

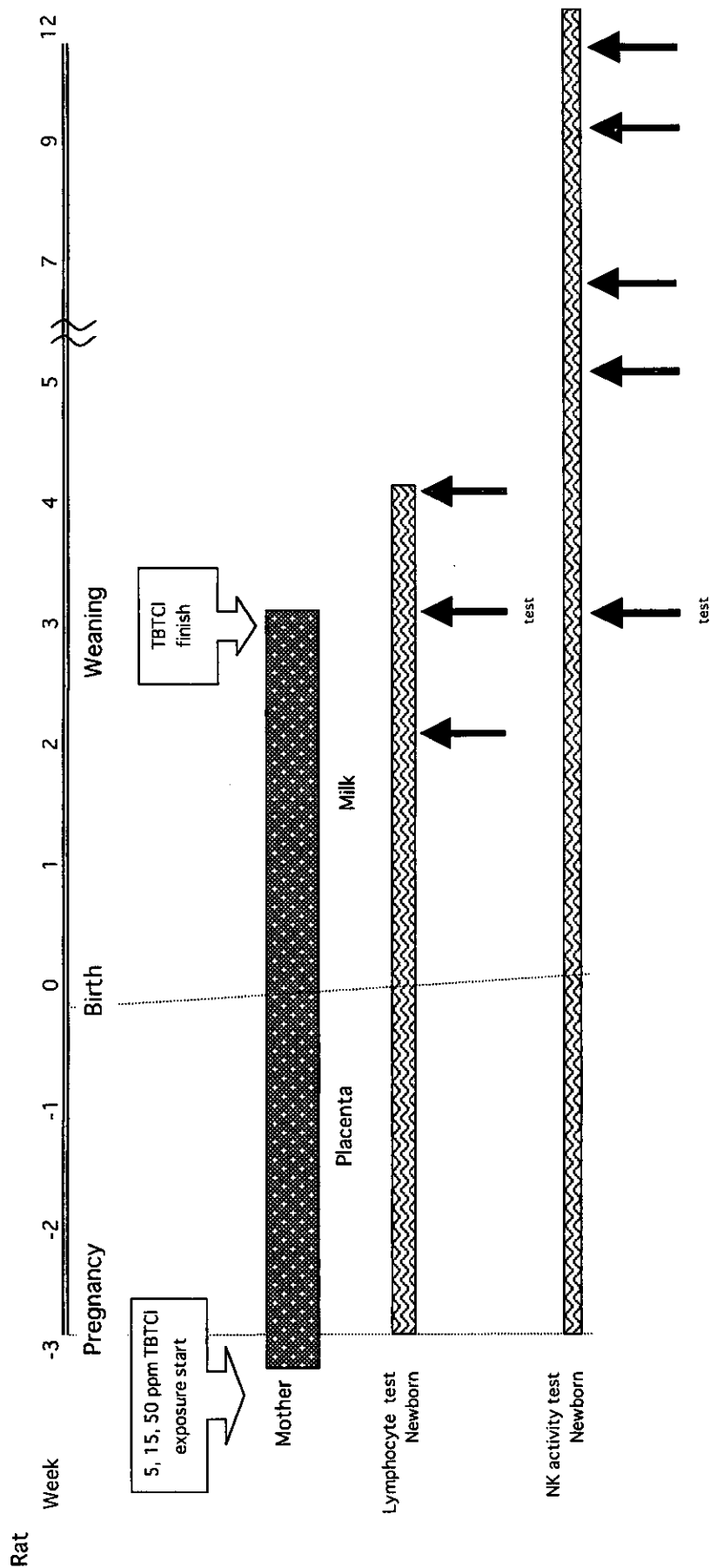


Fig.1 TBTCI exposure schedule. Mother rats of pregnancy day 1 were began to drink water containing TBTCI (5, 15, 50 ppm) freely until weaning. Offsprings rats were assayed their splenocyte, thymocyte and NK cell activity with laser flow cytometer.

