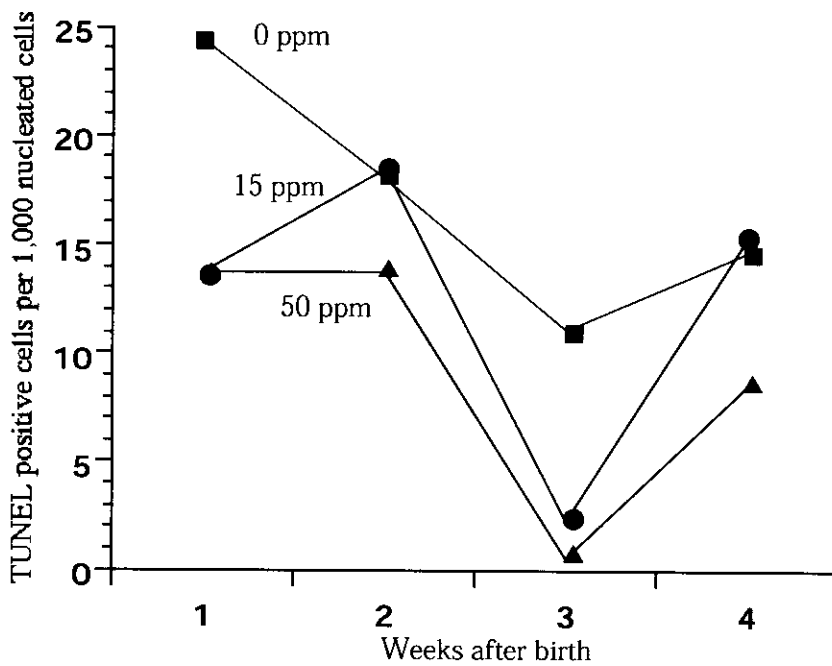
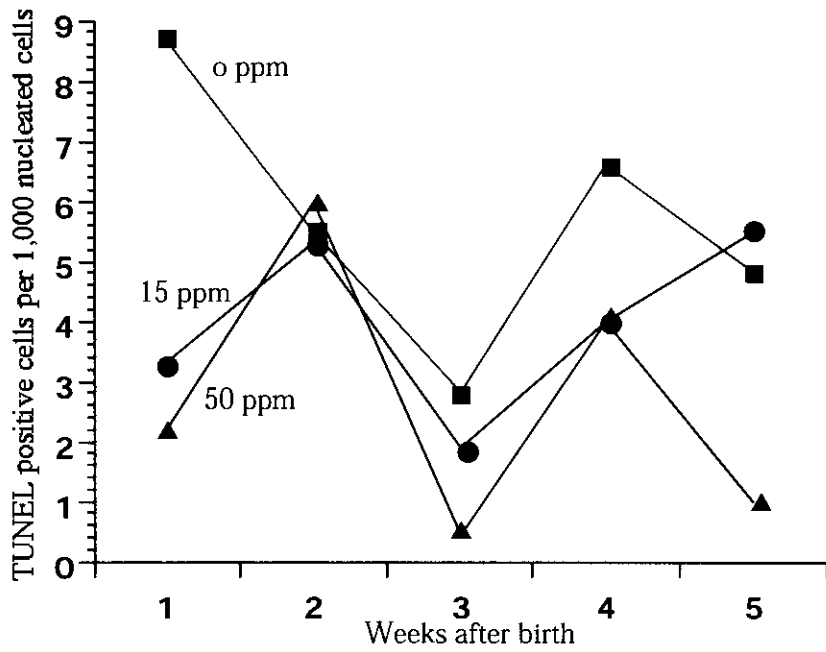


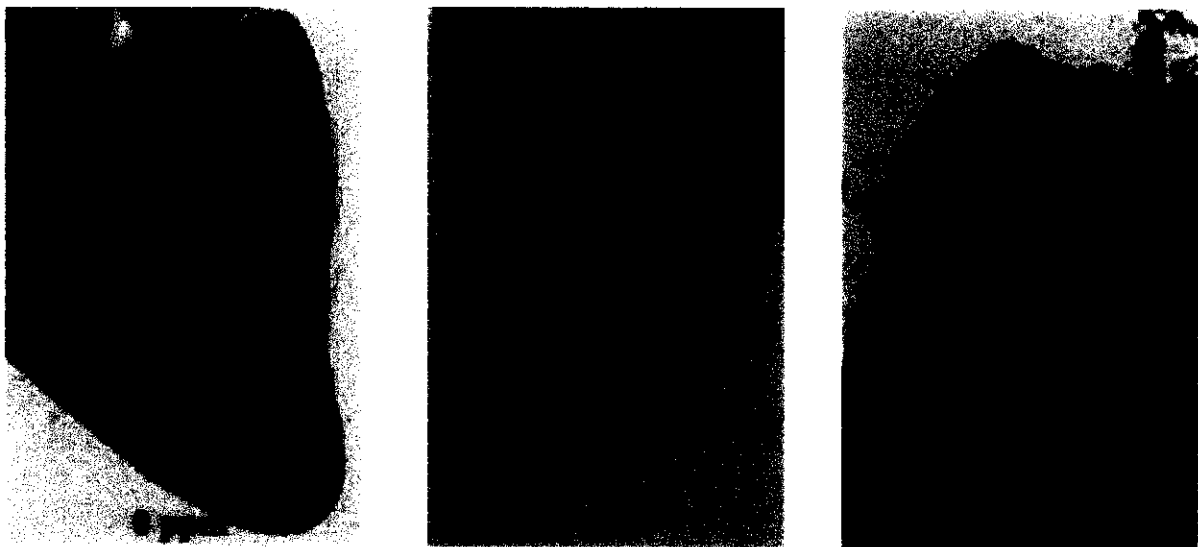
⊗ 1. Effects of administration of tributyltin to maternal rats on the number of apoptotic cells detected by the TUNEL technique in the thymus of new-born rats (1 week after birth).



⊗ 2. Effects of administration of tributyltin to maternal rats on the number of apoptotic cells (TUNEL) in the medulla of the thymus of new-born rats



⊗ 3. Effects of administration of tributyltin to maternal rats on the number of apoptotic cells (TUNEL) in the cortex of the thymus of new-born rats



⊗ 4. Effects of administration of tributyltin to maternal rats on the number of apoptotic cells detected by the TUNEL technique in the spleen of new-born rats (1 week after birth).

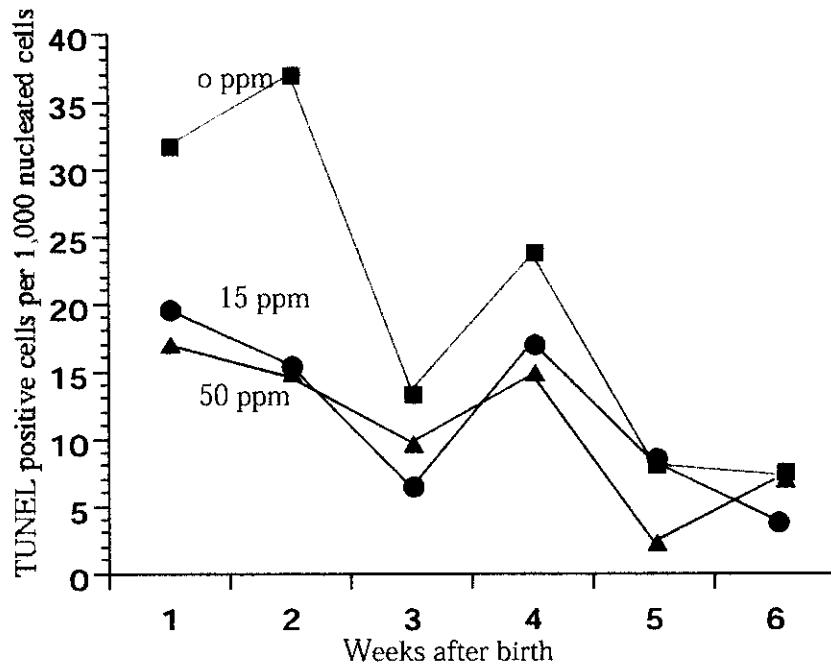


Fig 5. Effects of administration of tributyltin to maternal rats on the number of apoptotic cells (TUNEL) in the red pulp of the spleen of new-born rats

