

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

生活環境中の脂溶性化学物質の感染症抵抗性に

及ぼす影響

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小西 良子

平成13年（2001）年 4月

## 目次

### I. 総括研究報告

生活環境中の脂溶性化学物質の感染抵抗性に及ぼす影響	-----	1
---------------------------	-------	---

小西良子

### II. 分担研究報告

1. トリブチルスズの次世代への免疫毒性に関する研究 (1)	-----	6
--------------------------------	-------	---

小西良子

2. トリブチルスズの次世代への免疫毒性に関する研究 (2)	-----	16
--------------------------------	-------	----

小西良子

3. トリブチルスズの次世代への細菌感染抵抗性に及ぼす影響	-----	22
-------------------------------	-------	----

小西良子

4. 生活環境中の脂溶性化学物質の真菌感染抵抗性に及ぼす影響	-----	33
--------------------------------	-------	----

杉浦義紹

5. 脂溶性化学物質の日和見感染に対する抵抗性に及ぼす影響	-----	38
-------------------------------	-------	----

鈴木嘉彦

6. 潜伏感染ウイルスの再活性化の検出、評価法の検討に関する研究	-----	47
----------------------------------	-------	----

山田章雄

7. HIV 等のマクロファージ潜伏感染ウイルスの再活性化に及ぼす影響の評価	-----	57
--	-------	----

天野富美夫

8. 脂溶性化学物質のヒト腸管上皮細胞へ影響	-----	64
------------------------	-------	----

小西良子

III 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	69
--------------------	-------	----

### IV. その他

研究班会議事録

付録 研究成果の刊行・別刷

# 生活環境中の脂溶性化学物質の感染抵抗性に及ぼす影響に関する研究班

## 平成12年度 研究組織

### 主任研究者

小西 良子	国立感染症研究所	食品衛生微生物部
-------	----------	----------

### 分担研究者

天野富美夫	国立感染症研究所	細胞化学部
杉浦義紹	東京理科大学	薬学部
鈴木嘉彦	麻布大学	獣医学部
山田章雄	国立感染症研究所	つくば霊長類センター

### 協力研究者

井上 智	国立感染症研究所	獣医科学部
志村純子	麻布大学	獣医学部
阪本晴彦	香川医科大学	第2病理学研究室
向井鏡三郎	国立感染症研究所	つくば霊長類センター

### 事務および経理担当者

中川 路子	国立感染症研究所	食品衛生微生物部
-------	----------	----------

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

生活環境中の脂溶性化学物質の感染抵抗性に及ぼす影響

主任研究者 小西 良子 国立感染症研究所 食品衛生微生物部

研究要旨

食品や飲料水などを介して摂取される生活環境中の脂溶性化学物質は体内での蓄積性が高いことから、長期間低濃度の曝露が引き起こす健康被害に対して社会的関心は非常に高い。しかしその危険性を予測するために必要な研究はほとんどなされていない。本研究は、生活環境の中でも食品や水などに混入して摂取される脂溶性有害化学物質に注目し、その摂取による免疫機能に対する影響、特に感染症に対する抵抗性への影響をマウス、ラット、サルを用いた動物実験およびヒト由来の継代細胞を用いて明らかにすることを目的とする。本年度に得られた成果は、脂溶性化学物質のモデルとしてトリブチルスズを用い、妊娠初期からの曝露の影響および母乳を介しての曝露の影響をラットおよびマウスを用いて検討し、これらの曝露形態においても次世代の免疫機能に影響が出現し細菌感染および真菌感染への抵抗力を低下させる危険性があることを見いだしたことである。また低蓄積性の脂溶性化学物質といわれているビスフェノールやフタル酸エステルには免疫反応を亢進する作用があることが示唆された。さらに今後サルを用いたウイルスでの感染動物実験系の確立のための基礎実験を行なった。またヒトに対する影響を予測する実験系としてヒト由来腸管細胞とマクロファージを用いる方法を確立し、ダイオキシンなどの影響を検討した。

分担研究者名

天野富美夫（国立感染症研究所 細胞化学部）

杉浦義紹（東京理科大学薬学部）

鈴木嘉彦（麻布大学 獣医学部）

山田章雄（国立感染症研究所 つくば 霊長類センター）

(1) 体内蓄積が懸念される生活環境中の脂溶性化学物質の長期間低濃度の曝露が、免疫系および感染症に対する宿主抵抗性にどのような影響を及ぼすかを動物実験およびヒト由来培養細胞を用いて明らかにする。

(2) 感染機序の異なる数種の感染症に対する宿主抵抗性低下と定量的な相関関係のある免疫関連パラメーターを解析決定し、未知の化学物質の安全性評価方法の確立を行う。

A. 研究目的

本研究の目的は次の2つである。

本年度では、脂溶性有害化学物質のモデルとしてトリブチルスズ、ビスフェノール、フタル酸エステル、ダイオキシンなどを用いた。とくに免疫毒性を有することが報告されているトリブチルスズは、水生動物への強い致死毒性から船底貝類付着防止剤として長期間世界の多くの国で使用されており、魚介類への体内濃縮が懸念されている有害化学物質である。伝統的に魚介類の摂取量が多い我が国において、この化学物質が引き起こす危険性のある健康被害を予測することは極めて重要と考えられる。

## B. 研究方法

(1) 胎盤および母乳移行による TBT の影響を検討するために次の実験を行なった。妊娠1日目のSDラットにTBT(0, 15, 50ppm)を含む飲水を産後離乳まで与え、産まれた仔の脾臓および胸腺を経時的にリンパ球表面マーカーを用いたフローサイトメトリーにより解析した。TBT 投与の母親ラットから移行する乳中 TBT 含量は FPD-ガスクロマトグラフィーを用いて定量した。(小西班)

(2) (1) の投与実験で得られた次世代のラットを生後、一週毎に2匹ずつ6週まで屠殺し、胸腺および脾臓を摘出した。これらの臓器は緩衝ホルマリンにて固定しパラフィン切片を作成した。Apoptosis 細胞の検索は ApopTag peroxidase in situ apoptosis detection kit (Intergen) を使用し TUNEL 法により apoptosis 細胞を染色し光学的顕微鏡により観察した。免疫染色は Histofine (Nichirei) を使用し StrAviGen 法により免疫染色を行った。

(小西班)

(3) 母乳移行の TBT の影響を検討するために次の実験を行なった。妊娠 ICR マウスに、産直後から母親に TBT を 0, 15,

50 ppm を含有した水を飲水として与え、うまれた仔は生後21日間母親からの哺乳で飼育し、雌雄それぞれの免疫影響とリステリア感染抵抗性を検討した。リンパ球表面マーカーを用いたフローサイトメトリーにより行った。リステリア感染抵抗性は雌雄別に一群4匹とし、哺乳期間終了時に  $2 \times 10^4$  のリステリア菌 (Y1, 臨床分離株) を用いて腹腔に感染させた。感染4日後、脾臓を採取しホモゲナイズし、0.1%の Triton X を含むリン酸緩衝液により段階希釈し、生菌数を測定した。(小西班)