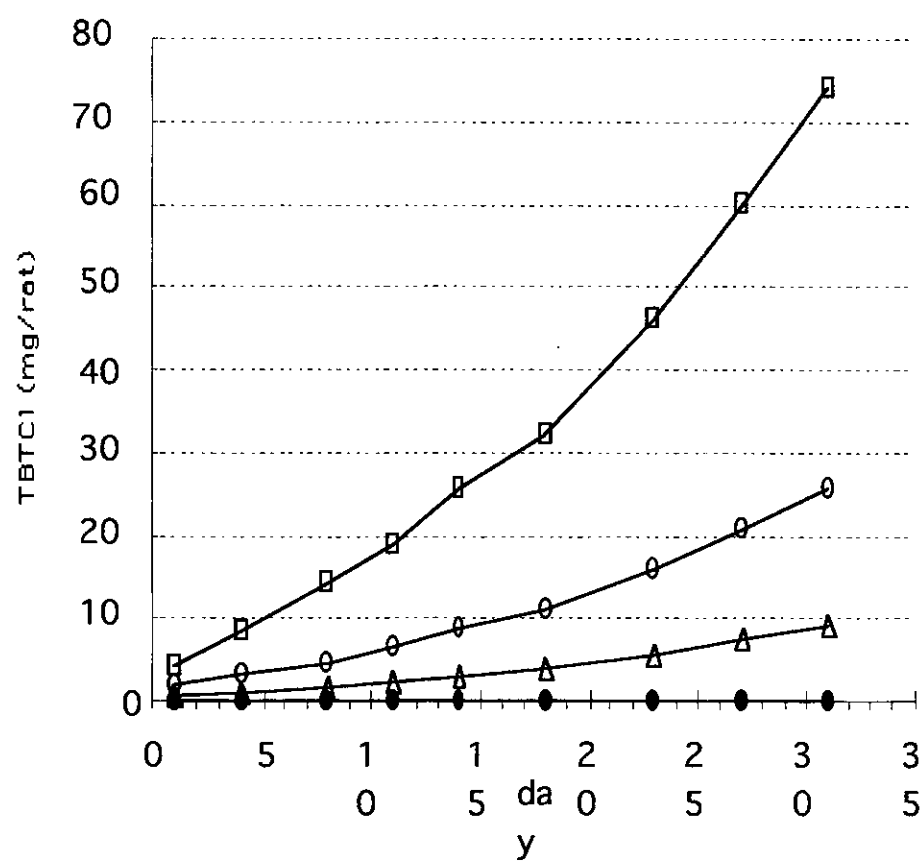


Fig. 2 Accumulated TBTCI quantity in mother rat

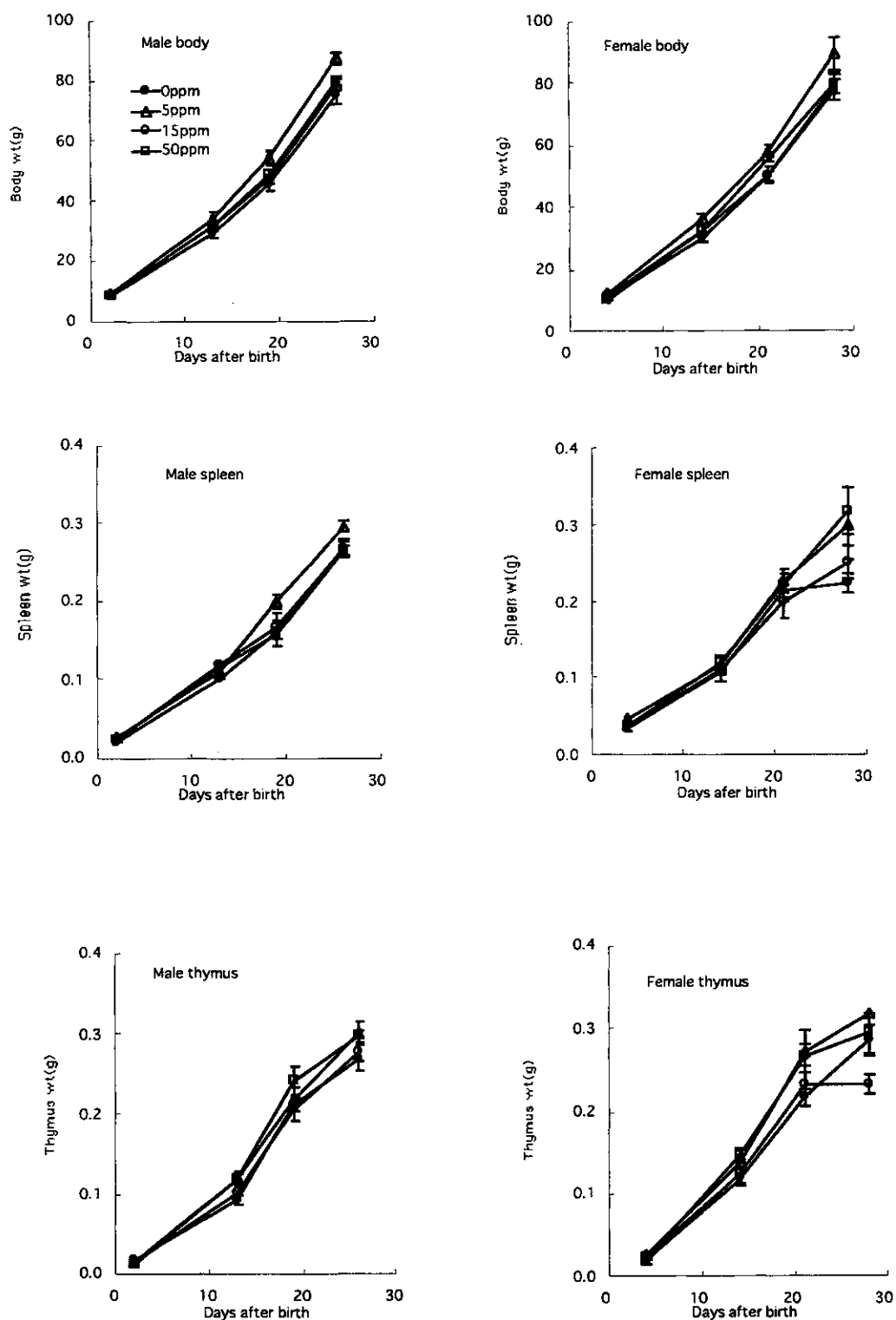


Fig. 3 Time course of body , spleen and thymus weight of offsprings rats exposed to TBTCI via placenta and milk.

