

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抵抗性に及ぼす影響

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小西良子

平成14（2002）年 3月

研究班 構成

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 食品毒素室長)

分担研究者 天野富美夫 (大阪薬科大学薬学部 教授)
清水 誠 (東京大学農学部 教授)
杉浦 義紹 (神戸市環境保健衛生研究所 副部長)
向井鏖三郎 (国立感染症研究所 筑波霊長類センター室長)

協力研究者 田村 慎一 (国立感染症研究所 感染病理部 室長)
阪本 晴彦 (香川医科大学 医学部 教授)
三浦 克洋 (動物衛生研究所 安全性部 部長)
鈴木 嘉彦 (麻布大学 獣医学部 教授)
志村 純子 (麻布大学 獣医学部 講師)
鈴木 穂高 (国立感染症研究所 食品衛生微生物部)

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. トリブチルスズが次世代のナチュラルキラー細胞活性に及ぼす影響	11
小西良子	
2. トリブチルスズが次世代の脾臓及び胸腺がトーンに及ぼす影響	26
小西良子、阪本晴彦	
3. トリブチルスズが次世代の細菌およびウイルス感染抵抗性に及ぼす影響	32
小西良子、田村慎一	
4.トリブチルスズの粘膜免疫系への免疫毒性に関する影響	40
小西良子、鈴木穂高	
5.トリブチルスズの真菌感染抵抗性に及ぼす影響	46
杉浦義紹	
6. サルにおけるトリブチルスズの免疫毒性に関する研究	55
向井鑑三郎	
7. ダイキソンの次世代への細菌感染抵抗性に及ぼす影響	66
小西良子、三浦克洋	
8.ビスフェノール A による日和見感染抵抗性低下の機序に関する研究	73
小西良子、鈴木嘉彦	
9.潜伏型 HIV 感染実験とその評価	81
天野富美夫	

10.脂溶性化学物質のヒト腸管での吸収と毒性	89
清水 誠	
III 研究成果の刊行に関する一覧表	99
IV. その他	
研究班会議事録	103
付録 研究成果の刊行・別刷	

I 総括研究報告

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、長期間低濃度の暴露が引き起こす健康被害に対して早期に危険性を予測することが切望されている。しかしこれらの有害化学物質のリスク評価に必要な研究はほとんどなされていない。本研究は、生活環境の中でも主に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。本年度は、脂溶性化学物質のモデルとしてトリブチルスズおよびダイオキシンを用い、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次世代に対する影響をラットおよびマウスを用いて検討し、これらの暴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だし、感染抵抗性の指標になる免疫パラメーターの動向を検討した。さらにその抵抗性の低下の原因となる免疫細胞の解明を試みた。潜伏性感染を誘起するウイルスに対しての影響は、ヒト継代細胞を用いた系で明らかにした。また、食品や飲料水由来のルートで摂取された有害化学物質は腸管から吸収されると考えられていることから、腸管への影響を腸管の有する防御機構への影響を指標に検討した。実験動物は主にマウス、ラットを用いたがヒトに最も近いモデル系としてサルを用いて日本人で摂取量の高いトリブチルスズの長期間投与による免疫系に対する影響を検討した。

分担研究者名

天野富美夫（大坂薬科大学）

杉浦義紹（神戸環境保健研究所）

清水 誠（東京大学大学院）

向井鏖三郎（国立感染症研究所 つくば霊長類センター）

本研究の目的は次の2つである。

（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

（9）研究目的

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。

昨年度は、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て、感染抵抗性への影響を細菌感染症、真菌感染症に対する抵抗性を見るための基礎研究をおこなった。その結果から、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きており、魚介類への体内濃縮が懸念されているトリブチルスズが、ミルクを介してリステリア感染への抵抗性を減少させることが明らかになった。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。そこで本年度は、脂溶性有害化学物質のモデルとしてトリブチルスズ、ダイオキシン、ビスフェノール A に焦点を絞り、トリブチルスズおよびダイオキシンに関しては、母親の暴露が次世代の感染抵抗性にどのような影響を及ぼすかを詳細に検討した。さらにヒト潜伏性 HIV 感染への影響も明らかにした。ビスフェノール A は低蓄積性であることから、次世代への影響はあまり大きな問題にはならないため、暴露された生体に対しての感染抵抗性を非特異的防御機構に焦点を当て検討した。また、これらは、食品や飲料水を介して体内に吸収される化学物質であることから、吸収器官である腸管の防御システムに及ぼす影響をも検討した。

B. 研究方法

(1) 胎盤および母乳移行による TBT の次世代へ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, 5, 15, 50ppm) を含む飲水を出

産後離乳まで与え、NK 細胞活性を調べた。(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 5 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。昨年度行った研究では事例が少なかったことから今年度は確認実験をかねて、匹数を多くしておこなった。

(小西班)

(3) 母乳移行および胎盤移行の TBT のどちらが毒性に強く影響を与えるかを検討するためにこの影響を検討するために次の実験を行なった。トリブチルスズの投与方法は、胎盤経由および母乳経由の 2 通りで行った。胎盤経由での暴露群は妊娠 1 日目から出産前日までトリブチルスズを 0, 5, 15, 50 ppm を含む飲料水を与えた。新生児はトリブチルスズを投与していない里親に移し、その後もトリブチルスズを含まない飲料水を与えた。母乳経由での暴露群では出産当日から 17 日間トリブチルスズを 0, 5, 15, 50 ppm を含む飲料水を与えた。) リステリア感染実験は新生児が生後 21 日目の時にオメガにより群に分け、 5×10^4 個/一匹のリステリアを腹腔感染させた。感染後 2, 4, 6 日にそれぞれの群から 4 匹ずつの脾臓を採取しホモゲナイズした後、段階希釈を行い生菌数を測定した。インフルエンザウイルスの感染実験は、感染が上気道で限局して起こるように 1 マイクロリットルのウイルス液を左右鼻孔に全 2 マイクロリットル滴下することによって行った。感染 11 日後の鼻洗浄液中

