

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）経過しているのにもかかわらず、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、TCDD30 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。

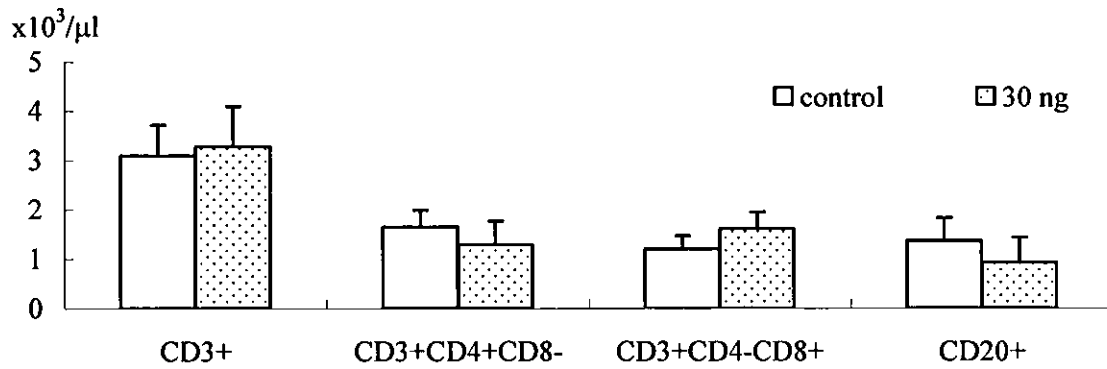
表 4. F1のリンパ球表面抗原の割合

初産児(F1a)		control		30 ng		300 ng	
CD3 ⁺							
	♀	78.19	± 2.09	74.18	± 3.45	70.64	± 4.29
	♂	76.18	± 4.23	66.20	± 5.21	** 58.28	± 2.76
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻							
	♀	54.93	± 3.32	49.80	± 5.61	58.49	± 10.18
	♂	57.61	± 3.38	57.91	± 4.39	56.48	± 2.94
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺							
	♀	36.08	± 3.45	43.33	± 5.61	33.23	± 7.75
	♂	32.30	± 1.97	32.83	± 3.92	32.08	± 3.61
CD4/CD8							
	♀	1.66	± 0.24	1.31	± 0.27	2.08	± 0.71
	♂	1.83	± 0.20	2.20	± 0.44	1.94	± 0.41
CD20 ⁺							
	♀	15.20	± 1.73	18.14	± 1.80	20.97	± 5.82
	♂	17.26	± 2.01	23.14	± 3.05	** 30.77	± 2.75
第二児 (F1b) (♀のみ)		control		30 ng		300 ng	
CD3 ⁺		59.10	± 1.43	66.20	± 3.00	** 68.66	± 0.47
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻		52.56	± 2.86	61.35	± 4.24	53.13	± 2.10
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺		37.51	± 1.87	* 28.51	± 3.29	35.41	± 1.40
CD4/CD8		1.44	± 0.16	2.24	± 0.37	1.51	± 0.11
CD20 ⁺		23.58	± 2.54	19.54	± 2.14	15.64	± 1.79

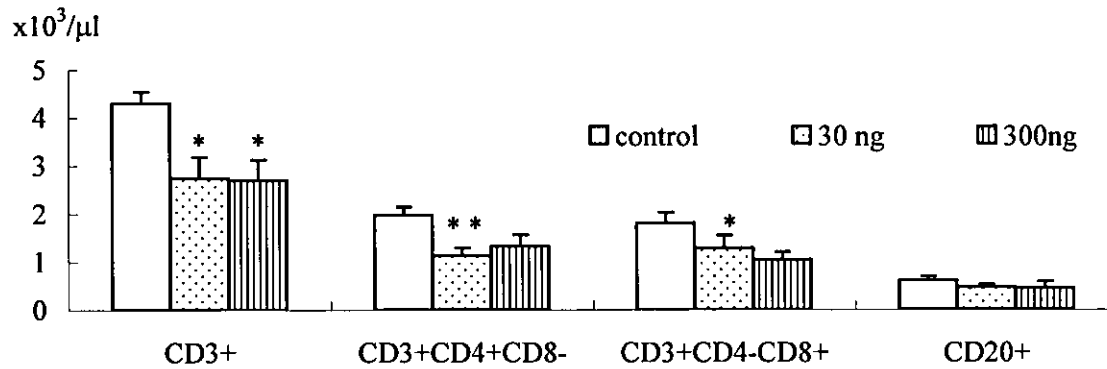
データは平均値 ± SEで、対照群との有意差は、*: P<0.05、**: <0.01で示す。