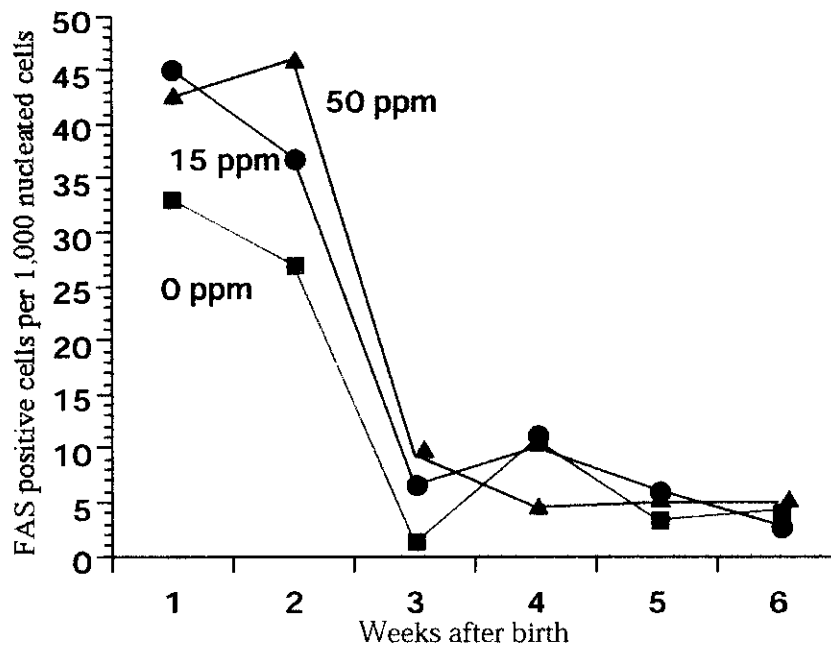
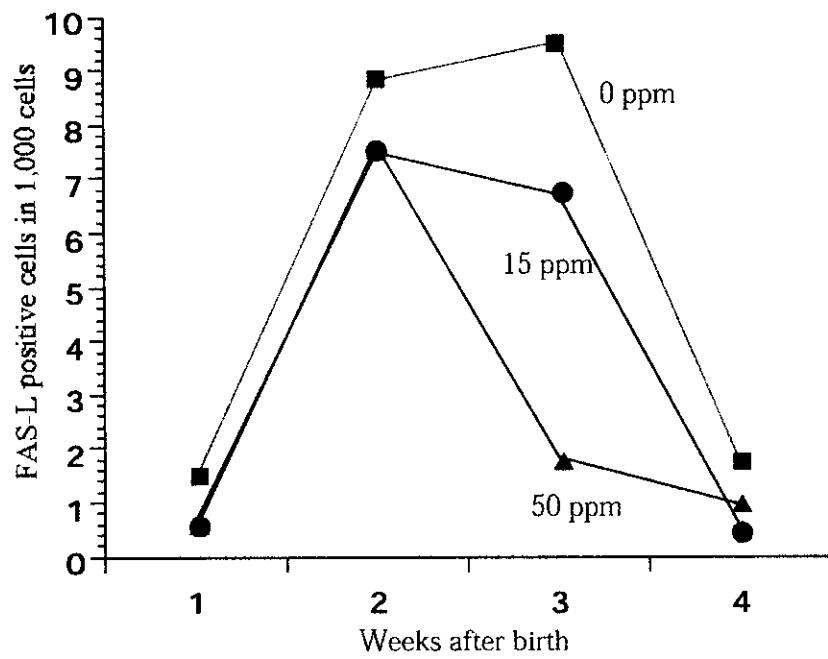


Fig 6. Effects of administration of tributyltin to maternal rats on the number of FAS positive cells in the red pulp of the spleen of new-born rats



☒ 7. Effects of administration of tributyltin to maternal rats on the number of FAS-L positive cells in the spleen of new-born rats

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細菌感染抵抗性に及ぼす研究

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 井上 智 国立感染症研究所 獣医科学部

研究要旨

トリブチルスズを母乳を介して暴露した乳児マウスを用いて、免疫機能への影響および細菌感染に対する宿主抵抗性を検討した。その結果、オスでは 15 ppm のトリブチルスズを与えた母親にほ乳された群において脾臓の T 細胞、マクロファージおよび NK 細胞の減少が認められたが、メスでは 50 ppm を与えた母親にほ乳された群で認められた。このことから雌雄の違いにより、次世代への免疫毒性の発現に有する暴露量に差があることが明らかになった。

A. 研究目的

我々はラットを用いたトリブチルスズ (TBT) の次世代への免疫毒性を検討し、胎盤および母乳を介して影響が出ることをすでに見いだしている。そこで本研究では TBT を母乳を介して暴露させ、免疫影響の有無と細菌感染症への抵抗性への影響をマウスを用いて検討した。

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。抗マウス CD4—FITC ラベル抗体、抗マウス CD 8a—PE ラベル抗体、抗マウス NK cell-PIA-FITC ラベル抗体および抗マウス MAC1 ビオチンラベル抗体はファージン社から購入した。

動物および感染実験：妊娠 16 日目の ICR マウスを日本 SLC(株)より購入し用いた。出産までは TBT を含まない飲水を与え、出産直後から母親に TBT を 0, 15, 50 ppm を含有した水を飲水として与えた。うまえた仔は生後 21 日間は母親からの哺乳で飼育し、哺乳期間終了時に雌雄それぞれ

一群 4 匹ずつ分け、 2×10^4 のリステリア菌 (Y1, 臨床分離株) を腹腔に感染させた。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、寒天培地上に塗抹し生菌数を測定した (Fig 1)。

リンパ球組成の測定：TBT を投与した母親から母乳を介して暴露された仔の脾臓および胸腺を生後 21 日後に摘出し、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 細胞サブセット、マクロファージ、NK 細胞の組成を測定した。0 ppm, 15 ppm 投与群で哺乳された仔は雌雄それぞれ 3 匹ずつ測定に用いたが 50 ppm 投与群では哺乳中に母親に食われた仔が多かったことからメス 2 匹のみ測定に用いた。

C. 研究結果

TBT を生後 21 日間母乳を介して暴露された仔における体重を Fig 2 に示した。オスでは TBT 投与による違いは認められなかったがメスにおいては母親に 15 ppm 投与した群ではやや増加が認められた。脾

臓の重量ではオスにおいては 15 ppm および 50 ppm 投与した母親にほ乳された群では対照群に比べやや増加している傾向があった。しかしメスにおいては違いは見られなかった (Fig.3)。胸腺の重量は 15 ppm および 50 ppm 投与した母親にほ乳された群のメスでは顕著に減少していた (Fig.4)。

リンパ球の組成への影響では、胸腺の CD4 陽性 T 細胞、CD4CD8 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の比率は対照群に比べオスでは違いは認められなかったが、メスでは 50 ppm 投与した母親にほ乳された群でやや CD8 陽性細胞の減少が見られた (Fig.5)。脾臓の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の比率は、15 ppm 投与した母親にほ乳された群のオス、50 ppm 投与した母親にほ乳された群のメスにおいて顕著な減少が認められた (Fig.6)。さらに同様な群でマクファージおよび NK 細胞の減少が見られた (Fig.7)。

我々はすでにマウスにおけるリステリア感染実験を確立しており、生後 21 日目のマウスに $2-5 \times 10^4$ の菌数を腹腔感染させると、正常な生体防御能を有している場合には 4 日目に脾臓ではほとんどのリステリア菌が排除され生菌数が検出限界以下になることを見いだしている¹⁾。そこで本研究でこの系を用いてリステリア感染実験を行なった。オスでは 15 ppm 投与した母親にほ乳された群において顕著に脾臓中のリステリア菌の生菌数が多かった。メスでは 50 ppm 投与した母親にほ乳された群においてリステリア菌が検出された。これらの結果から、TBT に暴露した母親から母乳を介して暴露されることによって次世代の仔の免疫系に影響がみとめられ、さらにリステリア菌への感染抵抗性も低下することが明らかになった。さらに TBT の

