

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25305024

研究課題名(和文)ベトナムにおけるダイオキシンの胎児脳機能と乳幼児脳神経発達に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of dioxin exposure on fetal brain development and infant neurodevelopment after birth

研究代表者

西条 旨子(NISHIJO, Muneko)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：40198461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期ダイオキシン暴露が生後の脳神経発達への影響を明らかにすることを目的として、ベトナム・ビエンホア市の元米軍基地周辺地区に居住する母親の出生児の新生児調査と、生後3歳までの追跡調査を行った。その結果、臍帯血中のテストステロン(TS)は、女兒では総ダイオキシンTEQと有意な負の相関、男児では高暴露群の有意なTSの低下が認められた。新生児脳波との関連性については、男児でO誘導の4-7Hzのパワーと正の相関、女兒で、C誘導の2-3Hzのパワーと負の相関が認められた。母乳中TCDD濃度5.5 pg以上群では女兒の出生が多く、男児では2歳で言語発達の遅れている頻度が高く、内分泌攪乱作用が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate effects of prenatal dioxin exposure on neurodevelopment of offspring, we performed measurements of testosterone (TS) in umbilical cord blood and neonatal EEG at birth and neurodevelopmental tests at 6 months, 2 years, and 3 years of age in offsprings living in exposed areas around former American air base. In girl, TS in cord blood were inversely correlated with total Toxicity Equivalency Quantity (TEQ), and in boys, TS levels in high TCDD group (TCDD \geq 5.5 pg) were significantly lower compared with low TCDD group (TCDD < 5.5). In boys, EEG power at 4-7 Hz of electrode O was correlated with total TEQ, but in girls, EEG power at 2-3 Hz of electrode C inversely correlated with total TEQ. At 2 years of age, toddlers who showed delay of language development were significantly more frequent in high TCDD boys. In mothers with high TCDD in breast milk, female offspring was more frequent, suggesting endocrine disruption effects on gender ratio at birth in high TCDD group.

研究分野：環境保健

キーワード：ダイオキシン 母乳 臍帯血 新生児脳波 性ホルモン 脳神経発達 ベトナム

1. 研究開始当初の背景

近年、日本やアメリカなどの先進国で発達障害児（広汎性発達障害、多動注意欠陥症候群や学習障害を含む）が増加し、環境汚染物質との関連が予想されているが、ダイオキシンと発達障害の関連性についての疫学調査は極めて少ない。日本においては北海道小児コホート研究があり、母親の血中ダイオキシン濃度が高いほど、生後6ヶ月の出生児の脳神経発達スコアが低いことが報告されている。また、海外ではオランダで、ダイオキシン暴露が乳幼児期の脳神経発達に影響を及ぼすことが報告されている。オランダのコホート研究では、学齢期に達した対象者、特に男児で多動注意欠陥症候群の発症が多いことが示唆されているが、追跡数が少なく、結論を得るには至っていない。しかし、ダイオキシン環境曝露で知られているベトナムにおいては、我々の先行研究が初めての発達障害の発症を示唆したコホート研究であり、更なる研究が、ベトナム国内だけでなく、欧米の研究者からも注目されている。また、ダイオキシンに胎内暴露した出生児の発達についての動物実験では、胎児期暴露の影響が出生後の授乳による暴露に比べ大きいことが知られているが、我々の先の調査では、母乳中ダイオキシン濃度を周産期暴露指標として用い、それと生後の発達スコアとの関連性をも強いことを明らかにしてきた。

ベトナムでは、ベトナム戦争時に散布された枯葉剤によるダイオキシン汚染がよく知られているが、40年以上経過した現在でも旧米軍基地周辺の、いわゆるホットスポットと呼ばれる地域では、ダイオキシン環境汚染の存在が明らかになっている。また、基地周辺住民の母乳中ダイオキシン濃度が枯葉剤散布地域および非散布地域住民の母乳中濃度に比べて高く、現在もなお、住民へのダイオキシン暴露が続き、健康、特に次世代の健康が危惧されている。

2. 研究の目的

本研究は、ダイオキシンの胎児に対する影響、特に胎児期の微細脳障害、及び生後の脳発達過程における自閉症様症状との関連等を検討するものであり、胎児期ダイオキシン暴露の高次脳機能に及ぼす影響を明らかにすることを最終目的としている。

