

Acknowledgment

We are deeply thanks to the heads of Mr. Nobuo Asaba and Mr. Shinsuke Asaba, Arashiyama Monkey Park Iwatayama, Kyoto, Japan to keep the birth record of monkeys and help handling monkeys. This study was supported by Health Labor Sciences Research Grants for Research on Food and Chemical Safety from the Ministry of Health Labor and Welfare of Japan, MEXT Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 13027240), and a Grant for the Biodiversity Research of 21st Century COE (A14) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- Abraham, K., Wiesmuller, T., Brunner, H., Krowke, R., Hagenmaier, H., Neubert, D., 1989. Absorption and tissue distribution of various polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDDs and PCDFs) in the rat. *Arch. Toxicol.* 63, 193-202.
- Asaoka, K., Iida, H., Suzuki, J., Watanabe, K., Inoue, M., Fukusato, T., Murata, N., Nomizu, M., Nagata, R., Kubota, S. 2003. Gene expression disorder in various tissues in rhesus monkeys treated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects via subcutaneous single injection. *Organohalogen Compounds*, 64, 423-426.
- Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Miyaji, K., Goda, H., Ihara, T., Nagata, R., Yasuda, M., Kubota, S. 2004. No effects of dioxin shingly on limb malformations in macaque monkeys through epidemiological and treated studies. *Organohalogen Compounds*, 66, 3421-3425.
- Birnbaum, L.S., 1994. Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics: Implications for policy and future research. *Environ. Health Perspect.* 102, 676-679.
- Birnbaum, L.S., 1995. Developmental effects of dioxins. *Environ. Health Perspect.* 103, 89-94.
- Gray L.E. Jr., Ostby J.S. and Kelce W.R. 1997. A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of in male Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146, 11-20.
- Hendrickx, A.G. & Peterson, P.E. 1997 Perspectives on the use of the baboon in embryology and teratology research. *Human Reproduction Update*, 3, 575-592.
- Ihara, T., Oneda, S., Yamamoto, T., Boudrel, L., Lau, D., Nagata, R. 1999. An embryotoxic/teratogenic potential and abortifacient effect study of interferon alafacon-1 (Infergen®) via subcutaneous administration to rhesus monkeys. *Cong Anom.* 39, 223-42.
- Itani, J. and Mizuhara, H. 1957. Notes on malformed individuals found in the wild group of Japanese macaques at Takasakiyama. *Bull. Exp. Anim.*, 4, 105-107 (in Japanese).
- Kubota, K., Ihara, T., Sato, M., Takasuga, T., Yasuda, M., Fukusato, T., Hori, H., Nomizu, M., Kobayashi, T., Seyama, Y. Nagata, R. 2000. Tissue distribution of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in pregnant rhesus monkeys and their fetuses following a subcutaneous single injection. *Organohalogen Compounds* 49, 255-258.
- Kubota, K., Ihara, T., Oneda, S., Inoue, M., Sato, M., Takasuga, T., Yasuda, M., Fukusato, T., Hori, H., Nomizu, M., Kobayashi, T. and Nagata, R. 2001. Kinetic profile of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in pregnant and lactating rhesus monkeys and their infants. *Organohalogen Compounds* 53, 88-91.
- Michalek, J.E., Pirkle, J.L., Caudill, S.P., Tripathi, R.C., 1996. Pharmacokinetics of TCDD in veterans of operation ranch hand: 10-year follow-up. *J. Toxicol. Environ. Health* 47, 209-220.

- Minezawa, M., Nozawa, K., Gotoh, S., Yoshihiro, S., Hamada, Y., Inagaki, H. and Nigi, H. 1990. A cytogenetic study on congenital limb malformations in the Japanese monkey. *Primates*, 31, 571-577.
- Nagao, T., Yamashita, K., Golor, G., Bittmann, H., Korner, W., Hagenmaier, H., Neubert, D., 1996. Tissue distribution after a single subcutaneous administration of 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-p-dioxin in comparison with toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in female wistar rats. *Life Sci.* 58, 325-336.
- Pohjanvirta, R., Tuomisto, J., 1994. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol. Rev.* 46, 483-549.
- Tamimura, T. 1972. Effects of macaque embryos of drugs reported or suspected to be teratogenic to humans. *Acta Endocrinol. [suppl]*, 166, 293-308.
- The Ministry of Environment in Japan, 1999, The state of dioxins accumulation in the human body, blood, wildlife, and foods: Findings of the fiscal 1998 survey.
- WHO Consultation, 1998. Assessment of the health risk of dioxins; re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI).
- Wilson, J.G., Gavan, J.A. 1967. Congenital malformations in nonhuman primates: Spontaneous and experimentally induced. *Anat. Rec.* 158, 99-110.
- Yasuda, I., Yasuda, M., Sumida, H., Tsusaki, H., Arima, A., Ihara, T., Kubota, S., Asaoka, K., Tsuga, K., Akagawa, Y. 2005. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects tooth development in rhesus monkeys. *Reprod. Toxicol.* (in press)
- Yoshihiro, S., Goto, S., Minezawa, M., Muramatsu, M., Saito, Y., Sugita, H., and Nigi, H. 1979. Frequency of occurrence, morphology and causes of congenital malformation of limbs in the Japanese monkey. *Ecotox. Environ. Safe.*, 3, 458-470.

Table I. The physical conditions of monkeys examined and dioxins detected in the blood of monkeys living in free ranging and breeding places in Japan, 2003. The amounts were expressed as pg/g of lipid of the blood.

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	ND	2.6	1.4	×1
	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 #126	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 #103	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'-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.

Table II. TEQs of dioxins detected in the blood of monkeys living in free ranging and breeding places in Japan, 2003.

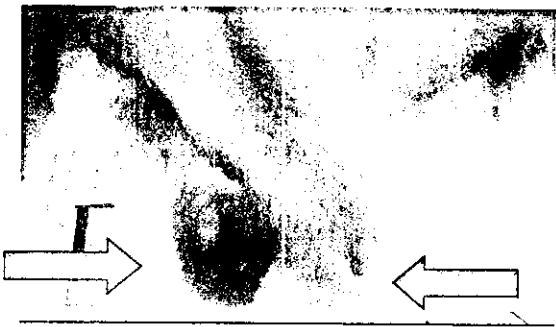
The amounts were expressed as pg-TEQ/g of lipid of the blood..

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.



a) ID-1 Arashiyama,
normal limbs



b) ID-2 Arashiyama,
abnormal limbs,
sprite fingers



c) ID-3 Arashiyama,
abnormal limbs,
arms' less



d) ID-4 Arashiyama,
normal limbs

Figure 1: Free ranging monkeys analyzed in this study including with limb malformations to be born at Arashiyama in Japan. Arrows are pointed the parts of abnormal limbs. More details of the individuals were shown in Table I.