図1. F0のリンパ球各サブセット数

初産のみのF0



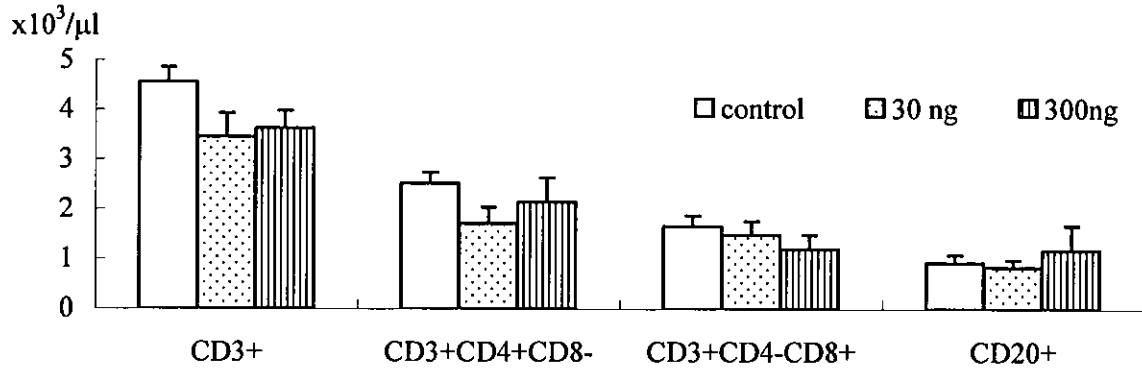
第二児を出産したF0



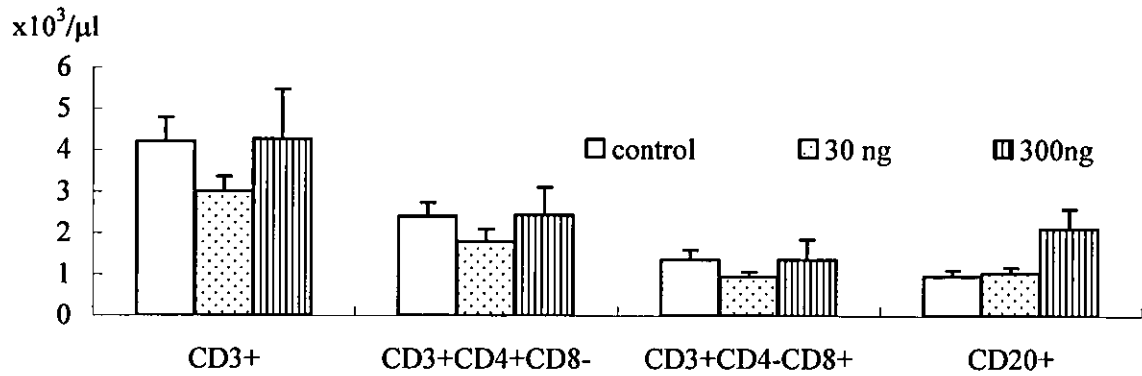
データは平均値 ± SEで示す。対照群との有意差は、*: P<0.05、**:<0.01で示す。
 第二児を出産したTCDD投与群ではCD3+リンパ球 (T細胞) が有意に減少している。
 30 ng投与群では特にCD4+T細胞が減少している。

