

图2 内膜面积

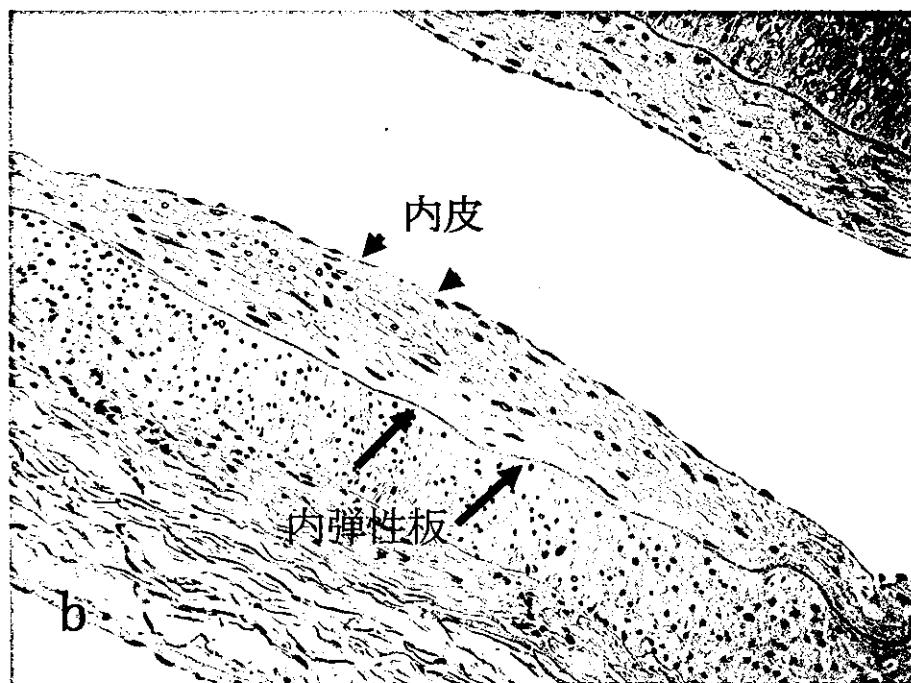
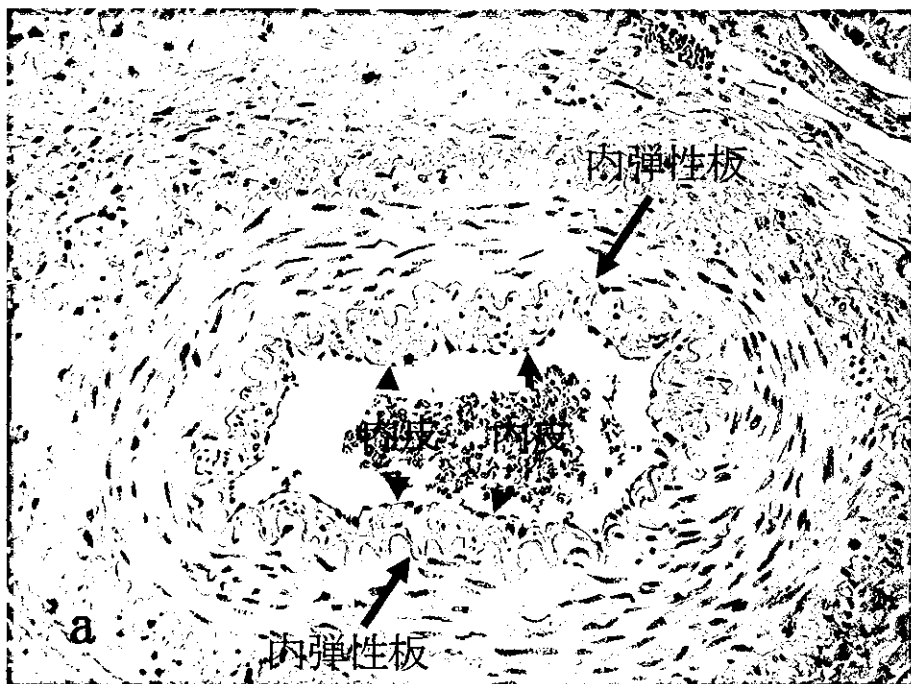


