン類曝露による児の気管支喘息の発症機序には曝露した量的な問題ばかりでなく、ダイオキシン類に対する感受性が関与している可能性があることが考えられた。

(2) 次世代への健康影響と母体-130bpAhR遺伝子多型および母体血中ダイオキシン類濃度との関連

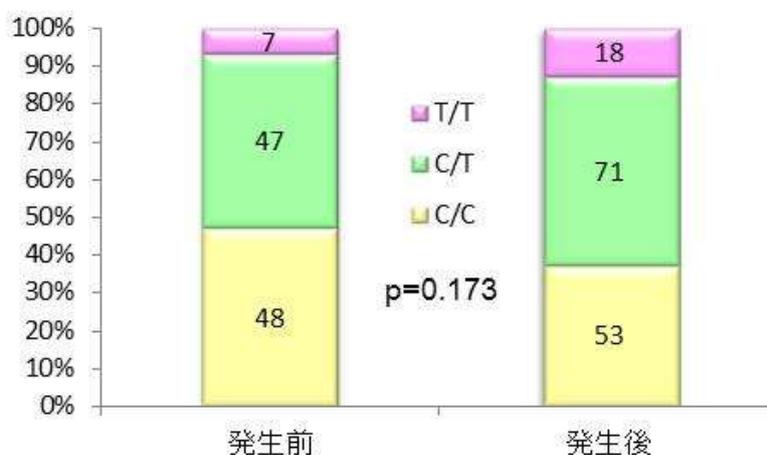
カネミ油症発生後の油症患者における児への健康影響としては、人工流産が15例(10.6%)、自然流産が19例(15.0%)、胎児死亡（自然流産+死産）が22例(17.3%)に認められた（表(1)-7）。油症発生前10年間に妊娠した油症患者50例(102妊娠)における発症頻度と比較すると、人工流産は1.89倍、自然流産は1.94倍、胎児死亡は1.47倍増加したが、有意な差はなかった。また、油症発生から10年間、発生から10-20年、発生から20年以降の3つの時期に分類し、児への健康影響について検討すると、各時期における人工流産、自然流産、胎児死亡の発症頻度は油症発生前の頻度と比べて有意な差はなかった。

表(1)-7. 油症患者における児への健康影響の発生頻度

健康影響	油症発生前 10年間	油症発生後			
		総数	発生から10年間	発生から10-20年	発生から20年以降
人工流産	5.9%(6/102)	10.6%(15/142)	13.6%(11/81)	10.0%(4/40)	0%(0/21)
	Ref	1.89(0.71-5.05)	2.51(0.89-7.12)	1.78(0.47-6.67)	NA
		p=0.250	p=0.122	p=0.468	p=1.000
自然流産	8.3%(8/96)	15.0%(19/127)	12.9%(9/70)	13.9%(5/36)	23.8%(5/21)
	Ref	1.94(0.81-4.63)	1.62(0.59-4.44)	1.77(0.54-5.83)	3.44(0.99-11.85)
		p=0.151	p=0.438	p=0.340	p=0.056
胎児死亡	12.5%(12/96)	17.3%(22/127)	15.7%(11/70)	13.9%(5/36)	28.6%(6/21)
	Ref	1.47(0.69-3.14)	1.31(0.54-3.16)	1.13(0.37-3.47)	2.80(0.91-8.61)
		p=0.352	p=0.651	p=0.779	p=0.091

Data are shown as %(n/N) and OR (95%CI) .

カネミ油症発生後に妊娠した油症患者142妊娠における-130bpAhR遺伝子多型の頻度は、C/Cが53例(37.3%)、C/Tが71例(50.0%)、T/Tが18例(12.7%)に認められた(図(1)-1)。油症発生前の頻度(C/C 47.1%、C/T 46.1%、T/T 6.9%)と比較して有意な差はなかった(p=0.173)。



AhR SNP	発生前	発生後	計
T/T	7(6.9%)	18(12.7%)	25(10.2%)
C/T	47(46.1%)	71(50.0%)	118(48.4%)
C/C	48(47.1%)	53(37.3%)	101(41.4%)
計	102(100%)	142(100%)	244(100%)

図(1)-1. 油症患者におけるAhR遺伝子多型の頻度(妊娠あたり)

各AhR遺伝子型における児への健康影響の発生頻度を検討すると、各々のAhR遺伝子型において人工流産、自然流産、胎児死亡の発症頻度は油症発生前の頻度と比べて有意な差はなかった（表(1)-8）。

表(1)-8. 各遺伝子型における児への健康影響の発生頻度

健康影響	AhR SNP	油症発生前 10年間	油症発生前後			
			総数	発生から10年間	発生から10-20年	発生から20年以降
人工流産	C/C	8.3%(4/48)	11.3%(6/53)	20.0%(6/30)	0%(0/16)	0%(0/7)
		Ref	1.40(0.37-5.31)	2.75(0.71-10.71)	NA	NA
			p=0.744	p=0.171	p=0.565	p=1.000
	C/T	4.3%(2/47)	12.7%(9/71)	11.1%(5/45)	19.0%(4/21)	0%(0/5)
		Ref	3.27(0.67-15.85)	2.81(0.52-15.31)	5.29(0.89-31.61)	NA
			p=0.196	p=0.262	p=0.068	p=1.000
	T/T	0%(0/7)	0%(0/18)	0%(0/6)	0%(0/3)	0%(0/9)
		Ref	NA	NA	NA	NA
			p=1.000	p=1.000	p=1.000	p=1.000
自然流産	C/C	6.8%(3/44)	10.6%(5/47)	4.2%(1/24)	12.5%(2/16)	28.6%(2/7)
		Ref	1.63(0.37-7.25)	0.59(0.06-6.05)	1.95(0.30-12.91)	5.47(0.73-41.03)
			p=0.715	p=1.000	p=0.602	p=0.133
	C/T	11.1%(5/45)	19.4%(12/62)	20.0%(8/40)	17.6%(3/17)	20.0%(1/5)
		Ref	1.92(0.62-5.90)	2.00(0.60-6.71)	1.71(0.36-8.12)	2.00(0.19-21.62)
			p=0.294	p=0.367	p=0.673	p=0.487
	T/T	0%(0/7)	11.1%(2/18)	0%(0/6)	0%(0/3)	22.2%(2/9)
		Ref	NA	NA	NA	NA
			p=1.000	p=1.000	p=1.000	p=0.475
胎児死亡	C/C	13.6%(6/44)	14.9%(7/47)	12.5%(3/24)	12.5%(2/16)	28.6%(2/7)
		Ref	1.11(0.34-3.60)	0.90(0.21-3.99)	0.90(0.16-5.02)	2.53(0.40-16.15)
			p=1.000	p=1.000	p=1.000	p=0.300
	C/T	13.3%(6/45)	19.4%(12/62)	20.0%(8/40)	17.6%(3/17)	20.0%(1/5)
		Ref	1.56(0.537-4.53)	1.63(0.51-5.17)	1.39(0.31-6.33)	1.63(0.15-17.10)
			p=0.447	p=0.560	p=0.696	p=0.546
	T/T	0%(0/7)	16.7%(3/18)	0%(0/6)	0%(0/3)	33.3%(3/9)
		Ref	NA	NA	NA	NA
			p=0.534	p=1.000	p=1.000	p=0.213

Data are shown as %(n/N) and OR (95%CI) .

また、人工流産、自然流産、胎児死亡を認めた群における各遺伝子型の頻度はこれら合併症を認めなかった群の頻度と比較して有意な差はなかった（図(1)-2）。



図(1)-2. 油症患者における児への健康影響とAhR遺伝子多型の頻度

このように-130bpAhR遺伝子多型と人工流産、自然流産、胎児死亡の頻度との間に明らかな傾向はみられなかった。

一方、これらの児の健康影響と母体分娩時血中ダイオキシン類推定濃度との関連について観察すると、人工流産、自然流産、胎児死亡を発症した各群およびこれら合併症を発症しなかった群（正常妊娠）における母体分娩時血中ダイオキシン類（2,3,4,7,8-PeCDF[PeCDF]、3,3',4,4',5-PeCB[PCB-126]、3,3',4,4',5,5'-HxCB[PCB-169]）推定濃度を図(1)-3に示す。人工流産群では、PeCDFおよびPCB-169の血中推定濃度は正常妊娠群の値と比して有意に高値を示した。自然流産群および胎児死亡群におけるこれらの血中ダイオキシン類推定濃度は正常妊娠群の値と比して有意な差はなかった。



図(1)-3. 油症患者における児の健康影響と母体分娩時血中ダイオキシン類推定濃度 (pg/g lipid) との関連

今回の検討では、油症発生後に妊娠した油症患者59例(142妊娠)においては、-130AhR遺伝子多型の頻度は油症発生前の頻度と有意な差はないこと、児への健康影響(人工流産、自然流産、胎児死亡)の有無とAhR遺伝子多型との間に明らかな傾向はみられないことが示された。一方、人工流産群における分娩時推定血中ダイオキシン類濃度は正常妊娠群の値と比して有意に高値を示した。今回、油症発生後に自然流産や胎児死亡などの児合併症の頻度の増加が観察できなかった理由として症例数が少なかったことが要因のひとつとして考えられるので、今後さらに症例数を増やして-130AhR遺伝子多型と児合併症の頻度との関連を検討していく必要があると考えられた。また、人工流産の頻度や男児出生割合には少なくとも母体ダイオキシン類の曝露量が影響を及ぼしている可能性があると考えられた。

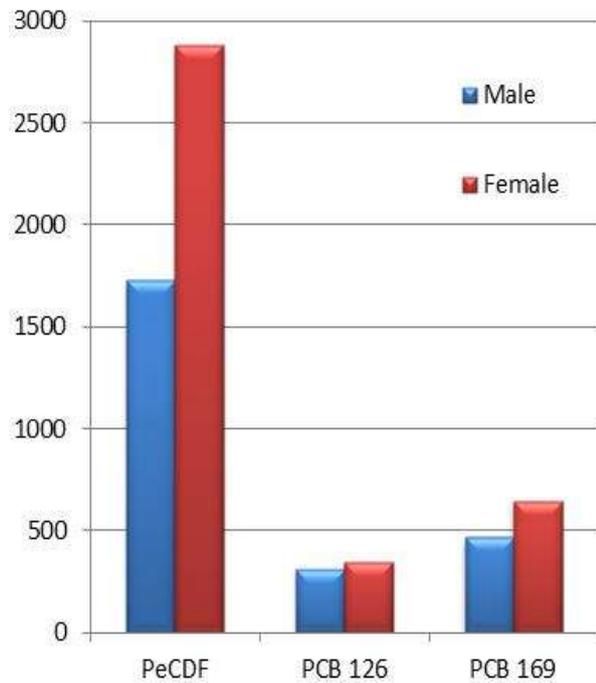
(3) 次々世代への健康影響と母体-130bpAhR遺伝子多型および母体血中ダイオキシン類濃度との関連
カネミ油症発生後に油症患者から出生した児における男児出生割合は0.55で、general populationの割合0.514と比較して有意な差はなかった。油症発生から10年間、発生から10-20年、発生から20年以降の3つの時期における男児出生割合も、general populationの割合と比較して有意な差はなかった(表(1)-9)。次々世代における男児出生割合は0.51と次世代より低下し、なかでも女系(母親)曝露では男児出生割合は0.38とさらに低下したが、general populationの割合と比較して有意な差はなかった。

表(1)-9. 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.

油症発生後に女兒を出生した油症患者におけるPeCDFの分娩時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(図(1)-4)。一方、PeCDFの分娩時血中推定濃度が1000 pg/g lipid以上の群では1000 pg/g lipid未満の群と比較して男児出生割合が低値を示す傾向(p=0.057)があった(表(1)-10)。



	男児	女児
n	51	39
2,3,4,7,8-PeCDF		
Mean	1730.7	2881.0
SD	3004.3	4447.5
p value	0.135	
3,3',4,4',5-PeCB(#126)		
Mean	309.5	350.3
SD	270.0	268.2
p value	0.675	
3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)		
Mean	466.7	646.5
SD	451.6	687.5
p value	0.168	

図(1)-4. 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 (pg/g lipid) との関連

表(1)-10. 母体分娩時血中ダイオキシン類推定濃度と男児出生割合との関連

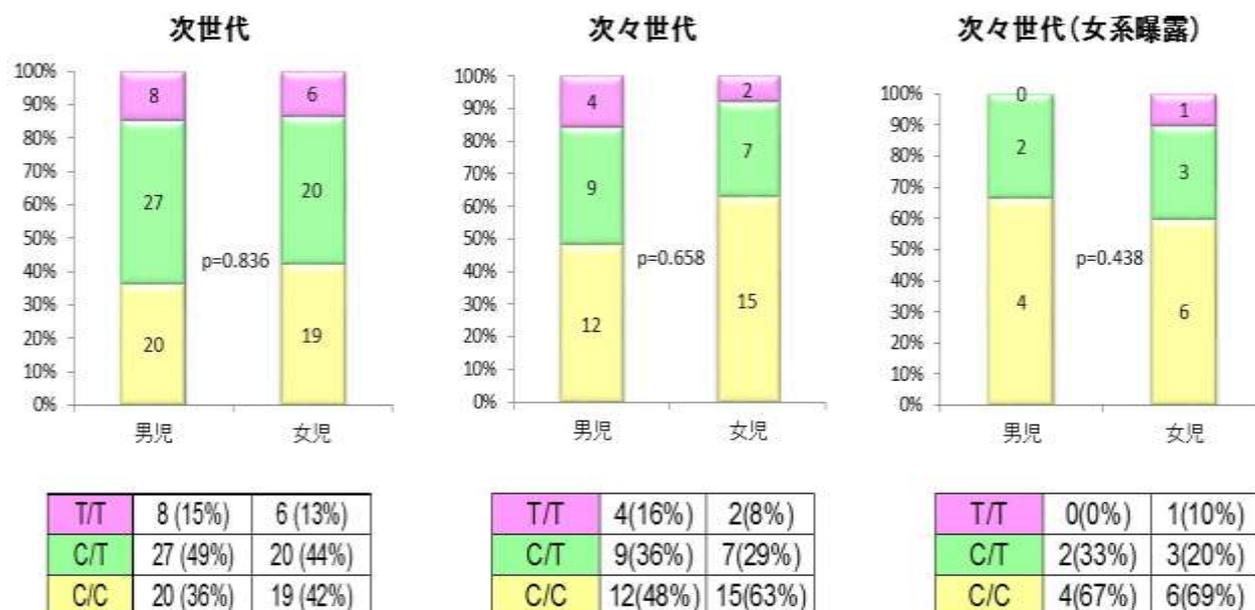
異性体	血中濃度 (pg/g lipid)	男児出生割合 (Male/Female)
2,3,4,7,8-PeCDF		
	> 1000	0.447(17/21)
	< 1000	0.654(34/18)
	p value	0.057
3,3',4,4',5-PeCB(#126)		
	> 300	0.514(18/17)
	< 300	0.600(33/22)
	p value	0.514
3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)		
	> 400	0.472(17/19)
	< 400	0.630(34/20)
	p value	0.193

各AhR遺伝子型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(1)-11）。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)-5）。

表(1)-11. AhR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)-5. 次世代および次々世代の性別とAhR遺伝子多型の頻度

これまでの油症曝露による次々世代への健康影響の観察から、20歳未満で母親が油症曝露した場合には、出生した児（次世代）の男児出生割合は0.450と低い傾向（ $p=0.06$ ）を示し、さらにこの次世代が母親となった場合の児（次々世代）の男児出生割合は0.348と一般集団（0.514）と比較して有意に低値を示すことが分かった³⁾。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と低下する傾向が示されたが、-130bpAhR遺伝子多型と男児出生割合との間に明らかな傾向はみられなかった。

受精時の母体の性ホルモン状態は児の性の決定に影響を及ぼすことが報告されている⁷⁾。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、抗アンドロゲン作用を有するとともに、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きたすことが報告されている⁸⁾。油症患者においては、PCDF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⁹⁾。今回の検討では、分娩時推定血中ダイオキシン類濃度が高い場合には次世代の男児出生割合が低下する傾向があったことから、カネミ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率の低下には、ダイオキシン類の胎児期曝露によるエピジェネティックな遺伝子発現制御の破綻がひとつの要因となっている可能性が示唆された。

5. 本研究により得られた成果

（1）科学的意義

カネミ油症患者より出生した児（次世代）のなかで、皮膚色素沈着を発症した群では母体血中ダイオキシン類濃度が高く、母体の高濃度のダイオキシン類曝露による児の健康影響のひとつとして皮膚色素沈着が示された。また、母体の血中ダイオキシン類濃度は児の気管支喘息およびアトピー性皮膚炎の発症リスクに影響を及ぼさないが、母体の血中ダイオキシン類濃度が高いと児のアレルギー性鼻炎の発症リスクは低下する傾向があることが分かった。一方、油症患者より出生した児の気管支喘息の発症頻度は一般頻度よりも高く、母体の血中ダイオキシン類濃度は児の気管支喘息の発症リスクに影響を及ぼさないことから、ダイオキシン類曝露による児の気管支喘息の発症機序には曝露した量的な問題ばかりでなく、ダイオキシン類に対する感受性が関与している可能性があることが考えられた。油症発生後の人工流産、自然流産、胎児死亡の頻度は油症発生前10年間に妊娠した油症患者における頻度と比較すると有意な差はなく、母体血中ダイオキシン類濃度や母体AhR遺伝子多型との間に明らかな関連はなかった。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。また、母体AhR遺伝子多型と次世代・次々世代の男児出生割合との間においても明らかな傾向はみられなかったが、母体の血中ダイオキシン類濃度が高い場合には男児出生割合が低下する傾向があった。このように高濃度のダイオキシン類に曝露した油症患者より出生した児で観察された健康影響のなかには、母体のダイオキシン類曝露量と関連するものと関連しないものが存在すること、さらに次々世代にも影響、すなわち継世代的な影響があるものがあることが示された。今後、ダイオキシン類の量的な問題ばかりでなく、児への健康影響と遺伝的感受性（遺伝子多型やエピジェネティックな変化）との関連について検討することが必要であると考えられた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

高濃度のダイオキシン類に曝露した事例において、ダイオキシン類曝露と児の健康影響との関連を検討することは、ダイオキシン類曝露による次世代への健康影響とその発現機序を明らかにするうえで極めて有用な知見をもたらすと考えられた。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

1) K. TSUKIMORI, H. UCHI, S. TOKUNAGA, F. YASUKAWA, T. CHIBA, J. KAJIWARA, T. HIRATA and M. FURUE: Chemosphere, 90, 5, 1581-1588(2013) "Blood levels of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in Yusho mothers and their descendants: association with fetal Yusho disease."