暴露量および雌雄によってその抵抗性に違いがあった。

D. 考察

我々は、TBT が胎盤經由および母乳經由で次世代の子供に免疫影響を与えることをすでに明らかにしている。ここではリステリア感染実験がすでに確立しているマウスの系を用いて母乳暴露による免疫影響と細菌感染に対する宿主抵抗性に及ぼす影響を検討した。母乳暴露の実験系は母親に既知の量の TBT を飲料水として投与し、その母乳で哺育した子供を用いることとした。母乳から移行する TBT の濃度は母親の摂取する量の 1000 分の 1 以下であることがラットを用いた我々の実験でわかっている。しかし、母乳を介した低濃度の暴露にもかかわらず、乳児には免疫影響とリステリア感染に対する抵抗性の低下が認められた。

リステリア症が乳児や幼児および老人に発症率の高い感染症であることを考慮に入れると、TBT のような免疫毒性のある脂溶性有害化学物質の暴露は、母乳を介する暴露においての乳児に対する影響を検討していくことが重要であると考えられる。

E. 結論

TBT に暴露された母親に哺育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。その結果、母親への暴露量および雌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。今後は乳に移行した TBT の正確な濃度を測定し、このような影響の出る暴露量を算定することが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) S. Inoue, K. Suzuki, T. Nakamura
and Y. Sugita-Konishi: The
immunoparameters for predicting the
effect of immunosuppressive agents
on host resistance to *Listeria* ,
submitted.

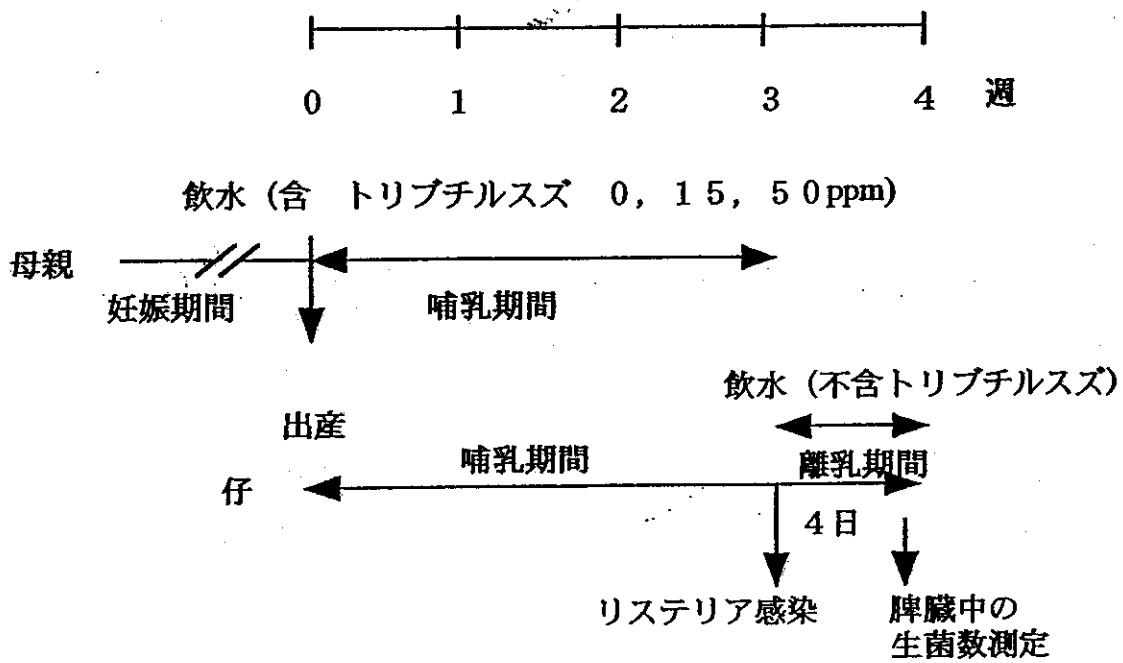


Fig.1 リステリア感染実験スケジュール

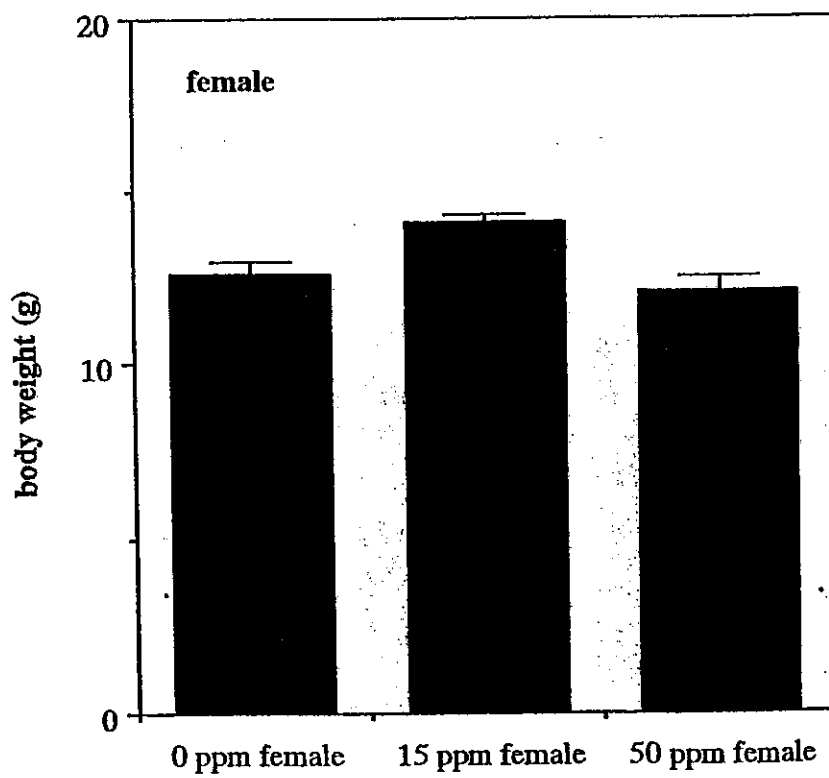
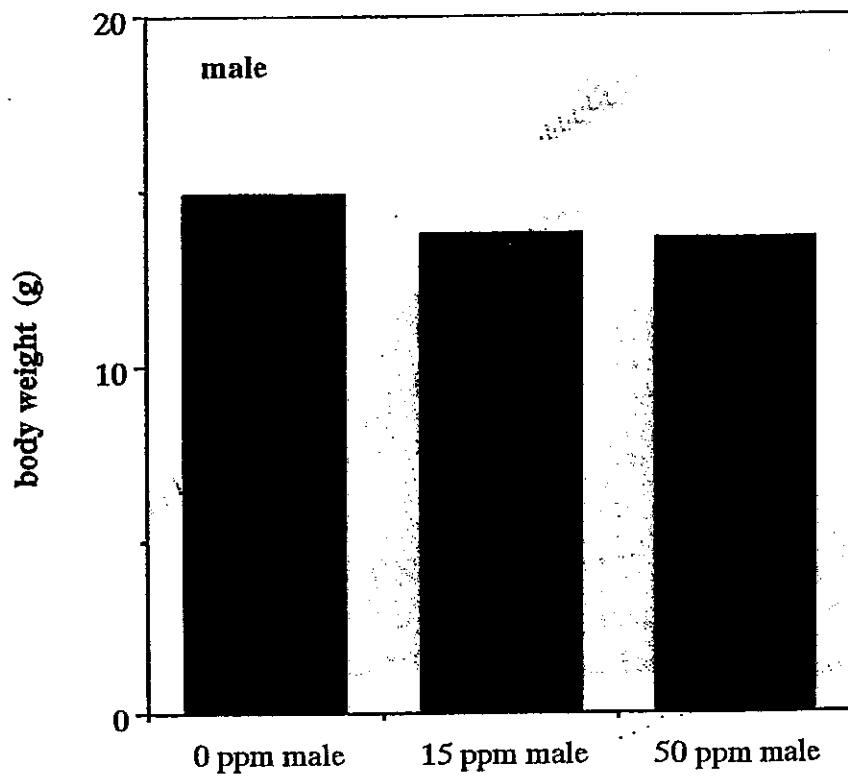