図3 弓状動脈あるいは葉間動脈の内膜肥厚例
 a: 動脈の横断面、b: 動脈の縦断面

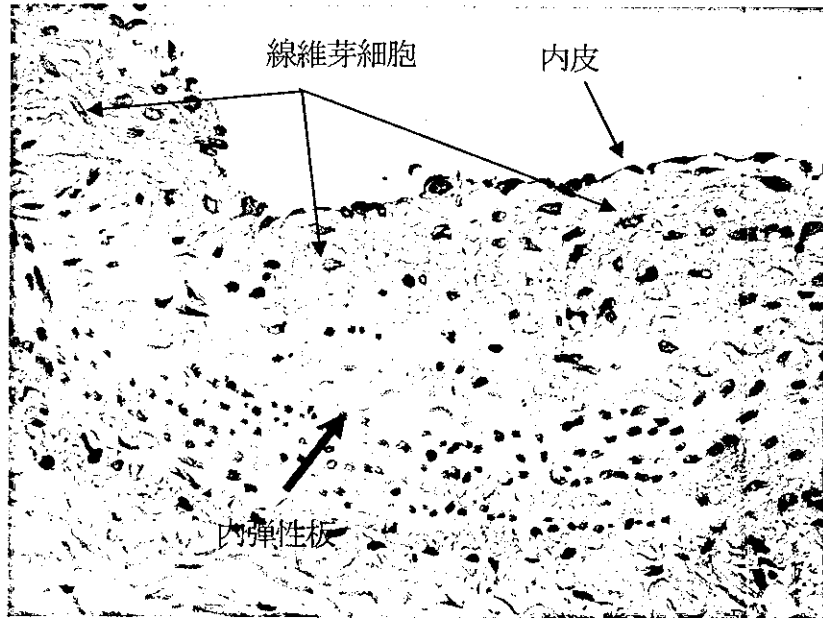


図4 弓状動脈あるいは葉間動脈内膜の強拡大

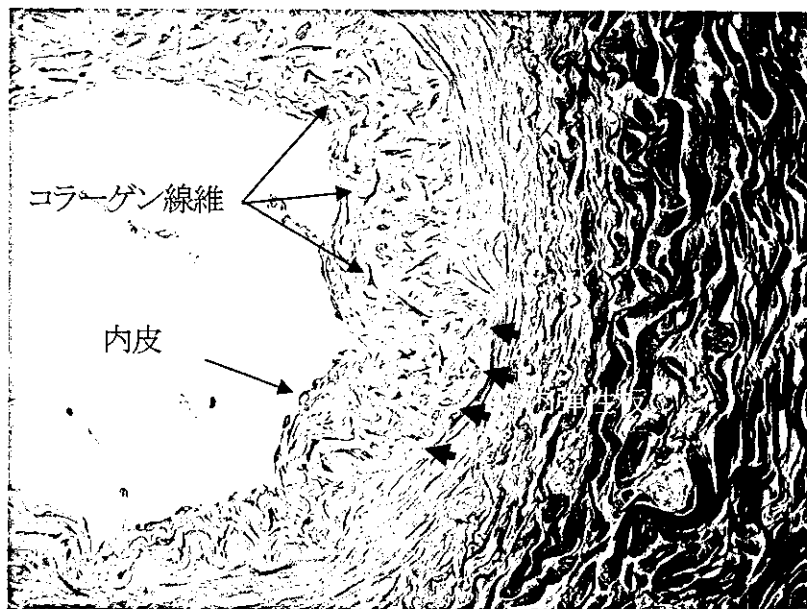


図5 弓状動脈あるいは葉間動脈壁のピクリシウス赤染色



図6 弓状静脈あるいは葉間静脈

平成 16 年度厚生労働科学研究費
化学物質リスク研究事業

研究分担者報告書

ダイオキシン曝露におけるアカゲザルの臓器にみられる遺伝子発現障害性の
長期影響の解析および胎児期サルへの曝露における四肢形成影響の検討

分担者研究者 浅岡一雄 京都大学霊長類研究所 助手

研究要旨

文明社会生活において非意図的に生じてくるダイオキシンは曝露を受けた人々の健康へ影響を及ぼすことが懸念されている。ダイオキシン曝露の影響を調べる研究は主にラットなどのげっ歯類を用いて研究が行われている。しかしげっ歯類とヒトとの種属の違いを考慮するとヒトに最も近い実験動物の研究からの外挿が望まれるためサルを用いて研究を行った。

I. ダイオキシン曝露後長期経過したアカゲザル臓器の遺伝子発現性障害性の解析

ダイオキシンを曝露した後に無曝露で3年から5年を経過したアカゲザルの臓器への影響を遺伝子発現性から解析した。

研究方法

交配で受胎を確認したアカゲザルを約 20 匹毎に 3 群に分け、妊娠 20 日に 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (以下 TCDD) を 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg を皮下投与し、後の 30 日毎に初回投与量の 5% 量を維持量として追加投与した。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続け、胎児期から乳児期まで曝露したアカゲザル母児を用意した。出産は自然分娩させ、曝露母体の授乳により児を哺育させた。分娩 90 日以降は無曝露で飼育し TCDD 曝露から約 5 年経過した母体と児の影響を研究した。一部の母体については再度交配し、TCDD 負荷を同様にした母体と児を得て、TCDD 曝露から約 3 年経過した母体と児の影響を研究した。TCDD 曝露における臓器影響は遺伝子の発現量から解析した。これまでのアカゲザル母体への曝露

の短期影響の結果について簡略に記述する。30ng-300ng/kg 体重で TCDD を単回投与したアカゲザルの投与後 49 日目の臓器において CYP1A1 遺伝子の発現変動が乳腺、皮膚、腎臓、膵臓、肝臓、および脳において検出されている。このため従前と同様の RT-PCR 法を用いて長期影響の研究を行った。TCDD を負荷した母体と児の得られた総ての試料について肝臓から mRNA を得て CYP1A1 遺伝子の発現量を解析した。

研究結果

TCDD を負荷したのちに 3 年-5 年間の長期間に無曝露で経過した母体と児の肝臓における CYP1A1 遺伝子発現量を調べた。母体への 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg 投与の 3 群の計 40 個体、児への投与 3 群の計 26 個体からなる総計 66

個体について CYP1A1 遺伝子の発現量を解析したところ、母児ともに TCDD 曝露 30 または 300 ng/kg 投与群はいずれも 0 ng/kg (溶媒) 投与群に比較して発現量の変動は検出されなかった(表1)。

考察

TCDD 曝露後長期経過したアカゲザル臓器の遺伝子発現性障害性はみいだされなかった。これまでのアカゲザルで得られたデータから TCDD 曝露後 49 日目の短期間の影響は遺伝子発現性が 30 および 300 ng/kg 投与群の母体臓器においては生じていた。TCDD 曝露後に無曝露で 3 年以上の長期間を経過した母体および児の臓器では遺伝子発現性はコントロールレベルに回復したものと言える。短期間の曝露下の胎児あるいは