のウイルス増殖はMDCK細胞を用いた PFU assayにより定量した。(小西班)

(4) 5~6 週齢の BALB/c♀マウスに TBT を蒸留水で希釈し、500 μ g/day、50 μ g/day となるように胃内投与した。コントロールには蒸留水を胃内投与した。

IEL (腸管リンパ細胞) の分離は、各濃度の TBT を 1、3、7 日間連続投与した後、最終投与の 1 日後にマウスから小腸を採材した。IEL の分離は、腸管内容物とパイエル板を除去した後、小腸を約 2cm の断片に 1mM EDTA 加 Joklik-modified medium 中に浮遊させ、上清中に分離された IEL を遠心分離し、RPMI 1640 medium で懸濁した。これらの操作を 2 回繰り返した後、collagenase と DNase I を加えて 5 分間振盪して分離した。

IEL subset の解析は、上記で得られた細胞を抗 CD3 ϵ 、抗 CD19、抗 CD4、抗 CD8 α 、抗 CD8 β 、抗 β TCR、抗 γ δ TCR 等の蛍光モノクローナル抗体 (Pharmingen) を用いて染色した。測定及び解析には FACS Calibur (Becton Dickinson) を用いた (小西班)。

(5) (3) と同じ方法で

ミルク経由で暴露させた ICR マウスを用いて真菌感染実験を行った。条件は昨年度の結果に従った。真菌菌種は *Candida albicans* IFO1594 を用い、抵抗性を生死判定および感染 3 日後、7 日後の腎臓に残存している生菌数を指標とした。(杉浦班)。

(6) サルへの TBT 長期間投与を行い、ヒトへのリスク評価の知見を得る目的で以下の実験を行った。ヒトに対する危険度分類表で、P4 にランクされる B ウイルス抗体が陰性で、サルレトロウイルス

(SRV/D) や γ -ヘルペスウイルス抗体陽性のカニクイザルを 4 頭選別した。選別したカニクイザルは K1; 20 歳 3.10kg ♀,

K2; 13 歳 5.10kg ♂, K4; 6 歳 3.88kg ♂, K5; 6 歳 3.98kg ♂ の 4 頭である。

K1 カニクイザルには 117.8 mg、K2 カニクイザルには 194.6mg の TBT を経口投与したところ、その急性毒性のため、嘔吐や鼻汁がみられたため、2 週目にはその 1/2 量を投与したが、やはり鼻汁がみられたため、3 週目の投与時にはその 1/4 量を投与し、以降 K1 カニクイザルには 29.5mg、K2 カニクイザルには 48.7mg を週 1 回のペースで投与を続けた。また、1 回に経口投与する TBT は少量であるので 2.5ml の乳酸菌飲料(ヤクルト)で希釈して与えた。TBT の定量は (財) 日本冷凍食品検査協会にて行い、Flame Photometric detector (炎光光度検出) - Gas Chromatography を用いた。また、サル K1 と K2 においては、体重 1kg あたり 38mg TBT を経口投与した後、24 時間および 48 時間後には糞を採取し、TBT の濃度を定量した。カニクイザル K1 においては糞とともに尿の採取も行い、TBT の定量を行った。

末梢血球検査は、Sysmex MICROCELLCOUNTER F-800 により赤血球数 (RBC)、白血球数 (WBC)、血小板数 (PLT)、小型白血球数 (W-SCC)、大型白血球数 (W-LCC) を TBT 投与前後、定期的に測定した。NK 活性の測定は標的細胞としては、ヒト白血病細胞株 K562 を用い、放射性クロム酸ナトリウム法を用いた。Effector 細胞は、上述の末梢血リンパ球をターゲット (K562) 細胞に対し 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2.5:1, 1.25 の比になるように加えた。リンパ球サブセットの解析は、ファイコールにより、末梢血リンパ球を分離した後、B 細胞、T 細胞、CD4+, CD8+, CD16+ の検出にはそれぞれ蛍光色素標識モノクローナル抗体 (Leu-16, α / CD3 FN-18, Leu3a, Leu2a, Leu11a) を用いて染色し、末梢

血中の量比をフローサイトメトリーにより測定した。リンパ球幼若化反応は、末梢血リンパ球を $1 \times 10^5 / 0.1 \text{ ml}$ ずつ 96 穴平底プレートに加え、 $12.5 \mu\text{g/ml}$ Concanavalin A (ConA) $10 \mu\text{g/ml}$ Phytohemagglutinin P (PHA), $1/100$ Pokeweed Mitogen (PWM) の 3 種のマイトジェンを加え、48 時間刺激後、24 時間の H3 チミジンのリンパ球への取り込みを測定した。(向井班)。

(7) ダイオキシンの次世代への感染抵抗性を検討するために以下の実験を行った。初回妊娠 19 日目の C57BL/6NCrj マウスを対照群、低濃度暴露群、高濃度暴露群の 3 群に分け、一群 8 匹ずつとした。出産までは対照群と同様に水道水を与えたが、出産から 20 日間は低濃度暴露群では 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, 和光純薬株) を DMSO に溶解後最終濃度が 1.8 ng/l になるように溶かした飲料水を、高濃度暴露群では 18 ng/l の濃度に溶かした飲料水を自由摂取で与えた。対照群ではダイオキシン投与群と同等の DMSO 溶液を加えた飲料水を与えた。細菌感染実験は、母乳中にダイオキシンを投与した仔は、生後 21 日に乳、乳にわけ、水道水を飲料水として与えた。同時に 5×10^4 のリスチア菌 (*Listeria monocytogenes*) を腹腔投与した。感染後 2, 4, 6, 9 日目に 4 匹ずつ脾臓および血液を採取した。脾臓はホモゲナイズしたあと段階希釈をし生菌数を測定した。(小西班)。