図2. F1のリンパ球各サブセット数

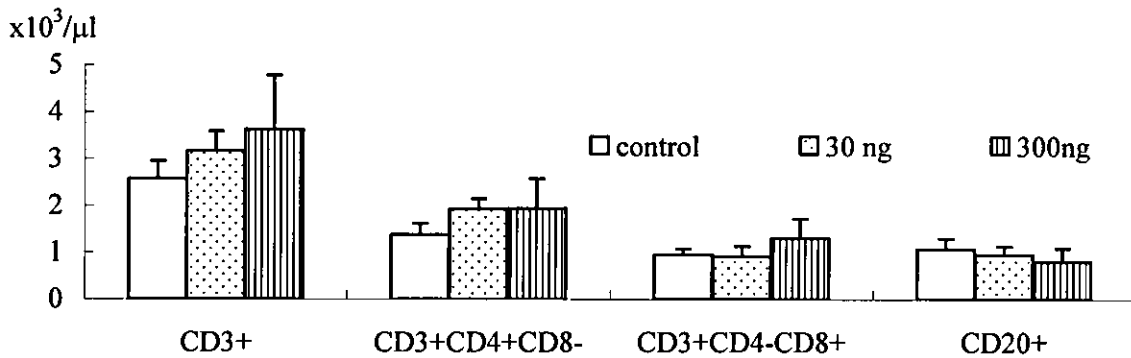
初産児 (F1a)♀



初産児 (F1a)♂



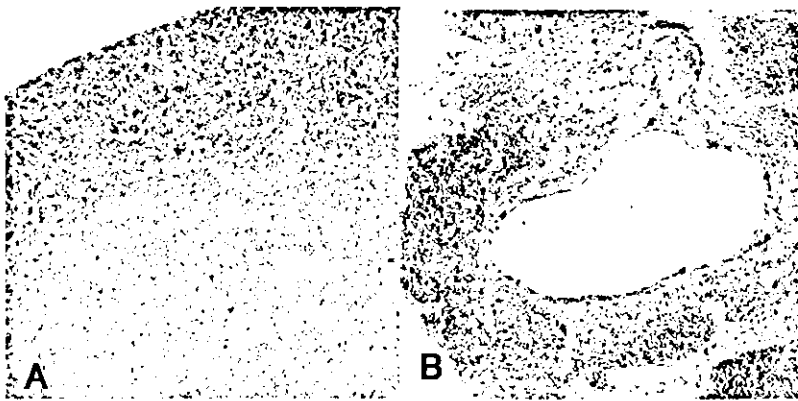
第二児(F1b)♀



データは平均値±SEで示す。

F1aでは投与群でT細胞数が減少する傾向が見られたが、有意差はない。

図3. 胸腺組織像



A: 正常胸腺。皮質・髄質の境界がはっきりしており、ハッサル小体が散見される。
B:F1胸腺の一例。髄質の中に腺様(のう胞様)の構造が見られる。

Ⅱ 研究成果の刊行に関する一覧表

(平成 14 年度～平成 16 年度)

研究成果刊行一覧

著表者氏名	論文タイトル	雑誌名	巻	ページ	出版年
Kubota, S.	Effects of paronylphenol on matrix metalloproteinase secretion by human leukemia cells.	Organohalogen Compounds	65	210-213	2003
Asaoka, K., Iida, H., Suzuki, J., Watanabe, K., Inoue, M., Fukusato, T., Murata, N., Nomizu, M., Nagata, R., Kubota, S.	Gene expression disorder in various tissues in rhesus monkeys treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin via subcutaneous single injection.	Organohalogen Compounds	64	423-426	2003
Korenaga, T., Kubota, S., Ohta, M., Asaoka, K., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., and Fukusato, T.	Liver injury in Rhesus monkeys subcutaneously injected with 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin.	Organohalogen Compounds	66	3315-3320	2004
Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M., Korenaga, T., Fukusato, T., Asaoka, T., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., and Kubota, S.	Effects of 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin (TCDD) on signal transduction pathway-related protein expression in liver and cerebrum of Rhesus monkey.	Organohalogen Compounds	66	3299-3304	2004
Yasuda, I., Yasuda, M., Sumida, H., Arima, A., Ihara, T., Kubota, S., Asaoka, K., Takasuga, T., Tsuga, K., and Kagawa, Y.	In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects tooth development in Rhesus monkeys.	Organohalogen Compounds	66	3321-3325	2004
Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M., Korenaga, T., Fukusato, T., Asaoka, K., Murata, N., Arima, A., and Kubota, S.	Long-term Effects of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) on signal transduction pathway-related protein expression in precentral gyrus, amygdaroid body and liver of rhesus monkey.	submitted to Chemosphere			2005

