

分担研究報告書

油症における末梢血ヘルパーT細胞亜集団に関する検討

研究分担者 辻 博 北九州若杉病院 西日本総合医学研究所 所長

研究要旨 2019年度福岡県油症一斉検診受診者217例について末梢血CD4陽性T細胞中の細胞内サイトカインを測定し、Th0細胞、Th1細胞およびTh2細胞と血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度との関連について検討した。血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度とTh0細胞、Th1細胞あるいはTh2細胞との間に相関をみなかった。Th2細胞は2,3,4,7,8-PeCDF高濃度群では2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群に比べ上昇を認めたが、Th0細胞およびTh1細胞は両群間に差をみなかった。血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度が高値の油症患者ではTh2細胞の上昇を認め、Th2細胞の上昇に対する2,3,4,7,8-PeCDFの慢性的影響が示唆された。

A. 研究目的

1968年4月頃よりポリ塩化ビフェニル(PCB)混入ライスオイル摂取により北部九州を中心に発生した油症では、原因油の分析から油症の原因物質としてポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)の毒性影響が大きいと考えられる¹⁾²⁾。PCDFは、狭義のダイオキシンであるポリ塩化ジベンゾ-パラジオキシン(PCDD)およびコプラナーPCBとともにダイオキシン類と総称され、これらの物質の毒性は細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体(Ah受容体)を介すると考えられているが、その機構の詳細は未だ不明である³⁾。油症発生以来50年以上が経過し種々の症状は軽快しているが、重症例においては体内のPCB濃度が今なお高く血中PCBの組成には未だに特徴的なパターンが認められ、慢性中毒に移行していると推定される⁴⁾⁵⁾⁶⁾。2001年度より福岡県油症一斉検診においてダイオキシン類の測定が開始され、油症患者では未だに血中PCDF濃度が高値であり、PCDFの体内残留が推測される⁷⁾。

近年、PCB、ダイオキシン類が内分泌攪乱物質として正常なホルモン作用を攪乱し、生殖機能の阻害、悪性腫瘍の発生、免疫機能の低下等を引き起こす可能性が指

摘されている⁸⁾⁹⁾。油症における免疫機能影響については、1996年度福岡県油症一斉検診において血中PCB濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認め油症患者における免疫機能の障害が推測された¹⁰⁾。そして、1997年度の福岡県油症一斉検診において免疫グロブリンIgA、IgG、IgMのいずれか1分画以上の上昇を40.0%に、自己抗体では抗核抗体を45.6%と高率に認め、油症において液性免疫の障害を高頻度に認めることが報告されている¹¹⁾。

今回我々は、2019年度福岡県油症一斉検診において細胞性免疫機能検査として末梢血CD4陽性T細胞中の細胞内サイトカインを測定し、油症原因物質であるPCDFの細胞性免疫に対する慢性的影響について検討した。

B. 研究方法

2019年度福岡県油症一斉検診における15歳以上の受診者225例中、細胞性免疫検査にアンケートにて同意が得られ、血中2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran(PeCDF)濃度の研究目的の使用に同意が得られた217例を対象者とした。

末梢血CD4陽性T細胞中の細胞内サイト

カインの測定は抗ヒトマウスモノクローナル抗体を用いフローサイトメトリー法により行なった。細胞内サイトカインの産生は Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (Sigma) および Ionomycin (Sigma) により細胞を刺激した。細胞表面染色は CD4-PC5 (Immunotech) を用い、細胞内サイトカイン interferon (IFN)- γ および interleukin (IL)-4 の染色は BD FastImmune Anti-Human IFN- γ FITC/IL-4 PE (BD Biosciences) を用いて BD FACSCanto II フローサイトメーター (BD Biosciences) にて測定した。IFN- γ 産生かつ IL-4 産生細胞を Th0 細胞、IFN- γ 産生かつ IL-4 非産生細胞を Th1 細胞、IFN- γ 非産生かつ IL-4 産生細胞を Th2 細胞として総 CD4 陽性細胞に対する比率で表した。

2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の測定は福岡県保健環境研究所で行なった。血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 2019 年度福岡県油症一斉検診に最も近い時期に測定した 2016 年度 20 例、2017 年度 59 例、2018 年度 66 例、2019 年度 72 例の計 217 例の測定値を用い、Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞亜集団との関連について検討した。

結果は平均±標準偏差 (mean±S. D.) で表し、平均値の比較については t 検定で行なった。

C. 研究結果

2019 年度福岡県油症一斉検診における 15 歳以上の受診者で細胞性免疫検査および血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度の研究目的の使用に同意が得られた 217 例の内訳は女性 125 例、男性 92 例で、平均年齢は 65.2 ± 13.2 (16-92) 歳であり、油症患者 161 例、油症患者 (同居家族) 25 例、未認定患者 31 例であった。血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と年齢の間に有意の正の相関 ($r=0.434$, $P<0.001$) を認めた。