(8) 昨年度明らかにしたビスフェノールの日和見感染に対する抵抗性の低下の機序を解明する目的で、以下の実験を行った。4 週令 Balb/c マウスを一群 5 匹として用い、ビスフェノール A を 5 mg/Kg の濃度でコーン油に融解し、 0.2 ml をマウスの皮下に 5 日間連続投与した。対照群にはコーン油のみを投与した。好中球の採取は最終投与の 2 日後に 0.1% カゼイン溶液をマウスの腹腔に投与し、18 時間後腹腔を生理食塩水 (大塚製薬) で洗浄しおこなった。マクロファージの採取は、最終投与から 4 日後にビスフェノール A 投与群および対照群から脾臓を採取し、単細胞とし、プラス

チックシャーレに付着した細胞を回収して行った。食食能の測定は $5 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整した好中球およびマクロファージに $5 \times 10^7 / \text{ml}$ の大腸菌 k-12 株と 4°C で 1 時間反応させ、余剰な菌を生理食塩水で洗浄した後、 37°C で 1 時間反応させた。その後、食食されていない菌を生理食塩水で洗浄した後 0.1% トライトン X-100 を含むリン酸食塩水緩衝液 (PBS) で溶解し、寒天培地に塗抹し一昼夜培養しその cfu から細胞内に食食された菌の数を測定した。また、 4°C で反応させたあとの細胞に結合した菌数を測定し、その割合から食食率 (食食された菌数/細胞に結合した菌数 $\times 100$) を計測した。殺菌能の測定は、食食能を測定する過程で得られた食食した細胞をさらに適当な時間反応させ、細胞内の菌数を測定することによって測定した。

(9) 潜在型 HIV 感染実験は以下の方法でおこなった。U1 細胞の培養と HIV-1 遺伝子の再活性化は、ヒト単球系細胞株の HIV-1 潜伏感染株 U1 細胞を増殖状態の良い状態で集め、 $2 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ に懸濁した。これを 48 穴プレートに分注し、TBT のエタノール溶液を終濃度 $1-100 \text{ nM}$ となるように添加した後、さらに 3 群に分け、無添加、 10 nM PMA 添加、あるいは 1 ng/ml TNF- α を添加して 37°C で 5 日間培養した。その後上清を回収し、その中に含まれる HIV-1 の p24 タンパク質を ELISA 法 (Dynabot™, Abot) で定量した。

U937 細胞の培養と HSV-1 の感染実験はヒト単球系細胞株 U937 の亜株 Cl.1-4 を RPMI1640+10%FBS 中で培養、継代し、

HSV-1 (strain F) の感染実験に際して、細胞を $1 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ に懸濁したのち 12 穴プレートに 1 ml ずつ分注し、これに $0.1-100 \text{ nM}$ PMA または $0.1-1000 \text{ nM}$ All-trans retinoic acid (ATRA) を添加して 37°C で 20 時間培養した。新鮮な培地と交換した後、HSV-1 を $\text{MOI}=0.01$ または 10 PFU/cell となるように加えてさらに TBT を 0.1 または 10 nM 加えて 37°C で 20 時間培養した。その後、細胞を回収した。なお、HSV-1

を MOI=10 で感染させる実験系では、Vero 細胞に添加し、抗 HSV-1 中和抗体存在下で 37°C で 48 時間培養した。また MOI=0.01 で感染させた実験系では、くり返し凍結融解することによって細胞を破壊した。この細胞抽出液を上と同様に Vero 細胞に添加して培養したが、この場合には抗 HSV-1 抗体は添加しなかった。

いずれの実験系も最後に Vero 細胞を染色して生細胞数を定量し、U937 細胞（抽出液）中に含まれる HSV-1 ウイルス量を Vero 細胞障害活性によって評価した。各群とも 3 点からなるアッセイを行い、結果を TCID₅₀あるいは培養系におけるウイルス感染細胞の数によって表した。

(10) TBT のヒト腸管細胞への影響はヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 を用いておこなった。2 週間培養して分化させた Caco-2 に高濃度（～1000nM）の TBT で短時間（24 時間）処理した場合と、低濃度（～100nM）で 2 週間培養した場合との 2 種類の暴露による細胞への影響を、タイトジャンクション透過性、P 糖タンパク質の活性、細胞層の酵素活性を指標に検討した。

C. 研究結果および考察

(1) 生後 3 週めから 9 週まで TBTCI の投与による NK 細胞と NKT 細胞のポピュレーションポピュレーションの変化は認められなかった。♂では 3 週目のみに有意な NK 細胞活性の亢進が認められた。その後、12 週令まで測定を続けたが、再亢進や減少は認められなかった。♂では 5 週目まで有意な亢進が認められた。このことから、TBTCI による次世代の NK 細胞の活性は亢進することが分かったが、細胞数では対照群とほとんど差がない