発表者氏名	論文タイトル	雑誌名	巻	ページ	出版年
Korenaga, T., Fukusato, T., Ohta, M., Asaoka, K., Murata, N., Arima, A., and Kubota, S.	Long-term effects of subcutaneously injected 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin on the liver of rhesus monkeys.				2005
Yasuda, I., Yasuda, M., Sumida, H., Tsusaki, H., Arima, A., Ihara, T., Kubota, S., Asaoka, K., Tsuga, K., and Akagawa, Y.	In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects tooth development in Rhesus monkeys.		20	21-30	2005
Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Miyaji, K., Goda, H., Ihara, T., Yasuda, M., and 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.				2005

Ⅲ 研究成果の刊行物・別刷

(平成 14 年度～平成 16 年度)

Endocrine Disrupters

環境ホルモン学会

Research

正式名 日本内分泌攪乱化学物質学会

第5回研究発表会
要旨集

The 5th Annual Meeting of Japan Society
of Endocrine Disrupters Research

PROGRAM and ABSTRACTS



25-26, November, 2002

INTERNATIONAL CONFERENCE CENTER HIROSHIMA, B2F

Organized by Japan Society of Endocrine Disrupters Research

日時／2002年11月25日(月), 26日(火)

会場／広島国際会議場 B2F

主催／環境ホルモン学会 (正式名 日本内分泌攪乱化学物質学会)

ダイオキシン類のサル子宮内膜におよぼす影響の DNA チップによる解析

飯田景子¹⁾、釜中慶朗²⁾、鈴木樹理²⁾、渡辺邦夫³⁾、安田峯生⁴⁾、久保田俊一郎⁵⁾、浅岡一雄¹⁾

1) 京都大学霊長類研究所分子生理、2) 同人類モデルセンター、3) 同ニホンザル野外施設、4) 広島国際大学保健医療学部臨床工学科、5) 東京大学大学院医学部代謝生理化学

ダイオキシン曝露による健康影響はマウスの胸腺萎縮や口蓋裂、マウスやラットでの発癌など多様な毒性を示し、ヒトにおいては多部位で多種の健康被害が生じるとする疫学報告があり、ダイオキシンの毒性機構の解明は大切である。ダイオキシンに曝露したサルは子宮に異常をきたし流産や内膜症などの多発する生殖異常が報告される一方で否定する見解もある。ダイオキシンの分子的作用機構として Ahr 依存性が知られるが更なる解明が必要である。このため我々はサルにおける発現遺伝子のクローニングにより得られた多数遺伝子を対象として、サル子宮内膜における遺伝子発現へのダイオキシン影響について DNA チップを用いて解析した。mRNA は雌サルにダイオキシン様作用をもつメチルコラントレンを投与したのち子宮内膜を採取して抽出した。発現変動が検出された分子は RT-PCR によって分子量と配列の確認を行った。メチルコラントレンを投与した雌サルの子宮内膜には CYP1A1 および GST の遺伝子発現の増加が認められ Ahr 機構が作動していることが認められた。同時に c-fos、ウテログロビン、エストロゲンレセプターベータ型、インスリン様グロソファクターレセプター II 型に遺伝子発現の増加が認められ、エストロゲン機構が Ahr 機構と同時に子宮内膜において作動していることが認められた。一方、エストロゲンレセプターアルファ型、インスリン様グロソファクター II 型、アンドロゲンレセプターは発現が低下した。インスリン様グロソファクター I 型、インスリン様グロソファクター I 型レセプター、プロゲステロンレセプター、c-Jun、DNA ポリメラーゼカプパ、Ahr は曝露に影響されずに同一量の発現を示した。これらの結果から、ダイオキシン類はサルの子宮内膜に影響して遺伝子発現を変動させることが示された。サルの子宮内膜においてダイオキシン類は Ahr 機構にくわえてエストロゲン様機構による作用を示すことが見出され、発癌や子宮内膜症を研究する分子の手がかりが得られた。(厚生科学研究費補助金、文部科学省補助金による。)