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表(学会等)

特に記載すべき事項はない

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) 1) K. TSUKIMORI, S. TOKUNAGA, S. SHIBATA, H. UCHI, D. NAKAYAMA, T. ISHIMARU, H. NAKANO, N. WAKE, T. YOSHIMUA and M. FURUE: Environ Healt Persp 116, 5, 626-630 (2008) “Long-Term Effects of Polychlorinated Biphenyls and Dioxins on Pregnancy Outcomes in Women Affected by the Yusho Incident”
- 2) K. TSUKIMORI, H. UCHI, C. MITOMA, F. YASUKAWA, T. CHIBA, T. TODAKA, J. KAJIWARA, T. YOSHIMURA, T. HIRATA, K. FUKUSHIMA, N. WAKE and M. FURUE: Environ Int, 38, 1, 79-86 (2012) “Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease”
- 3) K. TSUKIMORI, F. YASUKAWA, H. UCHI, M. FURUE and S. MOROKUMA: Epidemiology, 23, 72, 349-350 (2012) “Sex ratio in two generations of the Yusho Cohort”
- 4) K. TSUKIMORI, S. MOROKUMA, T. HORI, K. TAKAHASHI, T. HIRATA, Y. OTERA, K. FUKUSHIMA, T. KAWAMOTO and N. WAKE: J Obstet Gynaecol Res, 39, 1, 83-90 (2013) “Characterization of placental transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in normal pregnancy”
- 5) K. TSUKIMORI, H. UCHI, C. MITOMA, F. YASUKAWA, K. FUKUSHIMA, T. TODAKA, J. KAJIWARA, T. YOSHIMURA, T. HIRATA, N. WAKE and M. FURUE: Chemosphere, 84, 7, 928-35 (2011) “Comparison of the concentrations of polychlorinated biphenyls and dioxins in mothers affected by the Yusho incident and their children”
- 6) K. TSUKIMORI, H. UCHI, S. TOKUNAGA, F. YASUKAWA, T. CHIBA, J. KAJIWARA, T. HIRATA and M. FURUE: Chemosphere, 90, 5, 1581-1588 (2013) “Blood levels of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in Yusho mothers and their descendants: association with fetal Yusho disease.”
- 7) WH. JAMES: J Endocrinol 198, 1, 3-15 (2008) “Evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels around the time of conception”
- 8) AM. ZAMA and M. UZUMCU: Front Neuroendocrinol 31, 4, 420-439 (2010) “Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: an ovarian perspective”
- 9) 辻博、池田正春：福岡医学雑誌 98, 5, 166-169 (2007) “油症における性腺機能の検討”

(2) ダイオキシン類の曝露量と継世代移行量の評価に関する研究

福岡県保健環境研究所 平田輝昭

<研究協力者>

福岡県保健環境研究所 梶原淳睦

福岡県保健環境研究所 堀 就英 (平成25年度)

福岡県保健環境研究所 高尾佳子 (平成25年度)

福岡県保健環境研究所 櫻井利彦 (平成26年度)

平成24(開始年度)～26年度累計予算額：617千円

(うち、平成26年度予算額：207千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

母体から胎児へのダイオキシン類の移行実態を明らかにするために、平成21年10月～23年3月に九州大学病院で29名の妊産婦(正常出産例19名及び胎児発育遅延例(FGR)10名)の協力を得て生体試料(母体血、母体脂肪、母乳、胎盤、さい帯、さい帯血(さい帯動脈血及びさい帯静脈血)、羊水、胎脂、胎便、新生児尿)の合計217件を採取した。大容量型高速溶媒抽出装置及び大量試料注入装置付き高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計を用いて、多種類の生体試料中のダイオキシン類を分析する方法を確立し、平成23年度までに母体血、母体脂肪、母乳、胎盤、さい帯、さい帯血(さい帯動脈血及びさい帯静脈血)試料の測定を実施した。今回は羊水、胎脂、胎便、新生児尿試料の合計67件のダイオキシン類濃度測定を行い各検体間の関連を解析した。また、ダイオキシン類の継世代移行量を解析するためカネミ油症患者の母子の血液中ダイオキシン類濃度を比較し解析した。その結果、胎脂試料中のダイオキシン類濃度は、平均8.0 pg-TEQ/g lipid(範囲; 2.5～23 pg-TEQ/g lipid)であり、胎便試料中のダイオキシン類濃度は、平均2.8 pg-TEQ/g lipid(範囲; 0.34～8.2 pg-TEQ/g lipid)であった。羊水、新生児尿試料についてはダイオキシン類濃度が検出下限以下であった。正常出産15名において、母体血、胎盤組織、胎脂、さい帯血、胎便の順にダイオキシン類濃度が低下する傾向が認められ、母体から胎児側に近い試料ほどダイオキシン類濃度は低くなる傾向が認められた。

[キーワード]

ダイオキシン、胎脂、胎便、羊水、世代移行

1. はじめに

ダイオキシン類は難分解性の有害化学物質であり、環境中で長期間にわたり安定して残留することが知られている。近年ゴミ焼却等の発生源の対策が進み、環境基準値を上回る汚染事例はほとんど認められなくなった。一方、環境中に残留する微量ダイオキシン類の持続的摂取によって

健康に影響が及ぶ可能性が指摘されている。高濃度のダイオキシン類曝露による急性毒性と同様に、内分泌かく乱作用に代表される微量ダイオキシン類による長期間曝露のリスクを正確に評価することが重要となっている。

一般人のダイオキシン類の主たる摂取経路は食品である。平均的な食事を介したダイオキシン類の摂取量が、成人に対して直ちに健康被害をもたらす量であるかは、既に一定の評価がなされている。厚生労働省研究班の調査結果によると、マーケットバスケット方式で、求めたダイオキシン類の平均摂取量は、近年ほぼ横ばいで1~2 pg-TEQ/kg体重/日を推移している。この量は、厚生労働省の定める耐容一日摂取量(TDI)の4 pg-TEQ/kg体重/日を下回っている¹⁾。ダイオキシン類の主たる摂取源は魚介類であるが、魚介類の摂取量寄与が低下に向かう将来予測はなく、平均的なダイオキシン類曝露量は今後も同程度のレベルで持続するものと考えられる。食事経由のダイオキシン類平均摂取量は、ただちに健康被害をもたらす量に達しておらず、厚生労働省は摂取リスクの高い食品に偏らない、バランスの良い食生活を推奨している²⁾。

環境省が実施した「ダイオキシン類の人への蓄積量調査(2002-2007)」報告書によると、全国の一般市民450名から採取した陰膳食事試料を分析した結果、8名のダイオキシン類摂取量がTDIを超過していた³⁾。このように、実際的なダイオキシン類摂取量は個人でバラツキの大きいことがわかった。また、国内にダイオキシン類のTDIを超過する高リスクの人々が少なからず存在することが示唆されている。

TDIによって示されるダイオキシン類の健康リスクは一般成人を対象にしており、生体防御機構の未発達な胎児や乳児期におけるリスク、影響等は正確に評価されていない。近年、胎児の発育や発達、さらに小児期から青年期にかけての健康は胎児期における環境要因に影響を受けるという指摘がなされている⁴⁾。ダイオキシン類の高濃度曝露事例である油症では、母体から胎児へのダイオキシン類の移行が示唆されている⁵⁾。食事を介したダイオキシン類の持続的な摂取、さらにそれらの体内への蓄積に起因する健康影響の解明が必要である。とりわけ胎児期における母体を介してのダイオキシン類曝露実態と影響を明らかにすることが重要である。

2. 研究開発目的

本分担研究では、母体並びに胎児関連の様々な生体試料を採取し、当該試料中のダイオキシン類濃度測定法を開発し、濃度を明らかにする。ダイオキシン類の母体側から胎児側への移行量やダイオキシン類異性体別の移行の傾向、母体-胎児間の濃度分布等を把握する。さらに、ダイオキシン類高暴露事例であるカネミ油症患者の母子の血液中ダイオキシン類濃度を比較しダイオキシン類の継世代移行量を解析することを目的とした。

3. 研究開発方法

(1) 試料採取

平成21年10月~23年3月に九州大学病院(福岡市)における出産事例において、インフォームドコンセントを得た妊産婦から母体及び胎児関連試料の採取を行った。試料採取は主に正常出産例、ほかに胎児発育遅延例(FGR)を対象とした。試料の内訳は、母体血、母体脂肪、母乳、胎盤、臍帯、臍帯血(臍帯動脈血(A血)及び臍帯静脈血(V血))、羊水、胎脂、胎便、新生児尿の10種で、あった。このうち今回は、羊水、胎脂、胎便、新生児尿のダイオキシン類濃度を測定し、各

検体間濃度を比較解析した。採取後の試料はガラス またはテフロンを材質とする清浄な密閉容器に移し、分析を始めるまで凍結保存された。正常出産例19名 から158件、FGR 例の10名から59 件の計217 件の生体試料を採取した。妊産婦の平均年齢は正常出 産例で3 1.8才、FGR 例で32.3 才であった。

(2) 使用機器

高速溶媒抽出 (ASE) にはダイオネクス製の大容量型装置 ASE 350を使用した。抽出セルは 33、66及び99 mLの各容量3種類を用途に応じ使用した。抽出温度は150℃、抽出圧力は1500 psiで、あり、抽出溶媒 はアセトン/ヘキサン(1:3, v/v) を使用した。ダイオキシン類の異性体分離分析には大量試料注入装置(アイスティサイエンス製L VI-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 7890A /Micromass AutoSpec Premier、HRGC/HRMS) を使用した。キャピラリーカラムは、バリアン製のVF5ms (内径0.25 mm, 膜厚0.25 μ m, 長さ30m) を使用した。

(3) 試薬、器材等

アセトン、ヘキサン、トルエン、ジクロロメタン、無水硫酸ナトリウムは関東化学製のダイオキシン分析用を使用した。ノナンはWellington Laboratories製を、硝酸銀シリカゲルは和光純薬製のダイオキシン分析用を、濃硫酸は同社製の有害金属測定用をそれぞれ使用した。活性炭(ナカライテスク製)はトルエンで、約30 時間還流洗浄し、無水硫酸ナトリウムに対して0.1%(w/w)になるよう混合して用いた。珪藻土粉末(抽出操 作用)はInternational Sorbent Technology製のBULK ISOLUTE SORBENT HM-NをASEで洗浄して使用した。同様に硝酸銀シリカゲル、無水硫酸ナトリウム及び珪藻土粉末は、ブランクレベルの低減を目的として、あらかじめASEで溶媒洗浄して使用した。クリーンアップスパイク並びに、シリンジスパイク用の各内部標準溶液は Wellington Laboratories製を用い適宜ノナンで希釈して使用した。

ブランクレベルの低減と維持を目的として、各種ガラス製器材(ピペット、フラスコ、スピッツ管等)は、すべて生体試料中ダイオキシン類を分析する専用品として調達し、一般化学分析用と厳重に区別して使用した。

使用するガラス器材は、あらかじめ重クロム酸カリウム・硫酸混液に一夜浸漬したのち、精製水で表面を十分にすすぎ、クリーンボックス内で乾燥させた。母体血、臍帯血の保存容器には50mL容のテフロン製ねじ口サンプル管を、上記以外の試料には200mL容のガラス製ねじ口保存瓶をそれぞれ使用した。保存容器は新品を使用し、使用する前に有機溶剤(アセトン、ヘキサン)で繰り返し洗浄し、十分に乾燥させて使用した。

(4) 分析方法

冷凍保存の生体試料を自然解凍して分析に用いた。ASE・350用の抽出セル(容量33mL)の1ないし2本を用い、胎脂は計0.5~3g、胎便は計0.5~5gを珪藻土粉末に混合してセルに充填し、凍結乾燥機を用いて試料中の水分を除去した。各試料に定量用内部標準(クリーンアップスパイク)として¹³Cラベル化PCDD/DFs及び¹³Cラベル化PCBs標準品(ノナン溶液)を正確に添加し、セルキャップを装着して 抽出装置に装填し、抽出を行った。羊水、新生児尿は、1~10mlgにクリーンアップスパイクを添加し、抽出溶媒にアセトン/ヘキサン(1:3, v/v) を用いて液-液抽出を行い、抽出液を調製した。得られた抽出液をロータリーエバポレーターで、減圧濃縮し、風袋を量った秤量瓶に移して乾燥させ、脂肪重量を測定した。

脂肪重量を確定後、脂肪を少量のヘキサンで溶解させ、10 mL容のスピッツ管に移し硫酸処理を

行った。ガラス製クロマト管に硝酸銀シリカゲル(0.5g)及び活性炭(0.5g)を各々充填して上下に連結し、カラムの最上端より硫酸層と分離した試料溶液を負荷後、ヘキサン15 mLで溶出した。硝酸銀シリカゲルカラムを取り外し、活性炭カラムの上端から10% (v/v) ジクロロメタン/ヘキサンを注ぎ、non-ortho PCBsを除く大部分の PCBsを溶出させた。次いでトルエン25mLを注ぎ入れ、PCDDs、PCDFs及びnon-ortho PCBsを溶出させた。得られたトルエン画分を減圧濃縮してヘキサンに転容し、窒素ガス気流による濃縮を経て1.5 mL容の濃縮 パイアルに移し、シリンジスパイクを添加して最終検液量を40-50 μ Lとしたものを測定試料とした。調製した測定試料のうち20 μ Lを大量試料注入装置付きHRGC/HRMSに注入し、測定した。得られたSIMクロマトグラムを解析し、2, 3, 7, 8位に置換塩素を持つ4~8塩素化のPCDD/Fs17種類、ダイオキシン様PCBsのnon-ortho PCBs4 種の計21種同族体を同定・定量した。

ダイオキシン類濃度 (pg/g) の 2, 3, 7, 8-TCDD 毒性当量 (TEQ) への換算には、2, 3, 7, 8-TCDD 毒性等価係数 (WHO-TEF (2005)) を用いた。なお、本報告におけるダイオキシン類の濃度値は特に注釈のない限り、脂肪重量あたりの濃度 (lipid weight basis) で表記するものとする。

(5) カネミ油症患者母子間のダイオキシン類移行の解析

調査対象

月森らが行ったアンケート調査⁵⁾に応じた、油症患者(母)の回答に基づき、母親と油症発症後に生まれた子の血中ダイオキシン等の濃度を比較検討した。なお、使用したデータは、1986年~2012年の油症一斉検診ダイオキシン類測定結果を使用した、また、2,3,4,7,8-PeCDF濃度(以下、PCDF濃度と略)は、2001~2012年のデータを使用した。

解析方法

① 母子間で血液中PCB、PCDF濃度の関連の検討。

PCB、PCDF濃度は、最大値を選択(複数回測定の場合)

ここで、アンケート回答者の内、油症発生後に出産した者で、油症検診時にPCB、PCDFを測定している者は、親34人、子54人であった。母子共に出産後相当の期間が経過しており、出産時の血液検査は行われていないことに留意する必要がある。

② 小児科検診、内科検診を受けたもので、ミルクのみで育てられた子と、母乳又はミルクで育てられた子の群にわけ、検診結果や血液中PCB、PCDF濃度に違いがあるかを検討。

なお、小児科検診ではPCB濃度しか測っていない。また、各データは、一番古い(若い頃に受けた)ものを使用した。

ここで、比較の方法は、同一項目の群間比較とし、量的データの比較においては、2群の比較の場合のt検定(対応なし)で計算した。また、質的データに対しては、2群・二値の場合の、 χ^2 検定(クラーメルの係数の検定)で計算した。