2019 年度福岡県油症一斉検診の受診者

217 例について血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞との関連について検討した (表 1)。血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と Th0 細胞、Th1 細胞あるいは Th2 細胞の間に関連をみなかった。

福岡県油症一斉検診受診者 217 例について血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度上位 25% を 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 高濃度群、下位 25% を 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 低濃度群として両群間の Th0 細胞、Th1 細胞および Th2 細胞について検討した (表 2)。2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 高濃度群 54 例の血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 66.22 pg/g lipids 以上、平均血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 205.36 ± 129.69 pg/g lipids であり、油症患者 54 例であった。2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 低濃度群 54 例の血中 PCB 濃度は 8.45 pg/g lipids 以下、平均血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 5.80 ± 1.61 pg/g lipids であり、油症患者 29 例、油症患者 (同居家族) 9 例、未認定患者 16 例であった。Th0 細胞は 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 高濃度群 $1.9 \pm 2.0\%$ 、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 低濃度群 $1.3 \pm 0.9\%$ 、Th1 細胞は 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 高濃度群 $23.8 \pm 10.7\%$ 、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 低濃度群 $22.7 \pm 9.7\%$ であり、両群間に差をみなかった。Th2 細胞は 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 高濃度群 $2.8 \pm 2.0\%$ と 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 低濃度群 $1.3 \pm 0.9\%$ に比べ有意の上昇を認めた ($P<0.01$)。

D. 考察

油症における免疫機能への影響については血中 PCB 濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認めることが報告されている。油症発症 28 年後の 1996 年の甲状腺機能検査において、甲状腺ホルモンは血中 PCB 濃度 3.0 ppb 以上の PCB 高濃度群と 3.0 ppb 未満の PCB 低濃度群の間に差がみられなかったが、抗サイログロブリン抗体を高濃度群の 41 例中 8 例 (19.5%) と低濃度群の 40 例

中1例(2.5%)に比べ高頻度に認めた¹⁰⁾。そして、1997年度福岡県油症一斉検診において免疫機能検査として免疫グロブリンおよび自己抗体を測定し、油症患者において免疫グロブリンIgA、IgG、IgMのいずれか1分画以上の上昇を40.0%に、自己抗体についてはリウマチ因子を8.9%に、抗核抗体を45.6%と高率に認め、液性免疫を中心とする免疫機能に対する慢性的影響が示唆された¹¹⁾。さらに、2007年度福岡県油症一斉検診において、血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度と免疫グロブリンIgAおよびリウマチ因子との間に正の相関を、抗核抗体を血中2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群に比べ高濃度群に高頻度に認め、油症における免疫グロブリンIgAおよびリウマチ因子の上昇、抗核抗体の出現に2,3,4,7,8-PeCDFが関与している可能性が考えられ、液性免疫に対する2,3,4,7,8-PeCDFの慢性的影響が示唆された¹²⁾。そして、油症におけるリンパ球亜集団への影響については2008年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者156例について末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度との関連について報告されている¹³⁾。血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度と末梢血リンパ球数、CD4陽性細胞数の間に相関が認められ油症患者の末梢血リンパ球、CD4陽性細胞の増加に2,3,4,7,8-PeCDFの関与が示唆された。また、血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度が高値の油症患者において低値の患者に比べ末梢血リンパ球、CD4陽性細胞の増加が認められ、細胞性免疫に対する2,3,4,7,8-PeCDFの慢性的影響が示唆された。

Mosmannら¹⁴⁾¹⁵⁾はマウスCD4陽性T細胞が産生されるサイトカインの違いによりTh1細胞およびTh2細胞の亜集団に分けられることを報告した。ヒトにおいてもTh1細胞およびTh2細胞の亜集団が認められ、ナイーブCD4陽性(Th0)細胞がIFN- γ や

IL-2を産生するTh1細胞、IL-4、IL-5、IL-13を産生するTh2細胞に分化すると考えられている¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。そして、Th1細胞はT細胞の活性化や細胞障害活性の増強により細胞性免疫に、Th2細胞はB細胞の活性化により液性免疫に関与すると考えられる。今回の検討では、2019年度福岡県油症一斉検診の受診者217例について血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度と末梢血Th0細胞、Th1細胞およびTh2細胞亜集団の関連について検討し、血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度とTh0細胞、Th1細胞あるいはTh2細胞の間に関連をみなかった。しかし、2,3,4,7,8-PeCDF高濃度群では2,3,4,7,8-PeCDF低濃度群に比べTh2細胞の上昇が認められた。血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度が高値の油症患者に認められるTh2細胞の上昇がこれまで報告されてきた油症におけるCD4陽性細胞の増加や免疫グロブリンの上昇の原因となっている可能性も考えられる。