Fig. 2 トリブチルスズを母乳を介して暴露されたた仔の体重 (21日後)

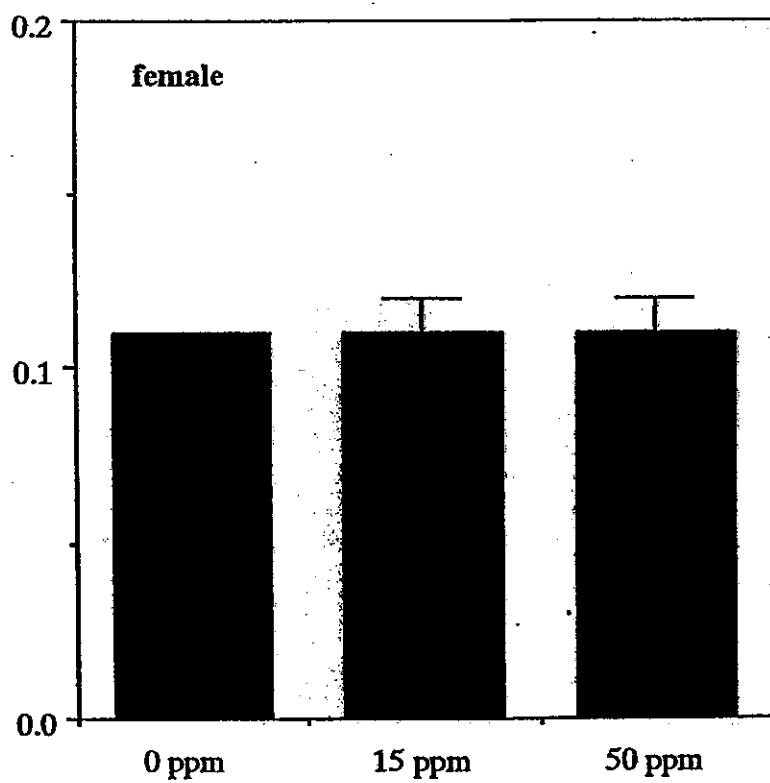
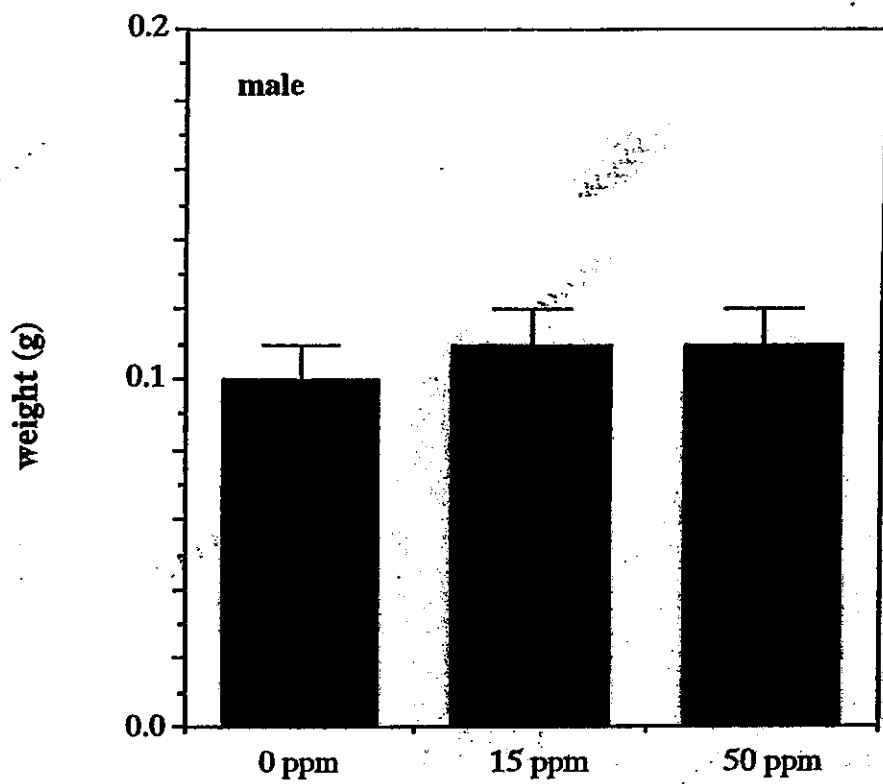


Fig. 3 トリブチルスズを母乳を介して暴露された仔の脾臓重量 (21日後)

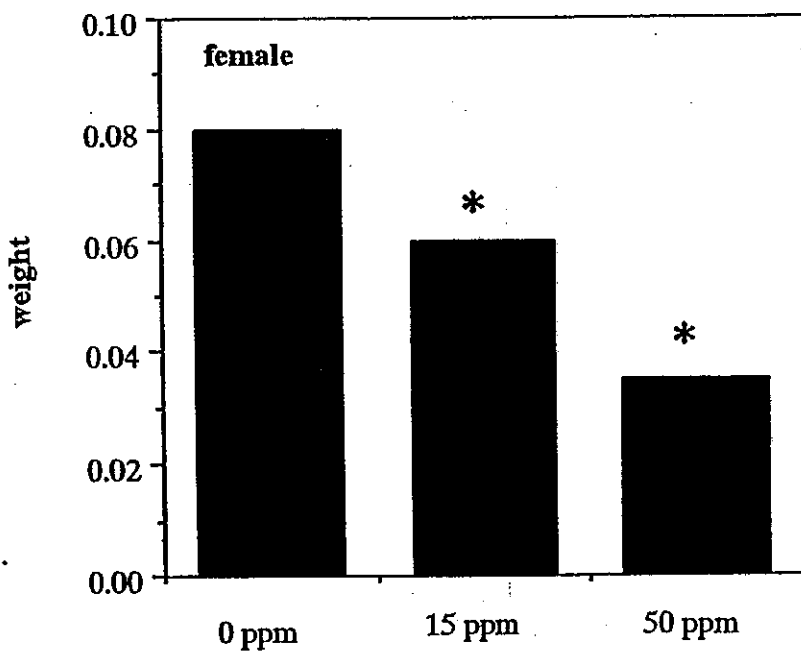
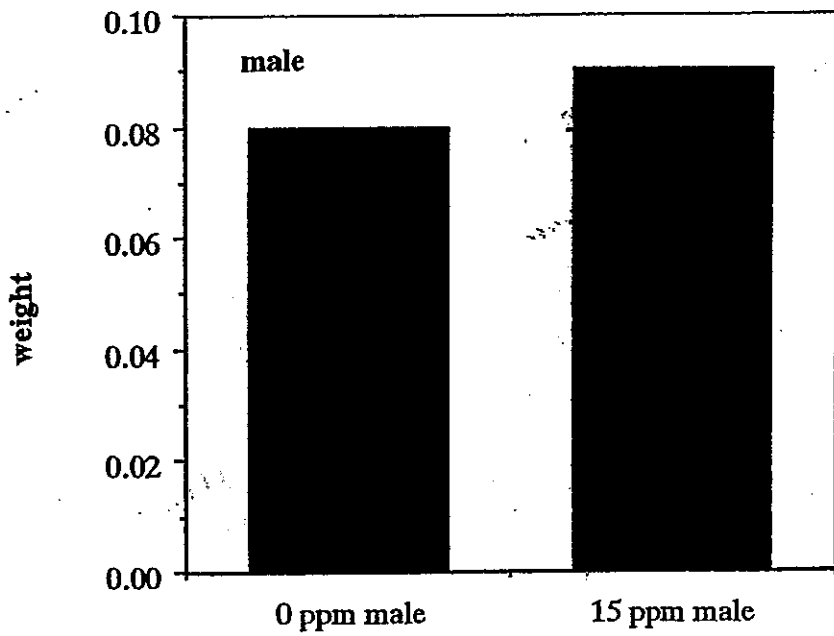


Fig.4 トリブチルスズを母乳を介して暴露された仔の胸腺重量 (21日後)