ことから、ここの細胞の活性が亢進されたものと考えられた。この亢進は可逆的であり、その傾向は♂の方が強いことが示唆された。

(2) 母ラットへの TBT 低濃度投与（5 ppm）では、生後 0 日の仔ラットの胸線皮質、脾臓のアポトーシスの増加を、また、高濃度投与（50 ppm）では仔ラットの胸線皮質、髄質および脾臓でのアポトーシスの減少をもたらした。胸線皮質のアポトーシスの変化は胸線重量と負の相関をしめした。Fas、FasL、タネル法によるアポトーシスの間には一定の関係はみられず、TBT によるアポトーシスの変化は、Fas/FasL 系とは異なった系への働きかけによると思われた。

(3) 胎盤を介しての TBT の移行と母乳中への移行は、50 ppm 暴露群から生まれた新生児および母親の泌乳するミルク中の TBT を測定したところ、新生児には 38ng（1 腹 12 匹として 450ng）、ミルク中には 3μg/100ml であった。新生児が生まれるまでに母親が摂取した TBT 量の積算は 15mg/匹であることから新生児に移行したのは全積算量の 3% であり、ミルクへの移行は毎日一定量移行していると考えられるため約 2% であった。この数値から計算して、一匹の新生児が一日に 3ml のミルクをのむとして 90ng/匹の TBT が新生児にミルク経由で移行している事となる。

リステリアの脾臓中のクリアランスは母乳経由の群からの新生児では 15ppm および 50ppm のトリブチルスズ投与群で脾臓クリアランスの機能低下がみられた。しかし胎盤経由で暴露した母親からの新生児はいずれの投与群でも対照群と比較して有意な差は認められなかった。インフルエンザウイルスに対する感染抵抗性へのトリブチルスズの影響は認められなかった。

(4) 経口投与された脂溶性有害化学物質の粘膜免疫毒性を評価するモデル系の確立のため、TBT 経口投与後の小腸 IEL subset の変化を検討した。その結果、特に非胸腺由来の $\gamma\delta$ T 細胞や CD8 $\alpha\alpha$ + $\alpha\beta$ T 細胞、CD8 $\alpha\alpha$ + $\gamma\delta$ T 細胞の減少が顕であった。従来、免疫毒性の評価対象とされていなかった非胸腺由来 T 細胞が通常の胸腺由来 T 細胞よりも TBT に対し、高い感受性を示したことは、様々な化学物質の免疫毒性を調べる上で従来の胸腺、脾臓などを中心とした全身免疫系に対する免疫毒性だけでなく、粘膜免疫系に対する免疫毒性についても評価する必要があることを示している。

(5) *Candida albicans* IFO1594 を用いた真菌感染実験では次世代のメスにおいて暴露濃度依存的に抵抗性の低下を示すことがわかった。オスではメスほど顕著ではないが同様の傾向が見られた。

(6) TBT を 117.8mg 経口投与したカニクイザル K1 の 48 時間までの糞中への総排出量は 5.53mg であり、尿中への排出量は 64.5ug であった。投与 TBT 量のそれぞれ 4.69% および 0.05% に相当し、投与 TBT のうち 95% 以上が体内に停滞もしくは吸収・蓄積されたものと考えられる。一方、TBT を 194.6mg 経口投与したカニクイザル K2 の 48 時間までの糞中への総排出量は 4.85mg であり、投与 TBT 量の 2.49% が糞便中に排出されたことになる。この K2 サルでは、TBT 投与後、大量の嘔吐がみられ、尿と嘔吐物を含む液体の総量が投薬 24 時間目までに 163ml 貯留していた。この液体中の TBT の総量は 4.48mg であった。従って、K2 サルにおいても、経口投与 TBT のうち 95% 以上が体内に残留しているか、または吸収・蓄積されたものと考えられる。免疫毒性の指標

として測定した項目のうち、K1 カニクイザルにおいては、TBT 投与 3 週目で NK 活性の低下がみられ、K2 カニクイザルでは投薬 1 週目から NK 活性の有意の低下を認めた。

(7) 飲料水に溶けうる最大限のダイキシンからの暴露では母乳を介して仔が暴露されたとしても細菌感染に対する抵抗性は顕著な低下は認められなかった。このことからもし飲料水に最大溶解度に相当する対するダイキシンが汚染したとしても、感染抵抗性に関しては NOEL（無作用量）の範囲にとどまっていることを示唆している。しかし、他の有害化学物質との複合汚染等の場合には、この濃度でも感染抵抗性に対して影響が出ることも十分に考えられることから、複合汚染に対するリスク評価が必須であると言える。

(8) ビスフェノール A は、日和見感染抵抗性を低下させることから、免疫系の中でも非特異的防御機構を担う好中球およびマクロファージの防御機能に及ぼす影響を検討した結果、好中球の貪食能および殺菌能を減衰させるがマクロファージの貪食能は促進させる事が明らかになった。

(9) HIV-1 の潜伏感染したヒト単球系細胞株 U1 細胞からのウイルスの再活性化に及ぼす生活環境中の脂溶性化学物質の影響を、TBT を用いて調べた結果、TBT は、自然活性化あるいは TNF- α による再活性化には抑制的、PMA による再活性化に対しては促進的に作用した。これより、TBT は Ca²⁺ の細胞内での動きを介して、プロテインキナーゼ C の活性化等を利用する潜伏感染ウイルスの再活性化を促進する可能性が示唆された。一方、ヒトの神経細胞やマクロファージに感染して潜伏化する HSV-1 の、ヒト単球系細胞株 U937 細胞への感染に及ぼす TBT の影響を調べた結果、

TBTは感染ウイルス数が少ない時には単独で促進的に作用することが示された。なお、感染させるウイルス数が多い場合にはTBTは感染に阻害的に作用することが示唆された。以上の結果から、TBTの低レベルでの長期にわたる慢性的な摂取が、ヒトの体内に潜伏感染あるいは再活性化するウイルスの増殖や遺伝子発現、ならびにウイルス感染自体に影響を及ぼし、ある条件下では憎悪因子になりうることを示唆された。