(4) 真菌感染実験系の確立のため、マウスの系統差による感受性、投与菌数および観察日数などを Balb/c マウスと ICR マウスを用いて検討した。真菌菌種は *Candida albicans* IF01594 を用いた。系を確立した後(3)の投与実験で得られた母乳のより TBT の暴露を受けた乳児を用いて、雌雄それぞれの真菌に対する感染抵抗性への影響を検討した(杉浦班)。

(5) 日和見感染のモデルとなる感染実験系の確立を目的に、非病原性細菌として大腸菌 k-12 株の標準品を用い、感染抵抗性の指標を検討した。大腸菌感染実験には Balb/c SPF マウス5週令を用いた。感染実験は  $2.0 \times 10^8$ — $3.0 \times 10^8$  /マウスの濃度に生理食塩水を用いて調整し腹腔に投与し、経時的に腹水、脾臓を採取し生菌数を測定した。血液および腹水は、サイトカインの測定に供した。陽性対照としてリステリア感染症に対する感染抵抗性を低下させるエストロゲン様ホルモンであるジエチルスチルベストロールを用いた。次に上記で確立した系を用いてのフタル酸エステル、ビスフェノールの宿主抵抗性の検討は、Balb/c SPF マウス4週令を用いた。それぞれ 340 mg/kg/day

および 5.0 mg/kg/day を少量のエタノールで溶解した後、コーン油で希釈し、0.2 ml/マウスを背部に投与した。投与期間は5日間とし、最終投与から2—3日後、大腸菌 K-12 を感染させ、0、24、98時間後の腹水、血液、脾臓を採取し、腹水中の細胞数および生菌数の測定、脾臓中の生菌数の測定、サイトカインの測定および血清脂質の分析を行った。(鈴木班)

(6) ヒトと同じ霊長類に属するサルを用いて、脂溶性有害化学物質が潜伏感染しているウイルスにどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で、サルレトロウイルス (SRV, SIV) やサルヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス (EB ウイルス、CMV) などのウイルス感染の測定法を確立し、つくば霊長類センター保有のサルの感染率を測定した。サルレトロウイルス感染の測定はウエスタンブロットイングによる抗 SRV/D 抗体の検出、PCR 法による SRV/D 遺伝子の検出、抗 SIV 抗体の検出により行なった。サルサイトメガロウイルスの感染の検出は間接蛍光抗体法により行なった。サルヘルペスウイルス感染の測定は PCR 法による EB ウイルス遺伝子の検出を行なった (山田班)。

(7) ヒトでの HIV ウイルス感染への抵抗性への影響を調べる指標を検討するため、ヒトマクロファージを用い HIV 潜伏感染のウイルス再活性化を検討した。細胞はヒト単球系細胞株 U-937 細胞由来の HIV-1 潜伏感染細胞株、UI を用いた。トリブチルスズヒトマクロファージに対する致死毒性は U-937 細胞を用いて検討した。アポトーシスの検出にはカスパーゼ3の活性化を指標に用いた。カルシウム依存性のトランスポーター MDR1 の阻害剤として

ベラパミルを用いた (天野班)。

(8) 生体での最初の暴露部位である腸管への脂溶性有害化学物質の影響を明らかにすることを目的に、腸管細胞としてヒト腸管由来の Caco-2 を用い、この細胞に発現している P-糖タンパク質 (P-gp) の活性を指標に実験系の確立を検討した。活性の測定には、P-gp の基質となることが知られている蛍光色素のローダミン 123 を用いた。Caco-2 細胞を2週間培養して分化した単層を形成させ、15mM の Rho を (P-gp の阻害剤あるいは試料とともに) 細胞に加えて1時間インキュベートしたのち細胞内に取り込まれた (残留した) Rho を蛍光光度計によって定量した。(小西班)

### C. 研究結果および考察

(1) TBT の胎盤および母乳を介して暴露された次世代への免疫影響をラットを用いて検討した。母親に 15ppm および 50 ppm の TBT を投与した群から T 細胞、CD8 陽性細胞、NK 細胞の減少が見られた。これらの影響が胎盤を介するものなのか、母乳を介するものなのか両者なのかは今後の検討が必要であるが、母乳中に含まれている微量な TBT も免疫毒性を引き起こす可能性があることは明らかになった。

(2) (1) の結果を踏まえて、これらの免疫臓器 (胸腺、脾臓) を病理学的に検討した。その結果 出生直後の乳児では胸腺のアポトーシスが抑制されていたことから TBT は経胎盤的に胎児に影響を与え胸腺のアポトーシスを抑制する可能性があることが示唆された。

(3) TBT に暴露された母親に哺乳された乳児の免疫影響および細菌感染症に対する感染抵抗性をマウスを用いた動物実験系

で検討した結果、母親への暴露量および雄での感受性の差異があるが、極めて低濃度で、哺乳された子供への免疫影響やリステリア症に対する抵抗性の低下が認められた。

(4) *Candida albicans* IFO1594 を用いた真菌感染動物実験系には ICR マウスが適しており、3週令マウスおよび5週令マウスにおいて感染抵抗性を検討するためにはそれぞれ  $1.0-5.0 \times 10^5$ /マウス、 $1.0 \times 10^6$ /マウスの菌数が適当であることを見いだした。なお  $5.0 \times 10^5$ /マウス以上の菌数を感染させることによって感染後5日目において腎臓、脾臓、肝臓および脳に菌が検出できることがあきらかになった。TBT に暴露された母親に哺乳された乳児の真菌感染症に対する抵抗性は現在検討中である。

(5) 盲腸炎モデルとしてよく用いられる非病原性大腸菌を腹腔感染させる系により非病原性最近に対する宿主抵抗性を検討することが可能であることがわかった。腹腔からの菌の排除、脾臓からの菌の排除、腹腔に遊走する免疫細胞の数、血清中のサイトカイン産生を指標にすることにより、この系を用いた感染系で非病原性細菌に対する宿主抵抗性を調べることができるとわかった。さらにこの系を用いて、フタル酸エステルおよびビスフェノールの宿主抵抗性を検討した。ビスフェノールおよびフタル酸エステルは、腹腔内に投与された大腸菌に対して細胞を局所に遊走させるサイトカインの産生を亢進する作用があった。この結果腹腔内細胞数の増加が見られ、腹腔からの菌の排除が対照群に比べて速やかに起こることが認められたが、脾臓からの菌の排除機能が低下していた。このことは、フタル酸エステルおよびビスフェノールの持続的投与が免疫系に影響し、炎症反応を

亢進する可能性を示唆している。

(6) つくば霊長類センターで飼育しているサルにおいてサルレトロウイルス (SRV, SIV) の抗体を保有しているサルはアフリカミドリザルの87%であった。サルサイトメガロウイルスの抗体保有率は84%であった。サルヘルペスウイルス抗体を保有しているサルは76%であった。これらのウイルスの再活性化の指標であるPCR法は現在開発中である。