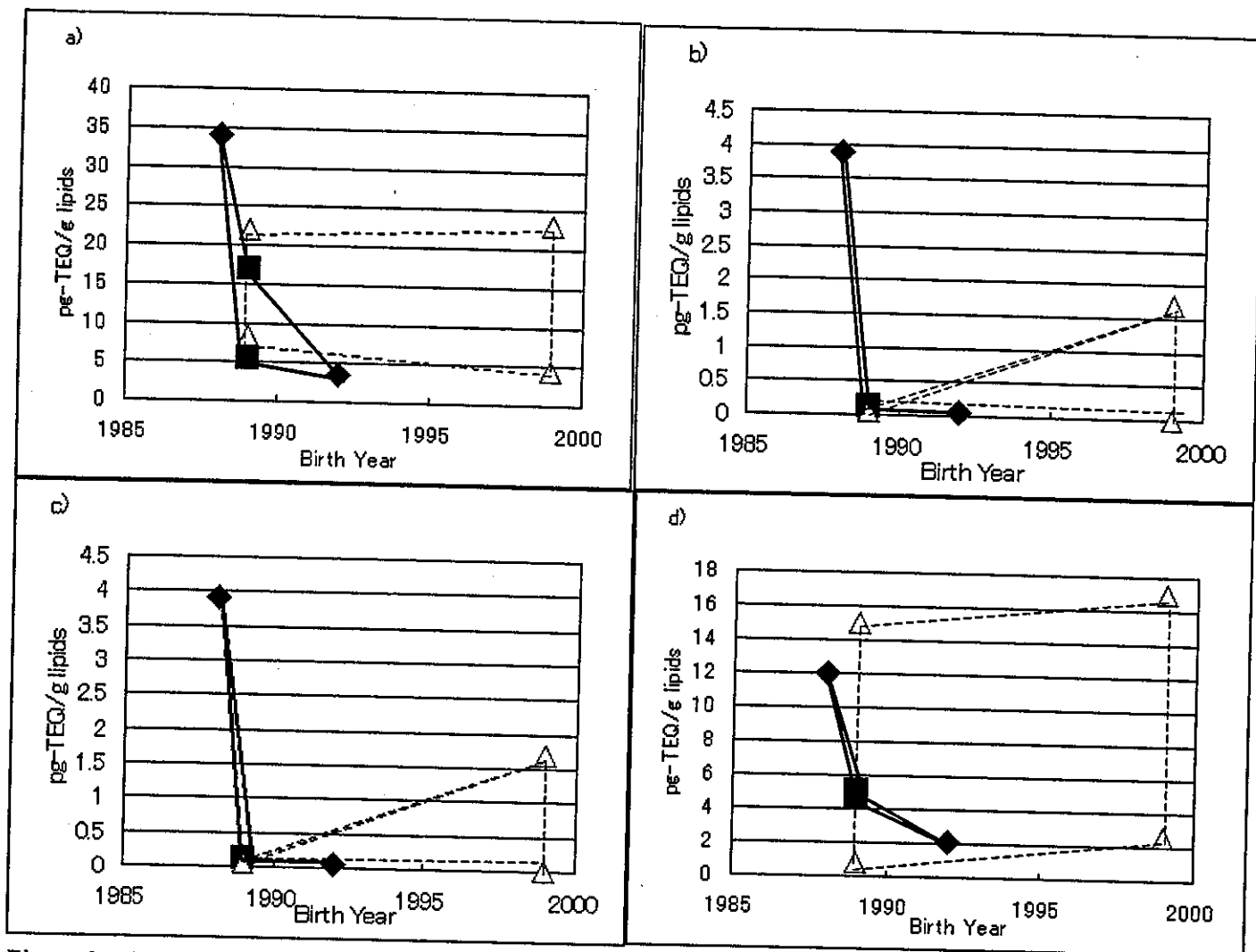


Figure 2. The comparison of TEQs of dioxins contaminated in blood between free ranging and breeding monkeys including with limb malformations. TEQs of dioxins contaminated in the monkey bloods are expressed as pg-TEQ/g lipids versus the year at the birth of each monkey. a) TEQ of total PCDDs+PCDFs+Coplanar PCBs, (b) TEQ of total PCDDs, (c) TEQ of total PCDDs, (d) TEQ of total Coplanar PCBs. Square: wild monkeys with abnormal limbs on 1989; diamond: wild monkeys with normal limbs, open triangle: breeding monkeys with normal limbs; solid line: TEQ's area detected in the wild monkeys; and dashed line: TEQ's area detected in the breeding monkeys. For more details, see the table I.

NO EFFECTS OF DIOXIN SINGLY ON LIMB MALFORMATIONS IN MACAQUE MONKEYS THROUGH EPIDEMIOLOGICAL AND TREATED STUDIES

Kazuo Asaoka¹, Hiroko Iida¹, Kunio Watanabe², Hiroshi Goda³, Toshio Ihara⁴, Ryoichi Nagata⁴, Mineo Yasuda⁵, Shunichiro Kubata⁶

¹Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Primate Research Institute, Kyoto University

²Field Research Center, Primate Research Institute, Kyoto University

³Towa Kagaku Co., Ltd.

⁴Safety Research Facility, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

⁵Department of Clinical Engineering, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University

⁶Department of Life Science, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

Introduction

Human populations exposed with highly dioxin were suspected to be caused immunological dysfunctions, carcinogenesis, and developmental and reproductive dysfunctions. Because of species resemblances, the dioxin effects have been investigated using monkeys as a model for assessment of dioxin exposure on human health¹⁻⁶. Since 1957 the limb malformations of monkeys in Japan have been reported⁷⁻⁸. The higher frequency of them was found in provisional groups of monkeys who were given the same kind of food for human. The chromosomal abnormalities are excluded from the factor for the congenital limb malformations⁹ that are still producing in Japan. In this study, the relations between dioxin and the limb malformations of macaque monkeys were estimated by the epidemiological and administered researches. The dioxin levels in monkeys were measured at two districts that one has the provisional groups including monkeys with limb malformations and the other has breeding groups never seeing the malformations for a long time. TEQ was calculated by the levels of dioxin isomers in the monkeys and the values show no difference between the two places and between the individuals with and without the limb malformations. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) was administered via subcutaneous to pregnant rhesus monkeys from the day 20 of gestation to the day 90 after birth. The exposed babies, including the offspring and died in neonatal, had observed normal limbs in the range of 30-300 ng TCDD /kg of body weight.