油症発生51年後の2019年度福岡県油症一斉検診受診者における末梢血CD4陽性T細胞の細胞内サイトカインの検討において血中2,3,4,7,8-PeCDF濃度が高値の油症患者にTh2細胞の上昇が認められた。2,3,4,7,8-PeCDF高濃度油症患者におけるTh2細胞に対する慢性的影響の機序は不明であるが、Th2細胞の上昇に2,3,4,7,8-PeCDFの関与が示唆された。Th2細胞は気管支喘息、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患、全身性強皮症、特発性肺線維症等の自己免疫疾患の発症や病態形成に関与することが報告されている¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾。油症において気管支喘息、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患、全身性強皮症、特発性肺線維症等の自己免疫疾患との関連について検討が必要と思われる。

E. 結論

油症発生51年後の2019年度福岡県油症一斉検診受診者217例の末梢血CD4陽性T細胞中の細胞内サイトカインを検討し

2,3,4,7,8-PeCDF 高濃度群では2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べTh2細胞の上昇を認めた。Th2細胞の上昇に対する2,3,4,7,8-PeCDFの慢性的影響が示唆された。

F. 参考文献

- Masuda Y, Yoshimura H : Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance : A Review. *Amer J Ind Med* 5 : 31-44, 1984.
- Oishi S, Morita M, Fukuda H : Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43 : 13-22, 1978.
- Gonzalez FJ, Liu SY, Yano M : Regulation of cytochrome P450 genes : molecular mechanism . *Pharmacogenetics* 3 : 51-57, 1993.
- 飯田隆男, 芥野岑男, 高田智, 中村周三, 高橋克巳, 増田義人 : ヒトの血液中におけるポリ塩化ビフェニルおよびポリ塩化クアテルフェニルについて. *福岡医誌* 72 : 185-191, 1981.
- 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一 : 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニル異性体. *福岡医誌* 76 : 150-152, 1985.
- 増田義人, 原口浩一, 古野純典 : 油症患者における PCB 異性体の 30 年にわたる特異な残留. *福岡医誌* 94:136-143, 2003.
- 飯田隆男, 戸高尊, 平川博仙, 飛石和大, 松枝隆彦, 堀就英, 中川礼子, 古江増隆 : 油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査 (2001 年). *福岡医誌* 94 : 126-135, 2003.
- Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP and Becker JL : Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21:433-441, 1993.
- Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S : Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423 : 545-550, 2003.
- 辻 博, 佐藤薫, 下野淳哉, 東晃一, 橋口衛, 藤島正敏 : 油症患者における甲状腺機能:油症発生28年後の検討. *福岡医誌* 88 : 231-235, 1997.
- 辻 博, 平橋高明, 緒方久修, 藤島正敏 : 油症患者における免疫機能の検討. *福岡医誌* 90 : 147-149, 1999.
- 辻 博 : 油症患者における免疫機能の検討. 熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究 平成 19 年度総括・分担研究報告書 37-39, 2008.
- 辻 博 : 油症における末梢血リンパ球亜集団の検討. *福岡医誌* 100:131-135, 2009.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL : Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357, 1986.
- Mosmann TR, Coffman RL : TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7 : 145-173, 1989.
- Romagnani S : Human TH1 and TH2 subsets : doubt no more. *Immunol. Today* 12 : 256-257, 1991.

17. Romagnani S: Biology of human TH1 and TH2 cells. J. Clin. Immunol. 15 : 121-129, 1995.
18. Miner KT, Croft M : Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells : role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. J. Immunol. 160 : 5280-5287, 1998.
19. Barnes PJ : Th2 cytokines and asthma: an introduction. Respir. Res. 2 : 64-65, 2001.
20. Brandt EB, Sivaprasad U : Th2 cytokines and atopic dermatitis. J. Clin. Cell Immunol. 2 : 1-25, 2011.
21. Romagnani S : T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann. Allergy Asthma Immunol. 85 : 9-18, 2000.

G. 研究発表

1. 論文発表

辻 博, 松村潔 : 油症における末梢血リンパ球亜集団に関する検討. 福岡医学雑誌 110:109-112, 2019

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と Th0, Th1 および Th2 細胞の関連

	r
Th0 細胞	0.109
Th1 細胞	0.024
Th2 細胞	0.063

表2 血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 高濃度群および低濃度群における Th0, Th1 および Th2 細胞

		2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度	
		≥ 66.22 pg/g lipids	≤ 8.45 pg/g lipids
No.		54	54
Th0 細胞	(%)	1.9 $\pm$ 2.0	1.3 $\pm$ 0.9
Th1 細胞	(%)	23.8 $\pm$ 10.7	22.7 $\pm$ 9.7
Th2 細胞	(%)	2.8 $\pm$ 2.0*	2.0 $\pm$ 0.8

*P<0.01 vs. blood 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF concentration ≤ 8.45 pg/g lipids.