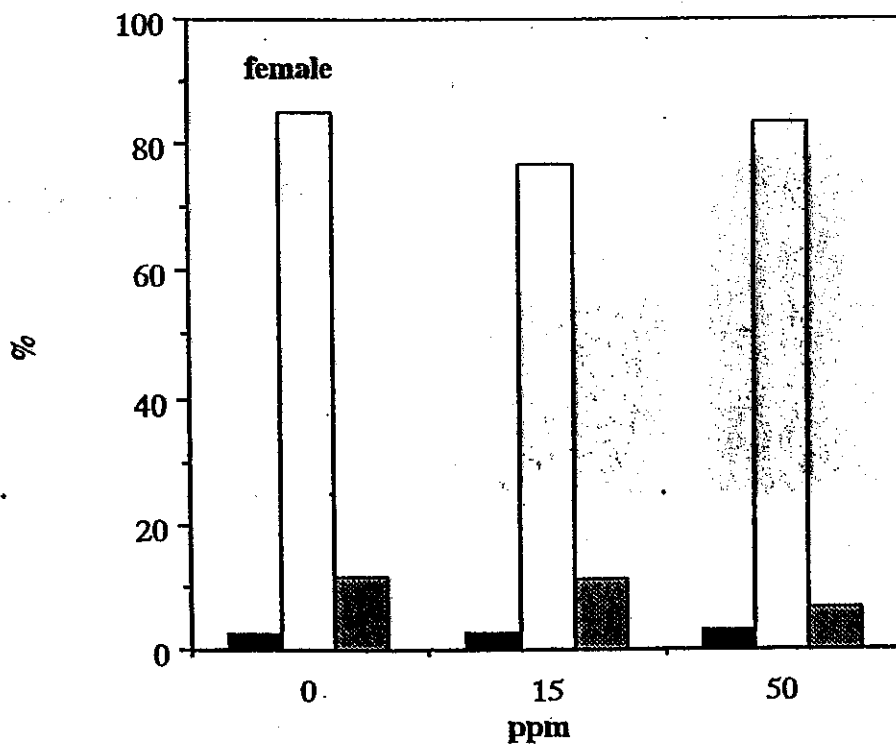
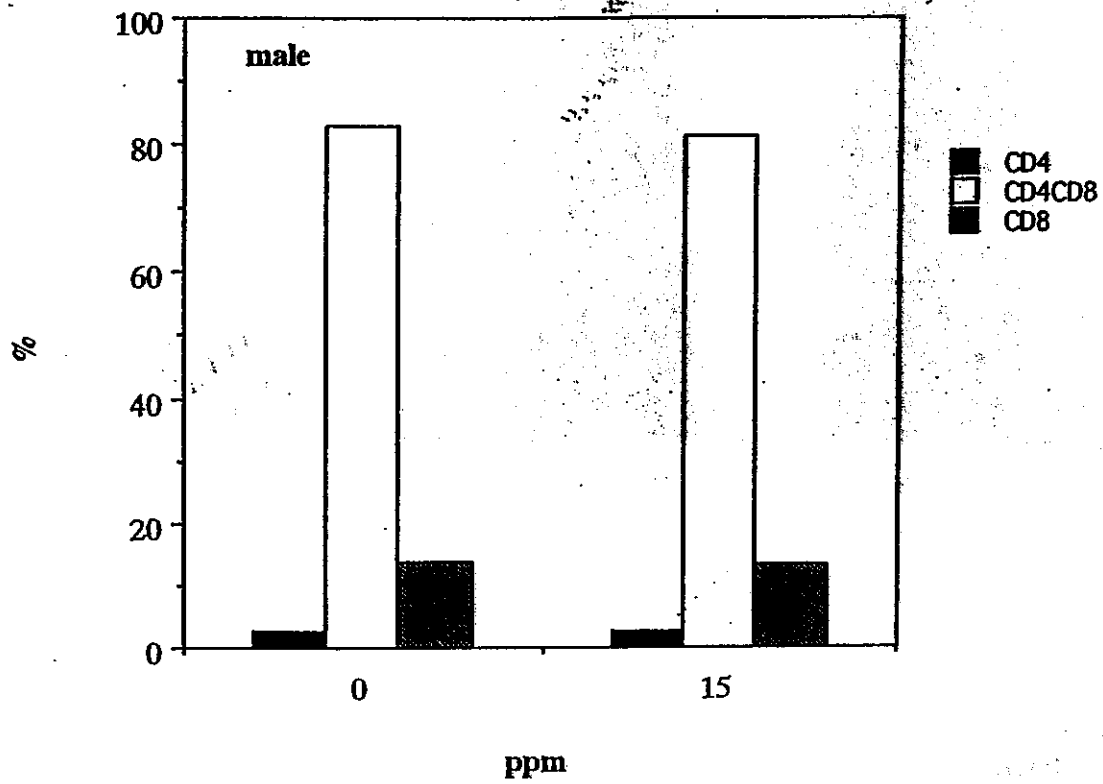


Fig.5 トリブチルスズを母乳を介して暴露された仔の胸腺の免疫細胞ポピュレーション (2.1日後)

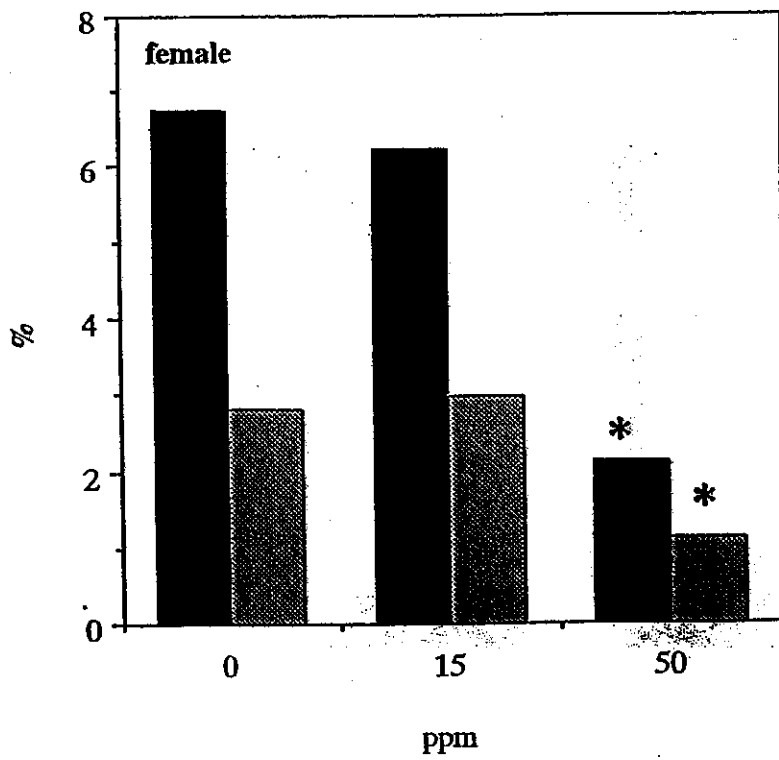
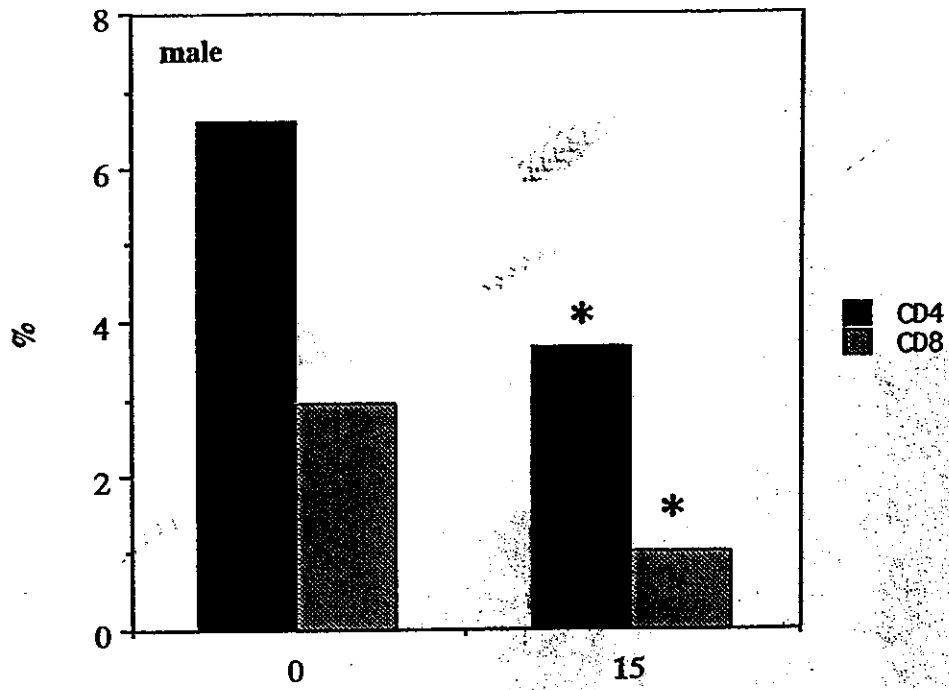