Methods and Materials

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

Animals. For epidemiological studies, blood samples were collected from Japanese monkeys living in two different districts, provisional groups of semi-wild monkeys and breeding monkeys. Some in the former are born with limb malformations and in the later no records of birth with malformation. The monkeys captured and treated according to the animal control program and the guide for the care and use of laboratory primates. Four samples including two abnormal monkeys were obtained from the provisional group of monkeys at Arashiyama, Kyoto Japan. The other four samples were obtained from the breeding facility at Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi, Japan. The ages of all the monkeys tested were conformed by records of birth. The samples were collected after anaesthetization with Ketalar and kept in freezing until used. For exposure studies, rhesus monkeys 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 previously¹⁰. The rhesus monkeys were mated, and the pregnancies were administered 2, 3,7,8-TCDD (30-300 ng/kg of body weight) via subcutaneous on day 20 of their gestation. Every 30 days interval, 5% of the initial dose of TCDD was given to the pregnancies until day 90 after birth for maintaining the body burden. Controls were given the vehicle.

Measurement of dioxin isomers in blood. The isomers of dioxins in 10 ml of blood samples from the monkeys was measured using a high resolution mass spectrometer by the methods of the provisional manual for analyzing the dioxin in blood by the Ministry of Health, Labour and Welfare (22 Dec, 2000).

Results and Discussion

Epidemiological analysis – In total four monkeys at the provisional groups, two monkeys had limb malformations that were split hands as shown in figure 1. This type categorized in absence deformities is the most frequently observed in the limb malformations that occurred under 5% of the groups at Arashiyama in 1972-1979⁸. The other monkeys including breeding monkeys had normal limbs. Among the measured dioxin isomers, polychlorinated dibenzofuran and coplanar polychlorobiphenyl were detected in major, and polychlorodibenzo-p-dioxine was detected in minor in the bloods of monkeys living at both semi-wild and breeding. TEQ was calculated by the amount of the dioxin isomers among the monkeys. Figure 2 show the values in the bloods of the two malformation monkeys were pointed in the range of the values of the other normal monkeys. The difference of TEQ between the two districts also was not detected in the values of their averages.

Exposure analysis – TCDD is the most toxic in dioxin isomers. In utero and lactational exposure, TCDD affects morphological abnormalities that are reported on teeth development especially at incisor and molar in rodents¹¹⁻¹² and monkeys⁶. But in the case of TCDD administration in the range of 30-300 ng /kg of body weight, the babies exposed with TCDD had observed normal limbs including the offspring and died in neonatal. The TCDD administration was started on day 20 of gestation that is enough, if TCDD is teratogenic on the limbs, to effect on the limb malformation in

macaque monkeys because famous thalidomide as a limbs teratogen acts sensitively on the embryo of rhesus monkey in the period of 24-30 days after gestation ¹³. The limb malformations with thalidomide also occur among macaque species including Japanese monkeys during almost same periods ¹⁴.

Above the results show dioxin isomers including TCDD may have no effects on the limb malformation when TCDD acts singly in the same period of thalidomide as a teratogen.

The limb malformations may be occurring with other material(s) or their complex in the living environments surrounding the monkeys. Those abnormalities are serious for humans because the physiological resemblance based on the molecular similarity between humans and monkeys. Further studies are necessary to clarify the materials and limb malformation relationships.

Figure 1: Provisional semi-wild monkey with congenital finger less in Japan

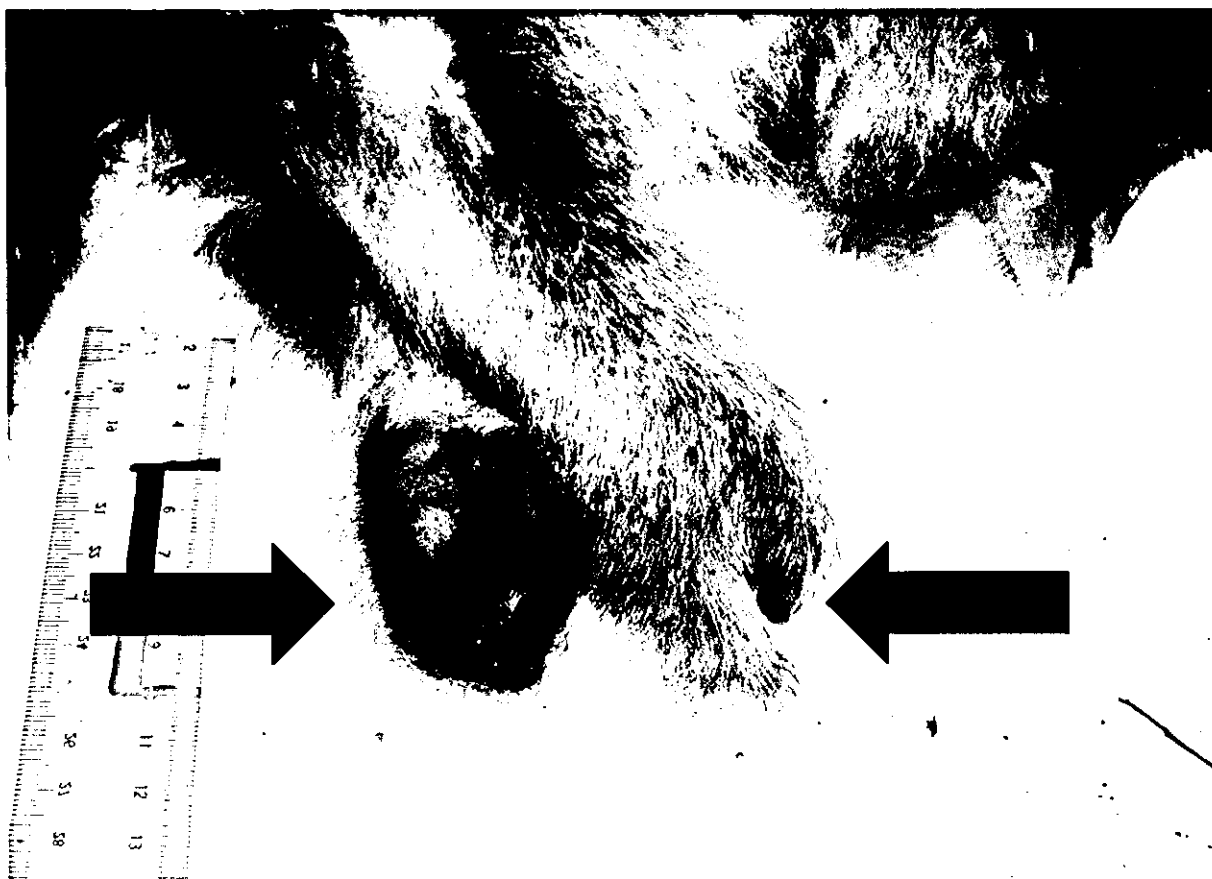
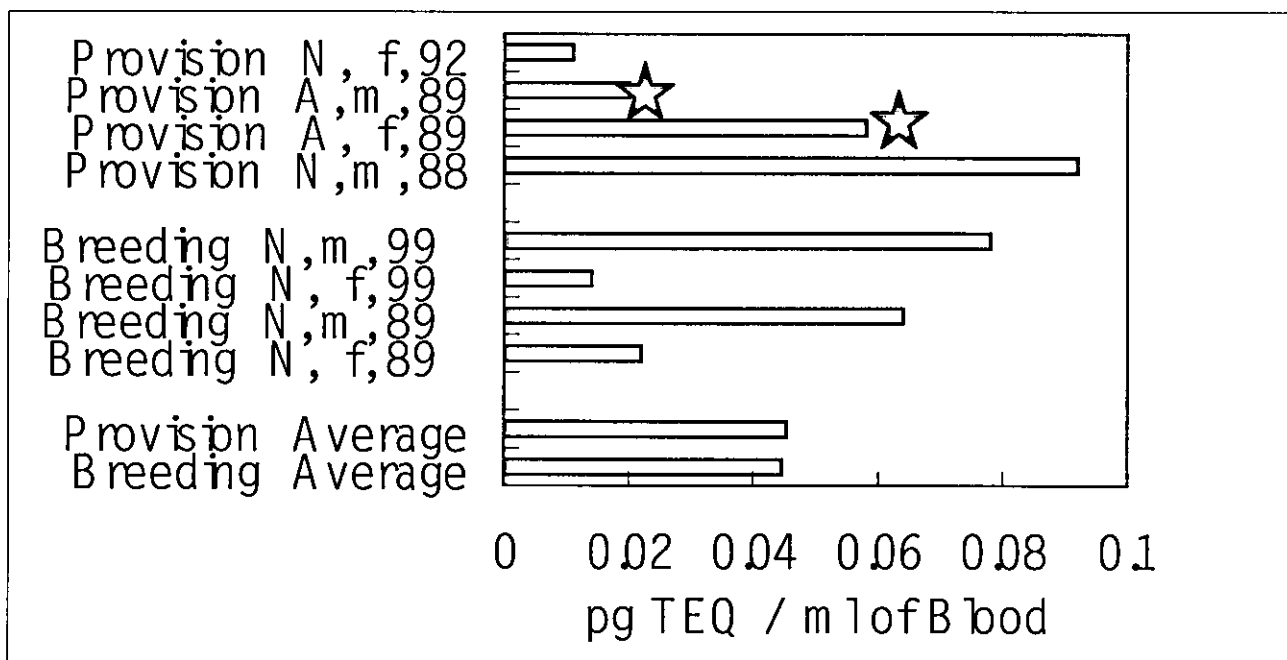