4. 結果及び考察

(1) 胎脂、胎便、羊水及び新生児尿中のダイオキシン類濃度

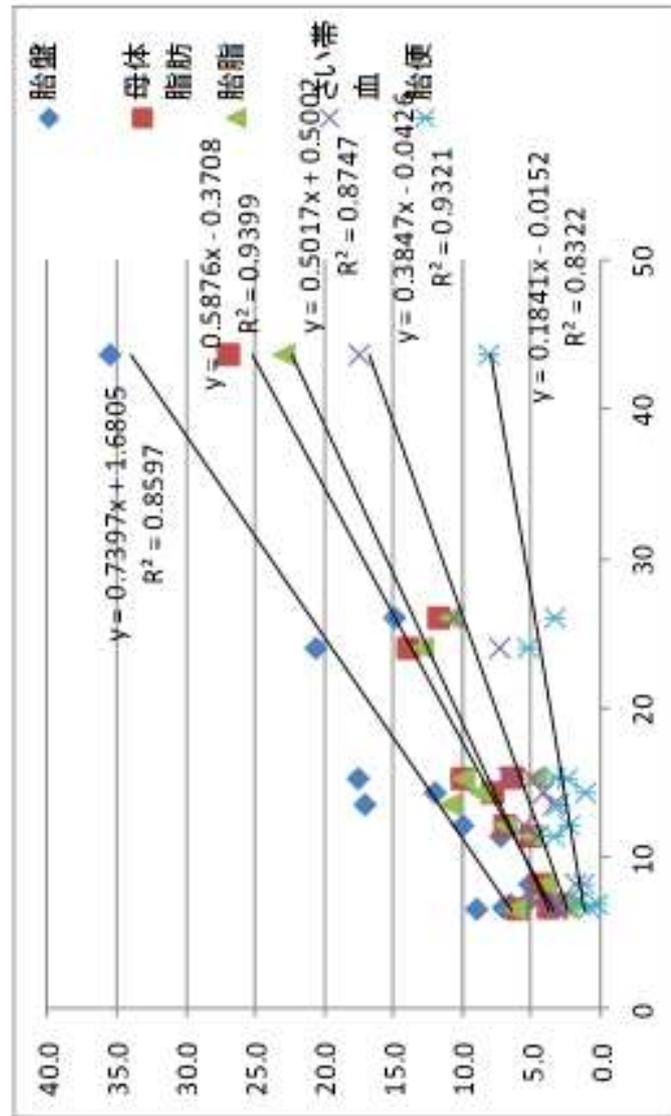
16件(正常例15件及びFGR1件)の胎脂試料中のダイオキシン類濃度は、平均8.0pg-TEQ/g lipid(範囲; 2.5~23 pg-TEQ/g lipid)であり、18件(正常例15件及びFGR3件)の胎便試料中のダイオキシン類濃度は、平均2.8 pg-TEQ/g lipid(範囲; 0.34~8.2 pg-TEQ/g lipid)であった。胎脂は母胎内で胎児の皮膚を保護する役割を果たし、また胎便は胎内で胎児が取り込んだ主に羊水に由

来している。胎脂のダイオキシン類には、母体脂肪組織に含まれるダイオキシン類の組成や濃度が、ほぼそのまま反映されることが分かった。一方、胎便から検出されたダイオキシン類濃度は今回測定した生体試料中で最も低い濃度であった。さらに、羊水、新生児尿試料については液-液抽出による脂肪の抽出を試みたが、検体量(1~10ml)及び脂肪含量が共に少なく脂肪が抽出されず、ダイオキシン類の測定を試みたが検出下限以下であった。

(2) 母体血、胎脂、胎便等生体試料のダイオキシン類濃度の比較

これまでに得られた生体試料（母体血、母体脂肪、胎盤、さい帯血、胎脂、胎便）中の分析結果より、正常出産例19名のうち14名についてダイオキシン類濃度（Total TEQ）の比較を行ったところ母体血、胎盤、母体脂肪、胎脂、臍帯血、胎便の順に低くなる傾向が認められた。さらにこれら生体試料と母体血のダイオキシン類濃度間に良好な正の相関（ $r^2 = 0.8322-0.9399$ ）が認められた(図(2)-1)。

各試料間の濃度相関



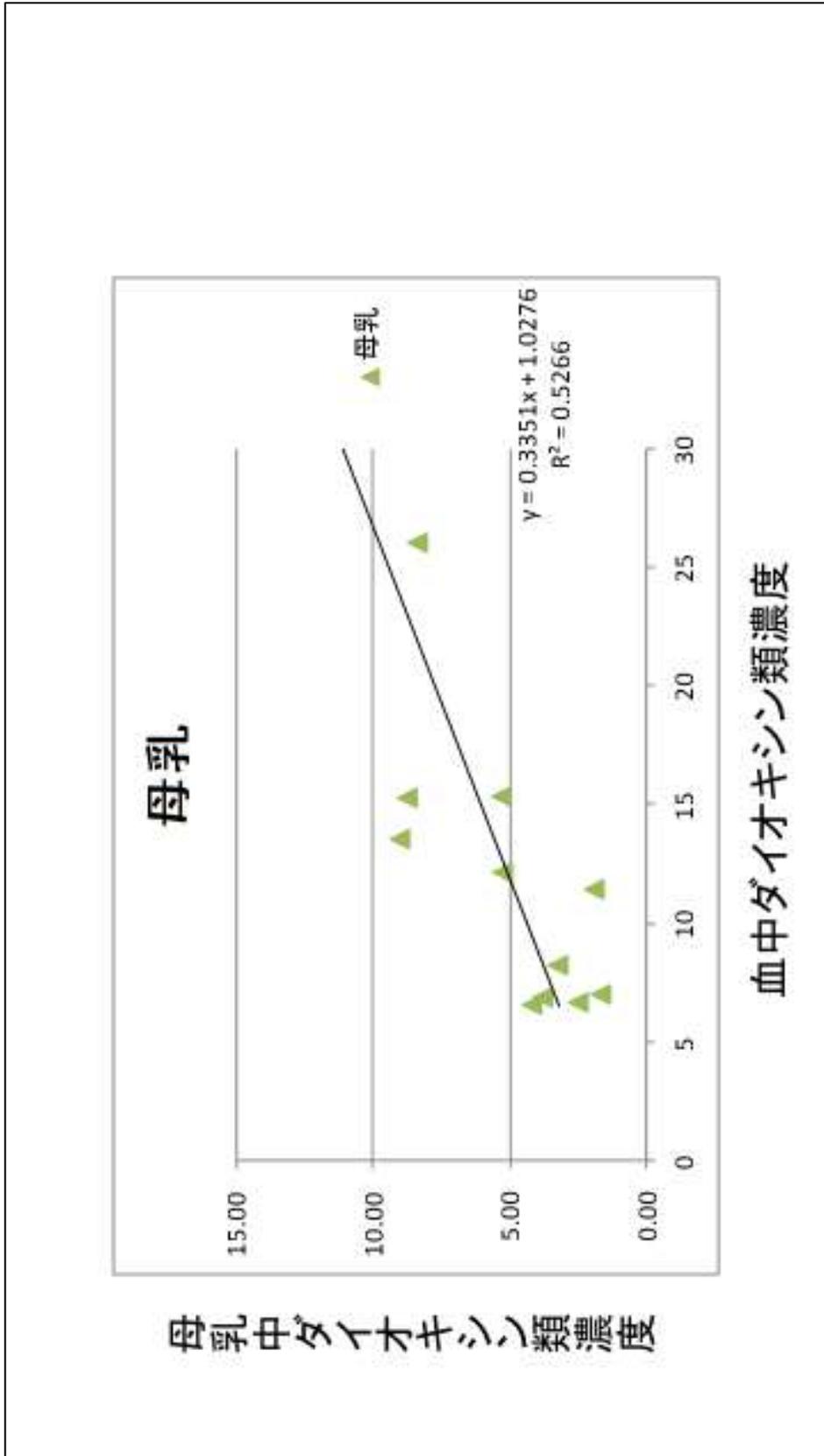
羊水、新生児尿
検出感度以下

図(2)-1

以上のように、母体内でのダイオキシン類の胎児への透過は、胎盤部位で一定の抑制がなされ、胎児へ移行する毒性量は軽減されることが示唆された。比較的毒性が高くTEF値の大きい低塩素化合物は胎盤で保持されやすいが、毒性の低い化合物は保持されにくく、胎児側へ移行しやすいことが示された。このことは胎盤組織に存在するAhレセプターへの各化合物の結合性(親和性)の強弱によって説明できると考えられる。

(3) カネミ油症患者母子間のダイオキシン類移行の解析

上記で解析した母体血、胎脂、胎便に加えて母乳も11件で解析しており、母体血のダイオキシン類濃度間に正の相関 ($r^2 = 0.5266$) を認めた(図(2)-2)。この結果は出生後も母乳を介して子がダイオキシン類に暴露し続け得ることを意味する。そこで母子間の血液中のダイオキシン類の濃度に関連があるか検討を行った。



図(2)-2

① 母子間で血液中PCB、PCDF濃度の関連の検討結果

解析の結果、母子の血中PCB濃度の関係は見られなかった。

次に、母と子の血中PCDF濃度を比較したが、PCB濃度と同じく関係は見られなかった。

次に、母親のPCDF濃度区別に、子のPCB、及びPCDF濃度を調べた。

ここで、血液2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF)の濃度の異常として以下のとおり区分した。

- 1) 50pg/g lipids以上:高い濃度
- 2) 30pg/g lipids以上、50pg/g lipids未満:やや高い濃度
- 3) 30pg/g lipids未満:通常みられる濃度

この基準で母親を分け、子の濃度を比較した。その結果、母のPCDF濃度が低い方が、子のPCB濃度の平均値が高い傾向を認めた。

次に、母のPCDF濃度と子のPCDF濃度関係を見ると母のPCDF濃度が高い方が、子のPCDF濃度の平均値が高い傾向を認めた。

次に子に与えた栄養別(母乳、ミルク、混合(栄養))に分け、子のPCB濃度及びPCDF濃度を検討した。その結果、栄養別によって子のPCB濃度に差を認めなかった。子のPCDF濃度に関しては、「混合」群、「ミルク」群、「母乳」群の順に子のPCB濃度分布幅が大きくなったが有意差は得られなかった。

最後に母のPCDF濃度群と子のPCDF濃度の関連(子に与えた栄養別)を子に与えた栄養、子の性別と伴に検討した。子の性別別に親のPCDF濃度と子のPCDF濃度の関連を調べると、子が女性の場合、親のPCDF濃度が高いと子のPCDF濃度も高くなる傾向を認めた。さらに子に与えた栄養との関連で見ると、「母乳」の場合で、親のPCDF濃度が高いと、子のPCDF濃度も高くなる傾向を認めた。しかし、今回の調査は「母乳」を摂取した子供たちは、検査までに何年も期間が過ぎていること、今回の調査はあくまでPCDF濃度が高い検体で比較していることに留意する必要がある。残念なことに出産前の母親の血液、出産後の血液、生まれた新生児の血液データは必ずしも採られていない。そのためこの解析はあくまで傾向を見ることに重きを置いているものである。そもそも、栄養別に与えたというアンケートでも「母乳だけ」、「ミルクだけ」の回答は、ある程度信頼性があるかもしれない。しかし、「混合」の場合はどれだけ母乳を与えたか分からないでいる。そこで、次に②の解析を試みた。

② 子に与えた栄養別健診結果の比較

小児科検診、内科検診を受けたもので、「ミルクのみ」で育てられた子と、「母乳又は混合(以下母乳群)」で育てられた子の群にわけ、検診結果や血液中PCB、PCDF濃度に違いがあるかを検討した。

ここで、データベースからの抽出は①の解析の1年後であり、抽出にあたり、子どもたちが一番若いときのデータを選んでいる。また、①の調査後、一部名寄せを行っていること、小児科検診では、PCB濃度しか測っていないことにも注意が必要である。そのため、小児科群と内科検診群に分けて解析した。

小児科検診群に関しては、統計的に差が認められるものは、「母親の流・早産」の項目がカイ二乗検定において、p値が0.035であり、Cramerの係数Vが0.592と有意差が認められた。また、「クレチニン」が、t検定でp値0.017、「ALT」が、p値0.0003であり差が認められたが、「PCB濃度」の差は認められなかった。

ここで、小児科検診群では、最初の検診時の年齢が「母乳」群で平均11.0歳、「ミルク」群は、12.2歳であるため与えられた栄養の違いが、その後の食生活による違いが加算され見分けがつかなくなっている可能性がある。

一方、内科検診群では、「関節痛」がカイ二乗検定で、p値0.002、Cramerの係数Vが0.563であり、「月経異常」が、p値0.031、Cramerの係数Vが0.680と差が認められた。また、「PCB濃度」は小児科検診での差が見

られなかったが、内科検診では、p値が0.070と傾向が見て取れた。しかしこの原因はよくわからなかった。さらに、小児科検診ほど明確ではないが「ALT」に関してもp値が0.062と、傾向が見て取れた。一方、ダイオキシン類の差は見られなかった。これも検診時の年齢の平均が「母乳」群で31.4歳で有り、「ミルク」群では、34.1歳と小児科検診時から年月をさらに重ねていることが原因だと考えられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

各種生体試料中の微量ダイオキシン類を高精度かつ迅速に分析できる手法を確立した。抽出工程に高速溶媒抽出法を採用し、抽出条件を最適化した。本研究で確立した方法を用いれば、安定的に高い抽出効率を得ることができ、分析精度の向上に寄与することとなる。本法を用いた場合の抽出脂肪量(含量%)は従来法とほぼ一致することを確認した。このことは本法と従来法とで得られたデータの相互比較が可能であることを意味する。

確立した試験法を用いて、母体から胎児へのダイオキシン類の移行について実態を明らかにした。各種生体試料からダイオキシン類を同定・定量した結果、ダイオキシン類濃度は過去の分析事例と比較して同等もしくは低くなる傾向が認められ、これは近年の環境汚染レベルの低下が一因と考えられる。また、母体中のダイオキシン類は胎盤部位で胎児側へ透過が抑制されること、母体から胎児への移行性には異性体間で差のあることが明らかとなった。胎盤を介したダイオキシン類の胎児への移行は一定の抑制がなされる(毒性量が軽減される)一方、過去に調査事例が無かった胎脂、胎便の分析データは、主に食事を介して母体に取り込まれたダイオキシン類が、胎児の成育環境や胎児体内に確実に到達していることを裏付けていた。

油症患者の母子間の解析では、散布図で見える限り、母子間の血中PCB濃度やPCDF濃度に関係は見られなかった。また、母親の血中PCDF濃度をランク分けし、子の性別ごとに分類すると、母のPCDF濃度が高いと、子が女性の場合はPCDF濃度が高い傾向が示唆された。

最後に、子を「母乳及び混合」群と「ミルク」群に分け、小児科検診、内科検診で差があるか調べたが、小児科検診では、2群間にPCB濃度の差が出なかった。内科検診では、2群間にPCB濃度の差がある傾向が示唆されたが、PCDF濃度に関しては差が見られなかった。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

本調査研究では、種々のヒト生体試料中のダイオキシン類分析に対応するために、分析法の構築・開発を行った。確立した分析方法は、国内外における本分野の研究進展に寄与し、環境政策に役立つ科学データの蓄積が図られることになる。また調査手順の全般(試料採取方法や試料保管方法など)で得られた知見や課題は、今後想定される大規模な調査プロジェクトにおいて、調査手法の設計・立案に役立つと考えられる

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会等）

特に記載すべき事項はない

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」平成 20 年度総括・分担報告書.
- 2) 環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室、関係省庁共通パンフレット「ダイオキシン類 2005」.
- 3) 環境省環境保健部環境リスク評価室「日本人におけるダイオキシン類の蓄積量についてーダイオキシン類の人への蓄積量調査（2002-2007）」報告書
- 4) 環境省「小児の環境保健に関する懇談会小児の環境保健に関する懇談会報告書」平成 18 年 8 月.
- 5) Tsukimori K et al., Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease, Environ Int. 38(1):79-86, 2012.