Fig 6. トリブチルスズを母乳を介して暴露された仔の脾臓の免疫細胞ポピュレーション (21日後)

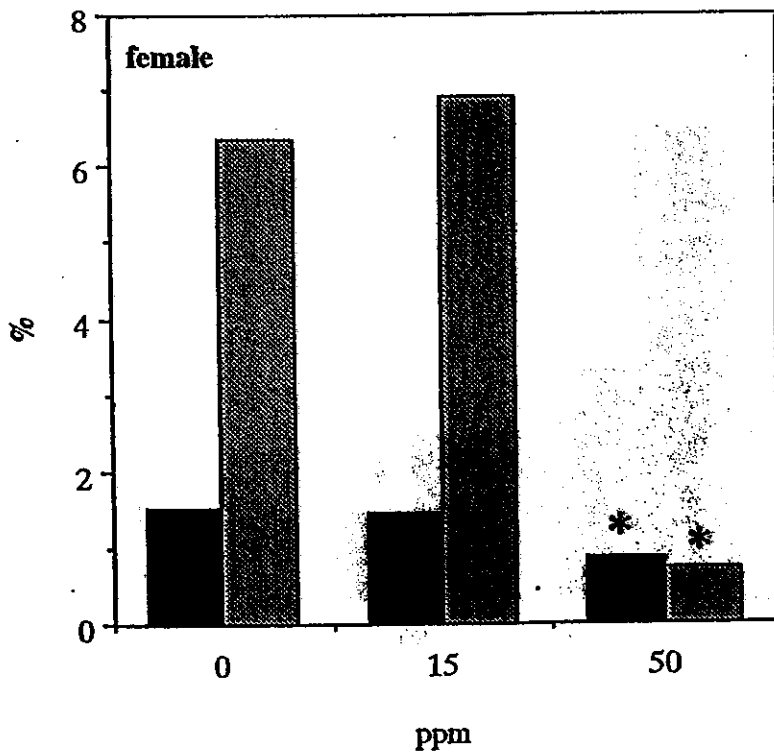
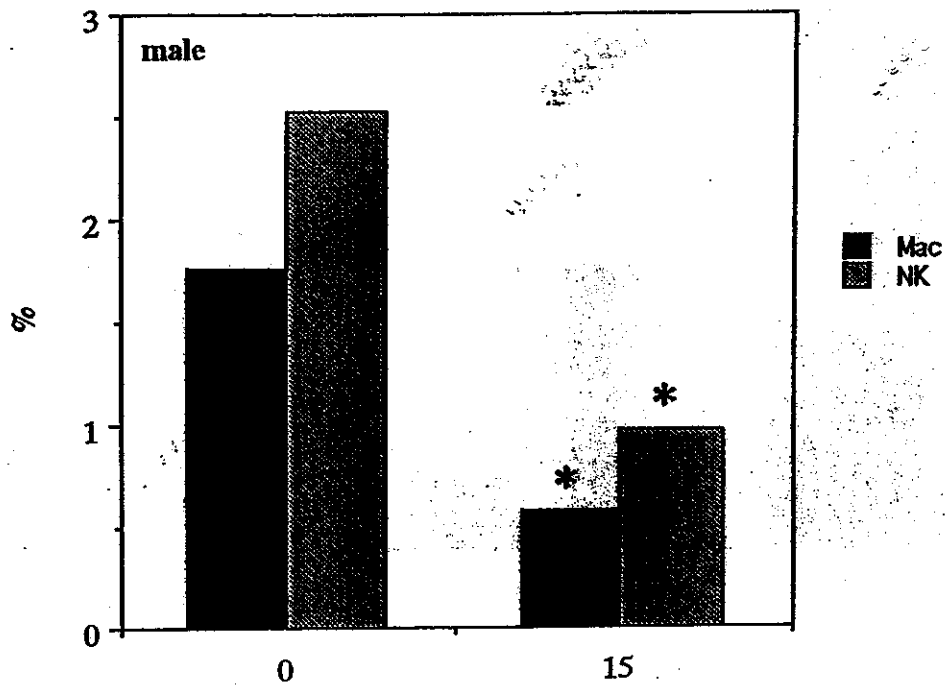


Fig. 7 トリブチルスズを母乳を介して暴露されたた仔の脾臓の免疫細胞ポピュレーション (21日後)

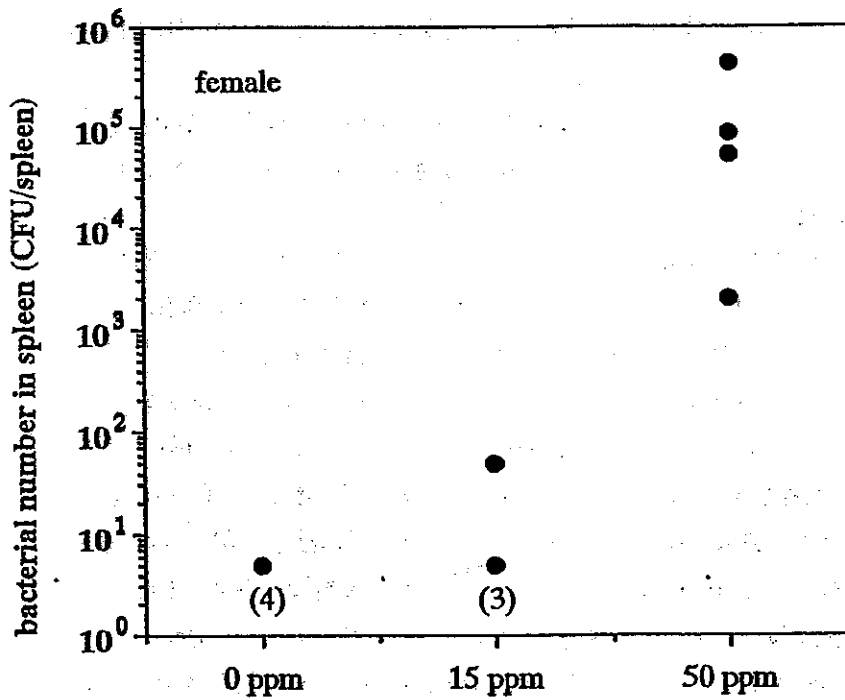
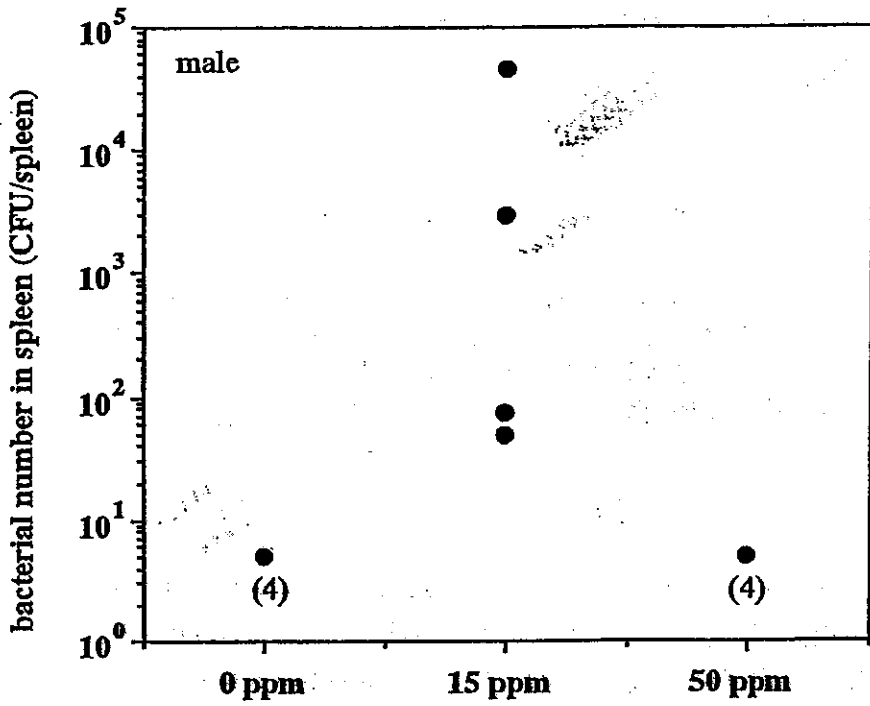