Figure 2: The comparison of TEQ in the blood of monkeys with between malformation limbs and normal limbs

☆A, abnormal; N, normal; f, female; m, male; number, birth year



Acknowledgment

This study was supported by Health Labour Sciences Research Grants for Research on Food and Chemical Safety from the Ministry of Health Labour and Welfare of Japan, and MEXT Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

1. Hagenmaier, H., Wiesmuller, T., Golor, G., Krowke, R., Heige, H. and Neubert, D. (1990) *Arch Toxicol* 64: 601-615
2. Kubota, K., Ihara, T., Sato, M., Takasuga, T., Yasuda, M., Fukusato, T., Hori, H., Nomizu, M., Kobayashi, T., Seyama, Y. and Nagata, R. (2000) *Organohalogen Compounds* 49: 255-258
3. Yasuda, M., Ihara, T., Takasuga, T., Kubota, S., Matsui, K., Yamashita, K. and Nagata, R. (2000) *Organohalogen Compounds* 49: 391-393
4. Kubota, K., Ihara, T., Oneda, S., Inoue, M., Sato, M., Takasuga, T., Yasuda, M., Fukusato, T., Hori, H., Nomizu, M., Kobayashi, T. and Nagata, R. (2001) *Organohalogen Compounds* 53: 88-91
5. Asaoka, K., Iida, H., Suzuki, J., Watanabe, K., Inoue, M., Fukusato, T., Murata, N., Nomizu, M., Nagata, R., and Kubota, S. (2003) *Organohalogen Compounds*, 64: 423-426
6. Yasuda, I., Yasuda, M., Sumida, H., Tsusaki, H., Inouye, M., Tsuga, K., and Akagawa, Y. (2003) *Organohalogen Compounds*, 64: 431-434
7. Itani, J. and Mizuhara, H. (1957) *Bull. Exp. Anim.*, 4: 105-107 (in Japanese)
8. Yoshihiro, S., Goto, S., Minezawa, M., Muramatsu, M., Saito, Y., Sugita, H., and Nigi, H. (1979) *Ecotox. Environ. Safe.*, 3: 458-470
9. Minezawa, M., Nozawa, K., Gotoh, S., Yoshihiro, S., Hamada, Y., Inagaki, H. and Nigi, H. (1990) *Primates*, 31: 571-577
10. Ihara, T., Oneda, S., Yamamoto, T., Boudrel, L., Lau, D., Miller, D., and Nagata, R. (1999) *Cong Anom.* 39, 383
11. Miettinen, H.M., Alaluussua, S., Tuomisto, J., and Viluksela, M. (2002) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184: 57
12. Kiukkonen, A., Villuksela, M., Sahlberg, C., Alaluusua, S., Tuomisto, J.T., Tuomisto, J. and Lukinmaa, P.-L. (2002) *Toxicol. Sci.*, 69: 482.
13. Wilson, J.G., and Gavan, J.A. (1967) *Anat. Rec.* 158: 99-110
14. Tamimura, T. (1972) *Acta Endocrinol.* 166 (Suppl.): 293-308

2004年10月13日-16日 第77回日本生化学会大会 (パシフィコ横浜)

Phylogenetic Characteristics of Genes Expressed in Macaque Monkeys and The Application for Ecotoxicogenomics of Dioxin Disorder

Kazuo Asaoka¹, Hiroko Iida¹, Yoshiro Kamanaka¹, Juri Suzuki¹, Masumi Wakita¹, Kunio Watanabe¹, Chisato mori², Minoru Inouye³, and Shunichiro Kubota⁴

¹Primate Research Institute, Kyoto University, Kanrin 41-2, Inuyama, Aichi 484-8506, Japan
(asaoka@pri.kyoto-u.ac.jp)

²Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670, Japan

³Safety Research Facility, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., 2438 Miyanoura,
Yoshida-cho, Kagoshima 891-1394, Japan

⁴Department of Life Science, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1
Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan

[Introduction] In experimental animals, macaque monkey has advantages for human models because of the most resemblance physiologically. Information on gene sequences is limited in the monkeys especially in an early developmental stage that is important in ecotoxicogenomics. The analyses based on mRNA have to be started. [Methods] Full-length cDNA was converted from mRNA expressed in the monkey embryo and transfected to *E. coli*. Their clones were selected randomly from about 3,000 plaques and were sequenced. Pregnant monkeys were administered with TCDD and the amount transported in the tissues was detected. The changing of genes expression was analyzed using RT-PCR and DNA microarray. [Result & Conclusion] The resemblance of genes expressed in the monkey embryo versus human genes was estimated about 94 % and 96 % based on the structure and the gene frequencies, respectively. Those are closer to human genes because both those of rats and mice versus that of humans are reported about 80%. The TCDD was detected in many tissues of the fetal and changed the gene expression. It shows TCDD transports from the mother to the fetal via placenta. In the analyses using DNA microarray, some were changed the gene levels up or down depending on the amount TCDD exposed. Those genes may be candidate TCDD affection on humans.