(7) ヒトマクロファージU-937細胞に対するTBTの細胞毒性には1-3nMで認められる長時間を必要とする細胞増殖抑制と1 $\mu$ Mで明らかに認められるアポトーシスを介した短時間で起こる細胞傷害性に分れることが示された。低濃度のTBTの作用はベラパミールに感受性的なトランスポーターとしてのMDR1が関与していることが示唆された。

(8) ほとんどの脂溶性化学物質はヒト腸管培養細胞ではP-gpに影響を及ぼさなかったが、ダイオキシン(TCDD)はP-gpの活性を高めることが観察された。TCDDの侵入が腸管細胞におけるP-gpの発現をup-regulateし、その排出を促進する方向に作用したものと推定される。

## E. 結論

蓄積性が懸念される脂溶性化学物質のモデルとしてトリブチルスズを用い、妊娠初期からの暴露の影響および母乳を介しての暴露の影響をラットおよびマウスを用いて検討した。妊娠初期から暴露した場合、経胎盤的に胎児に影響を与え胸腺のアポトーシスを抑制する可能性があることが示唆された。経胎盤および経母乳暴露を受けた場合には脾臓のT細胞およびNK細胞の減少が認められた。経

母乳暴露においても子供に免疫機能に影響がみられ細菌感染および真菌感染への抵抗力を低下させる危険性があることを見いだした。一方低蓄積性であるビスフェノールやフタル酸エステルを用いて、本年度に確立した日和見感染に対する抵抗性を調べる系で検討した結果、これらの脂溶性化学物質には免疫反応を亢進する作用があることが示唆された。

つぎにヒトと同じ霊長類に属するサルを用いて、脂溶性有害化学物質が潜伏感染ウイルスにどのような影響を及ぼすかを調べるために、サルを用いたウイルスでの感染動物実験系の基礎実験を行った。本年度に確立したウイルス感染の測定法を用いて、現在実験施設に飼育されているサルのウイルスの抗体保有率の調査を行なった。これらのウイルスの再活性化の指標である PCR 法は現在開発中である。

ヒトに対する影響を予測する実験系としてヒト由来腸管細胞とマクロファージを用いる方法を確立し、トリブチルスズ、ダイオキシンなどの影響を検討した。ダイオキシン(TCDD)は腸管の薬物排泄に関与するトランスポーター P-gp の活性を高めることが観察された。マクロファージを用いてトリブチルスズの細胞毒性を

検討した結果、長期間低濃度で起こる毒性と短期間高濃度でおこる毒性が存在し、それぞれは作用機序の異なる毒性がことが示唆された。

これらの結果を踏まえて、今後はそれぞれの感染症に対する抵抗性へ影響を及ぼす作用量をより詳細に検討し、ヒトへの健康被害を予測できるデータの蓄積を行なう。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sugita-Konishi, Y., Ogawa, M., Arai, S., Kumagai, S., Igimi, S. and Shimizu, M. Blockade of *Salmonella enteritidis* passage across the basolateral barriers of human intestinal epithelial cells by specific antibody. *Microbiol. Immunol.*, 44, 473-479 (2000).

2) Sugita-Konishi, Y., An approach to toxicity of *Fusarium* mycotoxins: Use in co-culture system with human intestinal cells. *Mycotoxins*, in press (2001)

### 2. 学会発表

なし



厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

トリブチルスズの次世代への免疫毒性に関する研究（1）

分担研究者 小西 良子 国立感染症研究所 食品衛生微生物部

研究要旨

蓄積性の高い脂溶性有害化学物質の一つであるトリブチルスズの免疫毒性を次世代に焦点を当てて検討した。暴露条件は妊娠初期から母親にトリブチルスズを飲水で与え（0, 15, 50 ppm）出産後も生まれた子供は母乳のみで飼育し、離乳後はトリブチルスズを含まない飲水を与えることとした。哺乳期間終了時と離乳3週間後の免疫臓器（胸腺、脾臓）の免疫担当細胞のリンパ球組成を測定し、免疫影響を検討した。その結果、50 ppm までは産仔数や体重の減少は見られなかったが、胸腺および脾臓重量の増加が見られた。哺乳期間終了時では T 細胞とくに CD8 陽性 T 細胞の減少が認められ、この影響は離乳後三週間後においても認められた。これらのことから、トリブチルスズは胎盤および哺乳を介して乳児の免疫臓器に影響を与え、この影響は少なくとも離乳後も持続する可能性が示唆された。

A. 研究目的

船底への貝類付着防止剤として使われているトリブチルスズ (TBT) は、その低分解性と蓄積性から魚介類に濃縮され、食物を介してヒトへ摂取される。しかし、ヒトなどへの毒性については不明な点が多い。本研究ではトリブチルスズをモデルとして蓄積性のある脂溶性有害化学物質の次世代への免疫毒性を明らかにすることを目的とし、ラットを用いた動物実験で、胎盤および母乳移行による次世代への影響を検討した。

B. 研究方法

試薬：トリブチルスズは和光純薬（株）から購入した。抗ラット CD4-ビオチンラベル抗体、抗ラット CD8a-FITC ラベル抗体、抗ラット CD3-FITC ラベル抗体、抗ラット CD45RA-PE ラベル抗体、抗ラット NK1.1-FITC ラベル抗体および抗ラ

ット mononuclear phagocyte-ビオチンラベル抗体はファーマーミンゲン社から購入した。

動物および投与実験：妊娠1日目のSDラットを日本 SLC（株）より購入した。TBT の投与実験は Fig.1 に示した方法で行なった。

TBT の定量：TBT の定量は FPD-ガスクロマトグラフィーを用いて行なった。

リンパ球組成の測定：TBT を投与した母親から生まれた仔の脾臓および胸腺を摘出し、リンパ球表面マーカーのフローサイトメトリーにより、T 細胞、B 細胞および T 細胞サブセット、マクロファージ、NK 細胞の組成を測定した。

C. 研究結果

TBT を投与した母親の乳を乳児の胃内から採取して TBT の含量を測定した結果を Table 1 に示した。15ppm 投与群の乳の TBT の含量は検出限界以下であった。

しかし、50 ppm 投与群の乳からは 0.03-0.04ppm の TBT が検出された。このことから非常に低い濃度ではあるが TBT は母乳を介して乳児に移行していることがわかった。

TBT を投与した母親から産まれた仔の産仔数は対照群と違いはなかった。雌雄数の差、体重の差は認められなかった。胸腺重量では TBT を 15ppm 投与した母親から生まれた仔において出生直後ではやや重い傾向にあったが3週間後には対照群に比べて減少していた。さらに離乳3週間後には 50 ppm 投与群から産まれた仔の重量が最も重かった。脾臓重量は出生直後では差異は見られなかったが3週間後には 15 ppm および 50ppm 投与群から産まれた仔の方が高い傾向にあり、この傾向は離乳後3週間後でも認められた(Fig2)。このことから、TBT は胎盤および母乳を介して乳児の免疫臓器に何らかの影響を与え、かつその影響は暴露が終了した後でも持続することがわかった。