は乳児への遺伝子発現性への影響は予算の関係で計画されなかったが、アイソトープ付加 TCDD を 30ng および 300ng/kg 体重で妊娠マカクサルに単回投与した投与後 7 日目の研究においては両曝露量ともに TCDD が胎児に移行していたこと(久保田ら、厚生労働科学研究費報告)、300ng/kg 群において出産児および死産児の歯の形成異常(安田ら、厚生労働科学研究費報告)、肝臓の形成異常(福里ら、厚生労働科学研究費報告)や腎臓の形成異常(福里ら、厚生労働科学研究費報告)が生じていたこと、などから胎児あるいは乳児への投与後の短期間においても TCDD は遺伝子発現性に影響を与え、臓器形成に異常性を与えるものと推定される。

II. ダイオキシン曝露における胎児期サルの四肢形成影響の検討

日本においてはアカゲザルと同じマカク属に属するニホンザルが自然生息している。ニホンザルからは四肢奇形をもつ児が生まれる自然現象があり現在もみられている。この原因として四肢奇形の遺伝性は否定されていることから、環境由来の汚染物質(ダイオキシンなど)の胎生期曝露による影響が懸念される。このため TCDD 曝露におけるアカゲザルにおける四肢形成の異常について検討するとともに自然群で産まれた四肢奇形サルの血液からダイオキシン類を分析し汚染物質と四肢奇形性の関連を検討した。

研究方法

TCDD 曝露のアカゲザルの用意は上記と同じである。すなわち、妊娠アカゲザルを約 20 匹毎に 3 群に分け、妊娠 20 日から TCDD を 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg を皮下投与した。児の四肢形態については生後に肉眼により観察した。また、サルのダイオキシン類汚染量の疫学調査を京都府嵐山野生群の四肢奇形を含むサルの捕獲調査および愛知県犬山の飼育群の 2 地点について行った。調査地点において 2003 年に各 4 頭のサルから血液を得て分析を行った。血液試料か

らのダイオキシン汚染量については厚生省ダイオキシン測定暫定マニュアル 2000 年版によって分析した。

研究結果

TCDD を胎児期—離乳期に 30 または 300 ng/kg を曝露した約 40 頭とコントロール約 20 頭から分娩された児において四肢奇形を持つ個体は見られなかった。血液疫学調査を行った 2 地点の調査した 8 頭のサル総てからダイオキシンの異性体が検出された。TCDD は 2 頭の血液中から検出された。ポリ塩化ジベンゾフラ

ンとコプラナポリ塩化ビフェニルは高く占め、ポリ塩化ジベンゾパラジオキシンは低含量であった(表 2)。異性体から算出した TEQ を用いて四肢奇形個体と正常四肢個体を比較した(表 3)。誕生年毎の TEG 変化をプロットすると奇形個体の TEQ は正常個体の TEG 変化の範囲内であり差異はみられなかった(図 1)。野生群および飼育群の間の TEQ についても差異は見られなかった。

考察

TCDD が検出された2頭においては四肢奇形性との関連はみられなかった。TEQ において野生群および飼育群の間および四肢奇形と正常四肢の個体間の差異はいずれも見られなかった。また、胎児期—離乳期に TCDD 曝露を受けた児において四肢奇形個体が見られていない。ヒトにおいて四肢奇形性は胎児期 12 ステージで生じることが知られている。アカゲザルやニホンザルなどのマカク属サルには四肢奇形が生じ、この感受期は妊娠 24 日以後と報告されている。我々の実験計画は曝露を妊娠 20 日目から始めていることから TCDD の四肢形成影響を検討することに合理性がある。以上を合わせて考慮すると、ダイオキシン類から換算された TCDD または曝露された TCDD は少なくとも単独では四肢奇形形成に関連しないと推定された。

結論

これまでの研究において、TCDD の遺伝子発現性に及ぼす曝露影響は投与後 49 日目の短期間曝露の母体臓器において生じているものの、曝露後に 3 年以上の長期間を経過した母体および児の臓器では遺伝子発現性はコントロールレベルに回復することが明らかとなった。また、TCDD は少なくとも単独では四肢奇形に関連しないと推定された。

TCDD 曝露影響を広く考察すると、歯、肝臓、腎臓などの器官臓器形成に TCDD は影響を与えていたことから、TCDD は曝露された妊娠 6 月間および乳児期 3 月間のあと 3 年から 5 年間に無曝露で経過しても一度生じた器官臓器の障害は回復しないことを示している。TCDD においては曝露から短期間における遺伝子発現量の変化が後に続く器官臓器の形成に異常性を与えていると言える。従って、今回計画になかった TCDD 曝露から短期間の試料について遺伝子発現性を研究すると形態異常までは生じない器官臓器への障害性が解析できるため更に研究する必要が残されている。これまで予備的データが得られた TCDD の低曝露群 30 ng/kg においても胎児への移行がみられること、低曝露群 30 ng/kg においても母体の乳腺に多くの遺伝子に発現の変動が見られたこと、TCDD 曝露によりサルに発現の変動がみられた遺伝子群についてヒト乳部癌 mRNA の一部に共通した陽性ハイブリダイズが認められること、などの厚生労働科学研究費報告に予報した結果についても今後注意を払うことが望まれる。

本研究班においてサルを用いて研究された生体障害性からヒトへの障害性を外挿することについては 94-96%の類似度で生じる可能性が高いと推定された。すなわち、生物の生体機能は生体分子の構造で担われていることを考慮すると生体において発現している分子の構造を比較すると生物間の類似度を推定できる。実際にマカクザルのメッセンジャーから cDNA にして調べた塩基配列はヒトの配列と比較した場合 94-96%の類似度であった。これはヒトへの TCDD 影響を外挿するためにサルを用いた本班の研究課題の重要性を示している。