第 94 回日本病理学会総会

会 期：平成 17 年 4 月 14 日（木）・15 日（金）・16 日（土）

会 場：パシフィコ横浜

（横浜市西区みなとみらい 1-1-1）

会 長 長 村 義 之（東海大学医学部基盤診療学系病理診断学）

副会長 上 山 義 人（東海大学医学部基盤診療学系病理診断学）

後 援 文部科学省 厚生労働省 神奈川県医師会 横浜市

総会事務局

〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台

東海大学医学部基盤診療学系病理診断学

TEL: 0463-95-9924 FAX: 0463-91-1370

E-mail: path@m.med.u-tokai.ac.jp

会期中：パシフィコ横浜学会本部 (212)

TEL: 045-228-6462

FAX: 045-228-6463

P3-I-62

妊娠および授乳期ダイオキシン暴露による牝親アカゲザルの肝障害

¹帝京大学医学部病理学教室,²東京大学大学院総合文化研究科,³新日本科学安全性研究所

是永 龍巳¹,久保田俊一郎²,太田 万理³,有馬 昭宏²,樋田壽々子¹,福里 利夫¹

【目的】ダイオキシン類は生体に対して様々な毒性を示すことが知られているが、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (TCDD) は最も毒性が強い。今回、妊娠期及び授乳期のアカゲザルにおける TCDD 投与後の肝障害について検討した。【方法】妊娠 20 日目の牝アカゲザルに 0ng, 30ng, 300ng/kg の TCDD を皮下投与し、分娩後 90 日まで 30 日毎に初回投与の 5% を追加投与した。3 年後に屠殺後病理学的及び生化学的検討を行った。【成績】TCDD 非投与群に肝病変は見られず、投与群で肝の巣状脂肪化、出血、梗塞、類洞内の微小血栓形成、胆管上皮の過形成が認められた。投与群では、免疫染色で平滑筋アクチン陽性細胞の増加、Western blotting で Ah 受容体及び VE-カドヘリンの発現減少、CYP 1A1 の発現増加が認められた。電顕では、類洞内皮細胞の腫大、細胞膜の不明瞭化、細胞質の不規則な形の拡大など類洞内皮細胞の変性所見が見られ、類洞内腔の狭窄が認められた。【結論】TCDD 投与群で肝内に認められた所見は類洞内皮障害と局所循環障害の存在を示唆していた。その原因がダイオキシン投与による可能性が考えられた。

2-F-18

妊娠および授乳期ダイオキシン暴露による仔アカゲザルの新規腎障害

¹帝京大学医学部病理学教室,²東京大学大学院総合文化研究科,³新日本科学安全性研究所

是永 龍巳¹,久保田俊一郎²,太田 万理³,有馬 昭宏²,樋田壽々子¹,福里 利夫¹

【目的】ダイオキシン類暴露による次世代への影響が問題になっている。今回、最も毒性が強い 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (TCDD) を妊娠期及び授乳期の牝アカゲザルに投与後、仔アカゲザル (F1) にみられる臓器障害を検討した。【方法】妊娠 20 日目の牝アカゲザルに 0ng, 30ng, 300ng/kg の TCDD を背部皮下投与し、分娩後 90 日まで 30 日毎に初回投与の 5% を追加投与した。約 3 年後に F1 を屠殺後病理学的検討を行った。【成績】TCDD 非投与群及び 30ng/kg 投与群の F1 (各々 6 頭, 3 頭) で腎病変は見られず、300ng/kg 投与群からの 9 頭中 5 頭でのみ特異な腎線維化が認められた。いわゆる間質性腎炎とは異なり、炎症細胞浸潤は軽度で、尿細管周囲・糸球体周囲・血管周囲の間質に強い線維化が認められ、同時に腎盂・腎杯周囲の強い線維化も伴い、腎乳頭萎縮や腎機能不全も認められた。免疫染色ではビメンチン陽性細胞と I 型コラーゲンが増加し、シリウス赤染色後の画像解析で腎間質に線維化領域の拡大が有意に認められた。【結論】TCDD 投与後次世代 (F1) における特異な腎間質線維化の報告は初めてである。300ng/kg 投与群の F1 のみに認められた点は TDI (耐容 1 日摂取量) の設定に有用な情報を提供すると判断される。

解剖学雑誌

2005

Vol.80 No.1

目次

追悼文		
馬場 悠男 鈴木 尚	東京大学名誉教授を偲んで	1
学会報告		
島田 達生, 西井 清雅	アメリカ解剖学会に参加して	3
地方会抄録		
第64回中部支部学術集会		5
第50回東北・北海道連合支部学術集会		11
第92回関東支部学術集会		17
第59回中国・四国支部学術集会		20
おしらせ		25
会議記録		26

Japanese Association of Anatomists

日本解剖学会

<http://www.anatomy.or.jp>

日本解剖学会

第59回中国・四国支部学術集会

日時：平成16年11月6日(土)，7日(日)
場所：岡山国際交流センター(国際会議場)

1 中耳の機能説明に重点を置いた鼓室模型の製作

里田隆博，樋山伸二，山西恵美子，Shisbir K. Sarker，林田浩一，内田 隆
(広島大院・医歯薬総合・探索医科学・口腔細胞生物学)

解剖実習で、ご遺体を用いて中耳の構造と機能を学生に説明するのは非常に難しい。模型が有用であるが、耳小骨の正確な動きや耳小骨筋の働きを再現できる模型は見あたらない。今回、音の伝導と鼓膜反射の際の中耳の機能を再現できる鼓室模型を作製した。

耳小骨は針金を芯にして紙粘土で作製した。音の振動が耳小骨で増幅されて前庭窓に伝わるしくみを明確に表現するため、耳小骨関節はゴムを用いて可動性とし、運動の軸である前ツチ骨靭帯をバナネで作り、キヌタ骨の短脚(後キヌタ骨靭帯)を鼓室後壁に固定した。これによって、ツチ骨とキヌタ骨の動きによって増幅された振動がアブミ骨に伝わる様子がよく理解できるようになった。