Analysis of dioxin effects on monkey endometrium using a DNA chip

Hiroko Iida¹⁾、Yoshiro Kamanaka²⁾、Juri Suzuki²⁾、Kunio Watanabe³⁾、Mineo Yasuda⁴⁾、Shunichiro Kubota⁵⁾、Kazuo Asaoka¹⁾

1) Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, 2) Center for Human Evolution Modeling Research, Primate Research Institute, Kyoto University, 3) Field Research Center, Primate Research Institute, Kyoto University, 4) Department of Clinical Engineering, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University, 5) Department of Physiological Chemistry and Metabolism, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

There is much argument about monkey endometriosis affected by dioxin. We have been investigating the dioxin effects on the gene expression in monkey endometrium using a DNA chip. In the endometrium from monkeys injected with dioxin-like compound, methylcholanthrene, mRNA expressions of CYP1A1 and GST genes were increased. Those of c-fos, uteroglobin, estrogen receptor beta, and insulin like growth factor II genes were also increased in the same tissue. These results show that dioxin affects simultaneously estrogen-like effects adding to gene expression of Ahr molecular mechanism in the monkey endometrium. Those molecular gene mechanisms related to dioxin might be useful to understand dioxin related diseases, i.e. cancer and endometriosis. (Supported by Health Science Research Grants for Research on Environmental Health from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan and by Grants in Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.)

ダイオキシン曝露のサル器官における遺伝子発現の障害性

浅岡一雄¹⁾、飯田景子¹⁾、井上稔²⁾、福里利夫³⁾、村田宣夫⁴⁾、野水基義⁵⁾、久保田俊一郎⁶⁾

1) 京都大学霊長類研究所分子生理、2) 新日本科学安全性研究所、3) 帝京大学医学部病理、4) 埼玉医科大学医学部外科、5) 北海道大学大学院地球環境科学、6) 東京大学大学院医学部代謝生理化学

ダイオキシンのヒトへの健康影響として免疫系神経系への機能障害、発癌や奇形などに関与することが懸念されている。ヒトの体内影響を調べるモデルとしてはラットなどでの研究にあわせて、ヒトに最も近い実験動物であるサルを用いて研究することは意義がある。サル曝露モデルとして、ダイオキシンの中で最も毒性の高い2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラジオキシン(TCDD)を用いて30-300 ng/kg体重を皮下投与する条件で研究した。対象は溶媒のみを投与した。これまでに、TCDDの排泄速度は30日間に5%程度であること、体内では器官に血中に較べ高濃度で移行すること、胎盤や母乳を通して胎児や新生児に移行することなどを明らかにした。TCDD曝露サルに死亡はみられていないものの、胎児死亡や流産の割合がやや高い傾向がある。300 ng/kg投与群の出産児は約半数が生後に死亡した。器官における障害は肝臓辺縁部での小葉像明瞭化、腎臓に両側性異型性、肺の癒着・赤色点、腸粘膜の暗赤色化などの組織異常が認められた。これらを分子的に解析するため、TCDDを0, 30, 300 ng/kg体重の単回皮下投与したのち49日目のサル器官において遺伝子の発現をRT-PCRにより調べた。CYP1A1遺伝子についてmRNA発現量は、30 ng/kg曝露において対象サル器官に較べて乳腺3.1倍、皮膚2.7倍、腎臓2.5倍、膵臓1.4倍に増加した。300 ng/kg曝露では乳腺3.8倍、皮膚3.3倍、肝臓1.8倍、脳1.6倍に増加した。心臓はCYP1A1の小増加が見られた。卵巣、甲状腺、肺での変化はみられていない。CYP1A1は環境化学物質の水酸化、エポキシ化を触媒する酵素であり侵入化学物質を細胞外に排出するのに役立つものの、反応生成物が過剰となればDNAに付加体を形成することが知られている。このためTCDD曝露サルにおいて多くの器官にCYP1A1の発現が増加したことは合目的的生体反応であるものの、核内のDNAの複製や転写を阻害して器官の障害を引き起こす可能性を示している。(厚生科学研究費補助金、文部科学省補助金による。)