(10) 高濃度で短期間暴露した場合、ヒト腸管では細胞層の酵素活性等は影響を受けなかったが、タイトジャンクション透過性の亢進が観察された。また、異物は異物排出トランスポーターであるP糖タンパク質の活性の阻害が認められた。しかし、低濃度で長期間の暴露では、タイトジャンクション透過性の顕著な上昇、P糖タンパク質の活性の亢進が認められ、TBTにより、腸管上皮細胞の異物排出メカニズムが亢進するという防御的適応反応の存在が示唆された。

E. 結論

本年度は、脂溶性物質としておもにトリブチルスズを用い、その免疫毒性から、感染抵抗性の免疫パラメーターになり得る細胞の検索まで一連の研究を行った。これらの結果から、トリブチルスズは、胎盤経由よりミルク経由の方が、次世代への細菌および真菌感染抵抗性に影響を及ぼしやすいことが示唆された。ミルクを介して暴露される濃度では次世代のNK細胞の活性は亢進されており、そのためウイルス感染への抵抗性には影響を及ぼしにくいことが明らかになった。この抵抗性の低下には、T細胞、とくにCD8positive細胞の減少だけでなく非特異的防御機構である好中球やマクロファージの機能低下にも深く関わっていることが示唆された。さらに腸管への影

響を検討した結果、TBTは短期間暴露と長期間暴露では腸管に対する毒性が全く異なってくることが明らかになった。このような現象はいままで理論的に解明できなかった低用量での影響の解釈に解明の光を当てたものと言える。また、システムティックな免疫とは分化が異なる腸管免疫機構に対しても、TBTは免疫毒性を現すことが明らかになったことで、今後のリスク評価に重要な知見を示すことができた。

ダイオキシンに関しては、次世代のリステリアに対する感染抵抗性を指標に、その影響を検討したが、飲料水に最大解けうる濃度ではやや排菌機構に影響がみとめられたものの、顕著な毒性は認められなかった。この結果から、水道水に最大限のダイオキシンが汚染したとしても、母乳を通じて次世代の感染抵抗性を低下させる恐れはほとんどないであろう。しかし、汚染が複合となった場合には、全くその危険がないとは言いきれない。現社会は一つの有害化学物質のリスク評価だけしていてもあまり意味のない時代である。数百という人工の有害化学物質が複雑に混ざりあって存在することを踏まえ、それぞれの無作用量を決定すると同時に、複合的な影響を早期に予測できるリスク評価の実験系の構築を行う必要がある。

(7) 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugita-Konishi, Y., Amano, F., Sugiura, Y., "Effect of Tributyltin on microbial infections on mice" *Toxicology Sci., suppl.* 66 (2002)
- 2) Takano J., Narita, T., Fujimoto, K., Mukai, R., Yamada, A.: Detection of B-virus infection in cynomolgus monkeys by ELISA using sinian agent 8 as alternative antigen *Exp. Anim.* **50** : 345-347, 2001

- 3) Uda, A., Tanabayashi, K., Mukai, R., Yachi, M., and Yamada, A. : CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). J. Med. Primatol. **30** : 141-147, 2001
 - 4) Tanabayashi, K., Mukai, R., and Yamada, A. : Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells. J. Clin. Microbiol., **39** : 3025-3030, 2001.
 - 5) Misumi, S., Takamune, N., Ido, Y., Hayashi, S., Endo, M., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Shoji, S. : Evidence as a HIV-1 self-defense vaccine of cyclic chimeric dodecapeptide wrapped from undecapeptidyl arch of extracellular loop 2 in both CCR5 and CXCR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 13095-13163, 2001.
 - 6) Hodaka Suzuki, Kwang Il Jeong, Kunio Doi
Regional Variations in the Distributions of Small Intestinal Intraepithelial Lymphocytes (IELs) in BALB/c +/+, nu/+ and nu/nu Mice
Comparative Medicine, vol.51(2), p127-133, (2001)
 - 7) Hodaka Suzuki, Kwang Il Jeong, Kunio Doi
Regional Variations in the Distribution of Small Intestinal Intraepithelial Lymphocytes in A lymphoplasia (*aly/aly*) Mice and Heterozygous (*aly/+*) Mice
Immunological Investigations, vol.30(4), p315-324, (2001)
 - 8) Ikegami, R., Sugimoto, Y., Segi, E., Katsuyama, M., Karahashi, H., Amano, F., Maruyama, T., Yamane, H., Tsuchiya, S., Ichikawa, A. The expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **166**, (2001) 4689-4696.
 - 9) Tanaka, Y., Igimi, S., Amano, F. Inhibition of prostaglandin synthesis by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* **391**, (2001) 207-217.
 - 10) Gwakisa P., Yoshihara K., Long To T., Gotoh H., Amano, F., Momotani E. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. *Vet Parasitol.* **99**, (2001) 53-61.
 - 11) Ohki, K., Amano, F., Kohashi, O
Lipopolysaccharide (LPS) and zymosan-resistant mutant isolated from a macrophage-like cell line, WEHI-3, with a defective response to LPS under serum-free conditions. *Immunol. Cell Biol.*, **79**, (2001) 462-471.
 - 12) Inoue, S., Suzuki, K., Nakamura, T. and Sugita-Konishi, Y. Immunoparameter Kinetics of *Listeria* infection in mice pretreated with prednisolone or diethylstilbestrol., *J. Toxicol. Pathol.*, **14**, 237-245, 2001
 - 13) Sugita-Konishi, Y. and Pestlka, J.J., Differential Up-regulation of TNF- α , IL-6 and IL-8 production by deoxynivalenol (Vomitoxin) and other 8-ketotrichothecenes in a Human macrophage model., *Journal of Toxicol. Environ. Health, Part A* **64** 619-636, 2001
- 2.学会発表
- 1) 志村純子、鈴木嘉彦、西川朝、天野富美夫、小西良子、「非特異的生体防御システムに及ぼすビスフェノールの影響」免疫毒性学会 平成13年9月 仙台
 - 2) 小西良子、天野富美夫、杉浦義紹「トリブチルスズ暴露の感染症抵抗性に及ぼす影響」免疫毒性学会 平成13年9月