(3) ダイオキシン類曝露による継世代健康影響の発症機序に関するゲノム研究

国立大学法人 九州大学

環境発達医学研究センター 研究推進部門ゲノム疫学分野	和氣 徳夫・劉格
医学研究院皮膚科学分野	古江 増隆
病院油症ダイオキシン研究診療センター	内 博史
病院周産期母子医療センター	福嶋 恒太郎
医学研究院 地域医療学講座	浅野間 和夫
〈研究協力者〉 京都大学医学系研究科	高尾 知佳

平成24(開始年度)～26年度累計予算額：57,847千円

(うち、平成26年度予算額：18,919千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

AhR-130bpにはC/T SNPが存在する。T/T型ではC/C型と比較し1.75倍のプロモータ活性の亢進が認められる。AhR転写及び蛋白発現もそれぞれ1.7、2倍亢進する。T/T型ではNF1C転写抑制因子の結合サイトが消失するためである。

ダイオキシン類高濃度曝露に伴い出現する健康影響に関するAhR下流シグナルを明らかにするためヒト絨毛間質細胞を用いTCDD存在下及び非存在下での遺伝子発現変化をC/C型、T/T型細胞別にマイクロアレイ法による解析を行った。マイクロアレイ法によりTCDD応答性発現変化を示したIL24、EDNRB、SERPINB2、FAM43A、TIPRRARP及びNPTX1は様々な病態形成に関与することが知られているためReal-time RT-PCRにより発現変化の再確認を行った。

ダイオキシン類高濃度被曝例として油症患者に着目した。2011年油症患者一斉検診時に採血した32例のC/C型及び32例のT/T型油症患者についてIL24血中濃度及び各種ダイオキシン類濃度の測定を行った。遺伝子解析は九州大学倫理審査委員会の了承及び油症患者に対する説明と合意のもとに実施した。IL24血中濃度はT/T型で 180.9 ± 43.2 pg/m、C/C型で 59.1 ± 15.8 pg/mとT/T型で有意に高値であることが示された。PCDD、PCB、PCDF及びTEQ濃度とIL24血中濃度には有意な正の相関は示されなかった。マイクロアレイ法の感度が低いこと及びIL1 β がIL24発現調節をしていることからIL1 β 遺伝子発現をヒト絨毛間質細胞をTCDD処理しReal-time RT-PCRにて解析した。T/T型でTCDD応答性IL1 β 遺伝子発現は有意に亢進していた。しかしC/C型油症患者での血中ダイオキシン類濃度はT/T型に比し高値であったためT/T型油症患者におけるIL1 β 血中濃度はC/C型と比較し有意な低値を認めた。以上の結果から、血中ダイオキシン類が高濃度ではないダイオキシン類曝露次世代及び次々世代に発生する健康影響はAhR-130bp C/T SNP及びAhR下流のIL1 β 及びIL24により発症が誘導されることが強く示唆された。

[キーワード]

ダイオキシン類、AhR-130bp C/T SNP、NF1C、IL1 β 、IL24、油症

1. はじめに

化学物質の胎児期暴露による影響に世界的な関心が高まっている。我が国においても環境省の「子どもの健康と環境に関する全国調査：エコチル調査」が平成22年度に始動し、化学物質曝露等が子どもの健康に与える影響を明らかにする目的でコホート調査をすすめている。一方、高濃度の化学物質に曝露した群において次世代への健康影響を観察することは、化学物質曝露による次世代への健康影響を明らかにするうえで重要な基礎資料となる。

申請者らはpolychlorinated biphenyls(PCBs) およびダイオキシン類の曝露によるカネミ油症患者の治療法開発および発症機序の解明に向けた研究をすすめている（九州大学油症ダイオキシン研究センター）。胎児期に油症に曝露した例では、児の出征体重は母体血中ダイオキシン類濃度の有意に負の相関を示し、この胎児発育抑制効果は男児に特異的であることを明らかにした。また、次世代、次々世代において男児出生率が有意に低いことが分かった。一方、油症患者より出生した児の血中ダイオキシン類濃度は正常健常人と比して有意な差を認めないことから、これら次世代への健康影響の発現は、高濃度のダイオキシン類の母児間移送によるものとは異なる機序が推察される。（図3-1）

申請者たちは、AhRを介する細胞内シグナル伝達機構の個体差が健康影響の出現に関与していると考えた。このため、AhRプロモータ領域に存在するDNA多型に着目した。AhRプロモータ領域を明らかにするため、転写開始点から-237bp、-1417bp、-452bp、-122bp及び-59bpのDNA断片を作成し、ルシフェレースリポーターに組み込み、プロモータ活性を測定した。その結果、転写開始点から-452bpまでのDNA断片にはプロモータ活性が存在するが、転写開始点から-122bpのDNA断片ではその活性が消失した。その結果、AhRプロモータ領域は転写開始点から-452bpであることが判明した。この領域には図3-3に示す様々なDNA多型が存在するが、出現頻度の高い遺伝子型は-59bp領域の1×ggggc、2×ggggc、3×ggggc、4×ggggc、5×ggggc DNA多型及び-130bp領域のC/T SNPであった。このため、-59bp領域の異なるリピート数のDNA多型と-130 C/T SNPを有するDNA断片を作成し、ルシフェレースリポーターに組み込み、プロモータ活性の変化を解析した。その結果、リピート数の変化はプロモータ活性に全く変化を与えず、-130bp C/T SNPがプロモータ活性に大きく影響を与えることが判明した。-130bp T/TはC/C及びC/Tに比較し約1.75倍の活性亢進が観察された。一方、ラットを用いた実験では、PCBなどの化学物質曝露により次世代、次々世代の雄雌出生率の減少をきたし、この機序にはエピジェネティクス変化が関与することが報告されている。これらの成績から、ダイオキシン類曝露による次世代への健康影響の発現機序には、AhRを介する細胞内シグナル伝達機構の個体差（遺伝子多型）やエピジェネティクス変化による遺伝的感受性が関わっていることが推察される。

そこで、本研究では、油症患者を対象としてダイオキシン類曝露における次世代、次々世代の健康影響と遺伝的感受性要因との関連について明らかにすることを目的とする。

2. 研究開発目的

本研究では、ダイオキシン類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世代的な健康影響とその機序を明らかにすることを目的とする。この主旨に沿って、ヒトがダイオキシン類に曝露した事例である油症患者を対象として、油症曝露世代、次世代、次々世代の3世代にわたる健康影響を明らかにする。ついで、これら実態調査により明らかとなった継世代的な健康影響の機序について、血中ダイオキシン類濃度、ダイオキシン受容体(Arylhydrocarbon receptor, AhR)を介する細胞内毒性シグナル伝達機構の個体差をゲノム多様性及びエピジェネティックな遺伝子発現制御の破綻の観点から明らかにする。

3. 研究開発方法

ダイオキシン類はAhRに結合し、ARNTとヘテロダイマーを形成することにより細胞内へシグナルを伝達する。これにより下流のCYP1A1などの遺伝子発現を制御する。本研究ではヒトAhRプロモータ領域の一塩基多型(SNP : Single Nucleotide Polymorphism)および転写因子結合サイトの検索を行い、AhRプロモータ領域のSP1及びNF1転写因子の結合解析を行う。次に既存の細胞株を使いダイオキシン存在下、非存在下におけるAhR下流シグナル(CYP1A1など)伝達の活性化解析を行い、ダイオキシン類の細胞シグナル伝達におけるゲノム多様性の関与を証明する。

油症患者血液よりリンパ球を分離しDNAを抽出する。PCRにより標的領域の遺伝子増幅を行う。さらに増幅領域の直接塩基配列の決定及び制限酵素切断多型を用いて、AhRプロモータ領域のSNP遺伝子型決定を行う。健康影響、ダイオキシン類の血中濃度およびAhR遺伝子多型間の比較分析を行いダイオキシン類の細胞内毒性シグナルのゲノム多様性が油症の健康被害に与える影響を明らかにする。

4. 結果及び考察

化学物質の胎児期暴露による影響に世界的な関心が高まっている。我が国においても環境省の「子どもの健康と環境に関する全国調査：エコチル調査」が平成22年度に始動し、化学物質曝露等が子どもの健康に与える影響を明らかにする目的でコホート調査をすすめている。一方、高濃度の化学物質に曝露した群において次世代への健康影響を観察することは、化学物質曝露による次世代への健康影響を明らかにするうえで重要な基礎資料となる。

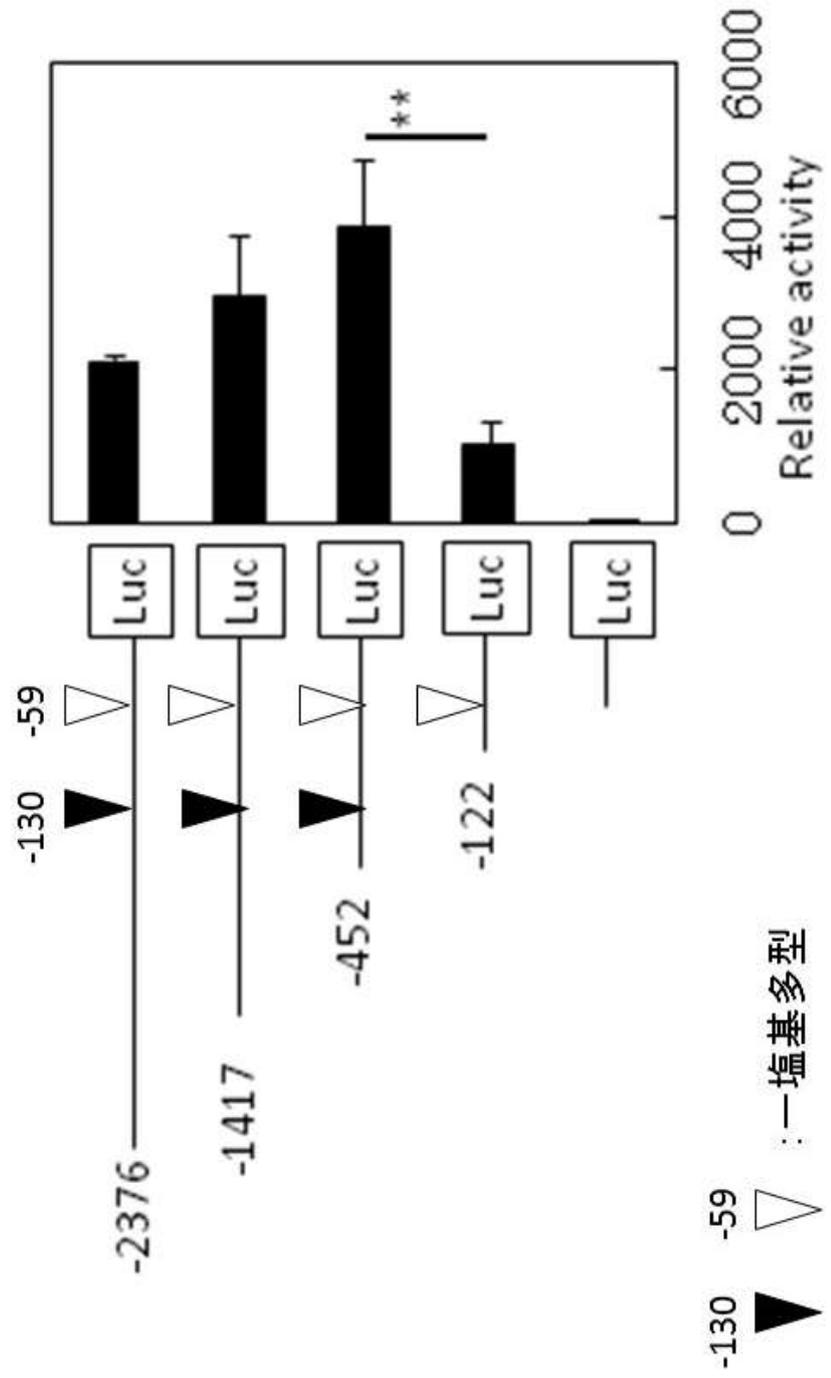
申請者らはpolychlorinated biphenyls(PCBs) およびダイオキシン類の曝露によるカネミ油症患者の治療法開発および発症機序の解明に向けた研究をすすめている(九州大学油症ダイオキシン研究センター)。胎児期にダイオキシン類に曝露した例では、児の出征体重は母体血中ダイオキシン類濃度の有意に負の相関を示し、この胎児発育抑制効果は男児に特異的であることを明らかにした。また、次世代、次々世代において男児出生率が有意に低いことが分かった。一方、油症患者より出生した児の血中ダイオキシン類濃度は正常健康人と比して有意な差を認めないことから、これら次世代への健康影響の発現は、高濃度のダイオキシン類の母児間移送によるものとは異なる機序が推察される。

ダイオキシン類はAhRを介して様々な機能を示すことが知られている。申請者らはAhR遺伝子内DNA多型がAhR機能に影響を及ぼし継世代的健康影響に関与するのではないかと考えた。

① AhR-130bp C/T SNPがプロモータ活性に及ぼす影響について

まずAhRプロモータ領域を決定するため、1精子受精・雄核発生全奇胎DNAを用い、様々なAhRプロモータ欠失変異体を作成し、ルシフェラーゼリポータに組み込んだ。1精子受精・雄核発生全奇胎は全ての対立遺伝子間でホモ接合を形成しているためSNP解析に有用である。ルシフェラーゼアッセイの結果、AhRプロモータは転写開始点から-452bpの領域に存在することが判明した。(図3-2)本領域内にはマイナーアレルの頻度が高い2種類のDNA多型が存在した(-59bpのGGGGCリピート数変化、-130bp C/T多型)。全奇胎DNAを用い予想される9種類のハプロタイプの頻度を調べた結果、-130bp C リピート数2 (18.0%)、-130bp T リピート数2 (24.0%)、-130bp Cリピート数3 (52.0%)のハプロタイプが日本人には高頻度に出現することが判明した。それぞれのハプロタイプを有するAhRプロモータをルシフェラーゼリポータに組み込み、AhRプロモータ活性を解析した。その結果、-59bp DNA多型に関係なく-130bp C/T SNPのみがプロモータ活性の変化に関与していた。C/CよりT/Tで転写活性が1.75倍亢進していた。(図3-3)

レポータ解析



図(3)-2

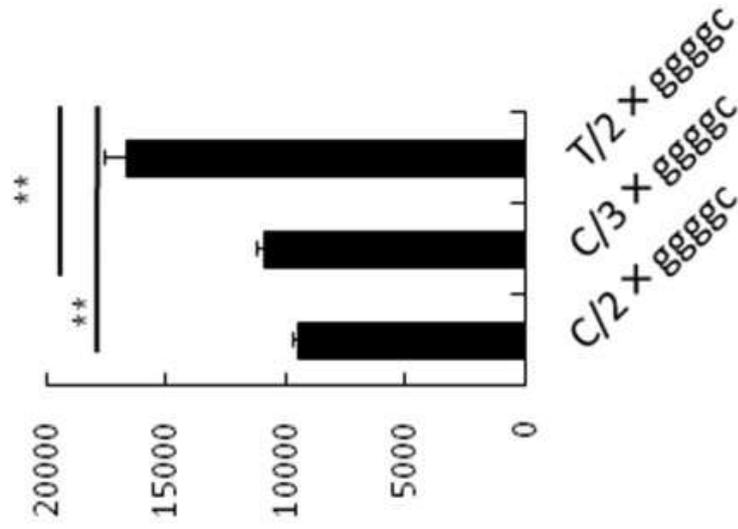
全胞状奇胎を用いて...

Table 1. SNP genotype of the AHR upstream region in CHM

Location	SNP	Genotype	n	ratio (%)
-59	rs71010234	1 × ggggc	1	2.0
		2 × ggggc	21	42.0
		3 × ggggc	26	52.0
		4 × ggggc	1	2.0
		5 × ggggc	1	2.0
-67	rs72152648	ggcggggcg	0	0
		-	50	100
-72	rs72286154	ggcgggggcg	0	0
-130	rs10249788	-	50	100
		C	38	76.0
		T	12	24.0
-188	rs71010233	G	0	0
-195	rs41446044	-	50	100
		G	50	100
		C	0	0
-196	rs11330131	G	0	0
-222	rs41351350	-	50	100
		G	50	100
		A	0	0
-268	rs74739585	T	48	96.0
		C	2	4.0

AhR遺伝多型によるプロモータ活性の変化

rs10249788	rs71010234	n	ratio (%)
C	3 × ggggc	26	52.0
T	2 × ggggc	12	24.0
C	2 × ggggc	9	18.0
C	1 × ggggc	1	2.0
C	4 × ggggc	1	2.0
C	5 × ggggc	1	2.0



rs10249788/rs71010234

5`- ACGGANNNNNTCCAG -3`

T

AhRプロモータ領域-59bp領域には転写因子SP1が結合する領域が存在し、SP1によりAhR転写が制御されている。一方、-130bp近傍にはNF1転写因子結合サイトが存在する。NF1にはNF1A、NF1B、NF1C及びNF1Xのサブタイプが存在する。NF1C及びNF1Xは転写抑制因子として機能する。AhR-130bp C/Cプロモータでは転写が抑制されることから申請者らはNF1Cに着目し、-130bp C/T SNPによるAhRプロモータ活性の制御機構について解析を進めた。

NF1CによるAhR-130bp C/T領域への特異的結合を証明するため、HeLa細胞(C/C)、TK-nu細胞(T/T)及びHec116細胞(C/T)を用い、NF1C抗体によるクロマチン免疫沈降を行った。図3-5に示す如く、NF1CはHeLa細胞DNAと強く結合し、TK-nu細胞DNAとの結合は顕著に抑制されていた。Hec-116細胞DNAと結合はHeLa細胞と比較すると減弱していた。この結果、NF1CはAhRプロモータ-130bp Cアレルと効率よく結合することが判明した。さらに図3-5-Cに示す如くNF1CはAhRプロモータ-130bp領域(NF1C結合サイト)中のCアレルに特異的に結合することがクロマチン免疫沈降により確認された。T/T型のTK-nu細胞と比較しC/C型のHeLa細胞では、NF1Cの結合サイトへの結合が有意に亢進していた。さらに、FlagをタグしたNF1CをHec116細胞に強制発現し、AhR-130bp C/Tアレルへの結合を解析するとCアレルとの結合がTアレルと比較し、有意に亢進していた。以上から、NF1Cと-130bp領域(NF1C結合サイト)との結合は特異性が存在し、TアレルよりCアレルの方が結合親和性が有意に亢進していることが判明した。