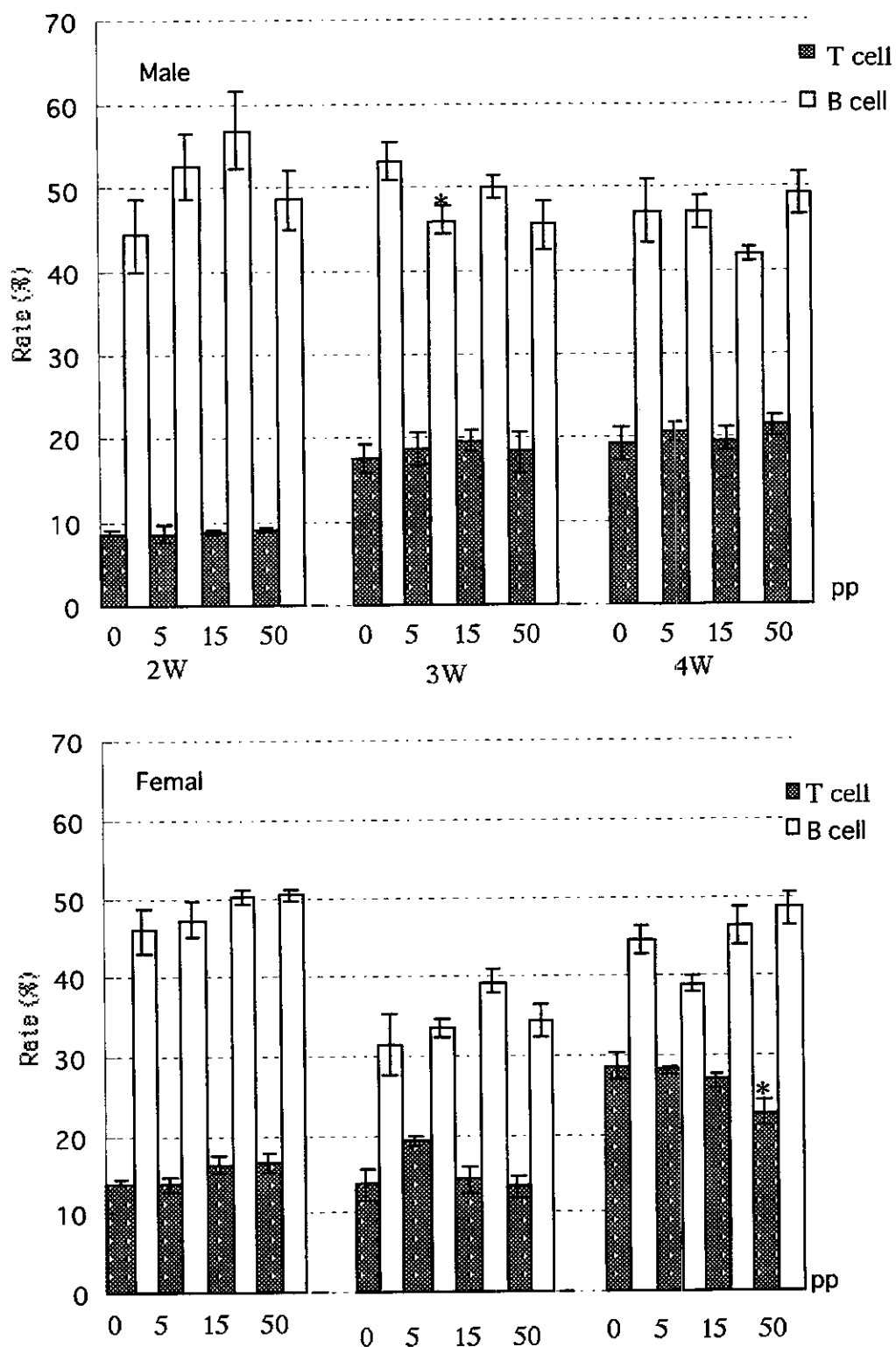


Fig 4 T /B cell populatuins of rats offspring exposed to TBTCI via placenta and milk. Percentages are given as the means $\pm$ SE of four rats. (* $p < 0.05$)