3) 小松原博文、菊池俊彦、佐多徹太郎、松田基夫、宇田晶彦、向井鐐三郎：中枢神経指向性 SIV のマクロファージ感染性と遺伝子解析 第 15 回日本エイズ学会（東京）2001 年

4) 中山大介、林辰一郎、向井鐐三郎、橘 罔臣、梅田 衛、高宗暢暁、三隅将吾、庄司省三：Chemokine receptor を基礎にした HIV-1 dual tropic ウイルスの感染を防止する単クローン抗体の調整及び性質 第 15 回日本エイズ学会（東京）2001 年

5) 菊池俊彦、小松原博文、佐多徹太郎、松田基夫、宇田晶彦、向井鐐三郎：Cloning and Analysis of Neurotropic SIV (Simian Immuno-deficiency Vvirus) 第 24 回日本分子生物学会（横浜）2001 年

6) 本藤 良、植田富貴子、向井鐐三郎、棚林清、山田章雄、吉川泰弘：B ウイルス感染の DNA 診断と分子疫学に関する基礎的研究

第 49 回ウイルス学会（大阪）2001 年

7) 棚林清、宇田晶彦、谷内真由美、向井鐐三郎、山田章雄：B ウイルス特異的 mAb の認識する gB 蛋白抗原部位の解析

第 49 回ウイルス学会（大阪）2001 年

8) 鈴木穂高、鄭光一、伊藤喜久治、土井邦雄

小腸上皮細胞間リンパ球(IEL)の分布の部位差に及ぼす腸内細菌の影響

日本実験動物科学技術大会 2001(第 48 回日本実験動物学会総会)(横浜市) 2001 年 5 月 8～12 日(ポスター発表)

9) 鈴木穂高、鄭光一、土井邦雄

マウス小腸上皮細胞間リンパ球(IEL) subset の部位差の週齢による変化

第 132 回日本獣医学会(盛岡市) 2001 年 10 月 6～8 日(ポスター発表)

10) . 唐橋久恵、玉野富美夫：LPS で活性化したマクロファージにおける TNF α

産生の p38MAP kinase による翻訳後調節。第 74 回日本生化学会大会。2001 年 10 月、京都。

Ⅱ 分担研究報告

トリブチルスズの次世代ラットの脾臓NK活性に対する影響

小西 良子（国立感染症研究所）

トリブチルスズの免疫毒性を検討するために、胎盤および母乳経路で暴露された次世代ラットの NK 活性を経時的に測定した。その結果生後 3 週間では NK 活性は亢進されていることが分かった。この現象は母では 5 週間まで続くが子では 3 週間目のみに認められた。その後 NK 活性が低下することはなかった。このことからトリブチルスズの毒性は可逆的であることが示唆された。

A. 研究目的

われわれは、トリブチルスズ (TBTCI) の次世代への影響を免疫毒性の観点から検討しているが、昨年度は妊娠 1 日目から離乳までの間、母親の胎盤および母乳を通してトリブチルスズが暴露された次世代の T,B 細胞のポピュレーション変化を検討した。

感染防御に関与する細胞は大きく分けて特異的な防御に関わる T,B 細胞と、非特異的な防御に関わる NK 細胞、好中球およびマクロファージなどの 2 種類がある。そこで本年度は非特異的な防御機構に関与する NK 細胞のポピュレーションの変化及び活性への影響を検討した。これらの結果を総合することにより、感染抵抗性の低下を予測するための免疫パラメーターの知見が得られることが期待される。

B. 研究方法

実験動物：妊娠 1 日目（ブラグ確認 1 日目）のメス SD ラットおよび妊娠 1 日目（ブラグ確認 1 日目）のメス ICR マウスは日本 SLC (株) から入手した。飼育は、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 55%

$\pm 5^{\circ}\text{C}$ で行った。明暗サイクルは明期 14 時間および暗期 10 時間に設定した。食餌は実験動物用固形飼料を船橋農場から入手した。

試薬：塩化トリブチルスズ（以降 TBTCI と略す）は和光純薬（株）より購入した。免疫細胞ポピュレーション測定に用いた蛍光標識抗体は BD Pharmingen および Caltago より購入した。また Hycoerythrin - conjugated streptavidin（以降 ST-PE と略す）は生化学工業（株）より購入した。チュルク氏液は武藤化学薬品工業（株）より購入した。ナイロンメッシュ 200 番は豊島製作所（株）より購入した。FACS 解析用 tube は FALCON より購入した。Bovine serum albumin (BSA) は Boehringer Mannheim より購入した。Dulbecco's PBS (-) は日水製薬（株）から、EDTA, 2Na は和光純薬（株）より購入した。

ナチュラル・キラー活性（以降、NK 活性と略す）測定に使用した RPMI 1640 medium は Sigma から購入した。また Propidium iodide（以降 PI と略す）は和光純薬（株）から購入した。サポ