研究発表

I. 論文発表

Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Miyaji, K., Goda, H., Ihara, T., Yasuda, M., Kubota, S. Contamination of dioxins in free ranging and breeding monkeys in Japan and relationship analysis between limb malformations and administration with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on macaque monkeys. (submitted to Chemosphere)

Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M., Korenaga, T., Fukusato, T., Asaoka, K., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., Kubota, S. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on signal transduction pathway-related protein expression in liver and cerebrum of rhesus monkey. Organohalogen Compounds 66: 3299-3304, 2004

Tatsumi, K., Kubota, S., Ohta, M., Asaoka, K., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., Fukusato, T. Liver injury in Rhesus monkeys subcutaneously injected with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Organohalogen Compounds 66: 3315-3320, 2004

Yasuda, I., Yasuda, M., Sumida, H., Arima, A., Ihara, T., Kubota, S., Asaoka, K., Takasuga, T., Tsuga, K., Akagawa, Y. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects tooth development in rhesus monkeys. Organohalogen Compounds 66: 3321-3326, 2004

Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Goda, H., Ihara, T., Nagata, R., Yasuda, M., Kubota, S. No Effects of dioxin singly

on limb malformations in macaque monkeys through epidemiological and treated studies. Organohalogen Compounds 66: 3421-3426, 2004

II. 学会発表

[国際学会]

Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Goda, H., Ihara, T., Nagata, R., Yasuda, M., Kubota, S. No Effects of dioxin singly on limb malformations in macaque monkeys through epidemiological and treated studies. Dioxin 2003 Conference. The 24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (PoPs) (September 6-10, 2004. Berlin, Germany)

[国内学会]

浅岡一雄, 飯田景子, 釜中慶朗, 渡辺邦夫, 鈴木樹理, 脇田真清, 森千里, 久保田俊一郎 サルの胎児に発現する遺伝子群の網羅的解析. 日本薬学会第125年会 (2005年3月29日-31日、東京都)

Fukusato, T., Korenaga, T., Ohta, M., Asaoka, K., Sumida, H., Yasuda, M., Arima, A., Murata, N., Kubota, S., Prenatal and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces renal injury in rhesus monkeys.

第7回日本内分泌攪乱化学物質学会大会 (2004年12月14日-15日, 名古屋市) 講演要旨集 p114.

Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Miyaji, K., Goda, H., Ihara, T., Yasuda, M., Kubota, S. Contamination of dioxin in monkey in Japan and the investigation

of dioxin effect on limb malformations of monkeys. 第7回日本内分泌攪乱化学物質学会大会(2004年12月14日-15日, 名古屋市)講演要旨集 p238.

Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M., Korenaga, T., Fukusato, T., Asaoka, K., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., Yasuda, M., Kubota, S. Long term effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on signal transduction pathway-related protein expression in liver and cerebrum of TCDD-treated rhesus monkeys during pregnancy.

第7回日本内分泌攪乱化学物質学会大会(2004年12月14日-15日, 名古屋市)講演要旨集 p316

Korenaga, T., Kubota, S., Ohta, M., Asaoka, K., Toida, S., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., Arima, A., Fukusato, T. Hepatic injury in rhesus monkeys injected with low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during gestation and lactation.

第7回日本内分泌攪乱化学物質学会大会(2004年12月14日-15日, 名古屋市)講演要旨集 p350

浅岡一雄、飯田景子、森千里、久保田俊一郎 マカクサルの胎生初期に発現している遺伝子群の網羅的解析.

第27回日本分子生物学会年会(2004年12月8日-11日, 神戸市)

Asaoka, K., Iida, H., Kamanaka, Y., Suzuki, J., Wakita, M., Watanabe, K., Mori, C., Inouye, M., Kubota, S. Phylogenetic characteristics of genes expressed in macaque monkeys and the Application for ecotoxicogenomics of dioxin disorder. 第77回日本生化学会

大会(2004年10月13日-16日, 横浜市)

浅岡一雄、飯田景子、釜中慶朗、鈴木樹理、西村剛、脇田真清、渡辺邦夫 ニホンザルの胎生初期に高頻度で発現している遺伝子群の網羅的解析.

第20回日本霊長類学会年会(2004年7月2日-4日, 犬山市)講演要旨集 p43

知的所有権の取得状況
なし

表1 TCDD 曝露のアカゲザル母体と児の長期経過後の影響

TCDD を負荷したのちに 3 年-5 年間の長期間経過した母体と児の肝臓における CYP1A1 遺伝子発現量を調べた。

Monkeys	Years after TCDD exposure	Heads analysed	Increasing of CYP1A1 expression
F0 Control	ca. 5	13	NI
F0 30ng/kg	ca. 5	9	NI
F0 300ng/kg	ca. 5	18	NI
F1 Control	ca. 3-5	12	NI
F1 30ng/kg	ca. 3-5	5	NI
F1 300ng/kg	ca. 3-5	9	NI

F0: 母体; F1:児; NI: No increasing of CYP1A1 expression.