しかし、胎児脳機能への影響を検討する前に、母乳中ダイオキシン濃度を、胎児期暴露量の指標とする妥当性について検討する必要がある。特に、ベトナムにおけるダイオキシン暴露指標としては、妊産婦の採血が困難なため、母乳を検体として用いているものが多い。一般に、胎児への直接的暴露量を推定する指標として母体血中ダイオキシン濃度が用いられているが、ベトナムの地方病院では、出産時にダイオキシンの分析に十分な臍

帯血を採取することは困難である。これらのことから、本研究では、母乳だけでなく、採取の容易な臍帯中ダイオキシン濃度を測定し、胎児期のダイオキシン暴露量を直接評価することを第一の目的とした。

さらに、臍帯血血清中の脳由来神経栄養因子や性ホルモンを測定し、ダイオキシンが胎児の脳神経発達へ及ぼす影響のメカニズムについても解析することを第二の目的としている。

一方、最近、臨床的にも注目されている新生児脳波検査を施行し、FFT absolute power (以下、パワー)や Coherence (以下、コヒランス)といった脳波指標により、胎児期脳機能発達を評価し、これらの脳機能指標に対するダイオキシン暴露の影響を検討することを第三の目的とする。

さらに、新生児脳波所見や臍帯血中因子と乳幼児期の言語、コミュニケーションおよび情動などの高次脳機能の発達との関連性を検討することを第四の目的とする。

以上のことから、本研究はダイオキシンの毒性研究に留まらず、現在増加していると推定されている小児の発達障害と胎児期微細脳障害の関連性を明らかにすることに寄与することを目指す。

3. 研究の方法

ダイオキシン汚染地域としてベトナム共和国ビエンホア市の元米軍基地周辺10地区を、対照地域としては枯葉剤非散布地域であるハノイ市を選び、汚染地域はドンナイ県立病院で出産した母と出生児210ペア、対照地域はベトナム軍医科大学で生まれた新生児とその母親を150ペアを対象とした。調査は、臍帯血中の脳由来神経栄養因子(BDNF)と性ホルモン測定および生後2-3日における脳波検査からなる新生児調査、母乳採取を行う1ヶ月児調査、6か月児、2歳児、3歳児に脳神経発達調査を行う追跡調査から成る。また、調査当初に胎児期暴露指標として、生後1か月時の母乳中ダイオキシン濃度を用いることの妥当性を検討するために、臍帯血中採取量が30ml以上の16検体につきダイオキシンを臍帯血と母乳中のダイオキシンをペアで分析し、母乳中の濃度、特に、TCDDと総ダイオキシン毒性指数(TEQ)が、胎児期暴露をよく反映するか否かを検討した(臍帯血と母乳中ダイオキシン濃度の比較)。

4. 研究成果

(1) 臍帯血と母乳中ダイオキシン濃度の比較: TCDDについては母乳と臍帯血中濃度が同じレベルであり、相関性も高かったが、高塩素系のダイオキシン異性体やフランについては臍帯血中の濃度が有意に母乳中濃度よりも高いことを認めた。総ダイオキシ

ン TEQ についても、臍帯は母乳に比べ有意に高かったが、相関性は高く、母から児への胎児期暴露指標としては、TCDD と総ダイオキシン TEQ は、母乳中濃度が良い指標となることが考えられた。

(2) 新生児調査

性ホルモン研究：臍帯血中性ホルモンとして、エストロジオール (E2) とテストステロン (TS) を 168 検体につき測定し、母乳中 TCDD および総ダイオキシン TEQ との関連性を検討した。その結果、Es とダイオキシン暴露は有意な関連性を認めなかったが、TS は女児で総ダイオキシン TEQ と負の相関を交絡因子を重回帰分析で調整した上で認めた。また、男児では TCDD 5.5pg/g lipid 以上の高暴露群で、交絡因子を調整した上でも TS が有意に低下していた。なお、臍帯血中 BDNF を ELIZA を用いて測定したが、在胎週数との関連性が強く、BDNF とダイオキシンとの有意な相関性は見いだせなかった。