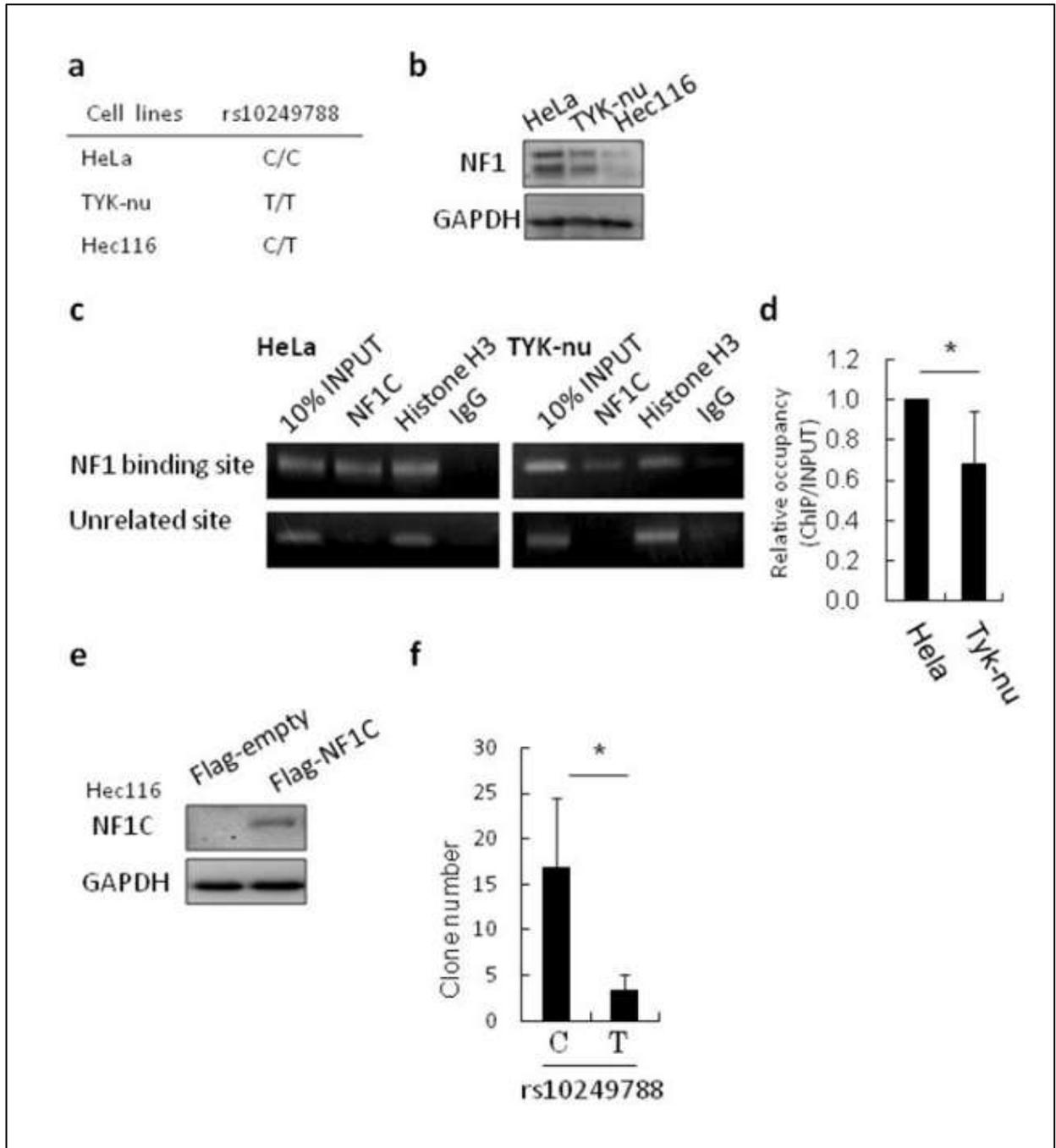
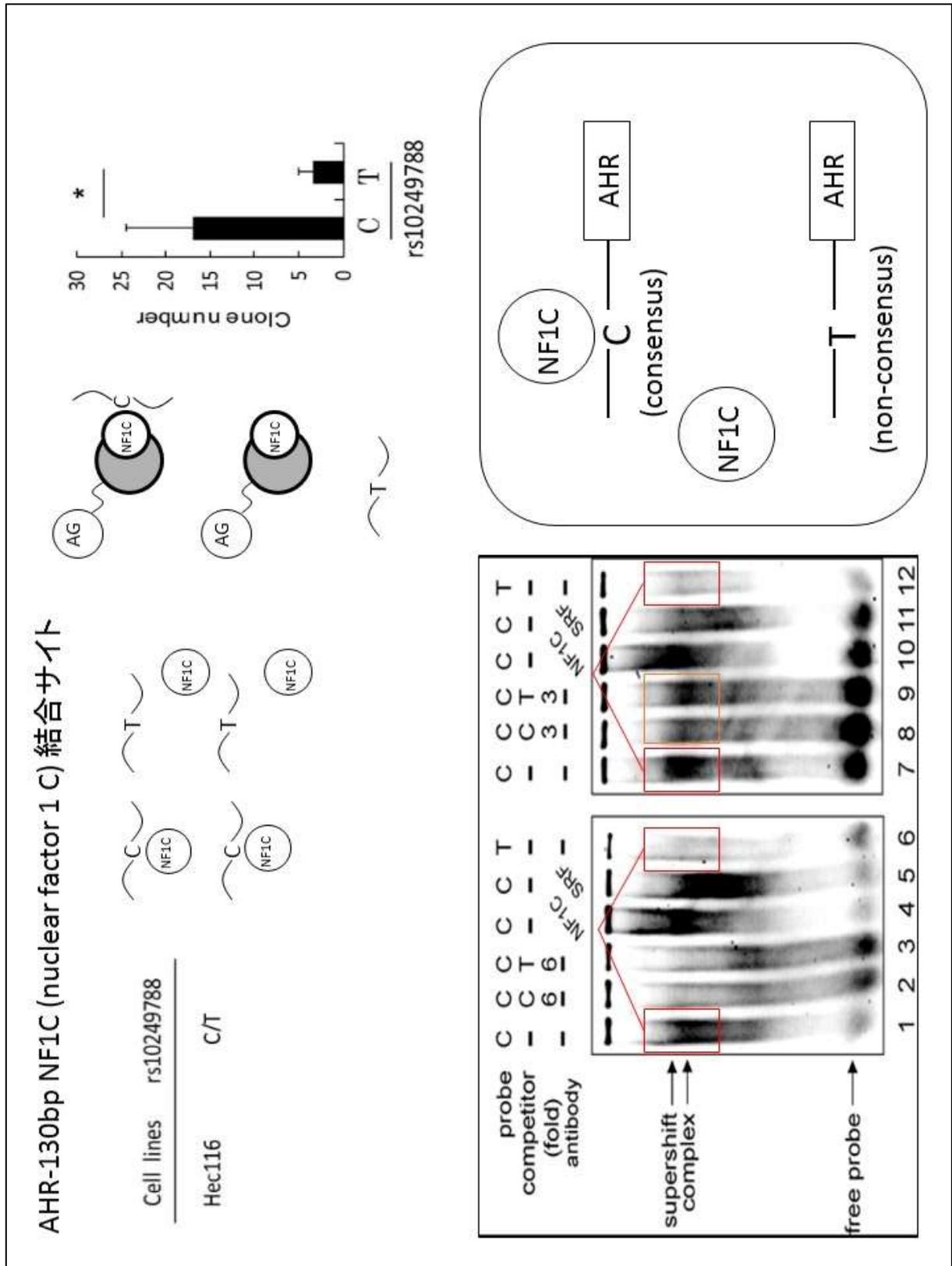


図 (3) -5

さらにElectrophoretic mobility shift assayを行った。-130bpCプローブはTプローブに比し複合体形成能が高く、さらにNF1C抗体によりスーパーシフトすることからNF1Cと-130bp領域との特異的結合が証明された。3倍量のcompetitor存在下において、NF1CはTプローブに比し、Cプローブで結合能が亢進していた。さらにHec116細胞 (SNP-130bp C/T) を用いてFlag-NF1Cを遺伝子導入した。PCR産物をサブクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、複合体に含まれる-130bpDNA領域はTアレルよりもCアレルの方が有意に高率であった。これらの結果から、-130bpC/C

はT/Tと比較し高率にNF1Cと結合しAhRプロモータ活性が抑制されるが、T/TはNF1C結合親和性が低く、AhRプロモータ活性が有意に抑制されないことが判明した。(図3-6)



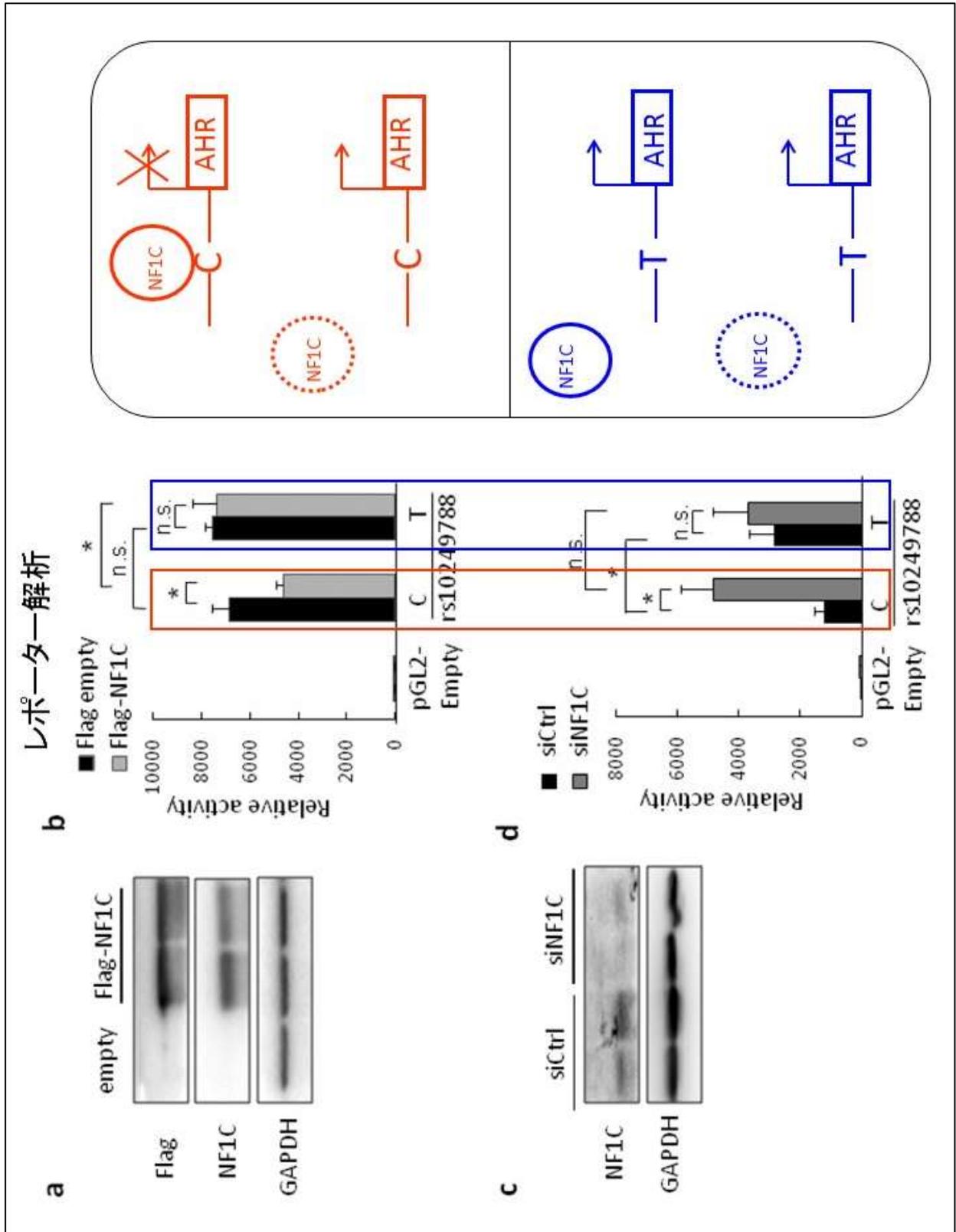
図(3)-6

② NF1C による AhR 発現抑制の分子機構

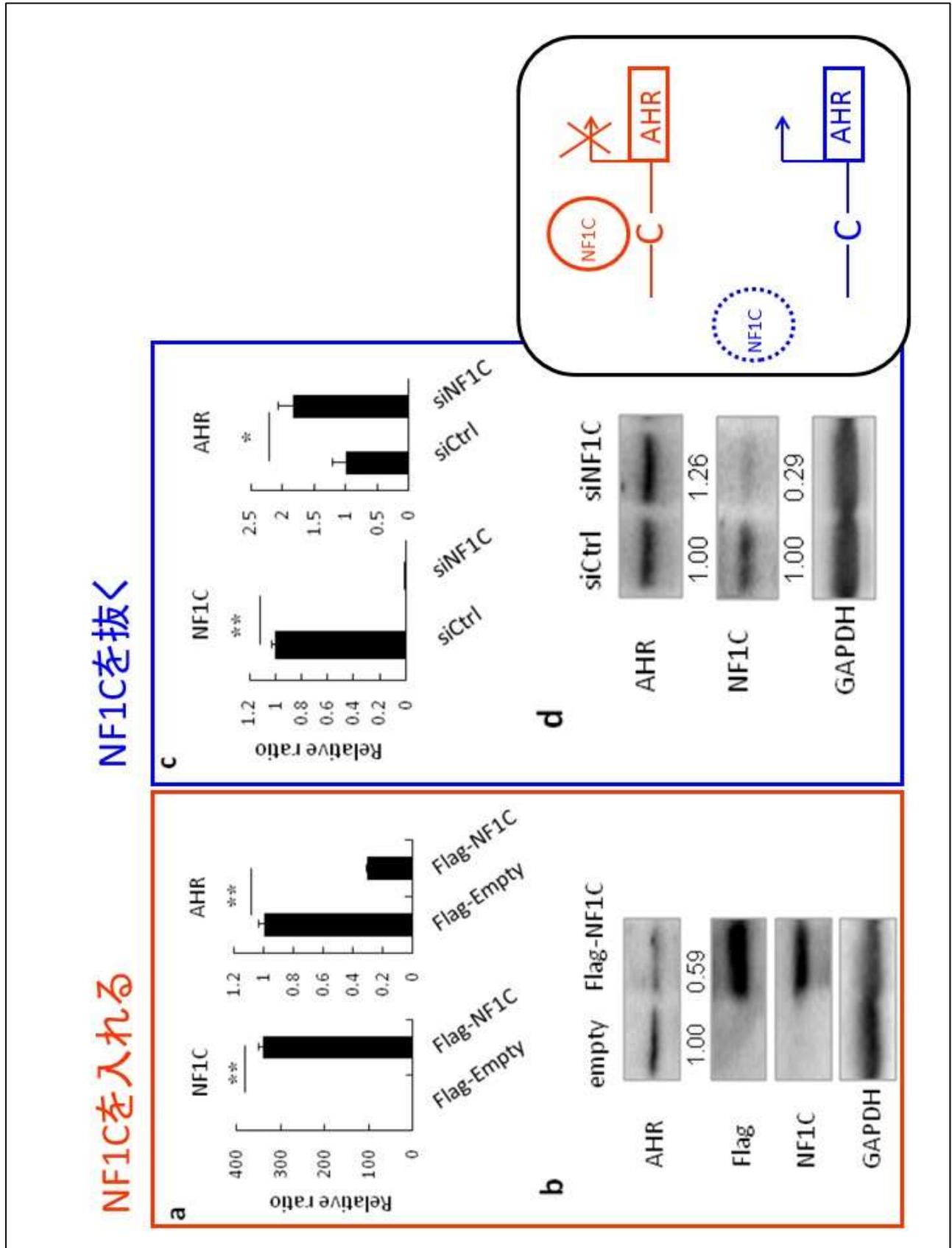
NF1Cを強制発現させるためflagをタグした安定型NF1CcDNA変異体をアデノウィルスベクターに組み込み、HEC293細胞に遺伝子導入した。さらにNF1Cノックダウンの為にSiRNAを用いた。AhR mRNA及び蛋白発現変化をreal time PCR及びウェスタンブロット法で解析した。

NF1Cの過剰発現によりAhRプロモータ活性がいかに変化するかを解析する為、-130bpC/C及びT/T遺伝子多型を有するAhRプロモータをルシフェラーゼ・リポーターベクターに組み込み、ルシフェラーゼ活性を解析した。NF1Cを過剰発現すると-130bpC/C遺伝子型ではAhRプロモータ活性が有意に抑制されたが、T/T遺伝子型では抑制を認めなかった。同様にNF1CをノックダウンしAhRプロモータ活性の変化を解析した。-130bpC/C遺伝子型ではAhRプロモータ活性の有意な亢進が示され、-130bp T/T遺伝子型では有意な変化は観察されなかった。以上より、SNP-130bpがCアレルの場合、Tアレルの場合より強くNF1Cと結合し、AhR転写活性を負に制御すること、及びSNP-130bpがCアレルの場合、NF1Cの強制発現はAhRプロモータ活性を抑制し、NF1Cの発現抑制はAhRプロモータ活性を有意に上昇させることが判明した。(図3-7) さらに、Flag NF1Cを強制発現したHEK293細胞を用い、NF1C強制発現に伴うAhR発現レベルの変化を解析した。NF1C強制発現によりAhR発現は有意に抑制された。Si RNAを用い、Hec293細胞でのNF1C発現を抑制すると、AhR発現レベルは有意に亢進した。