2 ニホンサルのダイオキシン類異性体汚染量の疫学調査

疫学調査を京都府嵐山野生群の四肢奇形を含むサルの捕獲調査および愛知県犬山の飼育群の2地点について 2003 年に行
た。調査したサルの性別、誕生年、四肢形状、体重、血液中のダイオキシン類量を pg/g 脂肪として表記した。血液試料から
ダイオキシン汚染量については厚生省ダイオキシン測定暫定マニュアル 2000 年版によって分析した。

Monkey	Place	Arashiyama				Inuyama				AVERAGE	STDEV	TEF
	living	free ranging				breeding						
	ID	1	2	3	4	5	6	7	8			
	Sex	male	female	male	female	female	male	male	female			
	Birth year	1988	1989	1989	1992	1989	1989	1999	1999			
	Limb	normal	abnormal	abnormal	normal	normal	normal	normal	normal			
	Body weight (Kg)	8.3	7.5	10	5.5	8	10.2	4.5	5.4			
	polychlorodibenzo-p-dioxin	2,3,7,8-TeCDD	3.6	ND	ND	ND	ND	ND	1.6			
1,2,3,7,8-PeCDD		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	×1
1,2,3,4,7,8-HxCDD		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	×0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD		2.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.5	ND	×0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	×0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD		ND	3	1.3	5.2	11	3.5	7.5	ND	5.3	3.5	×0.01
OCDD		26	79	21	24	49	31	43	58	41.4	20	×0.0001
Total PCDDs		32	82	22	29	61	35	52	58	46.4	20.3	
polychlorinated dibenzofuran	2,3,7,8-TeCDF	5.7	11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.4	3.7	×0.1
	1,2,3,7,8-PeCDF	ND	9.3	ND	ND	ND	ND	3.6	2.1	5	3.8	×0.05
	2,3,4,7,8-PeCDF	27	16	ND	ND	11	9.7	4.7	3.4	12	8.7	×0.5
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	11	8.9	ND	8.2	8	6	7.1	ND	8.2	1.7	×0.1
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	10	8.8	ND	6.4	9.2	5.1	6	ND	7.6	2	×0.1
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	12	9.6	4.1	ND	ND	7.6	ND	ND	8.3	3.3	×0.1
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	×0.1
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	ND	ND	ND	3.7	12	ND	3.5	ND	6.4	4.9	×0.01
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	ND	ND	7.1	ND	5	ND	6.1	1.5	×0.01
	OCDF	ND	ND	ND	ND	10	ND	3.2	ND	6.6	4.8	×0.0001
Total PCDFs	67	63	4.1	18	57	28	33	5.6	34.5	25.2		
coplanar polychlorobiphenyl	3,3',4,4'-TeCB #77	100	67	98	39	38	2100	2600	67	638.6	1064.9	×0.0001
	3,4,4',5'-TeCB #81	17	9.3	11	4.9	ND	280	270	ND	98.7	136.7	×0.0001
	3,3',4,4',5'-PeCB #120	110	42	43	19	7	110	130	21	60.3	48.6	×0.1
	3,3',4,4',5,5'-HxCB #16	30	8.4	17	3.4	ND	15	37	6.5	16.8	12.5	×0.01
	2,3,3',4,4'-PeCB #105	930	420	940	150	200	8100	6600	680	2252.5	3185.5	×0.0001
	2,3,4,4',5'-PeCB #114	110	40	110	20	23	850	730	75	244.8	339.9	×0.0005
	2,3',4,4',5'-PeCB #118	2500	860	2900	400	580	17000	16000	2400	5330	6963	×0.0001
	2',3,4,4',5'-PeCB #123	71	32	67	10	14	600	500	50	168	238.3	×0.0001
	2,3,3',4,4',5'-HxCB #15	480	140	340	85	46	870	1200	190	418.9	414.8	×0.0005
	2,3,3',4,4',5'-HxCB #15	150	46	100	24	16	240	260	61	112.1	95.5	×0.0005
	2,3',4,4',5,5'-HxCB #16	260	68	180	45	29	480	670	140	234	229.4	×0.00001
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB #1	140	30	82	25	8.7	110	230	ND	89.4	78.5	×0.0001
	Total Coplanar PCBs	4900	1800	4900	830	970	31000	29000	3700	9637.5	12680.3	

TEF used the WHO-TEF (WHO,1998). Isomers that were detected at levels below the lower limit of determination were assigned ND and concentrations below the lower limit of determination were converted to TEQ values equivalent to zero values.