新生児脳波検査：日本人の新生児 35 名の測定を行い、F1、C1、O1 誘導の 1 から 12Hz の脳波のパワーと在胎週数や母親と児の身体計測値、アプガールスコアなどとの相関を解析した。いずれの誘導も在胎週数、子供の身長はパワーと正の有意な相関、母親の身長は O1 以外の誘導で有意の相関を示した。F1 誘導の 5-7Hz のパワーがアプガールスコアと正の相関を示していた。なお、日本人の母乳中ダイオキシンは低く、TCDD は測定感度以下が多く、総ダイオキシン TEQ も 5pg-TEQ/g-lipid 以下であった。

ベトナム汚染地域で 78 名の新生児の脳波測定を行ない、生後 1 か月時に採取した母乳中のダイオキシン測定をした。さらに 27 名の脳波について、日本人新生児の脳波と同様に解析し、在胎週数とこれらの脳波指標との関連性について検討し、いずれの誘導も在胎週数とパワーの間には有意な正の相関が認められた。ダイオキシンと脳波との関連性については、男児で 0 誘導の 4-7Hz と TCDD、TEQ-PCDD/Fs との有意な正の相関、女児で、C 誘導の 2-3Hz と負の有意な相関を認めた。

(3) 追跡調査：ベアリー発達尺度と自閉症スペクトラム障害尺度 (ASRS) を用いた 2 歳児健診を行い、発語が見られない、あるいはベアリー検査の言語発達指数が低い児は、TCDD 濃度が 5.5pg /g-lipid 以上の者に多かった。

(4) 内分泌攪乱作用：これまでにハノイ市、ビエンホア市、ハノイ市で立ち上げた出生コホートの対象児 608 名の、性別と母乳中ダイオキシン濃度との関連性について、ジスティック回帰分析を行ったところ、5.5 以上群は女児であるオッズ比が 2.3 倍と有意に高かった。しかし、総ダイオキシン TEQ 高値群 (25 pg-TEQ/g-lipid 以上) では、女児のオッズ比は高くなったが、有意ではなかった。これらのことから、胎内における

母親から胎児への TCDD 暴露が 5.5pg/g-lipid 以上 (母乳による推定) である場合、出生児は女児である可能性が高いことが示唆された。

以上より、ベトナムでは現在も、枯葉剤由来の TCDD 高暴露により、出生児の性比、言語発達の遅れが生じている可能性が示唆されたが、新生児脳波や BDNF との関連性は明らかではなく、さらなるデータ解析が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Pham TT, Nishijo M, Tran NN, Nakagawa H, Hoang VL, Tran HA, Nishijo H: Effects of perinatal dioxin exposure on development of children during the first 3 years of life. *J Pediat* 175:159-166, 2016. (査読有)

Tran NN, Pham TT, Ozawa K, Nishijo M, Nguyen AT, Tran TQ, Hoang LV, Tran AH, Phan VH, Nakai A, Nishino Y, Nishijo H. Impacts of Perinatal dioxin exposure on motor coordination and higher cognitive development in Vietnamese preschool children: A five-year follow-up. *PLoS One*. 11:e0147655, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0147655. (査読有)

Nghi TN, Nishijo M, Manh HD, Tai PT, Van Luong H, Anh TH, Thao PN, Trung NV, Waseda T, Nakagawa H, Kido T, Nishijo H: Dioxins and nonortho PCBs in breast milk of Vietnamese mothers living in the largest hot spot of dioxin contamination. *Environ Sci Technol* 49(9):5732-42, 2015. (査読有)

Pham TT, Nishijo M, Nguyen AT, Tran NN, Van Hoang L, Tran AH, Nguyen TV, Nishijo H : Perinatal dioxin exposure and the neurodevelopment of Vietnamese toddlers at 1 year of age. *Sci Total Environ* 536: 575-81, 2015. (査読有)

Nishijo M, Tai PT, Anh NT, Nghi TN, Nakagawa H, Van Luong H, Anh TH, Morikawa Y, Waseda T, Kido T, Nishijo H : Urinary amino acid alterations in 3-year-old children with neurodevelopmental effects due to perinatal dioxin exposure in Vietnam: a nested case-control study for neurobiomarker discovery. *PLoS One* 10(1): e0116778, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0116778 (査読有)

[学会発表](計 10 件)

保田ひとみ、西条 旨子、Pham Ngoc Thao、西野善一。ベトナムにおける母親のダイオキシン暴露が臍帯血中性ホルモンに与える影響。第 87 回日本衛生学会総会、シーガイ