鼓膜(耳小骨筋)反射では、鼓膜張筋が鼓膜を緊張させると共に、アブミ骨底を前庭窓に押し込むように働き、それと同時にアブミ骨筋が収縮して、アブミ骨を引き出すことにより、音の伝導が低下する。これを再現するため、鼓膜張筋とアブミ骨筋をワイヤーにて作製し、それぞれの耳小骨に連結した。これによって、鼓膜張筋の収縮によりツチ骨が内側に引かれて鼓膜を緊張させる様子や、アブミ骨筋が収縮するとアブミ骨底が前庭窓に押し込まれることを防ぐ様子を再現できた。また、その結果耳小骨系にはねじれが生じ、剛性が増して耳小骨系全体が動きにくくなり、音の伝導が低下することも説明しやすくなった。

2 「身幹鏡」(足野木骨)について

片岡勝子，洲崎悦子，中谷寛弘(広島大・院・医歯薬総合・探索医科学)

足野良悦(1754-1802)は広島町の医師で、薬草採取の折に草叢に觸れて見つけ、刑死体の解剖を申請した。寛政3(1791)年に2体の刑死体の下げ渡しを受け、1体は内臓を中心とした解剖を行い、他の1体は骨格標本として、工人、原田孝次に模倣を作らせた。制作には約300日を要し、翌年、我國で最初の木骨が完成した。寛政10年、良悦は木骨を江戸に持参、杉田玄白、大槻玄沢らが絶賛して「身幹鏡」と命名した。平成12年に広島大学医学資料館に寄贈、16年に国の重要文化財に指定された。

舌骨及び耳小骨を除く全身の模倣が揃っており、骨は薄茶色に、関節軟骨や肋軟骨は白く塗られている。当時、我國にあった解剖学書、すなわち、いわゆる『ターヘル・アナトミア』や『解体新書』に比べ、形状は遥かに正確精巧で、これは特に頭蓋において著しい。第2-12胸椎や第2-5腰椎が椎間板を挟まずに一塊として作られている他は、各骨は別々に制作され、関節面と筋と靭帯により結合するようになっている。頭蓋の制作に際しては真骨を縫合近くで切り分け、各切断部分の模倣を作り、最後に頭蓋内から針金と糊で留め、表面から仕上げを施したと思われる。内視鏡観察すると、頭蓋内諸構造のうち、蝶形骨小翼後部、前床突起などが隠れている。篩骨篩板と冠冠、トルコ鞍、視神経管、上眼窩裂、正円孔、卵円孔、棘孔、頸動脈管、椎体、内耳孔、舌下神経管、夫々の静脈洞、頸静脈孔などが見える。これらの孔の多くは、それぞれ、外頭蓋底の対応する構造に連絡している。このように頭蓋内構造を作りながら、頭蓋冠を被せて当時の手法では見ることができないように仕上げたのは何故か、たいへん興味深い。

3 より能動的な人体解剖学実習の試み

青山裕彦，山下敬介，松井浩二，坂本信之(広島大学大学院医歯薬学総合研究科・解剖学および発生生物学)

近年の医学教育改革では、能動的な学習を求めて、問題解決・自己学習型の教育が取り入れられている。「実習」という形式は本来能動的なものであるが、学生がさらに能動的に学習することを目的に、本医学科において最近の2年間に試みた人体解剖学実習の方式について報告する。

全53回の実習を2つの期間に分けた。始めの44回は、従来通り、表層から深部へ順に解剖していく(第1クール)。残りの9回は、別の解剖体を用いて、特定の課題に沿った解剖を行った(第2クール)。第2クールの実習課題は、第1クールの間に、各班(学生3人)で議論し、学生自身が設定した。第2クールの始めにそれぞれの課題について全員の前で説明し、それに対する議論の結果を受けて解剖を実施した。最後に発表会を行い、学生・教員の投票により優秀賞を選定した。

課題の設定時には深い考えを伴っていない場合も、解剖を進め、発表の表現を模索していく内に、思考の深化が見られた。また、発表の相互評価は、他の班の評価を通じて、自身の振り返りとなることを期待したものである。

なお、この方式は、福井医科大学第2解剖の鳥越助教授(1980年代当時;現東海大教授)による脳実習を参考にした。

4 内分泌器：器官系としてまとめられるか—発生学的視点

藤本 十四秋 岡山医療技術専門学校

内分泌器は、系統解剖学における器官系としては、他のそれらと軌を一にしては扱い難い。それは以下の理由による。(1)個々の内分泌器は、解剖学的にも機能的にも独立しており、互いに関連した演の系統を形成しているとは言い難い。(2)内分泌器(内分泌腺)は、からだの各所に散在し、ホルモン効果とは関係ないところに位置している。多くのホルモンにはそれが作用する標的器官(組織)があって、血管によってそこに運ばれ、ホルモン効果が発揮されることになる。(3)発生学的にも特異性をもっている。すなわち、内分泌組織は、ある決まった胚葉から発生・分化してくるというわけではなく、三つの胚葉の全てに含まれる色々な原基から発生してくる。

ここでは、発生学的視点を軸に、この問題を論議し考察を加えていきたい。扱う内分泌器は、下垂体、副腎、甲状腺(ラングルハンス)、性腺(卵巣と精巣)、甲状状腺である。因みに、内分泌腺という用語は(性腺も含めて)、必ずしも器官系を意識して使われているとは言えない。

むすび：内分泌器は、系統解剖学における器官系として、他のそれらと同様に扱うには難がある。このように考えてみると、感覚器についても、また、少しニュアンスは違うが皮膚についても、似たような問題が浮かび上がる。

5 ヒト皮膚および付属器の基底膜IV型コラーゲン α 鎖構成

長谷川治子^{1,2}、内藤一郎¹、中野和代¹、米澤朋子²、西田圭一郎¹、田口勇仁²、佐渡義一²、二宮善文²、大塚愛二²(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科、¹人体構成学分野、²分子医化学分野、³岡山大学医学部保健学科、⁴重井医学研究所)

IV型コラーゲンは基底膜構成細胞外基質の1つで、 $\alpha 1$ 鎖から $\alpha 6$ 鎖までの6種類の α 鎖からなり、 $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ 、 $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ 、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ の3通りの三量体が存在する。そのうち、皮膚表皮基底膜には $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ 、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ が共存する。

表皮基底膜の他にも多様な基底膜構造が皮膚には存在する。今回は表皮、エックリン汗腺、エックリン汗腺導管、脂腺、毛立筋、毛包といった皮膚付属器の α 鎖構成を解析した。その結果これらすべての皮膚付属器に表皮と同様に $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ 、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ が共存することがわかった。また、両三量体の比率を解析するため、 $\alpha 2$ 鎖と $\alpha 5$ 鎖の二重染色で表皮基底膜を詳細に観察した結果、部分的に $\alpha 5$ 鎖が少なく、 $\alpha 2$ 鎖が多い部分を認めた。すなわち $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ に対して $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ が優勢な部位が存在した。この所見は昨年報告した小腸パイエル板と共通する現象であり、この部分での物質や細胞の易透過性を示唆する構造と考える。