さらに免疫担当細胞への影響を解析するために、リンパ球の表面マーカーを用いて脾臓細胞および胸腺細胞のリンパ球組成を検討した。検体としては、哺乳期間終了後と離乳3週間後の脾臓および胸腺を用いた。Fig3 は胸腺の T 細胞サブセットの組成を示したものであるが、哺乳期間終了後(3週間目)ではいずれの TBT 投与群でも CD8 陽性細胞の減少が見られた。この減少は離乳3週間後(6週間目)においても認められた。脾臓中の T 細胞および B 細胞の組成は哺乳期間終了後(3週間目)において 50 ppm 投与群でわずかに T 細胞の減少が見られた。しかし離乳3週間後(6週間目)においては、対照群と差異は無くなって

いた。脾臓中の T 細胞サブセットの組成を調べた結果、哺乳期間終了後(3週間目)には 15 ppm, 50 ppm 投与群とも CD4, CD8 陽性細胞の減少が認められた。しかし、離乳3週間後(6週間目)では CD8 陽性細胞の減少が有意であった(Fig5)。脾臓細胞中のマクロファージと NK 細胞への TBT の影響は Fig6 に示したように NK 細胞の減少が顕著であった。哺乳期間終了後(3週間目)では 50ppm の群のみで見られたが離乳3週間後(6週間目)では 15 ppm, 50 ppm 投与のいずれの群において認められた。

これらの結果から、TBT に暴露された母親から産まれた仔の免疫担当細胞のポピュレーションは、対照群のそれと比べて胸腺での CD8 陽性細胞、脾臓での T細胞および NK 細胞が減少していたことがわかった。さらにこれらの影響は TBT 暴露を受けなくなった後(離乳後3週間後)にも認められた。

#### D. 考察

脂溶性有害化学物質はその蓄積性から、暴露された個体への影響だけでなく胎盤、母乳を介しての次世代への影響も検討していかななくてはならない。本研究では生体防衛機構の未発達である胎児や乳児の期間に母親が TBT の暴露を受けたことを想定し、実験を行なった。その結果母親が 15 ppm 以上の TBT によって暴露された場合、胎盤や母乳を介して次世代へ免疫影響があることが明らかになった。免疫担当細胞の中でこの影響を最も受けやすいのは T 細胞と NK 細胞と考えられた。これらの細胞は細胞性免疫を担う重要な生体防衛担当細胞であるため、TBT 暴露によって感染症やがんに対す

る抵抗性が低下する可能性が強いことが考えられた。なお TBT は極めて低濃度ではあるが母乳によって乳児に移行することが本研究によって明らかになったことから、乳児では低濃度で免疫影響が発現することが示唆された。

さらに哺乳期間が終了した後3週間を TBT の含まれていない飲水により飼育を続けた結果、乳児期に被った免疫影響に対して回復は認められなかった。このことは、TBT の免疫毒性は一過性ではなく持続する可能性があることを示唆するものである。今後、このような影響の出る最小の濃度を詳細に検討する必要がある。

#### E. 結論

TBT の胎盤および母乳を介して暴露された次世代への免疫影響をラットを用いて検討した。母親に 15ppm および 50 ppm の TBT を投与した群から、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞の減少が見られた。これらの影響が胎盤を介するものなのか、母乳を介するものなのか両者なのかは今後の検討が必要であるが、母乳中に含まれている微量な TBT も免疫毒性を引き起こす可能性があることは明らかになった。

#### G. 研究発表

なし

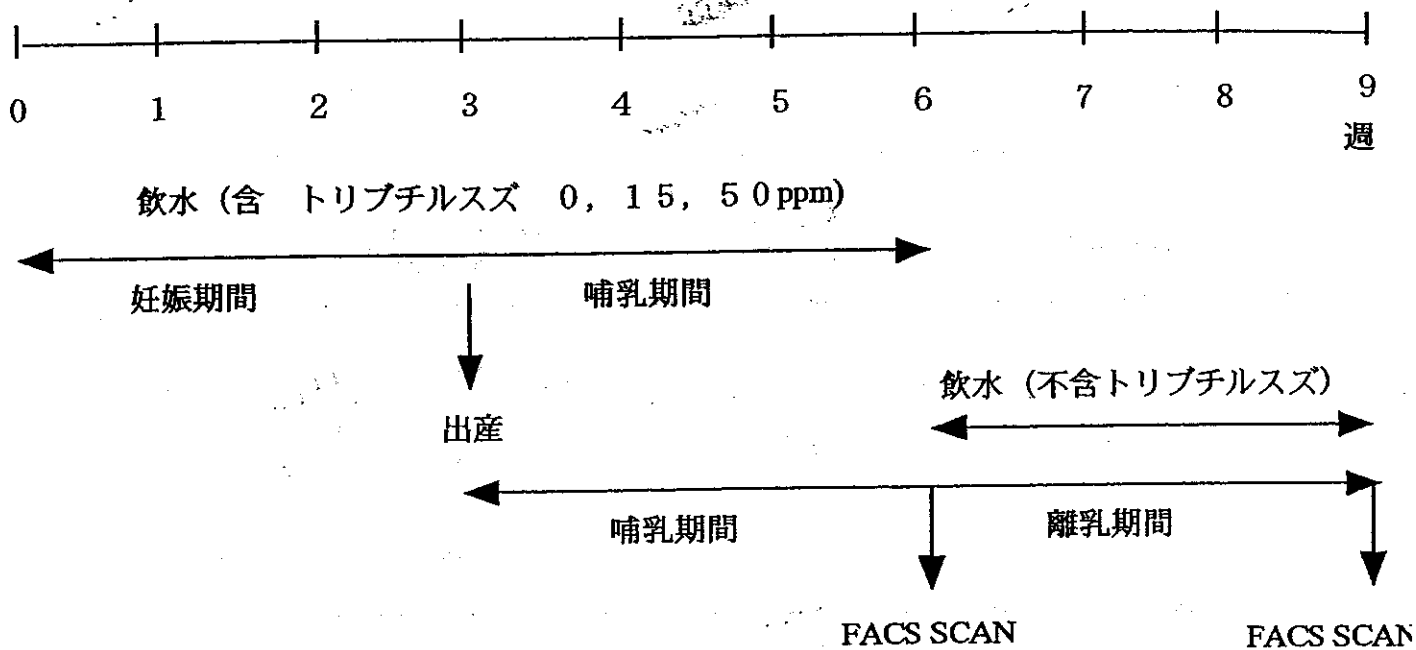


Fig.1 トリブチルスズの投与スケジュール

Table I. 母親の乳に移行したトリブチルスズ含量

採取週令	母親への 投与量	検出量 (ppm) (100g中)
0	0	<0.03
	15	<0.03
	50	0.04
1	0	<0.03
	15	<0.03
	50	0.03
2	0	<0.03
	15	<0.03
	50	0.04