ア・コンベンション・センター（宮崎県宮崎市） 2017年 3月 26-28日。

Pham NT, Nishijo M, Pham TT, Nishijo H, Nagasawa S, Nishino Y. A case control study of neurotoxic effects of perinatal dioxin exposure on children of 2 years of age in Vietnam. 5th Conference on Prenatal Programming and Toxicity, November 13-16 2016 北九州国際会議場（福岡県北九州市）。

Nishijo M, Pham NT, Pham TT, Tran HA, Boda H, Nagasawa S, Nishino Y, Nishijo H. Neurotoxic effects of perinatal dioxin exposure on children in Vietnam: Two birth cohort studies in hot spots of dioxin contamination from Agent Orange. 5th Conference on Prenatal Programming and Toxicity. 北九州国際会議場（福岡県北九州市） 2016年 11月 13-16日。

Nishijo M, Pham NT, Pham TT, Nishijo H, Nishino Y. Role of AHR signaling in effects on neurodevelopment in Vietnamese children perinatally exposed to Agent Orange. AHR 2016: The aryl hydrocarbon receptor as a central mediator of health and disease. Rochester, New York, USA, 2016年 8月 3-6日。

Tran NN, Nishijo M, Pham TT, Nishino Y, Hoang VL, Tran HA, Morikawa Y, Pham NT, Nishijo H. ベトナムの高濃度汚染地域住民における母乳中ダイオキシン濃度と臍帯血中ダイオキシン濃度の関連性 第86回日本衛生学会総会、旭川市文化会館（北海道旭川市） 2016年 5月 11-13日。

西条旨子、Tran Ngoc Nghi、Pham Ngoc Thao、森河裕子、西条寿夫、中川秀昭、西野善一。ベトナムにおけるダイオキシン胎内暴露の出生児の性差に与える影響。第86回日本衛生学会総会、旭川市文化会館（北海道旭川市） 2016年 5月 11-13日。

Nishijo M, Nghi TN, Thao PN, Tai PT, Tran AH, Luong HV, Nishijo H : Dioxin effects on growth and neurodevelopment of infants and children in Vietnam. International workshop on the harmful effects of Agent Orange /Dioxin on the environment and human health of Vietnam, November 24, 2015, Hanoi, Vietnam.

Nghi TN, Tai PT, Thao PN, Nishijo M : Dioxin concentration in breast milk and umbilical cord blood samples of mother - baby pairs living near Bien Hoa Airport. International workshop on the harmful effects of Agent Orange/Dioxin on the environment and human health of Vietnam. November 24, 2015, Hanoi, Vietnam.

Pham The T, Nishijo M, Do Minh T, Pham Ngoc T, Hoang Van L, Tran Hai A, Nguyen Van L, Tran Ngoc N, Tran Van K, Dang Tien T, Nguyen Tung L, Nishijo H, Nakagawa H :

Dioxin concentrations in blood and food consumption habits of a population living near Bien Hoa airbase - a "hot spot" of dioxin contamination in Vietnam. The 35th international Symposium on Halogenated Persistent Organic pollutants - Dioxin 2015, San Paulo, Brazil, August 27, 2015.

西条旨子、ファムテー タイ、トランゴックギー：ダイオキシンのこどもの成長・発達への影響のベトナムにおける解明 シンポジウム6（連携研究会・生殖次世代研究会）出生コホート研究の今後の展望 環境による子供の健康影響の解明 第85回日本衛生学会総会、和歌山県民文化会館（和歌山県和歌山市） 2015年 3月 26-28日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西条 旨子 (NISHIJO, Muneko)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：4 0 1 9 8 4 6 1

(2) 研究分担者

森河 裕子 (MORIKAWA Yuko)
金沢医科大学・看護学部・教授
研究者番号：2 0 2 1 0 1 5 6

(3) 連携研究者

西条 寿夫 (NISHIJO, Hisao)
富山大学・医学（系）研究科（大学院）・教授
研究者番号：0 0 1 8 9 2 8 4

(4) 研究協力者

海外研究者（ベトナム）
ベトナム軍医科大学
Pham Ngoc Thao
Nghiem Thi Thuy Giang
Pham The Tai
Phoung Van Luong
Tran Hai Anh
ベトナム厚生省
Tran Ngoc Nghi