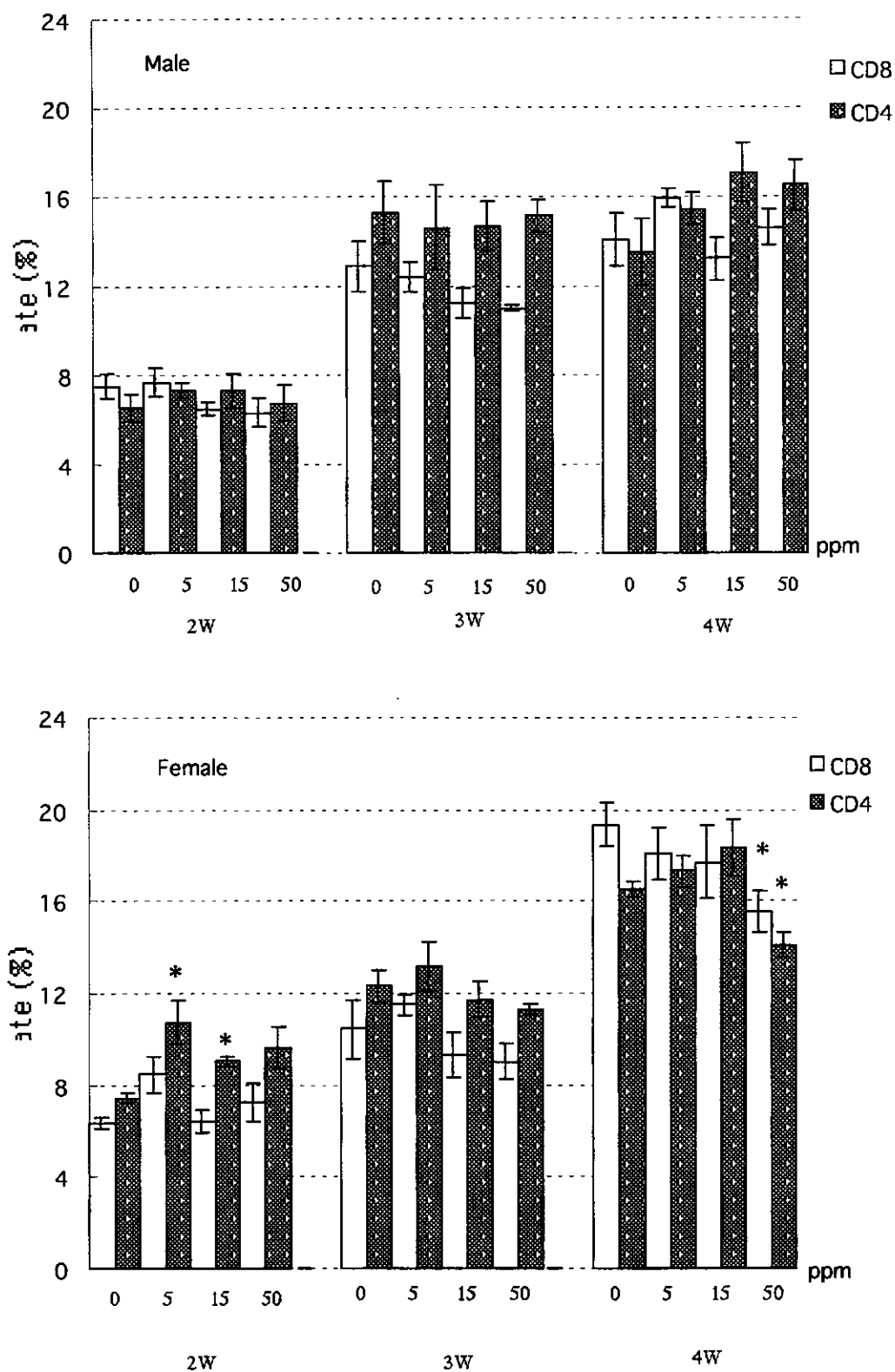


Fig.5 CD4/CD8 populations of rats offspring exposed to TBTCI via placenta and milk. (p< 0.05)