(図3-8) 以上からNF1Cは、NF1C結合サイトに特異的に結合し、AhR-130bp Cアレルを特異的にAhR発現を抑制することが明らかになった。



図(3)-7



③ -130bp C/T SNPの子宮内膜癌進展への関与

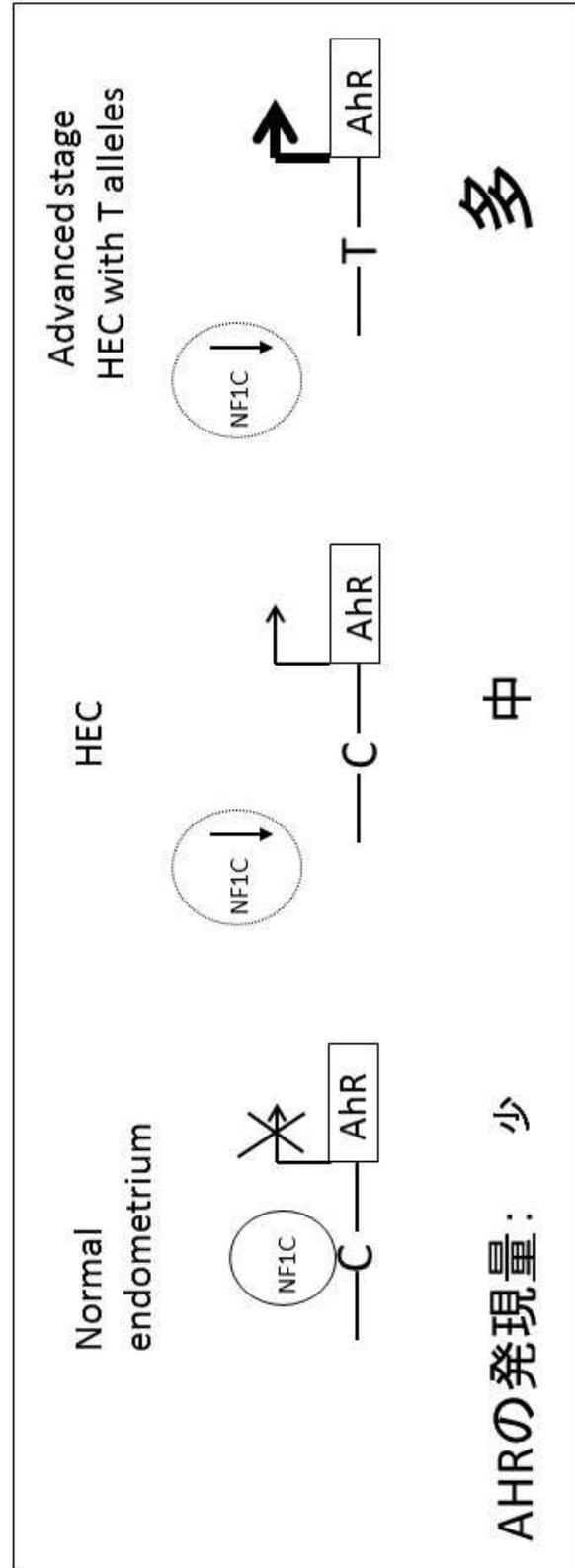
-130bpC/T SNPが子宮内膜癌進展にいかに関与するかを明らかにするため、正常健常人130例及び内膜癌患者121例から血液を採取し、DNAを抽出した。ケース及びコントロール間で-130bp C/T SNPの遺伝子型頻度に有意差は無かった。しかしT/T遺伝子型はC/C及びC/Tに比し、進行癌患者において有意に高頻度に出現した。さらに正常子宮内膜組織と子宮体癌組織での発現を解析すると、子宮体癌組織では、正常子宮内膜に比しAhR発現量が有意に高く、NF1C発現は有意に抑制されていた。(図3-8) AhR高発現、NF1C低発現は未分化子宮内膜癌において顕著であった。(図3-10)

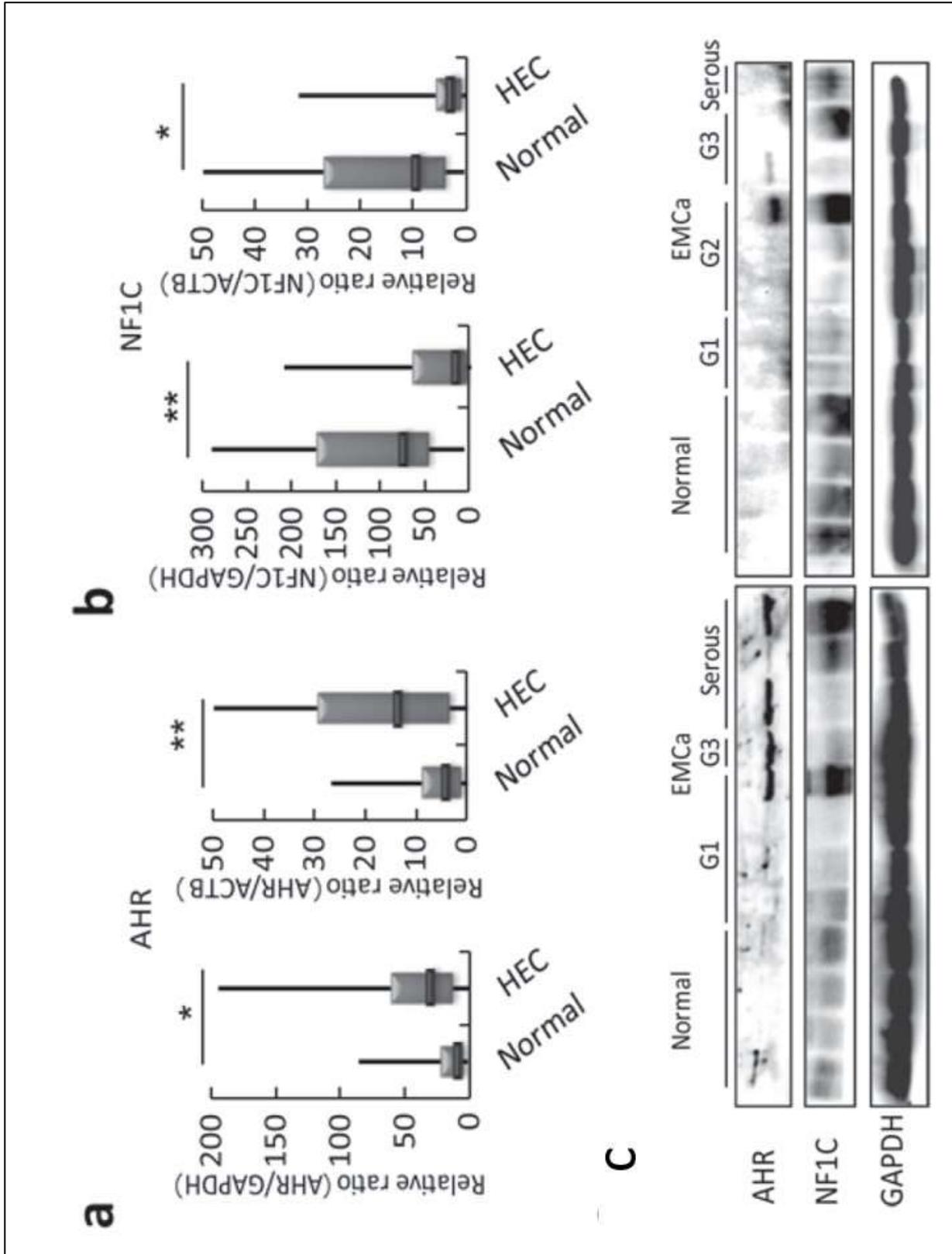
AhR高発現、NF1C低発現が子宮内膜癌の進展にいかに関与するかを解析するためHHUA、HEC6子宮内膜癌細胞及び、ヒト子宮内膜不死化細胞hEMに野生型NF1C及び活性型NF1C(NF1CS)を強制発現した。HHU及びHEC6子宮内膜癌細胞では、顕著な細胞増殖の抑制が観察されたが、ヒト子宮内膜不死化細胞hEMでは、細胞増殖の抑制を認めなかった。(図3-10, b) 次に、浸潤能及び運動能の解析をBoydenchamberを用いて行った。NF1Cを強制発現すると、HHUA、HEC6子宮内膜癌細胞能の浸潤は有意に抑制され、ヒト子宮内膜不死化細胞hEMの浸潤能は抑制されなかった。(図3-10, c) 同様にNF1C強制発現によりHHUA及びHEC6子宮内膜癌細胞の運動能は顕著に抑制されるが、ヒト子宮内膜不死化細胞の運動能は抑制をうけなかった。これらのことから、NF1Cは子宮内膜癌細胞特異的に、その増殖、浸潤、運動能を抑制することが明らかとなった。いかなるメカニズムにより、NF1Cによる癌細胞特異的な増殖、浸潤、運動能を抑制するのかを解析した。この目的のため、HHUA及びHEC6子宮内膜癌細胞にNF1Cを強制発現した。NF1C強制発現により、AhR発現は有意に低下し、ビメンチン、SNAIL1などの間葉系マーカーの発現抑制さらにはEカドヘリンなどの上皮系マーカーの高発現が観察された。(図3-10) さらに、SiRNAによりNF1Cノックダウンを行った。NF1Cノックダウンにより、HHUA、HEC6及びhEM細胞でのAhR発現レベルは亢進した。AhR高発現は、AhR SiRNAにより消失した。HHUA、HEC6及びhEM細胞の増殖は、NF1C SiRNAにより亢進し、NF1C SiRNA+、AhR SiRNAにより抑制された。NF1C SiRNAはコントロールSic1nと比較し、これらの細胞増殖を亢進した。(図3-11 b) NF1C SiRNAは、HHUA、HEC6及びhEM細胞の浸潤能を亢進させ、NF1C SiRNA+、AhR SiRNAは浸潤能の亢進を消去した。同様にHHUA、HEC6及びhEM細胞の運動能についても、NF1C SiRNAは亢進を誘導し、NF1C SiRNA+、AhR SiRNAはその亢進を消去した。(図3-11 c-d) さらに、NF1C SiRNAはビメンチン及びSNAIL1などの間葉系マーカーの発現を導き、Eカドヘリンなどの上皮系マーカーの発現を抑制した。NF1C SiRNA+、AhR SiRNAはNF1C SiRNAによるこれらの効果を完全に消去した。(図3-11 a) 以上の結果から、子宮内膜癌でのAhR高発現、NF1C低発現は癌細胞に上皮-間葉系以降(Epithelial Mesenchymal Transition EMT)を導き、進行癌や、未分化癌への進展に関与すると示唆された。

Table 3. 血液サンプルを用いたAhR-130bp C/T SNP遺伝子頻度

Sample group (n)	T/T	non-T/T	P
Healthy women (130)	12 (9.2 %)	118 (90.8 %)	0.724
HEC (121)	15 (12.4 %)	106 (87.6 %)	0.419
Early stages (89)	7 (7.9 %)	82 (92.1 %)	*0.015
Advanced stages (32)	8 (25.0 %)	24 (75.0 %)	

HEC, human uterine endometrial cancer.





图(3)-10

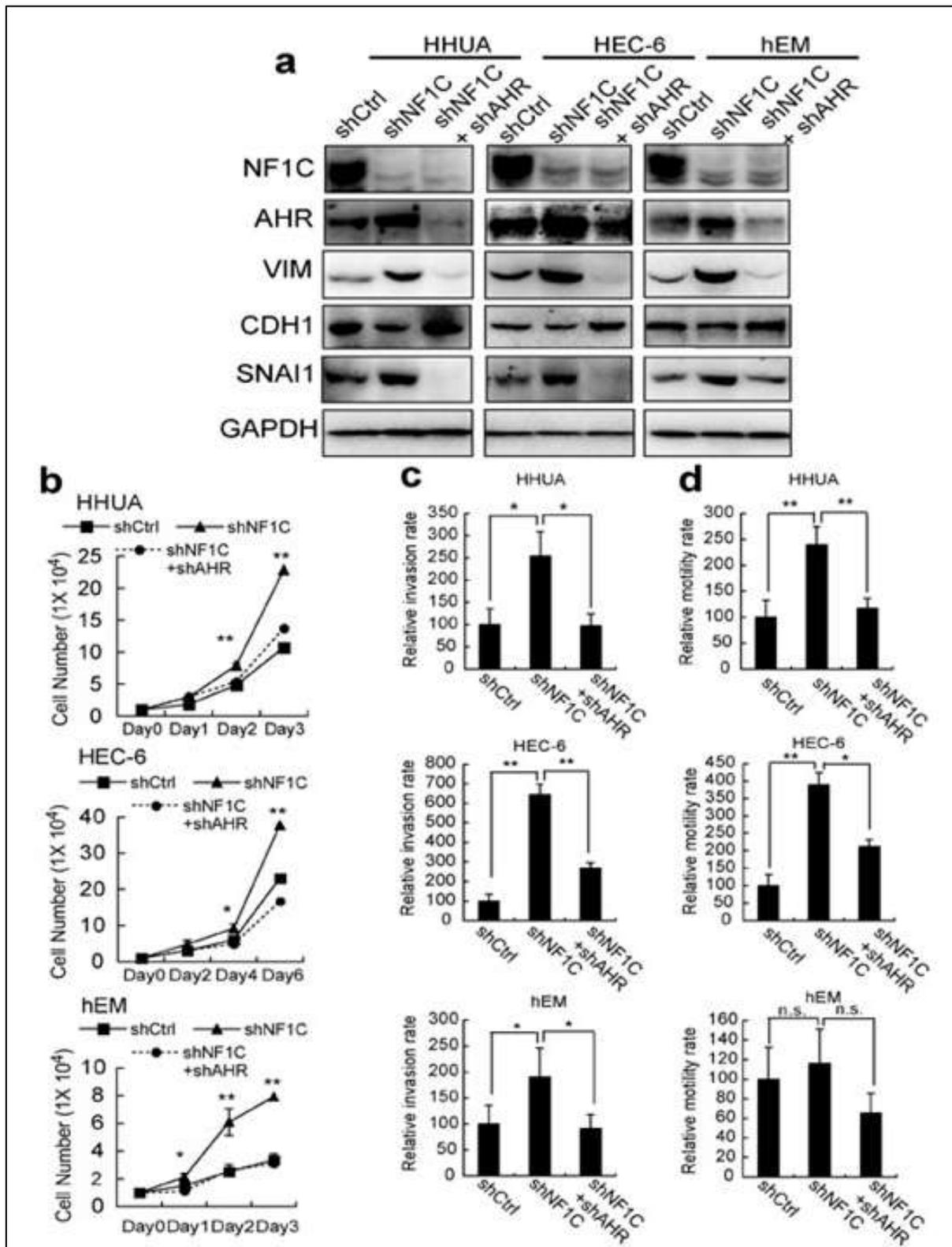


图 (3)-11

④ ダイオキシン類高濃度曝露により出現する病態に関与するAhR下流シグナルの解析

下流シグナルの同定に関与する遺伝子群を同定するため、至適TCDD濃度の決定を行った。CYP1A1発現レベルの変化を指標とした。その結果、TCDD10nMでCYP1A1発現の4亢進が観察されたため、以降の解析にはTCDD10nMを用いた（図3-12）

ヒト絨毛間質細胞の培養系を用い、TCDD非存在下におけるSNP-130 C/C及びT/T型におけるAhR mRNA及び蛋白発現レベルを解析した。T/T型ではC/C型と比較し、mRNA発現量が1.7倍、蛋白発現量が2倍高値であった。ARNT発現量は両遺伝子間で変化を認めなかったが、AhR下流に存在し解毒に関与するCYP1A1発現はC/C型に比しT/T型で有意に高値が示された。

ダイオキシン類曝露を原因とする病態形成に関与するAhR下流シグナルを同定するため、マイクロアレイ法による大容量遺伝子発現変化解析を行った。3個体のC/C型絨毛間質細胞及び3個体のT/T型細胞を混合し0.1%(V/V) DMSO処理及び10nM TCDD処理を行った。TCDD処理に伴い発現上昇した遺伝子群はC/C型で221個、T/T型で211個存在した。一方、81遺伝子(C/C型)及び233遺伝子(T/T型)は有意に発現抑制した。（図3-13）1.5倍を有意な発現変化の指標とした。TCDD存在下、C/C型及びT/T型の両方で共通に、発現変化した24遺伝子に注目した。そのうち14遺伝子発現はT/T型で、9遺伝子発現はC/C型で亢進していた。（図3-14）マイクロアレイ法よりTCDD応答性発現変化が示された遺伝子群のうち様々な病態形成に関与することが知られているIL24、EDNRB、SERPINB2、FAM43A、TIPRRP、及びNPTX1についてはReal-time RT-PCRによりマイクロアレイ法で示された発現変化の再確認を行った。TCDD処理により、これら6種類の遺伝子mRNAレベルは有意に亢進していることが示された。さらにSERPINB2はT/T型でC/C型と比較し有意に発現の低値を示したが残り5種類の遺伝子mRNAレベルはいずれもT/T型で有意に高値が示された。（図3-15）

TCDDにより、AhR依存性発現亢進、及びC/C型に比較し、T/T型で有意な発現亢進を示すIL24及びIL1 β に着目した。IL24及びIL1 β は様々な疾患の発症に関与する。このため、ダイオキシン類高濃度被曝例として油症患者に着目した。2011年油症患者一斉検診時に採血し32例のC/C型及び32例のT/T型についてIL24血中濃度及び各種ダイオキシン類濃度の測定を行った。遺伝子解析は九州大学倫理審査委員会の了承及び油症患者に対する説明と合意のもとに実施した。

T/T型32名及びC/C型32名の油症患者背景を表11に示す。油症患者の性差、ダイオキシン類曝露時の年齢、曝露から採血時までのインターバル、曝露からサイトカイン測定までのインターバル、喫煙、魚介類摂取量などについて、C/C型及びT/T型の間で統計学的有意差を認めなかった。

IL24血中濃度はT/T型で 180.9 ± 43.2 pg/m、C/C型 59.1 ± 15.8 pg/m/とT/T型で有意に高値であることが示された。しかしPCDD、PCB、PCDF及びTEQ濃度とIL24血中濃度の間には有意な正の相関は示されなかった。（図3-19）一方、IL1 β 血中濃度はT/T型で 61.5 ± 68.0 pg/m/、C/C型で 171.5 ± 188.9 pg/m/とC/C型で有意な高値が示された。（図3-17）