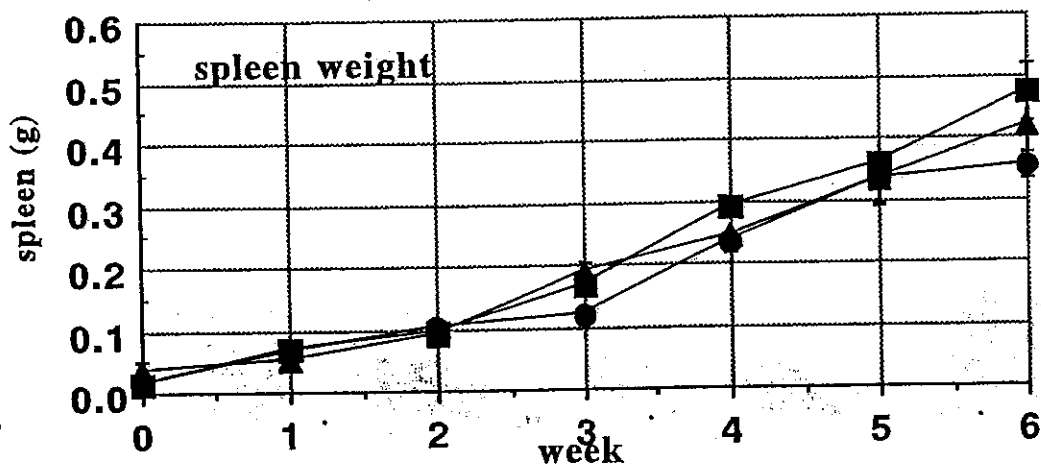
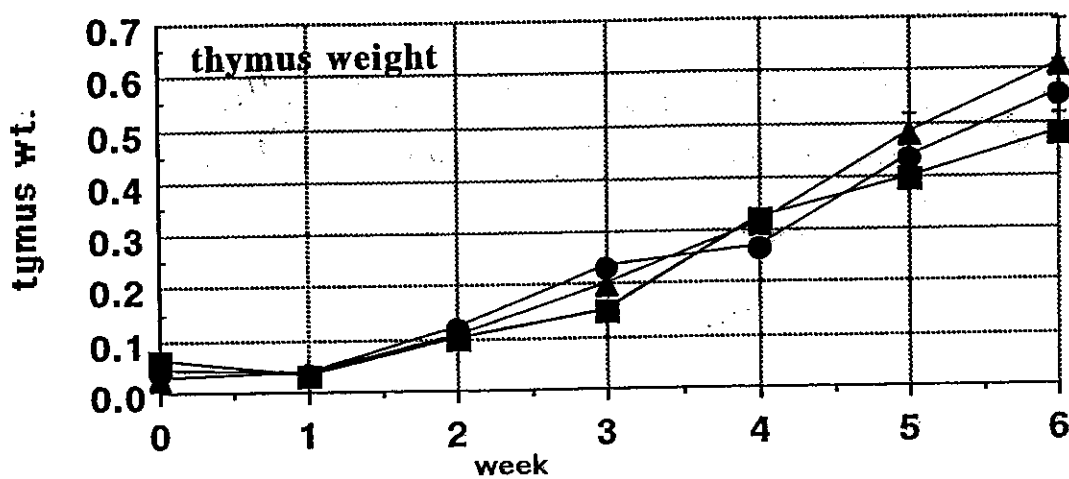
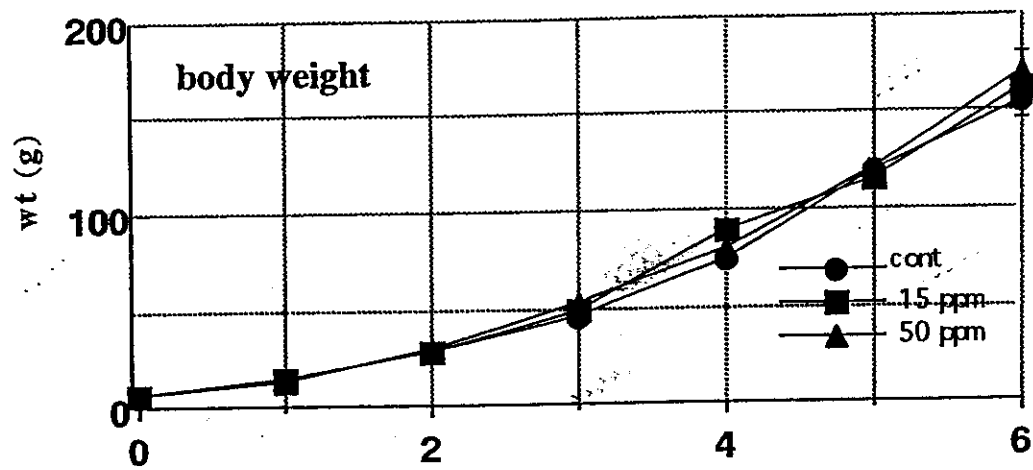