24 マウス肝臓マクロファージの三次元立体構築

園田 祐治, 野津 英司, 佐々木 和信 (川崎医大・解剖)

マウス肝臓を抗マクロファージモノクローナル抗体F4/80で免疫染色すると、肝臓内のマクロファージは細胞表面が高度に陽性に染色され、細胞輪郭全体を明瞭に観察できる。本研究は胎子と成熟マウスの肝臓切片をF4/80抗体(コスモバイオ社)で免疫染色し、造血性マクロファージと類洞腔マクロファージの形態を三次元レベルで比較した。肝臓を4%パラホルムアルデヒドで固定後、バラフィンに包埋し、約100 μ m厚の切片を製作し、免疫染色した。顕微鏡にZ軸ステップモーター(三谷商事)を装着し、油浸レンズ下でマクロファージを深さ0.5 μ m毎に連続撮影して、デジタル画像データを取得した。画像解析ソフトIPLab(ソリュージョンシステムズ社)およびAutoDeblur(レキシ社)にて各画像データ上のマクロファージの細胞輪郭を抽出した後、DeltaViewer(奈良女子大・和田昌昭教授によるfreeware, ver. 2.0.8)にて立体構築した。造血性マクロファージの細胞表面には造血細胞を格納するための薄い扁平な細胞質突起が放射状に多数存在する。一方、類洞腔マクロファージは太く複雑な分岐を伴う突起を持ち、突起の先端は隣接するマクロファージと接触することが少なくない。

[本研究の一部は川崎医科大プロジェクト研究費(No.16-214S)の援助によって行われた。]

25 ダイオキシシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル胸腺とリンパ球への影響

徳田信子¹, 安達泰弘¹, 沢田知夫¹, 福本哲夫¹, 安田某生², 隅田寛³, 久保田俊一郎⁴

山口大学医学部人体機能統御学¹, 広島国際大学保健医療学部臨床工学科², 広島国際大学保健医療学部診療放射線学科³, 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系⁴

【目的】ダイオキシシンの母体および児への胸腺およびリンパ球への影響を検討するために、胎生期・授乳期にダイオキシシン暴露を受けたアカゲザル母体の胸腺組織・血液、および児の血液を解析した。【方法】アカゲザルを交配し、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シン(TCDD)0(溶解)、30または300ng/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、児を哺育させた。母体および児の採血を行い、血球数の計測およびフローサイトメーターによるリンパ球表面抗原の解析を行った。また、母体を屠殺して胸腺の組織を検討した。【結果と考察】母体および児について、①投与群のリンパ球数の減少②Tリンパ球、特にCD4陽性リンパ球の割合が減少する傾向が見られた。また、③300ng/kg投与群の母体胸腺には重量の減少や正常ではみられない所見が観察された。TCDDは胸腺を中心とするTリンパ球に大きな影響があり、妊娠および授乳によって児にも同様の影響を与えると考えられた。(厚生労働科学研究費による。)

26 Fusion of cerebellar lobules and Purkinje cell loss in an ataxic mutant mouse, tottering. Md. Abul kalam Azad, Kazuhiko Sawada, Hiromi Sakata-Haga, Yoshihiro Fukui (Dept Anat & Dev Neurobiol, Univ Tokushima Grad Sch Inst Health Biosci)

Tottering mouse is an ataxic mutant that carries a mutation in a gene encoding for Ca²⁺ channel α_{1A} subunit on chromosome 8. We examined cerebellar cortical laminar structures in tottering mice by immunohistochemistry. In the sagittal sections, fusion of lobules VIII and IX of the vermis was observed, and around the fusion area, calbindin D-28k-positive Purkinje cell dendrites were disarranged. By GFAP immunostaining, glia limitans was absent in the deep portion of the fusion area. In the coronal sections, calbindin D-28k immunostaining revealed significant Purkinje cell loss throughout the vermis. The results suggest that disruptions of cerebellar cortical cytoarchitecture are characterized by fusions of lobules and Purkinje cell loss in tottering mice. This phenomenon may be involved in the development of ataxic symptoms.

第110回 日本解剖学会総会・全国学術集会

会 期 2005年3月29日(火)～3月31日(木)
会 場 富山医科薬科大学

会 頭 大谷 修 (富山医科薬科大学)
副会頭 井関 尚一 (金沢大学)