した。Percoll は Amersham Pharmacia より入手した。PKH-2 Green Fluorescent Cell Linker Kit は Sigma から購入した。Fetal Bovine Serum (FBS) は三光純薬 (株) より購入した。Trypan blue 0.4 % は GIBCO BRL から入手した。7-amino- actinomycin (以降 7-AAD と略す) は BD Pharmingen より購入した。

培地および試薬の調製：Flowcytometry medium (以降 FM 液と略す) は、Milli-Q 水に Dulbecco's PBS (-) 9.6 g、NaN₃ 1.0 g、NaHCO₃ 0.35 g、EDTA, 2Na 0.078 g、BSA 2 g を溶解し 1 l までフィルアップした。Yac-1 培養および NK 細胞調製で用いた 10 % FBS 含有 RPMI 1640 medium は、L-glutamine と NaHCO₃ を含む RPMI 1640 medium (Sigma) に非働化 (56°C、30 分間) FBS 50 ml、100-100 units/ml Penicilline-Streptomycin 5 ml、 5×10^{-2} M 2-メルカプトエタノール 500 μ l を加え、500 ml に調製した。赤血球溶血液は、NH₄Cl 0.829 g、KHCO₃ 0.1 g、EDTA, 2Na 0.367 g をリン酸緩衝食塩水 (以降 PBS と略す) に溶解し 100 ml までフィルアップしたのち、Filter 滅菌した。NK 活性測定において予め死標的細胞を除去するために用いた Percoll は、Percoll と 10 倍濃縮した PBS (-) を 9:1 で混合したものを Percoll 原液とし、さらに 10 % FBS 含有 RPMI 1640 medium で 30 % に希釈して使用した。

投与方法：ラットでは妊娠確認 1 日目の妊娠ラットを 16 匹購入し、4 匹ずつ 4 群にわけた。1 群はコントロール群とし、2、3、4 群は各々 5 ppm、15 ppm、50 ppm TBTCI 含有水道水を与えた TBTCI 投与群とした。TBTCI 投与期間は、妊娠 1 日目から離乳期まで行い、その間自由摂取させた。コントロール群には通常の水道水を

与えた。なお母親の TBTCI 暴露量は飲水量から算出して求めた。仔は生まれた日を 0 日目とし、出生後 2 日目で全仔ラットを各群同数になるよう 10~15 匹の割合で配分した。仔は離乳まで母親のミルクで育て離乳後に固形食および通常の水道水を与えた (Fig.1)。

標的細胞の蛍光標識：標的細胞として用いた Yac-1 は 10 % FBS 含有 RPMI 1640 medium で維持した。はじめに、Yac-1 を FBS 不含有 RPMI 1640 medium で一回遠心洗浄 (800 rpm, 5 分間) 後、濃度を 2×10^7 cells/ml になるよう FBS 不含有 medium に懸濁した (細胞数測定はトリパンブルーおよび血球測定盤を用いた)。細胞液 (2×10^7 cells/ml) 1 ml を別の試験管に採って遠心し、上清を 25 μ l 以下になるよう除去した。その後、PKH-2 Green Fluorescent Cell Linker Kit を用いて付属のプロトコルに従って、ペレット (2×10^7 cells) を Dilution A 1 ml に懸濁し、直ちに 4×10^{-6} M PKH-2 (FITC) in Dilution A 1 ml と混合した。穏やかにピペティングしながら遮光下室温で 3 分間インキュベート後、FBS 2 ml を添加し標識反応を行った。次に 10 % FBS 含有 RPMI 1640 medium 4 ml を加え遠心洗浄した。新しい試験管にペレットを移し、10 % FBS 含有 RPMI 1640 medium で 3 回遠心洗浄した。次に標的細胞を除去するため、標識した Yac-1 を 30 % percoll に重層した。ただちに遠心分離 (25 分間、800 rpm) し、上清をアスピレーターで吸引した。生細胞であるペレットを 10 % FBS 含有 RPMI 1640 medium で 3 回遠心洗浄したのち濃度を 2×10^5 cells/ml になるよう調整した。

NK 細胞の調製：仔ラットから脾臓を摘出し、10 % FBS 含有 RPMI 1640 medium を加えたシャーレ上で、200 番メッシュおよびピンセットを用いて押し潰したのち、注射針 (21 gage) 付注射器で細胞を回収して試験管に移した。細胞液を遠心 (800 rpm、5 分間) し、沈殿した細胞を赤血球溶血液 1 ml に懸濁し 1 分間静置した。直ちに 10 % FBS 含有 RPMI 1640 medium 4 ml を加え遠心分離した。免疫細胞数をチュルク氏液および血球測定盤を用いて測定し、 1×10^7 cells/ml に調整した。残りの脾臓細胞は免疫細胞ポピュレーション測定に使用した。

NK 細胞活性の測定：NK 細胞 (1×10^7 cells/ml) を 96 well 丸底マイクロプレートに適當濃度になるよう培養液で希釈し 100 μ l/well で播種した。エフェクター細胞/標的細胞 (E/T) の比に従って、各 well に標的細胞 100 μ l (2×10^4 cells) を添加した。コントロールは、最大死標的細胞は PKH-2 標識 Yac-1 に 3 mg/ml で PBS に溶解したサポニン 20 μ l を加えたもの、また自然死標的細胞は E/T の比に従った細胞液を 4 $^{\circ}$ C (冷蔵庫) で 3 時間共培養したものとした。細胞の接触を確立するために細胞液を遠心 (3 分間、800 rpm) したのち、37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 インキュベーター内で 3 時間共培養した。培養後、細胞液に FM 液 100 μ l を加えて反応を終了させた。遠心し上清除去後、FM 液 200 μ l 入れ細胞を回収し、200 番メッシュを通して FACS 解析用 tube に移した。0.025 mg/ml の PI 10 μ l 又は 7-AAD 5 μ l を細胞懸濁液に添加した。FM 液を 800 μ

l 加えて全量を 1ml にし、FACS Calibur (Becton Dickinson) で測定した。

NK 細胞細胞傷害活性 % = $\frac{\text{エフェクター細胞を加えた時の死標的細胞 \%} - \text{自然死標的細胞 \%}}{\text{最大死標的細胞 \%} - \text{自然死標的細胞 \%}} \times 100$