マイクロアレイ法の感度が低いこと及びIL1 β がIL24発現調節をしていることから、IL1 β 遺伝子発現とヒト絨毛間質細胞をTCDD処理し、Real-time PCR法にて解析した。TCDD非存在下のIL1 β 発現はC/C型に比しT/T型で有意に高値であった。さらにT/T型におけるTCDD応答性IL1 β 遺伝子発現も有意に亢進し、発現増大はT/T型とC/C型の間で有意差を認めなかった。IL1 β 遺伝子発現がC/C型で有意に高値である原因を明らかにするため、C/C型32例及びT/T型32例の油症患者血中ダイオキシン類濃度を測定した。その結果、Total PCDD濃度はC/C型とT/T型の間で有意差はなく、total PCDF及びtotal TEQはT/T型に比し、C/C型で高値であることが示された。加えて、total coplanar

PCB濃度はT/T型に比しC/C型で有意に高値であった。(図3-18)

以上の結果から、C/C型におけるIL1 β 血中濃度は、血中ダイオキシン類濃度高値を原因として示唆された。T/T型油症患者におけるIL24血中濃度が有意に高値であることから、血中ダイオキシン類が高濃度ではないダイオキシン類曝露次世代及び次々世代に発症する健康影響は、AhR-130bp C/T SNP及びAhR下流のIL24シグナルが発症に関与すると強く示唆された。

IL24には抗腫瘍効果があり、悪性腫瘍の治療への応用が試みられている。このため油症患者218名のAhR遺伝子型を決定した結果、C/C型、C/T型188名、T/T型30名であった。既往歴から悪性腫瘍発症の有無を調べた結果、12/188(C/C型及びC/T型)、0/30(T/T型)であった。統計学的有意差はないが、T/T型に悪性腫瘍の発生が低率である傾向が示された。一方、C/C型32名、T/T型32名の油症患者における炎症性疾患罹患の既往を調査した。症例数が少なく、統計学的有意差を得ることは出来なかったが、花粉症C/C型7/32例(21.9%)、T/T型13/32例(40.6%)、喘息C/C型3/32例(9.4%) T/T型5/32例(15.6%)とT/T型に多発する傾向が認められた。(図3-21)

表(3)-1. 油症患者背景

患者特性	Number (%)		<i>p</i> value ^d
	CC 型	TT 型	
患者	32	32	
性別			0.217
男性	14 (43.8%)	19 (59.4%)	
女性	18 (56.4%)	13 (40.6%)	
採血時年齢(年)			0.672
40-50	3 (9.4%)	1 (3.1%)	
50-60	2 (6.3%)	9 (28.1%)	
60-70	9 (28.1%)	4 (12.5%)	
70-80	9 (28.1%)	8 (25%)	
80-90	9 (28.1%)	10 (31.3%)	
曝露からの年数(年)			0.656
0-10	5 (15.6%)	8 (25%)	
10-20	5 (15.6%)	3 (9.4%)	
20-30	10 (31.3%)	9 (28.1%)	
30-45	12 (37.5%)	12 (37.5%)	
曝露から採血までの年数(年)	42.3 ± 0.9 ^a	42.2 ± 1.3 ^a	0.826
曝露からサイトカイ測定までの年数(年)	1.0 ± 0.7 ^a	1.3 ± 1.0 ^a	0.087
喫煙状況			0.172
喫煙	2 (6.3%)	6 (18.8%)	
喫煙なし	23 (71.9%)	21 (65.6%)	
その他 ^b	7 (21.9%)	5 (15.6%)	
魚介類の摂取			0.596
毎日	2 (6.3%)	8 (25%)	
3-4 回/週	15 (46.9%)	9 (28.1%)	
1-2回/週	11 (34.4%)	10 (31.3%)	
その他 ^c	4 (12.5%)	5 (15.6%)	

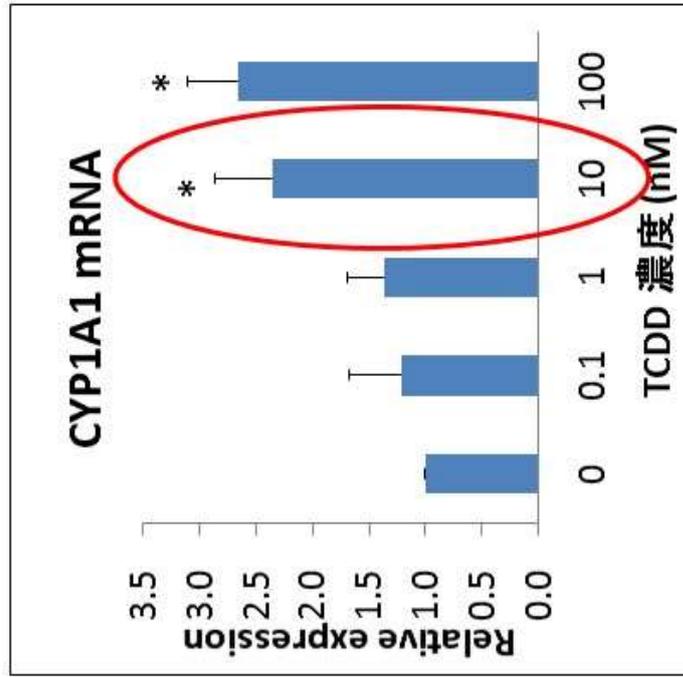
^a 平均値 ± 標準偏差

^b 喫煙を止めた患者

^c 月に1回又は2回で魚介類を摂取する患者

^d スチューデントのt検定

適正なTCDD濃度の確認

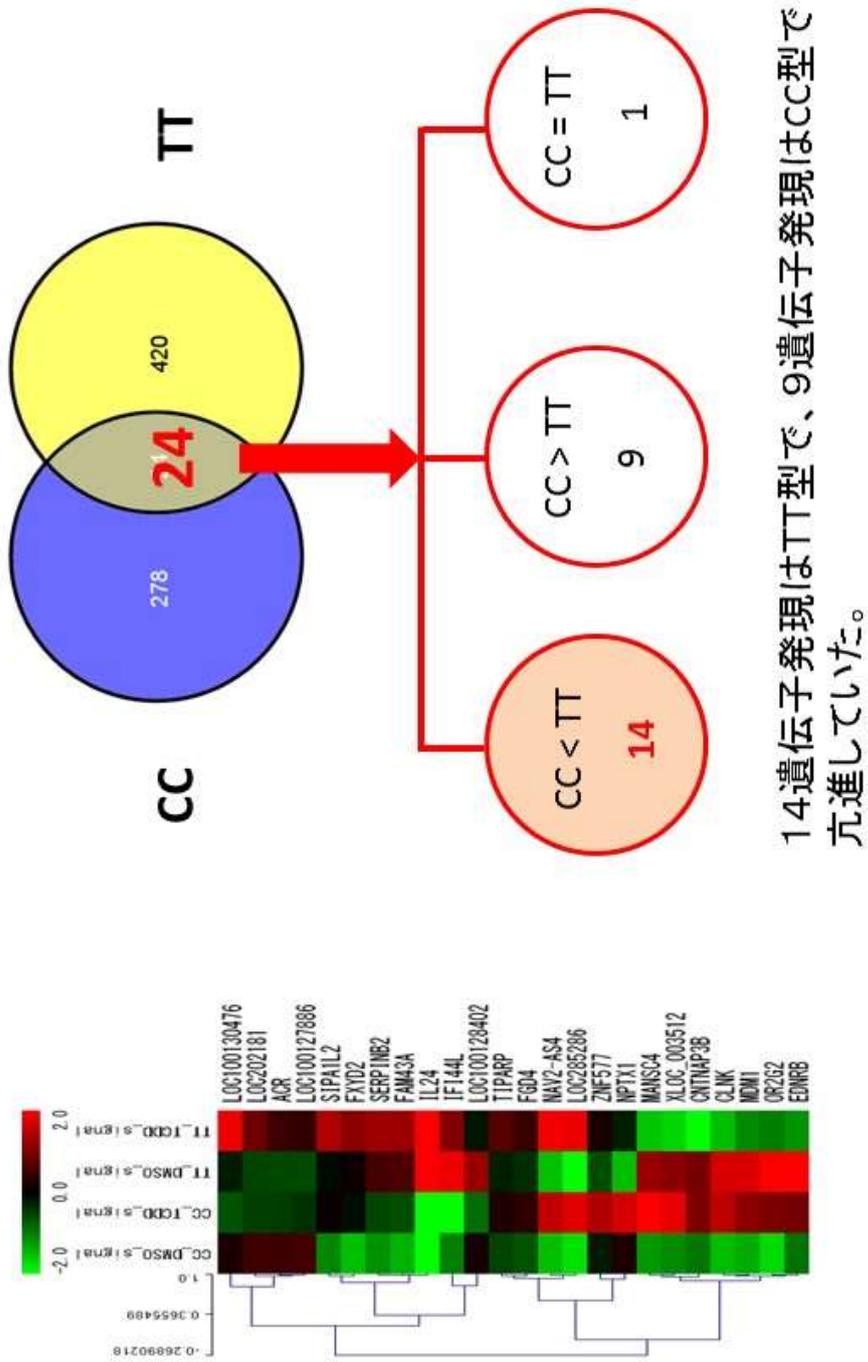


24時間

細胞内AhRの標的遺伝子であるCYP1A1 mRNA発現量解析 (Real-time RT-PCR)

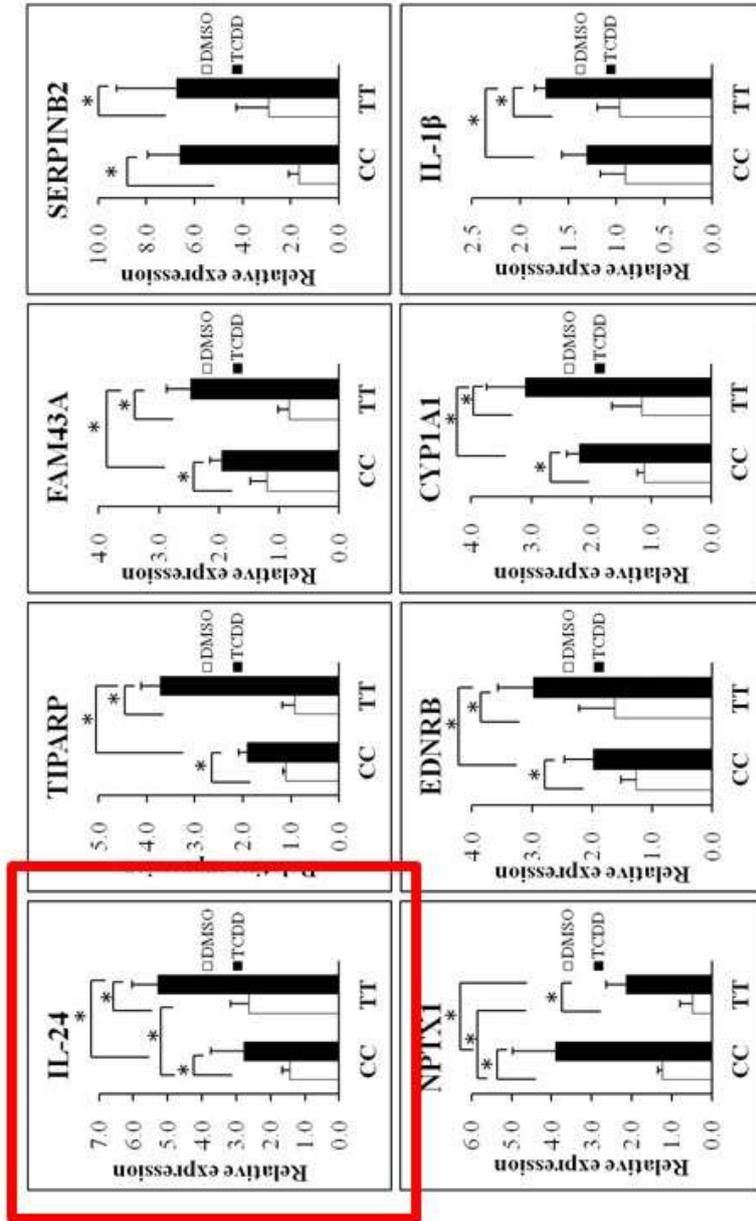
10nM以上のTCDD処理24時間後、細胞内CYP1A1 mRNA発現量が有意に上昇した。

CC及びTT両遺伝子型でともに発現変化する 遺伝子群 (TCDD存在下) の同定



図(3)-14

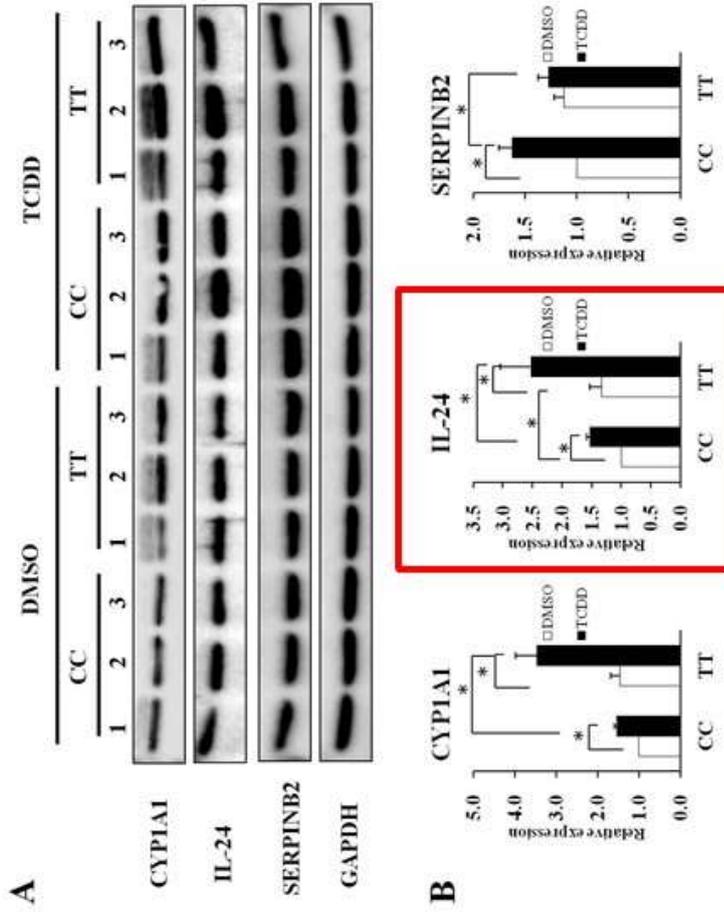
着目する遺伝子発現変動の確認(mRNAレベル)



DMSO処理後のIL-24 basal mRNAレベルはCC遺伝子型に比し、TT遺伝子型で有意に高値であった。TCDD処理により、遺伝子IL-24, TIPARP, FAM43A, SERPINB2, NPTX1, EDNRB, CYP11A1, IL-1βのmRNA発現量が有意に上昇した。NPTX1はTT型で有意に発現低下していた。IL-24, TIPARP, FAM43A, EDNRB, CYP11A1, IL-1β遺伝子はTT型で有意に発現亢進を認めた。

図(3)-15

着目する遺伝子発現変動の確認(タンパク質レベル)



TCDD 処理により、IL-24, SERPINB2, CYP1A1の蛋白発現量が有意に上昇した。SERPINB2はT T型で有意に発現低下した。IL-24, CYP1A1はT T型で有意に発現亢進を認めた。



AhR /IL-24シグナルに着目

油症患者血清中 IL-24 and IL-1 β レベル (ELISA)