Impediment to gene expressing in the organs of monkeys treated with dioxin

Kazuo Asaoka¹⁾, Hiroko Iida¹⁾, Minoru Inouye²⁾, Toshio Fukusato³⁾, Nobuo Murata⁴⁾, Motoyoshi Nomizu⁵⁾, Shunichiro Kubota⁶⁾

1) Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, 2) Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., 3) Department of Pathology, Teikyo University School of Medicine, 4) Department of Surgery, Saitama Medical School, 5) Division of Bioscience, Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University, 6) Department of Physiological Chemistry and Metabolism, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

We have been investigating effects of exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on impediment to functioning in the organs of monkeys. We reported some anatomical disorders in the liver (accentuated lobular pattern), kidney (bilateral heteroplasia), lung (adhesion, red spot), and intestine (dark red mucosa) of monkeys treated with 30 or 300 ng/kg TCDD. To clarify the molecular events in the organ disorder, we analyzed a gene expression using RT-PCR on the monkey organs at 49 days after exposure to TCDD. CYP1A1 gene expressed 3.1, 2.7, 2.5, 1.4 folds of mRNA content higher than that in controls in the mammary gland, skin, kidney, and pancreas, respectively, in the 30 ng/kg group. The values increased were 3.8, 3.3, 1.8, 1.6 folds in the mammary gland, skin, liver and brain, respectively, in the 300 ng/kg group. In the hearts, there is a slight increasing of the amount. The amount increased could not detect in the ovary, thyroid gland and lung. CYP1A1 plays as a detoxifying enzyme to environmental chemicals and its metabolites at high amounts attach to DNA. Therefore, these results indicate the impediment to functioning in the organs of the monkeys exposed by TCDD. (Supported by Health Science Research Grants for Research on Environmental Health from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan and by Grants in Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.)

GENE EXPRESSION DISORDER IN VARIOUS TISSUES IN RHESUS MONKEYS TREATED WITH 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-p-DIOXIN VIA SUBCUTANEOUS SINGLE INJECTION

Kazuo Asaoka¹, Hiroko Iida¹, Juri Suzuki¹, Kunio Watanabe¹, Minoru Inoue²,
Toshio Fukusato³, Nobuo Murata⁴, Motoyoshi Nomizu⁵,
Ryoich Nagata² and Shunichiro Kubota⁶

- ¹ Primate Research Institute, Kyoto University, Kanrin 41-2, Inuyama, Aichi 484-8506, Japan
² Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., 2438 Miyanoura, Yoshida-cho, Kagoshima 891-1394, Japan
³ Department of Pathology, Teikyo University Hospital, Tokyo, Japan
⁴ Department of Surgery, Teikyo University Hospital, Tokyo, Japan
⁵ Division of Bioscience, Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan
⁶ Department of Life Science, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Introduction

In Dioxin isomers, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is the most toxic and contaminating in an environment and bio-life. Human populations exposed with highly TCDD were reported to be caused immunological dysfunctions, carcinogenesis, and developmental and reproductive dysfunctions. The effects of TCDD on monkeys have been investigating as a model for assessment of TCDD exposure on human health¹⁻⁴. Because of species specificity, monkey model could expect to clear TCDD events on humans adding to many reports in other experimental animals⁵⁻⁸. In this study TCDD was subcutaneously administrated to female rhesus monkeys. At 49 days after the exposure, TCDD was remained in monkeys and caused the disorder of gene expression in many organs, especially in mammary gland in the monkeys.