表3 ニホンサルの TEQ 換算ダイオキシン類汚染量

調査したサルについては表1を参照。調査は 2003 年に行った。血液中の TEQ 換算ダイオキシン類量を TEQ 換算 pg/g 脂肪として表記した。

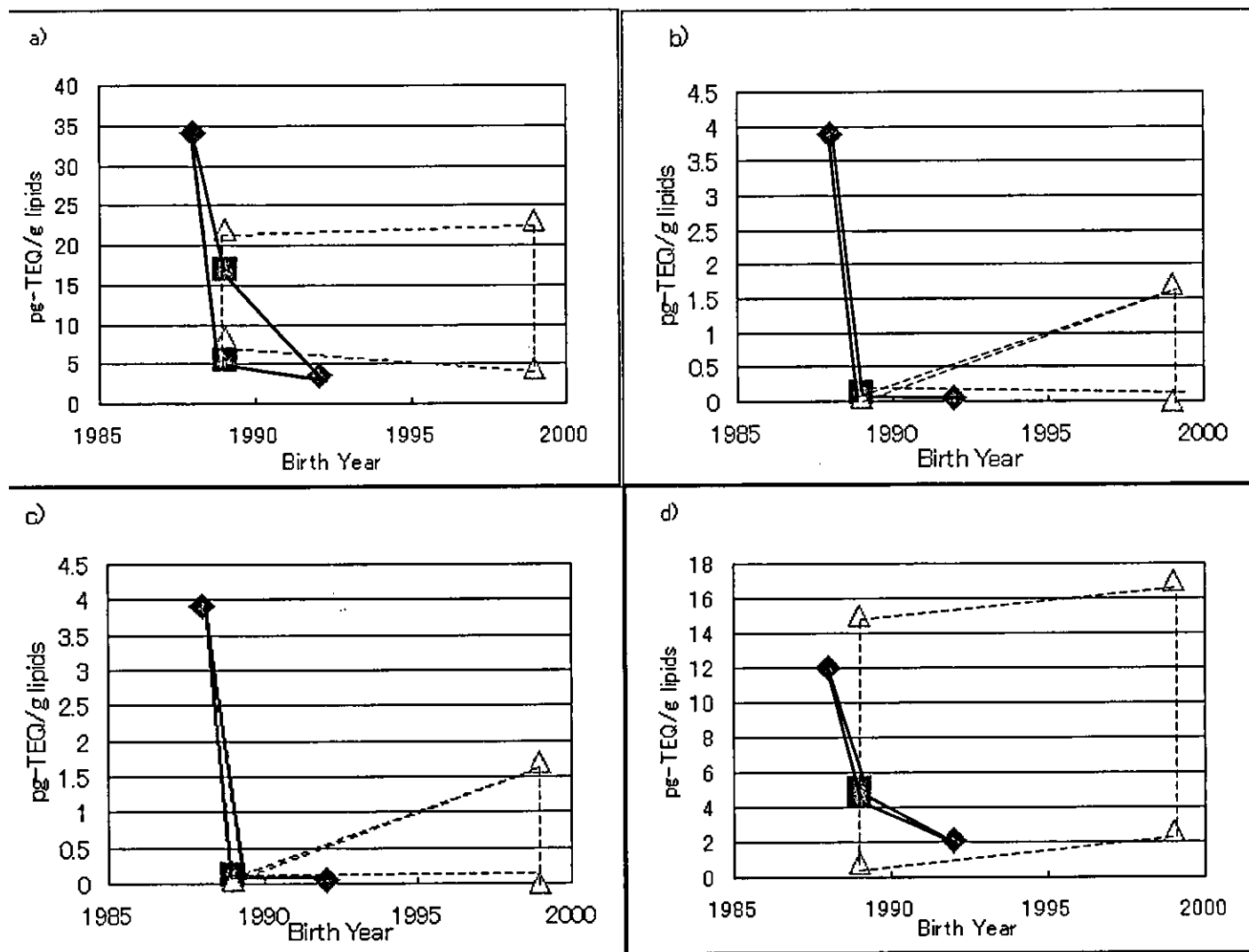
Place living	Arashiyama				Inuyama				AVERAGE	STDEV
	free ranging				breeding					
ID	1	2	3	4	5	6	7	8		
TEQ of total PCDDs	3.9	0.038	0.015	0.055	0.12	0.039	1.7	0.0058	0.7	1.4
TEQ of total PCDFs	18	12	0.41	1.5	7.4	6.7	4	1.8	6.5	6
TEQ of total Coplanar PCBs	12	4.6	5.1	2.1	0.83	15	17	2.6	7.4	6.3
TEQ of total PCDDs+ PCDFs+Coplanar PCBs	34	17	5.5	3.6	8.3	22	23	4.4	14.7	11.1

TEF used the WHO-TEF (WHO,1998). Isomers that were detected at levels below the lower limit of determination were assigned ND and concentrations below the lower limit of determination were converted to TEQ values equivalent to zero values.

図1 ニホンサル血液中の TEQ 換算ダイオキシン量における誕生年間の変化。

調査したサルについては表1を参照。血液中の TEQ 換算ダイオキシン類量を TEQ 換算 pg/g 脂肪として表記した。

(a) TEQ of total PCDDs+PCDFs+Coplanar PCBs, (b) TEQ of total PCDDs, (c) TEQ of total PCDDs, (d) TEQ of total Coplanar CBs. Square: wild monkeys with abnormal limbs on 1989; diamond: wild monkeys with normal limbs, open triangle: breeding onkeys with normal limbs; solid line: TEQ's area detected in the wild monkeys; and dashed line: TEQ's area detected in the reeding monkeys.



平成 16 年度厚生労働科学研究費
分担研究報告書

ダイオキシン暴露による免疫系への影響に関する研究

分担研究者 徳田 信子 山口大学医学部 助手

研究要旨

ダイオキシン類は暴露された生体の免疫系臓器・細胞に影響を与えることが知られている。本研究では、妊娠・授乳中にダイオキシン(TCDD)投与を受けたアカゲザル(F0)およびその児(F1)の採血を行い、白血球数とその分画の数を調べた。また、リンパ球については T 細胞(CD3、4、8)・B 細胞(CD20)の割合をフローサイトメーターで解析した。また F0 および F1 の一部の胸腺について組織像を検討した。その結果、TCDD 投与群の F0 では Tリンパ球数・CD4/CD8 比に長期に渡って影響が見られた。また、F1 への胎生期・授乳期暴露の影響(胎盤・授乳を介した影響)について、TCDD 投与群では、雌で CD4/CD8 比の減少、雄で Tリンパ球の割合が減少する傾向が見られた。また、TCDD 投与群の F0・F1 ともに、胸腺に異常所見を示すものがあつた。TCDD はリンパ球系、特に、胸腺を中心とする Tリンパ球系に長期に影響を及ぼし、経胎盤および授乳によって児にも影響を与える可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシン類の投与はリンパ球数の減少や胸腺を萎縮させるなど、免疫系に影響を与えることが知られている。本研究では、妊娠アカゲザル(F0)に TCDD を皮下投与したときのダイオキシンの長期的影響、雌雄出生児(F1)への経胎盤・授乳を介した影響について調べる。この研究により、妥当性のある TDI 設定について、免疫系の観点から見た有用な情報を提供し、厚生労働行政に貢献することが研究目的である。

