

## 分担研究報告書

### 長崎県油症認定患者における末梢血リンパ球分画の検討

研究分担者 宇谷厚志 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 教授  
研究協力者 大久保佑美 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 助教  
清原龍士 長崎大学病院皮膚科・アレルギー科 医員

**研究要旨** 我々は、長崎県油症検診受診者（認定患者（N=53）、未認定患者（N=14））におけるリンパ球サブセットの割合の変化を解析した。今回、油症認定患者は未認定患者より、CD3, 4, 8 陽性細胞、Treg 細胞の相対割合（%）が低く、一方NK細胞の相対割合（%）が高値であることを初めて明らかにした。このうち統計上有意なものは、CD3,8 陽性細胞の低下、NK細胞の上昇であった。また、血中ダイオキシンとTreg値の関連について検討を行ったところ、PCQ値とTreg細胞数に有意な相関が見られた。ダイオキシンが患者免疫機能へ影響を及ぼしていることが示唆された。

#### A. 研究目的

油症発生から45年以上が経過し、皮膚症状、眼症状を呈する患者は減少傾向にあるが、依然として油症患者血中には高濃度のダイオキシンが残留している状態である。油症の原因であるカネミオイルには Polychlorinated biphenyls (PCB), Polychlorinated quarterphenyls (PCQ) 及び Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) を含む dioxin 類が混在している事がわかっている<sup>1)</sup>。ダイオキシンレセプターとして知られる Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) は 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) や PCB などのダイオキシン類のレセプターとして、肺や肝臓をはじめとして幅広く発現が報告され<sup>2)</sup>、T細胞においてはTh17細胞、Treg細胞(制御性T細胞)に多く発現しているが、Th1細胞、Th2細胞にはほとんど発現が見られないことが明らかにされた<sup>3,4)</sup>。Treg細胞は免疫応答の抑制的制御を司るT細胞の一種である。

我々のグループは油症患者において、Treg細胞から産生されるサイトカインで

ある CTLA4, IL-10, IL-35 が血清中で上昇していることを示した。油症患者の免疫機能についてさらなる検討を進めるべく、去年症例数が不足していた未認定患者血清サンプル数を増やし、油症患者におけるリンパ球サブセットの検討と、血清中のダイオキシン濃度とTreg細胞数との関連について解析を行った。

#### B. 研究方法

対象：平成26年、平成27年7月に施行された長崎県油症検診五島玉之浦地区受診者のうち、同意を得られた受診者67名を対象とした。油症患者中、認定患者53名(家族認定8名)、未認定患者14名であった。検診時に採血を行い、血球を分離した。

リンパ球サブセットの内CD3陽性T細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NK細胞、Treg細胞に対するフローサイトメトリー用抗体キット(BD Simultest™, BD Bioscience)を用いてCD4+T細胞(CD4+)、CD8+T細胞(CD8+)、NK細胞(CD16+CD56+)、Treg細胞(CD4+CD25+)を測定し%で表し

た。

Treg 細胞と各種ダイオキシン濃度との相関: で算出した Treg 細胞サブセットと同一患者のダイオキシン濃度との相関を測定した。

統計処理: 測定したリンパ球サブセットにおける認定・未認定群での比較は Mann-Whitney の U 検定を、ダイオキシン濃度と Treg 細胞数は Spearman の順位相関係数の検定を使用した。

### C. 研究結果

長崎県の油症検診受診者 67 名において、認定患者 53 名、未認定患者 14 名の平均年齢は各々  $67.2 \pm 12.1$  歳、 $70.6 \pm 10.3$  歳で有意差はなかった。それぞれの群における血中の細胞の未認定患者、認定患者の比較を図 1 に示す。

- 1) CD4 陽性 T 細胞 ( $47.41 \pm 8.89\%$ ,  $43.3 \pm 7.77\%$ ,  $p=0.076$  )、
- 2) CD8 陽性 T 細胞 ( $18.4 \pm 6.91\%$ ,  $14.4 \pm 5.26\%$ ,  $p=0.0115$ )、
- 3) NK 細胞 ( $16.6 \pm 7.75$ ,  $21.8 \pm 9.35\%$ ,  $p=0.0322$  )、であった。
- 4) Treg 細胞 ( $7.91 \pm 3.36\%$ ,  $7.16 \pm 2.38\%$ ,  $p=0.173$ )、

また CD3 陽性 T 細胞は、未認定患者、認定患者で、それぞれ、 $67.6 \pm 7.3\%$ ,  $60.4 \pm 10.4$ ,  $p=0.00843$  であった。

油症患者では CD3、CD8 陽性 T 細胞が有意に低かった。CD4 陽性 T 細胞と Treg 細胞が低い有意差は見られなかった。認定患者で NK 細胞が有意差をもって高かった。

また認定患者における Treg 細胞と各種ダイオキシン濃度との spearman 順位相関係数をみたところ、PCQ では  $r=-0.4474$ ,  $p=0.0116$  となり、PCDF では  $r=-0.3012$ ,  $p=0.1731$  となった。PCQ のみにおいて有意な逆相関を認めた (図 2)。

### D. 考察

今回、油症認定患者は未認定患者より、CD3, 4, 8 陽性細胞、Treg 細胞の相対割合 (%) が低く、一方 NK 細胞の相対割合 (%) が高値であることを初めて明らかにした。このうち統計上有意差を示したのは、CD3,8 陽性細胞の低下、NK 細胞の上昇であった。

ダイオキシンは受容体である Ahr に結合し、Treg 細胞、Th17 細胞、Th1/Th2 細胞の分化増殖を調整しているとされる<sup>3,5,6)</sup>。

我々は油症認定患者では CTLA4、IL-10、IL-35 が血清中で上昇していると報告している。それらのデータから、Treg 細胞の増加を想定していたが、今回の研究では細胞の割合に有意差は見られなかった。

CD4 陽性 T 細胞は種々のサイトカイン刺激を受け Th1、Th2、Th17、そして Treg 細胞へと分化する。Treg 細胞への分化には Foxp3 を活性化する TGF 刺激が関与するとされる。しかし、TGF と IL-6 の存在下では Th17 への分化が促進され、Treg への分化は抑制されるとの報告がある。今回の結果は、今回の結果に加えて Th17 細胞を含めた解析を行うことが今後必要であることを示した。

NK に関してはダイオキシンとの関連の詳しい解析はこれまでされておらず、油症患者の免疫応答における病態解明には本研究を更に発展させる必要性があると考えた。

### E. 結論

油症患者は現在でもダイオキシン類の血中濃度が高く、様々な症状を有している。油症患者における免疫細胞に関する更なる検討が、油症患者の QOL 向上、病態解明に繋がるよう役立てていきたい。

### 謝辞

血算、ダイオキシン検査結果のデータを提供して頂いた長崎県環境保健研究センターの皆様、フローサイトメトリー解析にご協力頂いた柳原克紀教授をはじめ長崎大学病院検査部の皆様はこの場をお借りして御礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) Aoki Y: Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters --what we have learned from Yusho disease. Environ Res. 86(1): 2-11, 2001
- 2) Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA: Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. Mol Pharmacol. 44(5): 911-917, 1993
- 3) Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T: Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(28): 9721-9726, 2008
- 4) Kramer JM, Gaffen SL: Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. J Periodontol. 78(6): 1083-1093, 2007
- 5) Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, et al: Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. Nature 453:106, 2008
- 6) Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Buringham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate

regulatory T cell J immunol  
185(6):3190-3198, 2010

### F . 研究発表

なし

### G . 知的財産権の出願・登録状況

なし