Fig.2 トリブチルスズ投与の母親から生まれた仔の体重、胸腺および脾臓の重量

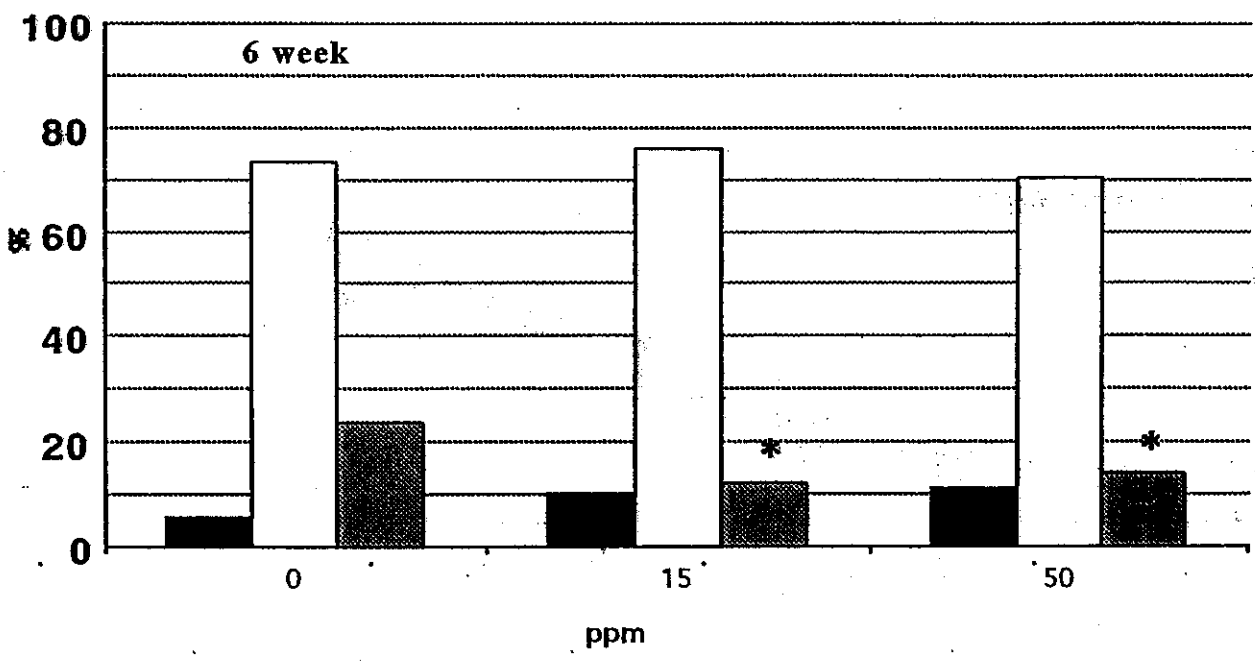
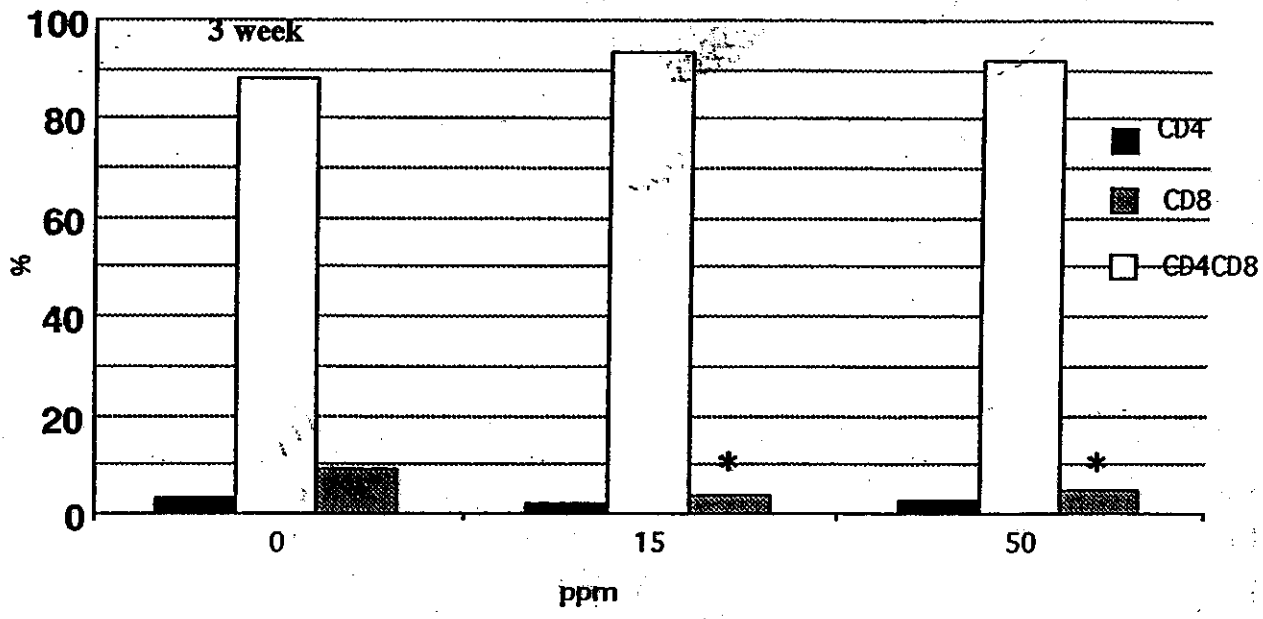


Fig.3 トリphenylsulfide投与の母親から生まれた仔の胸腺におけるCD4陽性,CD4CD8陽性およびCD8陽性T細胞のポピュレーションの変化

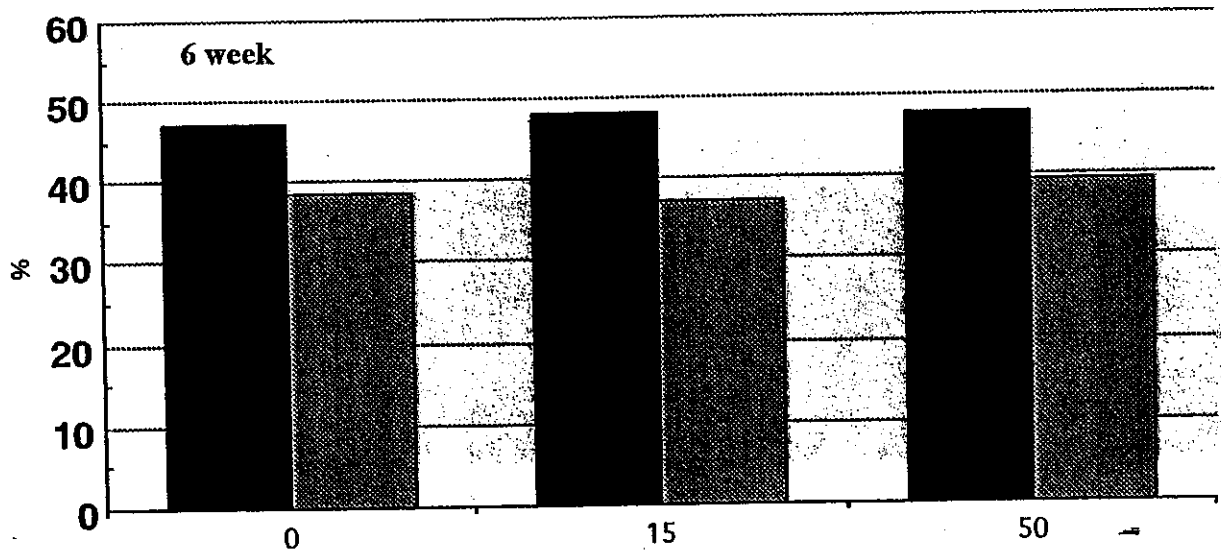
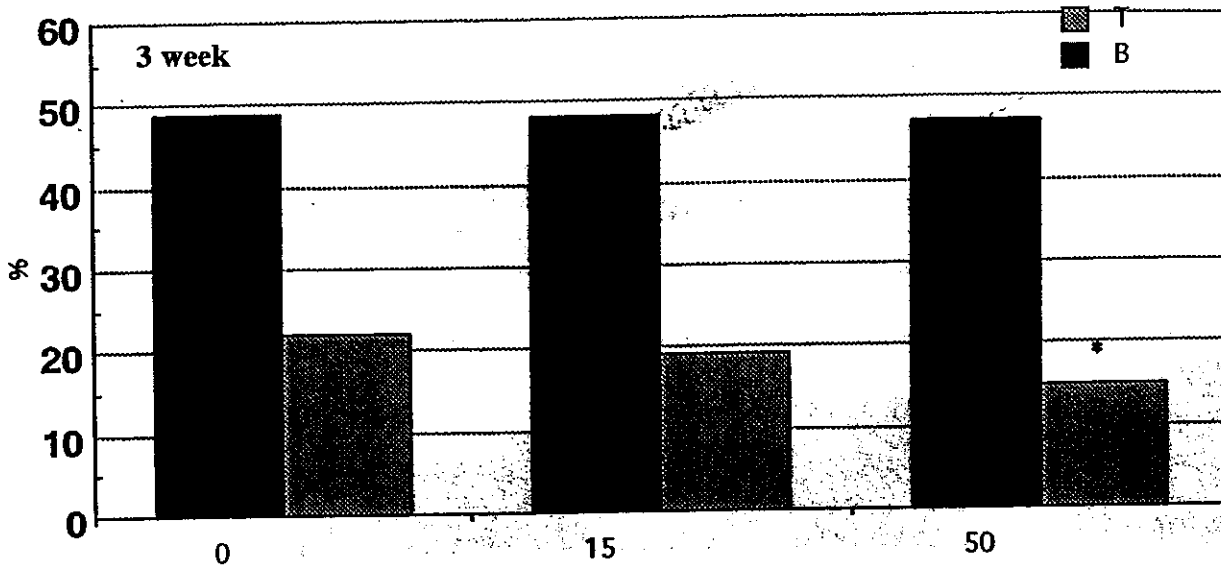