B. 研究方法

1. 血液採取

アカゲザルを交配し、約 60 匹を 3 群に分け、妊娠 20 日に TCDD 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg を皮下投与し、その後 30 日毎に初回投与量の 5% 量を維持量として投与した。妊娠動物は自然分娩させ、児を哺育・授乳させた。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。初産児(F1a)の離乳後、期間をおいて母体を再度交配・妊娠させ、同様に TCDD を投与して第二産児(F1b)を得た。F0 については、最終投与から約 1300 日後(初産児のみ出産した F0)もしくは最終投与の約 600 日後(第二児も出産した F0)に末梢血を採取した。F1a については出生後約 1450 日、F1b については出生後約 870 日に末梢血を採取した。第二産児を得

た F0 および F1a については、時間を置いて再び採血し、同様の解析を行った。F0 および一部 F1 は屠殺し、胸腺を採取した。

(倫理面への配慮)

アカゲザルは愛護的に取り扱い、実験者に TCDD の影響が及ばないように配慮した。

組織採取に当たってはサルを麻酔下に放血安楽死させた。実験廃棄物は 800°C 以上で償却処分した。

2. 血液の解析

白血球数およびそれぞれの分画数を ADVIA120 (Bayer, PA, USA) で測定した。また、リンパ球については蛍光標識した表面抗原に対する抗体 (CD3-FITC, CD4-PE, CD8-APC, CD20-PE, いずれも BD Biosciences Pharminge, CA, USA) と反応させ、flow cytometer (FACS Calibur, BD Biosciences, CA, USA) を用いて各サブセットの割合を解析した。

3. 統計処理

データは F 検定を行い、等分散であるときは Student の t-test、等分散とみなされないときは Welch test を行った。

4. 組織像の検討

採取した胸腺をカルノア固定し、パラフィンに包埋し、切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、光学顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1. F0 血液の解析

初産のみの F0 では TCDD 最終投与から約 1300 日 (約 3 年半) 経過しているにもかかわらず、CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (CD4⁺T 細胞) の割合が減少、CD3⁺CD4⁻CD8⁺ (CD8⁺T 細胞) の割合が増加する傾向が見られ、CD4/CD8 比は有意に減少していた (表 2)。リンパ球数・顆粒球数には差が見られなかった (表 1)。また、他の白血球系の細胞数にも差は見られなかった。

第二児も出産した F0 では、30 ng, 300 ng 投与群ともにリンパ球数が有意に減少していた (表 1)。また、TCDD 投与群で CD3⁺リンパ球 (T 細胞) 数が有意に減少していた (図 1)。他の白血球系の細胞数には差が見られなかった。第二児を出産した F0 については、8ヶ月後に再度採血し、同じ解析を行ったが、上記とほぼ同じ傾向が見られた。

2. F1 血液の解析

F1a では、300 ng 投与群で顆粒球数が有意に減少していた (表 3)。表面抗原については、30 ng 投与群において、CD4⁺T 細胞の割合が減少、CD8⁺T 細胞の割合が増加し、CD4/CD8 比が減少する傾向があった (表 4)。雄では、TCDD 投与群で顆粒球数が有意に増加していた (表 3)。サブセットについては、300 ng 投与群において、T 細胞の割合が有意に減少し、CD20⁺細胞 (B 細胞) の割合が有意に増加していた (表 4)。他の白血球系の細胞数には差は見られなかった。6ヶ月後に再度採血し、同じ解析を行ったところ、上記とほぼ同じ傾向が見られた。

尚、図 2 では投与群で T 細胞が減少する傾向が見られるが、6 ヶ月後の解析ではこの傾向は見られなかった。

F1b 雌では投与群が対照群に比較して T 細胞の割合が増加する傾向が見られた(表 4)が、対照群の値が F0 や F1a の対照群の値と比較して少なかった。30 ng 投与群では CD8⁺T 細胞の割合が有意に減少していた(表 4)。白血球系の細胞数には差は見られなかった。F1b の雄は n 数が 3 以下のため、検定できなかった。

3. 胸腺組織像の解析

F0 および一部の F1 の胸腺組織像について検討したところ、TCDD 投与群において、異常所見が観察される例があった(図 3)。これらの例では、腺様構造・リンパ濾胞様の構造や特殊な血管系など、正常の胸腺では見られない構造が観察された。著しい異常所は 300 ng 投与群に見られた。

D. 考察

げっ歯類を用いた研究では、直接投与された TCDD が胸腺や T リンパ球系に影響を与えることが知られている。今回、F0 の解析によって、ヒトに近いアカゲザルでも TCDD 投与数年後にも免疫系への影響が見られることがわかった。初産のみか第二児を出産したか(もしくは投与後の年数)で若干結果に差が見られるが、免疫系の細胞の中でも特に T リンパ球とそのサブセットに影響が有るという点では共通していた。異物である胎児を長い妊娠期間中維持するには T リンパ

球系の微妙なバランスが重要であると言われており、TCDD 投与と流産との関係を考察する上でも考慮すべき結果であると考えられる。

F1a では、直接投与ではなく、経胎盤・授乳による影響であるにも関わらず、T リンパ球への影響が見られた。雌では 30 ng 投与群で CD4/CD8 比が減少する傾向が見られた。ヒトでは CD4/CD8 比が一定の割合に保たれることが重要とされ、今回のアカゲザルの実験においても、6 ヶ月後に再解析する前に 30 ng 投与群雌の F1a が 1 匹死亡した。雄では用量依存性に T 細胞の割合が減少する傾向が見られた。雌雄の間には感受性の違いがあると考えられる。リンパ球だけではなく顆粒球数に差がみられたこと、および F1b で再現性がなかったことについてはこれからさらに検討しなければならない。