Fig. 8 トリブチルスズを母乳を介して暴露された仔の脾臓中のリステリアの菌数 (感染後4日目)

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

生活環境中の脂溶性化学物質の真菌抵抗性に及ぼす影響

分担研究者 杉浦 義紹 東京理科大学薬学部

研究要旨 環境汚染物質の中でトリブチルスズは魚介類を汚染し、それらを好む日本人にとってその影響を明らかにすることは健康評価において重要である。本研究ではマウスモデルを用いてトリブチルスズを母親から哺乳で摂取した子への真菌感染性を調べた。その結果、高濃度のトリブチルスズは子の真菌感受性を高める兆候を示す傾向があった。

A. 研究目的

新興および再興感染症の発生が近年頻発し、わが国ならびに諸外国で社会問題となっている。本研究では環境汚染化学物質のうち、脂溶性化学物質に曝露された母親から哺乳を介して仔にどのような影響を及ぼすかを検討するため、諸種の感染症の中から真菌感染に対する抵抗性を調べ、健康被害の評価に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

今年度はトリブチルスズを経口的に与えたマウス母親から生まれた仔マウスに真菌感染をした場合の影響を調べる目的で以下の(1)～(6)実験を行った。供試した真菌菌種は *Candida albicans* IF01594 (=ATCC 10231) を用いた。本菌株はヒト由来で、各種の抗真菌剤に感受性があり、また供試菌株としてすでにマウス感染の研究報告など実績があるので本研究に用いた。菌のマウス接種はすべて尾静脈投与で行った。接種後、感染の発症を経時的に観察し、必要に応じて解剖等を行った。

(1) *C. albicans* 感染による生体内の菌分布実験

BALB/c オス 5週齢 5匹に 2.69×10^4 blastoconidia/mouse の *C. albicans* を感染させ、5日目に解剖し、脳、腎臓、肝臓、脾臓を摘出して残存菌数の測定をした(出芽胞子の調製は2%グルコースのサブロー寒天斜面培地で18時間37℃培養後、生食5mlに懸濁した)。

(2) *C. albicans* 感染による臓器内残存菌数の確認実験

BALB/c オス 5週齢 15匹(1群3匹)に *C. albicans* を① 5×10^5 、② 5×10^4 、③ 5×10^3 、④ 5×10^2 、⑤ 5×10^1 CFU/mouse ずつ感染させ、5日目に腎臓、脾臓、肝臓、脳を摘出して残存菌数の測定した(出芽胞子の調製は(1)と同じ)。

(3) BALB/c 妊娠マウスへの感染実験

BALB/c 妊娠1日目マウス 9匹を3匹ずつ3群に分け、(1)精製水、(2)15 ppm 塩化トリブチルスズ水溶液、(3)50 ppm 塩化トリブチルスズ水溶液を与え、出産後、3週間後および5週間後に *C. albicans* 1×10^2 blastoconidia/mouse を感染させた。感染5日目に腎臓より菌を回収した。

(4) ホルモン影響薬剤の投与によるBALB/c マウスの真菌感受性実験

BALB/c 4 週令メスマウスにジエチルスチルベストロール (DES) 2mg とゼアレンノン (ZEN) 20mg を 5 日間皮下に連続投与し、7 日目に *C. albicans* 60 blastoconidia/mouse を感染させ、経過を観察し、5 日目に脾臓と腎臓での残存菌数を調べた。

(5) ICR マウスの真菌抵抗性の検討

3 週令 25 匹と 5 週令 25 匹 (計 50 匹) の ICR メスマウスを 5 匹ずつ週令ごと 5 群に分け、*C. albicans* を① 2×10^7 、② 2×10^6 、③ 2×10^5 、④ 2×10^4 、⑤ 2×10^3 blastoconidia/mouse ずつ接種し、経過を観察した。また ICR 3 週令のオスマウス 15 匹を同様に 5 匹ずつ 3 群に分け、①、②、および③の菌量を接種し、経過を観察した。

(6) ICR 妊娠マウスへの感染実験

ICR 妊娠 16 日目マウス 9 匹が出産した後、仔マウスを 3 群 (3 匹/群 各 33 匹ずつ) に分け、以下の水を飲ませた。(1) 精製水、(2) 15ppm 塩化トリブチルスズ水溶液、(3) 50ppm 塩化トリブチルスズ水溶液。仔マウス 3 週令目に雌雄を区分し、各群のオス 5 匹、メス 5 匹 (計 10 匹 \times 3) に *C. albicans* を 2.1×10^6 blastoconidia/mouse 感染させ、経過を観察した。親マウスにも 2.1×10^6 ずつ感染させ、接種後 11 日目に腎臓における残存菌数を計測した。5 週令目に 3 週令の時と同じように各群のオス 5 匹、メス 5 匹 (計 10 匹 \times 3) に 1×10^6 blastoconidia/mouse を感染させた。

(倫理面への配慮)

感染実験は国立感染症研究所動物実験ガイドラインに基づいて行った。動物種としてマウスを用いたが、動物愛護上の配慮を行い、できる限りマウスに苦痛を与えない

方法で実験を遂行した。

C. 研究結果

今回行った (1) ~ (6) の実験結果は以下の通りとなった。

(1) の結果：5 匹のマウスの脳、腎臓、肝臓、脾臓から菌を回収したところ、表 1 に見られるように肝臓の菌残存性が最も高く、それ以外はほぼ同じ菌の分布が認められ、*C. albicans* は生体内臓器に幅広く侵入することが判明した。

(2) の結果：表 2 に示した通り、*C. albicans* の接種量が 50 ~ 500,000 blastoconidia/mouse の場合、500 以下では速やかに接種した真菌が体内から除去されるのに対し、500,000 では調べた脳、腎臓、脾臓のうち腎臓での残存性が高く、若干実験誤差があるが、5,000 から 500,000 の間がほぼ 10 倍ずつの割合で残存性が示された。

(3) の結果：仔マウスは 1 匹のコントロールマウスのみで 6 匹生まれ (数日後、1 匹食われる)、他のマウスは流産した。流産した母マウス 8 匹に *C. albicans* 1×10^6 blastoconidia/mouse を接種した。腎臓より菌を回収したところ、50 ppm スズを飲ませたマウスが最も菌の回収 (約 300 ぐらい) が少なく、コントロールが一番多かった (1000 以上)。また、実験中に生まれた BALB/c 仔マウス 5 週令に 2.1×10^6 の真菌を感染させた (オス 2 匹、メス 3 匹)。18 日目を経過したがまだ死亡は認められない。

(4) の結果：ZEN、コントロール、DES の順で回収菌数が減少し、リステリア菌感染とは異なった結果となった。しかしなが

ら、本実験は流産した母マウスに行われたので、マウスの生理的状态やホルモンバランスが通常のマウスと異なることが推測されるので、今回の結果から結論を導き出すのは早計である。

(5)の結果：本実験はまだマウスへの真菌感染を観察中であるが、ICR メスマウスについては図1および2で示した通り 2×10^7 および 2×10^6 blastoconidia/mouse 投与群で 25 日間観察中にマウスの死亡が認められたが、それ以外では外見上感染を示す兆候は認められなかった。

(6)の結果：本実験もまだ真菌感染の影響を観察中であるが、3 週令マウスにおいて母親に 50ppm スズを飲ませ、乳として与えたマウスに真菌接種後 18 日目においてメスマウスの死亡が認められた。しかしながら、15ppm 投与群ではオスマウスの方がメスマウスより真菌に対して感受性を示し、濃度の異なるスズに対して相反する結果が得られたことから、雌雄マウスへのスズ接種の影響に関してはまだどちらのマウス群が真菌に対する感受性があるかは現時点では判別できない。