Fig. 4 トリブチルスズ投与の母親から産まれた仔の脾臓中のT細胞とB細胞のポピュレーションの変化



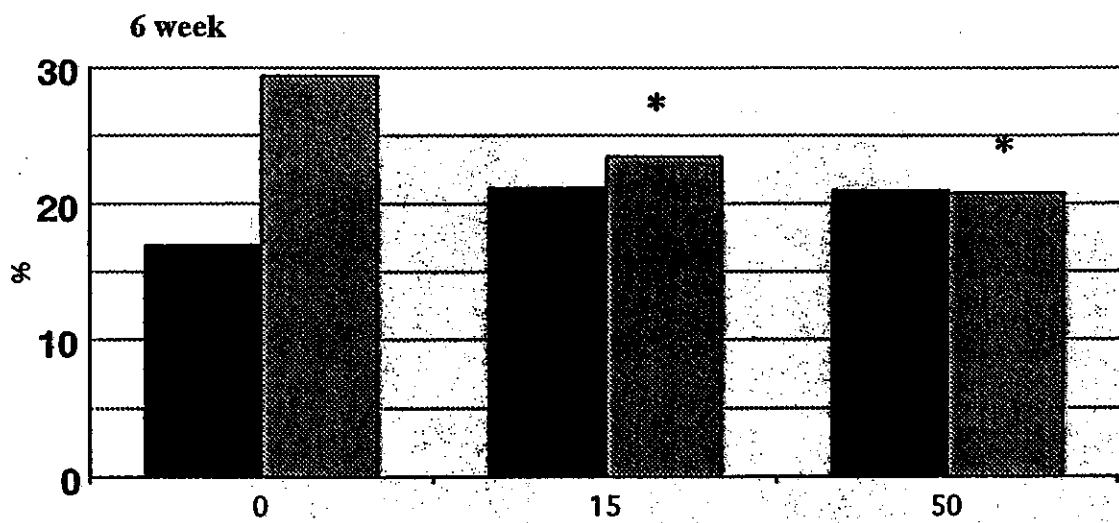
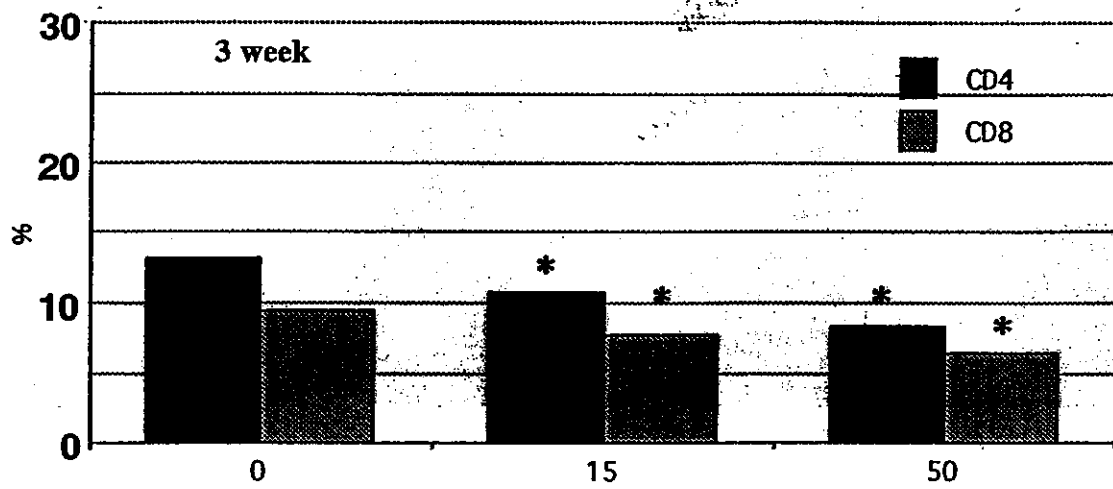


Fig.5 トリブチルスズ投与の母親から生まれた仔の脾臓中の免疫細胞のポピュレーションの変化

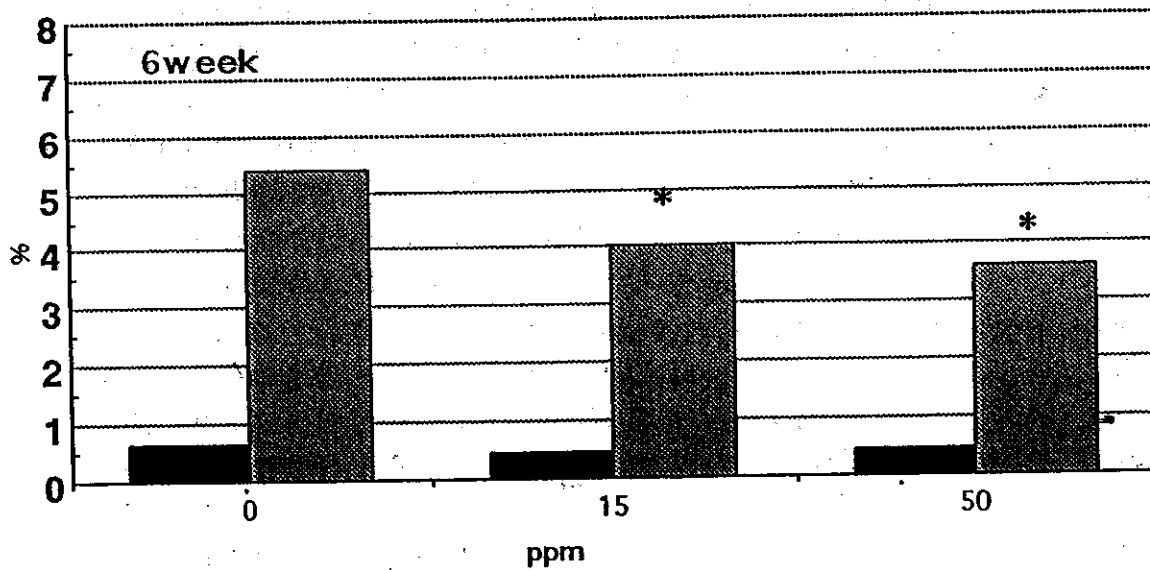
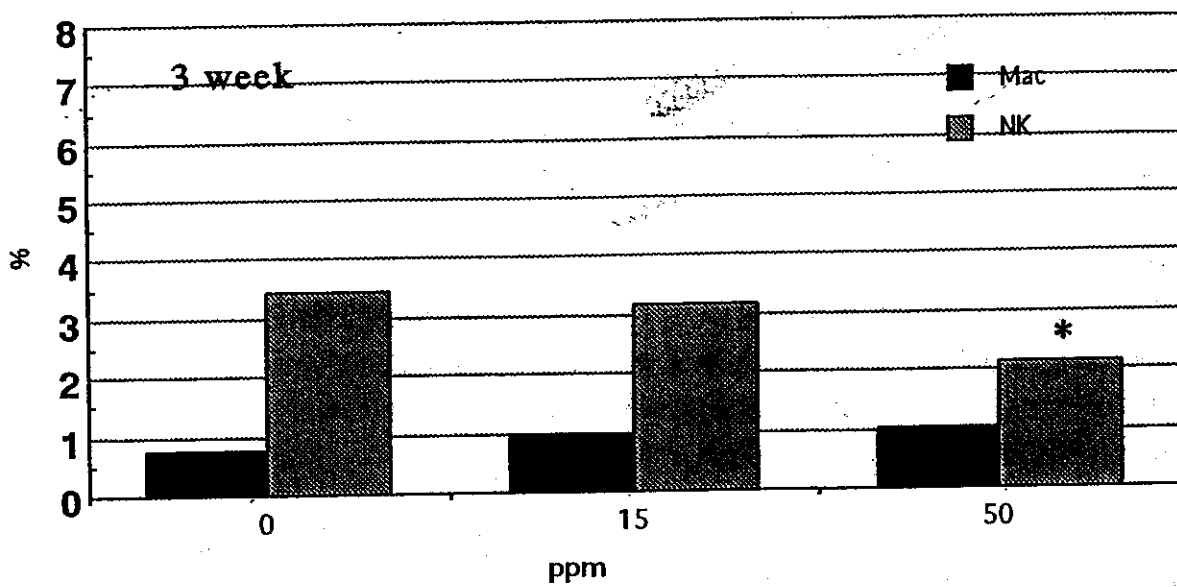