この後 F1a にこれらの傾向が続くのかどうかは不明であり、報告も少ないため、今後も定期的に採血を行って血液データを解析し、寿命などへの影響を考察することは有用であると思われる。F0 についての考察で述べたように、生殖への影響も考えられ、特に雌についてはさらに実験を進める必要があると考えられる。また、白血球の数だけではなくそれが対照群の白血球と同様な機能を持っているかどうかについてもさらなる研究が必要であると考えられる。胸腺の所見では、TCDD 投与群でも異常所見を示すものと示さないものがあり、感受性に非常に個体差があることも示唆された。この個体差も検討する必要があると思われる。また、異常所見が観察される組織につい

ては、更に特殊染色や免疫染色を行い、そこに見られる細胞の種類などについて同定を行う必要があると思われる。

E. 結論

妊娠・哺乳アカゲザルに TCDD を暴露したところ、最終投与から 1~3 年以上経ってもリンパ球数、T リンパ球数、CD4/CD8 比が減少するなどの傾向が見られた。また、暴露された母から生まれた児では、雌で CD4/CD8 比の減少、雄で T リンパ球の割合が減少する傾向が見られた。胸腺の組織像について、著しい異常所見は母・児ともに 300 ng 投与群のみで認められ、現行の TDI は概ね妥当と考えられる。しかしながら、母児ともに、リンパ球数やリンパ球表面抗原の割合などに 30 ng/kg 投与において対照群と差が見られるものもあり、TCDD 30 ng/kg 投与でも影響がある可能性が示唆された。

F.

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1) 徳田信子, 安達泰弘, 沢田知夫, 福本哲夫, 安田峯生, 隅田寛, 久保田俊一郎. ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル胸腺とリンパ球への影響. 解剖学雑誌, 80, 24, 2005. (日本解剖学会 第 59 回中国・四国地方会, 2004 年 11 月 6-7 日, 岡山)

2) 徳田信子, 安達泰弘, 福本哲夫, 安田峯生, 隅田寛, 福田剛司, 今井統隆, 有馬昭宏, 久保田俊一郎. TCDD

に暴露された母ザルおよび胎児の免疫系への影響. 環境ホルモン学会第 7 回研究発表会要旨集, 330(抄録), 2004. (環境ホルモン学会第 7 回研究発表会, 2004 年 12 月 14-15 日, 名古屋)

3) 徳田信子, Yamini Arudchelvan, 安達泰弘, 沢田知夫, 福本哲夫, 安田峯生, 隅田寛, 福田剛司, 有馬昭宏, 久保田俊一郎. ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル母児胸腺とリンパ球への影響. 解剖学雑誌, 80, 抄録号, 181, 2005. (第 101 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2005 年 3 月 29-31 日, 富山)

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1. F0の顆粒球数とリンパ球数

初産のみのF0	control		30 ng			
n	3		3			
顆粒球数	3.56	± 1.38	2.85	± 0.35		
リンパ球数	4.80	± 0.92	4.88	± 1.13		
第二児を 出産したF0	control		30 ng		300 ng	
n	5		6		9	
顆粒球数	3.34	± 0.35	2.76	± 0.39	3.80	± 0.61
リンパ球数	5.47	± 0.39	* 3.57	± 0.43	* 3.52	± 0.50

顆粒球数とリンパ球数の単位は $\times 10^3/\text{ml}$ 。

データは平均値 \pm SE、対照群との有意差は*: $P < 0.05$ で示す。

表2. F0のリンパ球表面抗原の割合

初産のみのF0	control		30 ng	
CD3 ⁺	66.17	± 8.23	67.28	± 6.32
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	53.00	± 1.48	37.23	± 4.46
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	38.33	± 1.93	* 49.79	± 2.45
CD4/CD8	1.39	± 0.11	* 0.76	± 0.12
CD20 ⁺	27.64	± 6.33	16.66	± 5.35

第二児を 出産したF0	control		30 ng		300 ng	
CD3 ⁺	79.20	± 1.47	74.62	± 4.38	76.17	± 2.98
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	45.70	± 2.72	43.71	± 4.20	48.91	± 2.66
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	42.21	± 5.29	44.69	± 3.72	39.64	± 2.36
CD4/CD8	1.17	± 0.17	1.04	± 0.43	1.31	± 0.47
CD20 ⁺	11.45	± 1.42	14.19	± 2.73	12.32	± 2.46

単位は%。データは平均値 ± SE、対照群との有意差は*: P<0.05で示す。

表3. F1の顆粒球数とリンパ球数

初産児(F1a)		control		30 ng		300 ng	
n							
	♀	7		6		3	
	♂	5		6		5	
顆粒球数	♀	3.19 ± 0.61		2.12 ± 0.22	*	1.51 ± 0.17	
	♂	1.31 ± 0.13		* 4.45 ± 1.08	*	4.95 ± 0.86	
リンパ球数	♀	5.89 ± 0.49		4.63 ± 0.59		5.24 ± 0.83	
	♂	5.53 ± 0.63		4.52 ± 0.33		7.07 ± 1.76	
第二児 (F1b) (♀のみ)		control		30 ng		300 ng	
n		6		3		3	
顆粒球数		2.39 ± 0.19		1.81 ± 0.26		2.00 ± 0.48	
リンパ球数		4.34 ± 0.57		4.78 ± 0.44		5.27 ± 1.65	

顆粒球数とリンパ球数の単位は $\times 10^3/\text{ml}$ 。
 データは平均値 \pm SE、対照群との有意差は、*: $P < 0.05$ で示す。