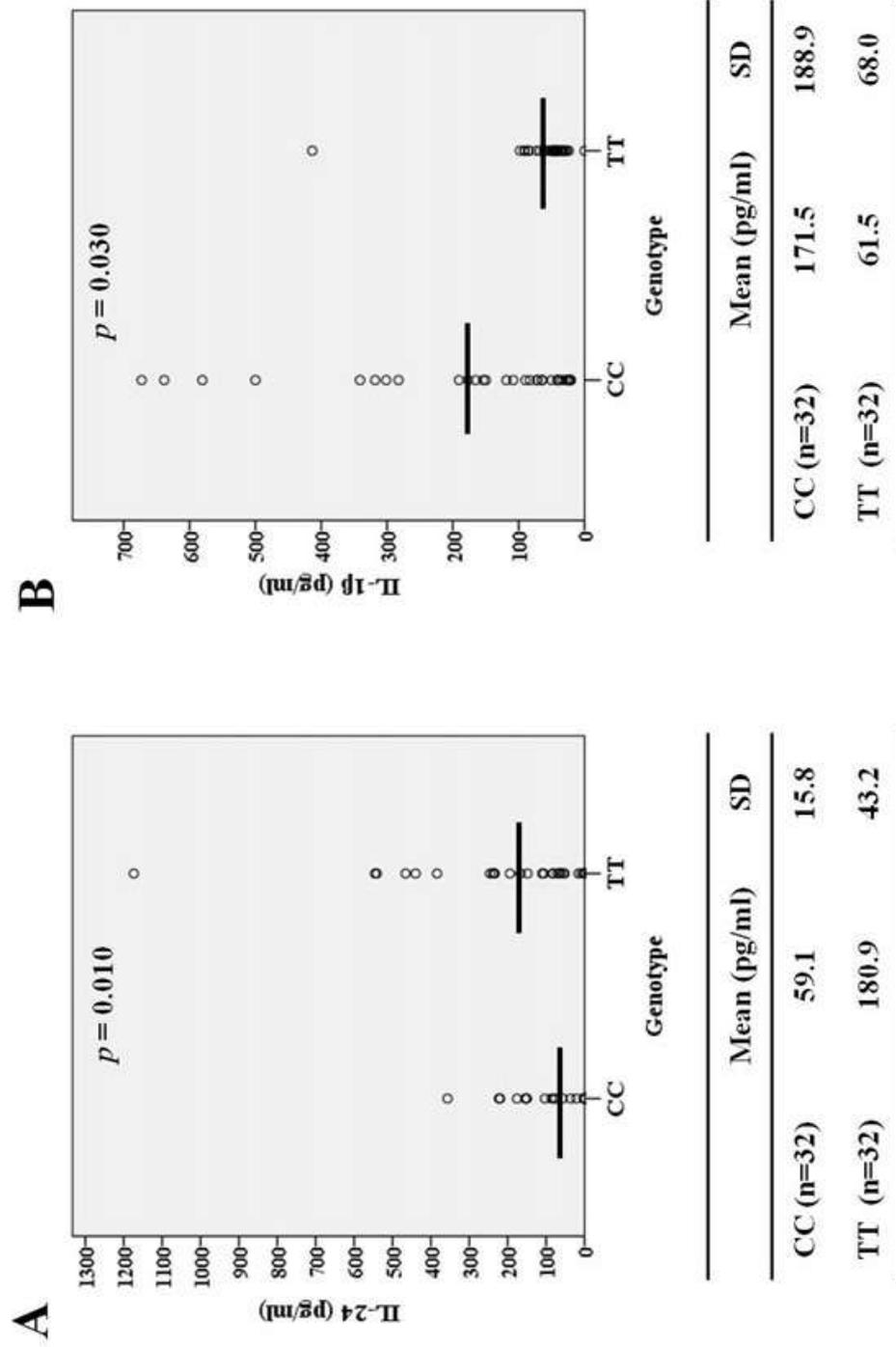
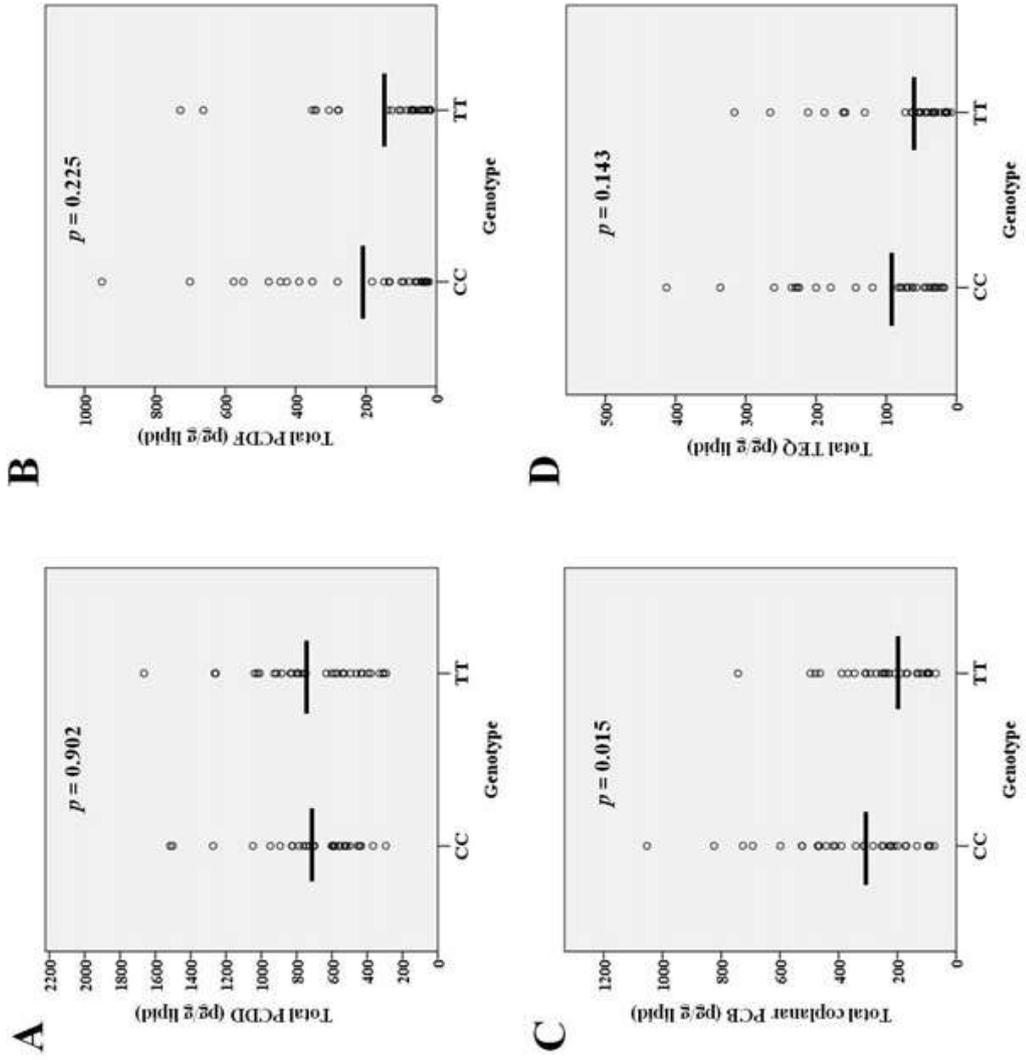
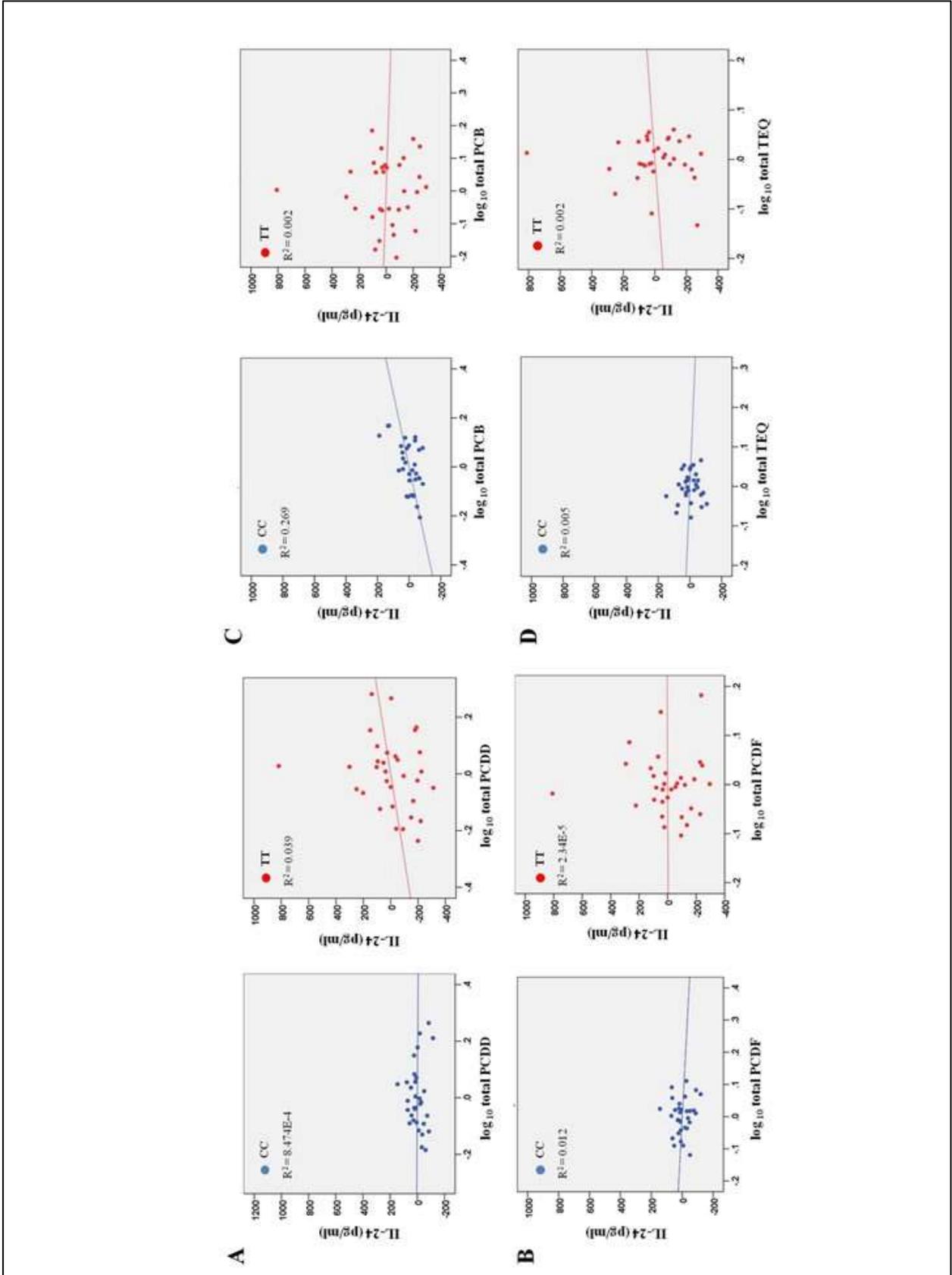


Fig.5 Total PCDD,PCDF,PCB and TEQ 濃度 in plasma of Yusho patients





☒ (3)-19

悪性腫瘍

		なし	あり	計
女	C/C	42	1	43
	C/T	39	6	45
	no template	1	0	1
男	T/T	13	0	13
	C/C	50	4	54
	C/T	45	1	46
	no template	1	0	1
	T/T	17	0	17
総計		208	12	220

図(3)-20

油症患者皮膚疾患、アレルギー疾患及び炎症の有症率

疾患	CC (n=32)		TT (n=32)		Total (n=64)		
	患者数	有症率	患者数	有症率	患者数	有症率	
皮膚の疾患	皮膚の掻痒	17	53.1%	20	62.5%	37	57.8%
	瘡癩	9	28.1%	10	31.3%	19	29.7%
	湿疹	17	53.1%	17	53.1%	34	53.1%
	色素沈着	11	34.4%	11	34.4%	22	34.4%
アレルギー疾患	花粉症	7	21.9%	13	40.6%	20	31.3%
	喘息	3	9.4%	5	15.6%	8	12.5%
	蕁麻疹	14	43.8%	13	40.6%	27	42.2%
	肺炎	3	9.4%	4	12.5%	7	10.9%
炎症	鼻炎	10	31.3%	14	43.8%	24	37.5%
	慢性気管支炎	5	15.6%	6	18.8%	11	17.2%
	中耳炎	6	18.8%	5	15.6%	11	17.2%

図(3)-21

ダイオキシン類曝露次世代、次々世代のほとんどは油症として認定されておられない。このため、油症一斉検診の受診率が低く、十分な症例数を解析することが出来なかった。このため、エコチル調査委にエントリーした新生児2740人についてAhR-130C/T SNPの遺伝子を決定した。C/C型1194例、C/T型1291例、T/T型255例で、これまで我々が解析した一般集団における遺伝子型頻度と有意な差を認めなかった。今後これらの例について、前方視的に健康調査を行い、様々な炎症性疾患の発生頻度を調べ、血中ダイオキシン類濃度の測定及びIL24及びIL1 β 血中濃度の解析を行い、AhR遺伝子型の炎症性疾患発症への関与及びIL24、IL1 β の炎症性疾患発症を予知するバイオマーカーとしての有効性について検証する予定である。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

AhR-130bpにはC/T SNPが存在する。T/T型ではC/C型と比較し1.75倍のプロモータ活性の亢進が認められる。AhR転写及び蛋白発現もそれぞれ1.75、2倍亢進する。T/T型ではNF1C転写抑制因子の結合サイトが消失するためである。

ダイオキシン類高濃度曝露に伴い出現する健康影響に関与するAhR下流シグナルを明らかにするためヒト絨毛間質細胞を用いTCDD存在下及び非存在下での遺伝子発現変化をC/C型、T/T型細胞別にマイクロアレイ法による解析を行った。マイクロアレイ法によりTCDD応答性発現変化を示したIL24、EDNRB、SERPINB2、FAM43A、TIPRRARP及びNPTX1は様々な病態形成に関与することが知られているためReal-time RT-PCRにより発現変化の再確認を行った。

ダイオキシン類高濃度被曝例として油症患者に着目した。2011年油症患者一斉検診時に採血した32例のC/C型及び32例のT/T型油症患者についてIL24血中濃度及び各種ダイオキシン類濃度の測定を行った。遺伝子解析は九州大学倫理審査委員会の了承及び油症患者に対する説明と同意のもとに実施した。IL24血中濃度はT/T型で 180.9 ± 43.2 pg/m、C/C型で 59.1 ± 15.8 pg/mとT/T型で有意に高値であることが示された。PCDD、PCB、PCDF及びTEQ濃度とIL24血中濃度には有意な正の相関は示されなかった。マイクロアレイ法の感度が低いこと及びIL1 β がIL24発現調節をしていることからIL1 β 遺伝子発現をヒト絨毛間質細胞をTCDD処理しReal-time RT-PCRにて解析した。T/T型でTCDD応答性IL1 β 遺伝子発現は有意に亢進していた。しかしC/C型油症患者での血中ダイオキシン類濃度はT/T型に比し高値であったためT/T型油症患者におけるIL1 β 血中濃度はC/C型と比較し有意な低値を認めた。以上の結果から、血中ダイオキシン類が高濃度ではないダイオキシン類曝露次世代及び次々世代に発生する健康影響はAhR-130bp C/T SNP及びAhR下流のIL1 β 及びIL24により発症が誘導されることが強く示唆された。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究によりヒトにおけるダイオキシン類への個体感受性にAhR-130bp C/T SNPが深く関与することが明らかとなった。AhR T/T型ではC/C型と比較しプロモータ活性は1.75倍、AhR mRNA、蛋白

量はそれぞれ1.75倍、2倍に発現亢進する。発現亢進したAhR蛋白は下流のIL1 β 及びIL24発現を亢進する。油症患者血清を用い、ELIZA法でIL24血中濃度を測定した結果、T/T型油症患者では180.9 \pm 43.2pg/mlとC/C型(59.1 \pm 15.8pg/ml)と約3倍の高値が示された。さらにPCDD, PCB, PCDF及びTEQ濃度とIL24血中濃度には有意な正の相関がなく、AhRによるIL1 β の活性化とは異なるシグナルによりIL24発現亢進を示すことが明らかになった。これらのことからAhR/IL24シグナルはダイオキシン類への個体感受性に深く関与しT/T型一般健常人におけるダイオキシン類摂取量に対する安全基準の設定が必要であることを示唆する。さらにダイオキシン類曝露に伴い発生する病態の早期予知にIL24血中濃度が有効なバイオマーカーとして活用できる可能性がある。個別別のダイオキシン類摂取のリスク評価や摂取量の耐用量設定は日本の将来を担うこどもの安全な環境の提供に極めて重大な意義を有し、環境政策の立案に反映されねばならないことである。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) G. Liu, K. Asanoma, T. Takao, K. Tsukimori, H. Uchi, M. Furue, K. Kato, N. Wake: Toxicology Letters, 232 (2015) 384-392
 “Aryl hydrocarbon receptor SNP -130 C/T associates with dioxins susceptibility through regulating its receptor activity and downstream effectors including interleukin 24”
- 2) D. Li, T. Takao, R. Tsunematsu, S. Morokuma, K. Fukushima, H. Kobayashi, T Saito, M. Furue, N. Wake and K. Asanoma: Oncogene, 32(2013) 4950-4959
 “Inhibition of AHR transcription by NF1C is affected by a single-nucleotide polymorphism, and is involved in suppression of human uterine endometrial cancer”

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表(学会等)

学会発表：第37回日本分子生物学会(ポスター:2P-0219)

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

特に記載すべき事項はない

**Generation specific health impairment by dioxins exposure
its association with genome diversity**

Principal Investigator: Norio WAKE

Institution: Department of Genomic Epidemiology, Reserch Center
for Environment and Developmental Medical Sciences,
Kyushu University
Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.
Tel: +81-92-642-6482 / Fax: +81-92-642-6482
E-mail: wake@med.kyushu-u.ac.jp

Cooperated by: Department of Obstetrics, Fukuoka Children's Hospital,
Fukuoka Institute of Health and Environmental

[Abstract]

Key Words: Genome diversity, Endometrial cancer, AhR -130bp C/T SNP, AhR transcription, serum IL24 concentration,

Transcriptional regulation by AhR -130 C/T SNP

AhR -130 T/T genotype expressed 1.7 folds and 2.0 folds higher mRNA and protein levels compared to that in C/C genotype, respectively. AhR -130 T/T genotype is associated with human endometrial cancer progression through eliciting the Epithelial – Mesenchymal Transition(EMT).

The microarray analysis identified IL24 gene and others of which expression were upregulated in response to TCDD. Additionally expression levels of IL24 in the absence of TCDD were significantly higher in AhR -130 T/T genotype than that in AhR -130 C/C genotype, implicating the TCDD – independent and AhR dependent transcriptional regulation of AhR.

We focused yusho patients as examples exposed to high levels of dioxins. We measured the serum levels of IL24 in 64 yusho patients including each 32 T/T genotypes and 32 C/C genotypes. The serum IL-24 level for T/T genotypes (180.9 ± 43.2 pg/ml) was significantly higher ($P=0.01$) than that for the C/C genotype (59.1 ± 15.8 pg/ml) However there was no positive correlation between serum dioxins concentration and serum IL24 levels in yusho patients with either genotype.

These findings implicate the availability of AhR -130 C/T SNP and serum IL24 concentration to biomarkers that are able to predict pathological outcomes by dioxins exposure in humans.