Fig.6 トリブチルスズ投与の母親から生まれた仔の脾臓中のマクロファージおよびNK細胞のポピュレーションの変化

厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究事業)

分担研究報告書

トリブチルスズの次世代への免疫毒性に関する研究 (2)

分担研究者 小西 良子 国立感染症研究所 食品衛生微生物部

協力研究者 阪本晴彦

香川医科大学第二病理学

研究要旨

妊娠ラットにトリブチルスズを投与し、その子供の胸腺、脾臓における apoptosis に陥った細胞の数、分布を TUNEL 法により調べた。その結果トリブチルスズは経胎盤的に胎児に影響を与え、胸腺のアポトーシスを抑制する可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

妊娠中に摂取したトリブチルスズ (TBT) が子供の免疫機能にどのような影響を与えるかを、ラットを使って子供の免疫臓器 (胸腺、脾臓) の組織学的検索により調べることにした。

B. 研究方法

材料：妊娠時より出産後 6 週目まで飲水中に TBT (0、15、50 ppm) を加え飼育した母ラットから生まれた子ラットを生後、一週毎に 2 匹ずつ 6 週まで屠殺し、胸腺および脾臓を摘出した。これらの臓器は緩衝ホルマリンにて固定しパラフィン切片を作成した。

Apoptosis 細胞の検索：ApopTag peroxidase in situ apoptosis detection kit (Intergen) を使用し TUNEL 法により apoptosis 細胞を染色し光学的顕微鏡により観察した。

免疫染色：Histofine (Nichirei) を使用し StrAviGen 法により免疫染色を行った。

一次抗体としては抗マウス Fas、家兎抗体 (Wako) および抗ラット Fas-L、家兎抗体 (Santa Cruz) をそれぞれ PBS に 200 倍希釈して使用した。なお、使用した抗マ

ウス Fas 抗体はラット Fas とも交叉反応を示す。

C. 研究結果

組織像の比較：通常のヘマトキシリン・エオジン染色では母ラットの TBT 摂取の有無にかかわらず組織像の違いは明らかでなかった。

Apoptosis の比較：胸腺では髄質周辺部に比較的多くの TUNEL 法陽性細胞が見られた (図 1)。この TUNEL 法で陽性の細胞は生後一週目のラットの胸腺髄質有核細胞 1000 個に対して TBT 無添加 (0 ppm) では 25 個、15 ppm、50 ppm 添加で 16 個にみられ TBT 添加群ではいずれも約 40% の低下が見られた。しかし、2 週目以後では TBT の添加の有無による差は明らかではなかった (図 2)。胸腺皮質では髄質に比べ TUNEL 法で陽性に染まる細胞は少数であったが、母ラットの TBT 投与により生後 1 週目では明らかな減少を示した (図 3)。

脾臓では白脾髄に比べ赤脾髄により多くの TUNEL 法陽性細胞がみられた (図 4)。1 週目の TBT 無添加 (0 ppm) では 1000 個中 32 個、15 ppm、50 ppm

添加ではそれぞれ20個、17個と約40%の陽性細胞の低下が見られた(図5)。白脾髄ではTBTの影響は明らかでなかった。

免疫染色の比較：胸腺ではFasおよびFas-L陽性細胞は殆ど見られなかった。これに対して脾臓では白脾髄に比べ赤脾髄により多くのFas陽性細胞が見られた。このFas陽性細胞は3週目以後白脾髄、赤脾髄のいずれにおいても激減した。また、母ラットへのTBTの添加は生後1、2週目のラットのFas陽性細胞数を20から75%増加させた(図6)。Fas-L陽性細胞は2週目、3週目の赤脾髄に出現(10/1000程度まで)したがTBT添加の有無による差は明らかでなかった(図7)。

#### D. 考察

以上の結果は母ラットへのTBT投与により子ラットの胸腺、脾臓では生後1週以内まではapoptosisの抑制が見られることを示している。また、胸腺、脾臓とも少なくともこの時期にはFasおよびFas-Lと

も陽性細胞が殆ど見られずapoptosisの出現やTBTによるapoptosisの減少にFas、Fas-Lは関与していないことが示唆された。また、TBTによる1週目のapoptosisの減少は経胎盤的なTBTの影響の可能性が高いが、母乳よりのTBTの影響は明らかではなかったと言える。生後は、外界からの影響も強く母乳由来のTBTの影響が見かけ上減弱した可能性も考えられる。

#### E. 結論

ラットにおいて妊娠開始日から飲水でTBTを与えられて生まれた仔の免疫臓器(胸腺、脾臓)の免疫担当細胞のポピュレーションに影響が見られることを見出している。そこで、これらの免疫臓器(胸腺、脾臓)を病理学的に検討した。TBTは経胎盤的に胎児に影響を与え、胸腺のアポトーシスを抑制する可能性があることが示唆された。