D. 考察

脂溶性化学物質の一つである塩化トリブチルスズを飲料水として摂取した母親から哺乳を介して仔にどのような影響を及ぼすかを検討するため、主要な真菌感染菌である *C. albicans* を感染させ、本菌に対する仔マウスの抵抗性を調べた。BALB/c 系マウスを用いて、真菌接種後の菌の臓器内分布を調べたところ、*C. albicans* の侵入はすべての臓器に生じることがわかり、その残存性は投与量に依存していた。しかしな

がら、真菌症発症までにかかり日数が必要なこともあり、臓器内での残存性を考慮して $1 \sim 2 \times 10^6$ blastoconidia の接種が適当であった。妊娠 BALB/c 系マウスは仔マウスの出産数が少なく、仔マウスの成長数(途中で母マウスが仔マウスを食べてしまう)が少ないため、本研究の続行が難しく、実験マウス種を BALB/c 系から ICR 系へ変更した。実験(5)および(6)で示される通り、ICR 系マウスは仔マウスの出産数および成長数が塩化トリブチルスズ投与実験に適した。現在塩化トリブチルスズ投与による影響の観察を継続中であるが、スズ摂取群のマウスに真菌への感受性が認められる傾向にある。

E. 結論

環境汚染化学物質のうち、脂溶性化学物質に曝露された母親から哺乳を介して仔にどのような影響を及ぼすかは非常に重要な課題であるが、今年度の研究から ICR 系マウスを用いて母マウスに脂溶性化学物質を摂取させることが出来、生まれた仔マウスへ真菌を接種することでその抵抗性や感受性などを検討できるモデルが確立された。現在得られた実験結果はまだ少数例であるため、今後さらに実験マウス数を増やすことで一定の成果が十分に期待できる。

表 1

Survival of *Candida albicans* IFO1594 in organs on day 5 after i.v. injection with 5 different inoculum doses in BALB/c male mice

Inoculum dose (blastoconidia/mouse)	Brain (cerebrum)	Kidney		Spleen	
		Left	Right	CFU	CFU
5×10	0	0	<1	0	0
5×10^2	<1	<1	<1	2	2
5×10^3	22	16	10	12	12
5×10^4	99	1228	283	215	215
5×10^5	501	1238	1175	1092	1092

BALB/c mice: Three 5-weeks-old male mice/group
Potato dextrose agar medium (48hrs 37°C incubation)

表 2

Survival of *Candida albicans* IFO1594 in organs on day 5 after i.v. injection in BALB/c male mice

No. mouse	Brain (cerebrum)	Kidney		Liver	Spleen
		Left	Right		
	CFU	CFU	CFU	CFU	CFU
1	213	83	75	2454	205
2	90	228	63	2268	125
3	233	48	83	2356	183
4	118	75	93	3077	253
5	235	60	100	3469	133
Av.	178	99	83	2724	180

BALB/c mice: 5-weeks-old male
Inoculum size: 2.69×10^4 blastoconidia/mouse of *C. albicans* IFO1594
Sabouraud medium containing 2% glucose (48hrs 37°C incubation)

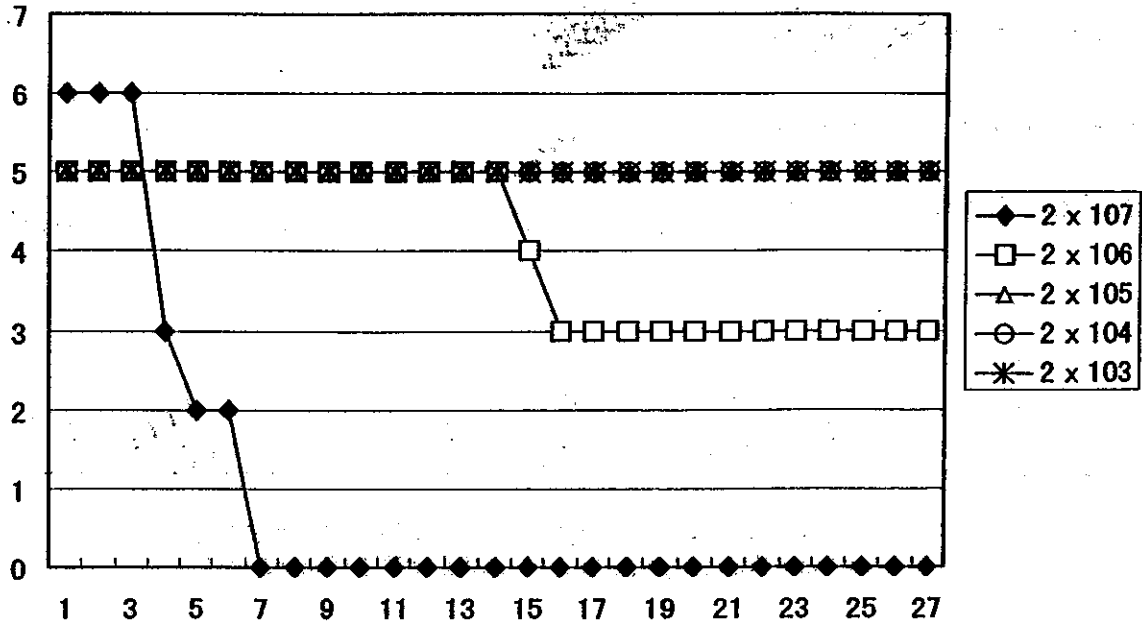


図1 ICR 3週令メスマウスの生存曲線

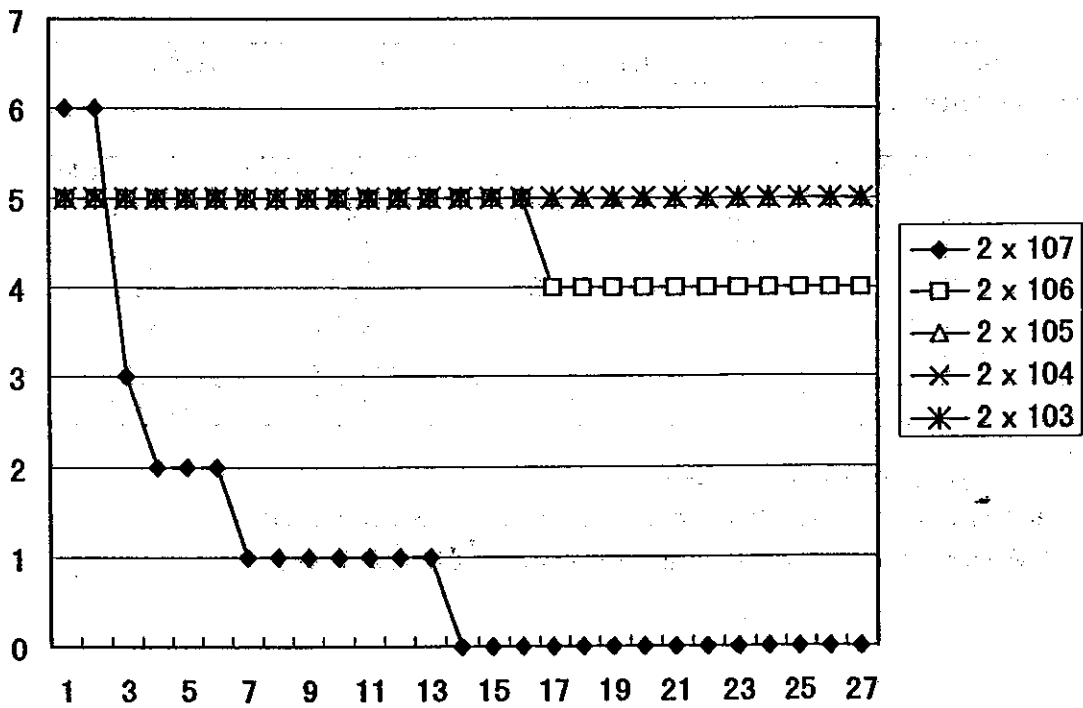


図2 ICR 5週令メスマウスの生存曲線