免疫細胞のポピュレーションの測定：仔ラットから脾臓および胸腺を摘出し重量測定後、FM 液入りシャーレに入れ、各臓器をピンセットおよびナイロンメッシュ 200 番を用いて押し潰した。注射針 (21 gage) 付き注射器でピペティングすることにより単一細胞化し試験管に細胞を移した。シャーレに再び FM 液を加え全細胞を回収した。細胞液を FM 液で適當濃度に希釈し、チュルク氏液および血球測定盤を用いて細胞数を計測した。細胞を 96 well 丸底マイクロプレートに 1×10^6 cells/well になるよう分注した。免疫細胞 (1×10^6 cells/well) を遠心 (1200 rpm、5 分間、4 $^{\circ}$ C) し上清除去後、マウス抗ラット正常血清 50 μ l を添加し氷上で 10 分間以上インキュベートした。これにより免疫細胞膜上の非特異的抗体レセプターをブロッキングした。その後、遠心 (1200 rpm、5 分間、4 $^{\circ}$ C) して上清を除き、各種標識抗体を各 well に適時希釈して加え、遮光下氷上で 30 分間インキュベートした。その後、FM 液で 3 回遠心洗浄 (1200 rpm、5 分間、4 $^{\circ}$ C) した。FM 液を 800 μ l 加えて、全量を 1 ml にし、FACS Calibur (Becton Dickinson) で測定した。Cell Quest ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いて解析した。

C. 研究結果

トリブチルスズの母親での蓄積量を Fig.2 に示した。50ppm 濃度の TBTCI をのませた母親では全暴露量は 7.5 mg/匹であり、1

5 ppm 濃度では全暴露量は 25 mg/匹、5 ppm 濃度では全暴露量は 10 mg/匹であった。生まれた仔の体重、脾臓重量、胸腺重量は、5 ppm 濃度を投与した群から生まれた仔でメスともやや増加する傾向が認められた (Fig.3)。免疫細胞のポピュレーションの変化をみると、脾臓の T 細胞の減少が 50ppm 濃度を与えた母親の仔のメスにおいて認められた (Fig.4)。この減少は T 細胞のサブセットとみてみると CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の両方が減少したことが原因であった (Fig.5)。胸腺の T 細胞のポピュレーションの変化は対照群と比較して有意差はなかった (Fig.6)。

NK 細胞と NKT 細胞のポピュレーションの結果を Fig.7 に示した。3 週めから 9 週まで TBTCI の投与によるポピュレーションの変化は認められなかった。Fig.8 には 5 週目のメスの NK 細胞活性の測定に適切な濃度の検討の結果を示した。E/T 比が 12.5 以上の時に、各群の間で有意差のある結果が得られたことから、この結果を踏まえ経時的な NK 活性の測定はすべて E/T 比 12.5 で行った。メスの踏まえ経時的な NK 活性の変化を Fig.9 に、メスの結果を Fig.10 に示した。メスでは 3 週目のみに有意な活性の亢進が認められた。その後、12 週令まで測定を続けたが、再亢進や減少は認められなかった。メスでは 5 週目まで有意な亢進が認められた。このことから、TBTCI による次世代の NK 細胞の活性は亢進することが分かったが、細胞数では対照群とほとんど差がないことから、ここの細胞の活

性が亢進されたものと考えられた。この亢進は可逆的であり、その傾向はメスの方が強いことが示唆された。

D. 考察

NK 細胞は主にウイルス感染や腫瘍に対して感染した細胞を直接攻撃する非特異的な生体防御機構である。NK 細胞の起源や活性に関与する因子はまだ分かっていないことが多いが、この防御作用が感染抵抗性に大きな役割を担っていることは確かである。最近、ヒトの血液細胞を用いて *in vitro* の系でトリブチルスズを反応させると、NK 細胞の活性が有意に低下するという報告がなされた。そこで、トリブチルスズの次世代への免疫毒性を検討するために NK 細胞の活性を検討することは不可欠であることから、検討を行った。本研究で暴露された低用量のトリブチルスズでは、次世代の NK 細胞活性は亢進することが明らかになった。離乳直後ではこの亢進は与えた容量に比例して亢進しており、容量依存性の反応であることが示唆された。しかしその影響はメスでは 5 週間では有意さが認められず、メスでは 5 週目までは有意さが認められたが 7 週目で、対照群との有意さは認められなくなった。その影響はこの結果から、トリブチルスズの NK 細胞活性亢進は可逆的なものであり、メスの方がその影響が長く続くことが示唆された。この活性の亢進は、T 細胞の欠如しているヌードマウスや SCID マウスにおいて NK 細胞活性が亢進されていることが報告されていることから他の免疫細胞、特に T 細胞の損傷に対しての代償作用の一つではないかと思われた。

E. 研究発表

1.誌上発表：なし

2.学会発表

- 1) 小松恵美、葉袋裕二、芳賀 実、
山本茂貴、小西良子、「トリブチ
ルスズの次世代への影響」日本農
芸化学会総会 平成 14 年 3 月