第110回 日本解剖学会総会・全国学術集会 事務局

〒930-0194 富山市杉谷2630

富山医科薬科大学医学部解剖学講座

TEL.076-434-7207

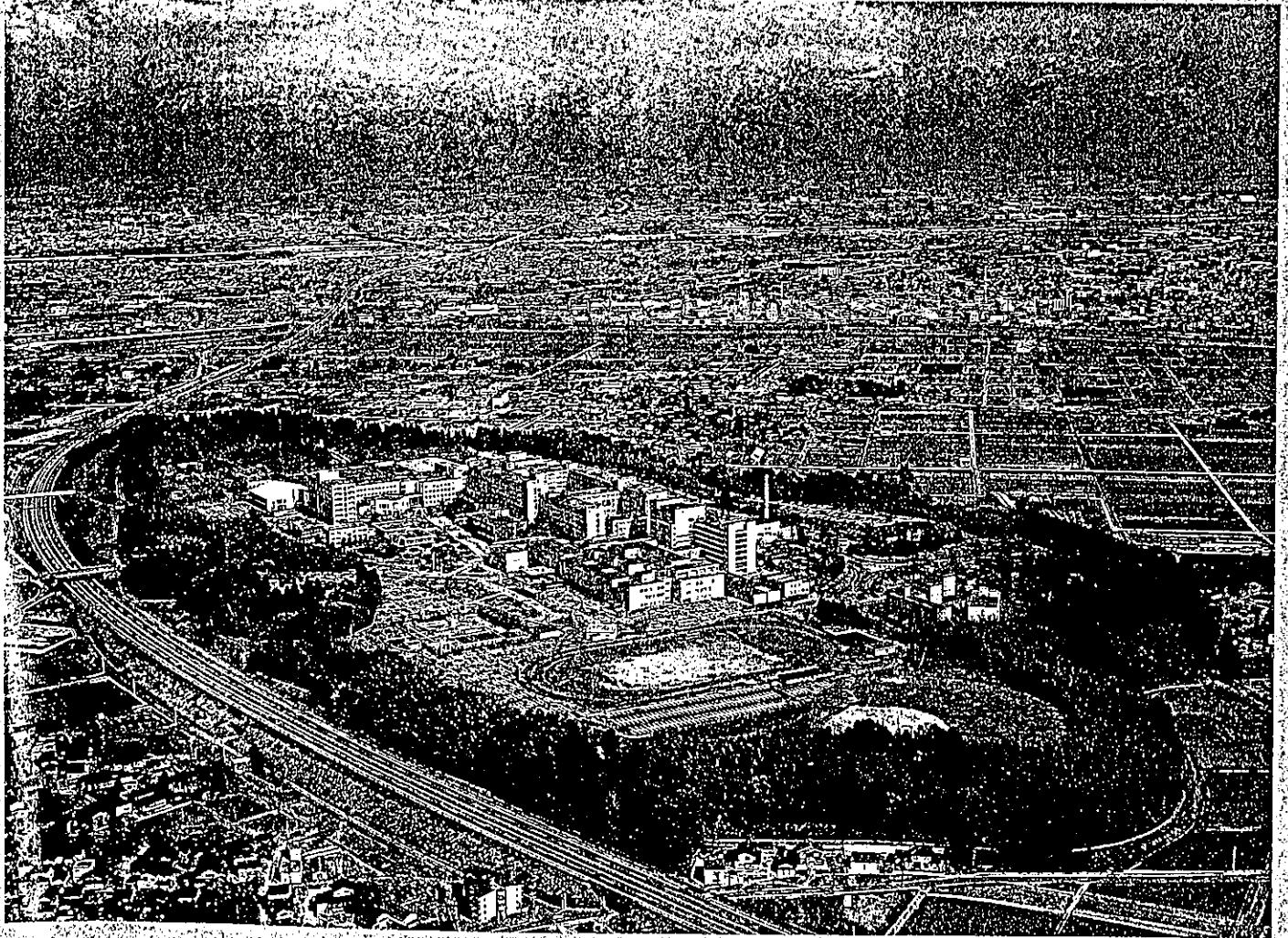
FAX.076-434-5010

E-mail jaa110@ms.toyama-mpu.ac.jp

Web-site <http://www.toyama-mpu.ac.jp/md/anat1/jaa/jaa110.htm>

Acta Volume 80, Supplement
March 2005

Anatomica Nipponica



解剖学雑誌 第110回総会・全国学術集会抄録号

Japanese Association of Anatomists

日本解剖学会

P2-31

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

山口大学 医学部 人体機能統御学¹、広島国際大学 保健医療学部 臨床工学科²、広島国際大学 保健医療学部 診療放射線学科³、(株)新日本科学 安全性研究所⁴、東京大学 大学院 総合文化研究科 生命環境科学系⁵

○徳田 信子¹、Yamini Arudchelvan¹、安達 泰弘¹、沢田 知夫¹、福本 哲夫¹、安田 峯生²、岡田 寛³、福田 剛司⁴、有馬 昭宏⁴、久保田 俊一郎⁵

我々は、ラットに様々な量の放射線を照射し、胸腺細胞の表面抗原や胸腺上皮細胞の変化などから胸腺の再生過程の詳細を解析し、報告してきた(第108回、109回本学会)。今回は、胎生期・授乳期にダイオキシンの暴露を受けた母ザルおよび児の胸腺とリンパ球への影響を検討したので報告する。【方法】アカゲザルを交配し、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(TCDD)を0(溶媒)、30または300 ng/kg皮下投与し、その後、胎生期・授乳期に30日毎に初回投与量の5%量を維持量として投与した。出産後数年を経て、母児の採血を行い、血球数の計測およびフローサイトメーターによるリンパ球表面抗原の解析を行った。また、母ザル胸腺の重量計測・組織の検討を行った。【結果と考察】母ザルについて、TCDD投与群ではTリンパ球数・CD4/CD8比への影響が見られた。また、300 ng/kg投与群の母ザル胸腺では重量減少や正常では見られない組織所見が観察された。児ではTCDD投与群でTリンパ球の割合が減少する傾向が見られた。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。(厚生労働科学研究費による。)

P3-01

P2-32

両生類の原腸胚形成における細胞内カルシウムイオンの役割

埼玉医科大学 医学部 解剖

○高野 和敬¹、駒崎 伸二¹、中村 裕昭¹

カルシウムイオンは細胞内の2次メッセンジャーとして、筋肉や神経組織の働きを制御したり、免疫や細胞分化や遺伝子の発現などさまざまな重要な役割を果たしており、動物の初期胚発生過程においても、受精や細胞の接着におけるカルシウムイオンの重要性は昔から良く知られている。しかしながら、初期胚発生過程での胚の形づくりに関する細胞内カルシウムイオンの果たす役割と、その調節機構については依然として未だ不明な点が多い。そこで本研究では、胚の形づくりに関する重要な役割を担う原腸胚形成過程で、細胞内カルシウムイオンがどのような役割を果たしているのか、その概略を明らかにすることを目的とした。

実験材料として、初期胚発生過程の実験に適したアカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)胚を用いた。実験発生学的手法に加えて、カルシウムイオン指示薬を用いた細胞内カルシウムイオンの測定や、カルシウムイオンチャネル特異的蛍光物質を用いたカルシウムイオンチャネルの胚内での局在解析や、電子顕微鏡による細胞内の超微形態学的解析など、形態学的、生理学的側面からの解析を行った。その結果、細胞内カルシウムイオンが原腸胚形成運動に重要な役割を果たしていることが明らかになったので、今回その詳細について得られた知見を報告する。

P3-02

ヒト冠状静脈と動脈の交叉と深さの類型

秋田大学 医学部 解剖学第一講座

○石澤 章光¹、周 明¹、阿部 寛¹

成人心臓52例について、冠状静脈(CV)が冠状動脈(CA)の浅・深いずれを通るか、(1)~(8)の合計8カ所の交叉部位で観察し、発生の早さとの関係を検討した。前心静脈については(1)右冠状動脈(RCA)と、中心静脈では(2)後室間枝、(3)RCAまたは回旋枝と、左室後静脈では(4)左後心室枝、(5)RCAまたは回旋枝と、大心静脈では(6)前室間枝、(7)対角枝、(8)回旋枝との、各々の交叉部位を選んだ。(1)(3)(5)(8)については冠状溝内の交叉に限定し、(2)と(4)では冠状溝に最も近い交叉を選び、(4)が複数の時は最大径の枝との交叉を選んだ。(3)と(5)ではCAの左右の優位性を考慮して選んだ。CVがCAより深部を通って交叉する頻度を求めると、前心静脈と中心静脈ではいずれも0%、左室後静脈では4.8%、大心静脈では60.1%であった。すなわちCVは右側の3枝ではほとんどCAの浅部を交叉し、一方、大心静脈では約半数例で深部を交叉した。中心静脈は常に早期に発生するので(Hirakow, 1983)、常にCAより浅部を通るのである。同様に左室後静脈は左冠状動脈(LCA)よりやや早く発生するので、大多数がLCAまたはRCAの浅部を通り、一方、大心静脈はLCAよりやや遅れて発生するので深部を通る頻度がふえるのであろう。