Methods and Materials

Chemicals. ³H-2, 3,7,8-TCDD (3.84 GBq/mg) dissolved in toluene and DMSO (1:2, V/V) was purchased from Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd. Tokyo, Japan.

Animals. Rhesus monkeys were purchased from China National Scientific Instruments & Materials Import/Export Corporation (Beijing, China). The monkeys (6-9 years old and 4.5-6.5 kg in body weight) were kept in Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd, Kagoshima, Japan. The breeding conditions were described previously⁹. ³H-2, 3,7,8-TCDD (30-300 ng/kg of body weight) was administrated subcutaneous to monkeys.

Measurement of TCDD in blood and tissues. The concentration of TCDD in various tissues of the monkeys after 7 and 49 days from the exposure was measured by the radioactivity counting by the methods described previously².

Measurement of gene expression in various tissues. Total RNA was extracted with Trizol from the tissues froze at -80 until use. For RT-PCR, an aliquot of the RNA was reversed to cDNA with super script reverse transcriptase and followed by PCR which was performed in the previous tube with primers adjust to each genes. For the microarray analysis, the reverse

transcription of the RNA was performed with dCTP labeled Cy3 or Cy5 and hybridization was done on a glass microarray, AceGene (Hitachi Software Engineering Co., Ltd, Tokyo, Japan).

Results and Discussion

RT-PCR showed CYP1A1 content was increased in many tissues in monkeys treated with TCDD at 49 days after the single exposure than that in the tissues treated with no-TCDD, as shown in Fig 1. The higher increasing was detected in the order from the mammary gland, skin, kidney, pancreas, liver and brain than their control. The increased amount was a slightly in heart and could not detect in the ovary, thyroid gland and lung. The increasing folds of CYP1A1 amount in the tissues were depending on the TCDD amounts exposed to monkeys. The increased CYP1A1 amount in the tissues exposed with 30 ng TCDD /kg of body weight was shown almost saturate to be compared with that of 300 ng TCDD /kg of body weight.

CYP1A1 plays as detoxifying enzyme acting on environmental chemicals but the over-activation of CYP1A1 might cause dysfunction of normal metabolites in life and attach to DNA, which is known in vitro, and cell experiments. Therefore, the increasing of CYP1A1 in the tissues of the monkey exposed with TCDD indicates the disorder of biological functions in the monkeys exposed with TCDD. Even though the mortality event was not affected in the monkey, some tissues of the monkeys were detected in anatomical disorders, in the liver (accentuated lobular pattern), kidney (bilateral heteroplasia), and intestine (dark red mucosa) by the levels of the administration of 30-300 ng TCDD / kg of body weight.

Microarray analysis – One hundred genes were analysed with the microarray using the RNA from the mammary gland which was the most affected in the CYP1A1 increase. Among a lot of genes, about 16 genes were increased depend on the amount exposed with TCDD to monkey and about 17 genes were decreased, as shown in Fig 2a and 2b. Those 33 genes may be candidate to detect the TCDD affections on monkeys and humans. In this analysis, some mismatch information of the genes in monkey might be given because the microarray glass is prepared to adjust for human gene analysis. Even though the lower sensibility and the gene name mistake for the monkey genes, some genes that were hybridized in the microarray were useful to evaluate the TCDD affection on the monkey. The number and the amount changing in the genes reacted on the glass were different profiles depending on the treated TCDD amount to monkeys. So the profile of each gene could give us the evaluation methods to estimate and compare the TCDD affection levels on monkey and humans. In the present results show the 14/33 genes were a non-sensitive in the 30 ng TCDD /kg administration to the monkey. This value might be near to affection level on humans with TCDD because of the physiological resemblance between human and monkeys.