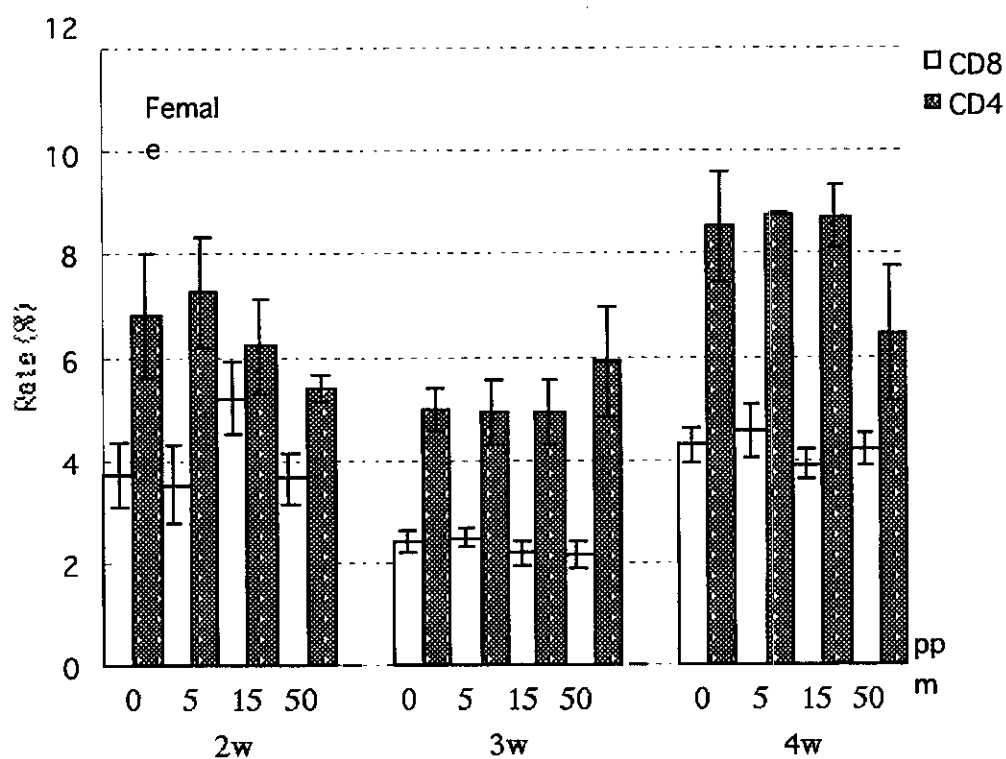
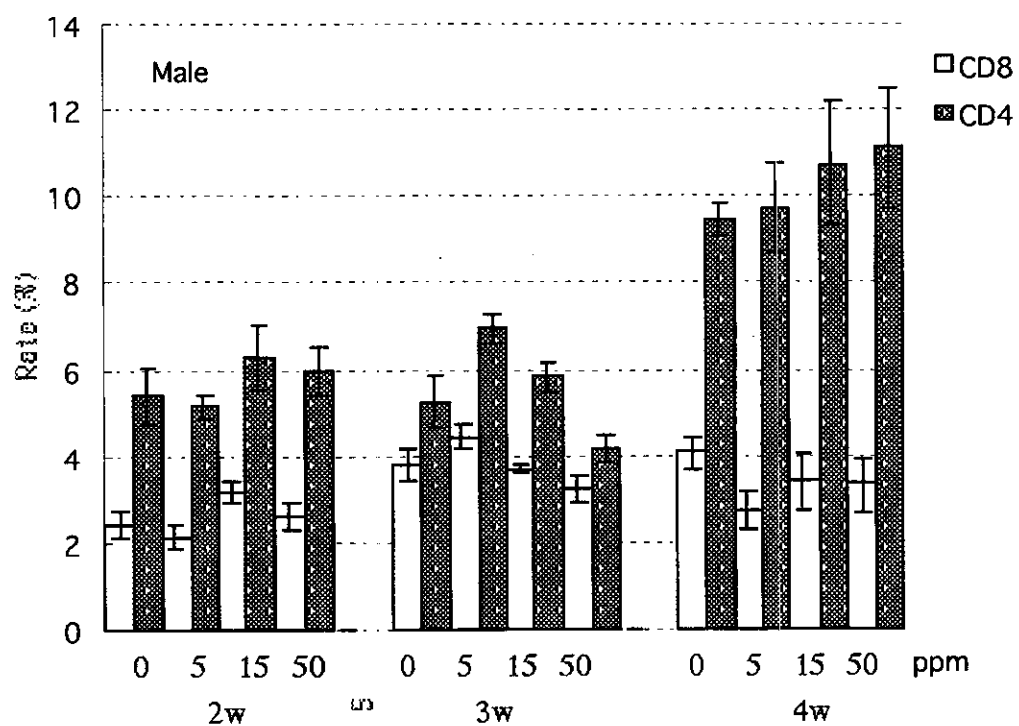


Fig.6 CD4 / CD8 thymus T cell populatuins of rats offspring exposed to TBTC1 via placenta and milk.Percentages are given as the means $\pm$ SE of four rats.(* p<0.05)

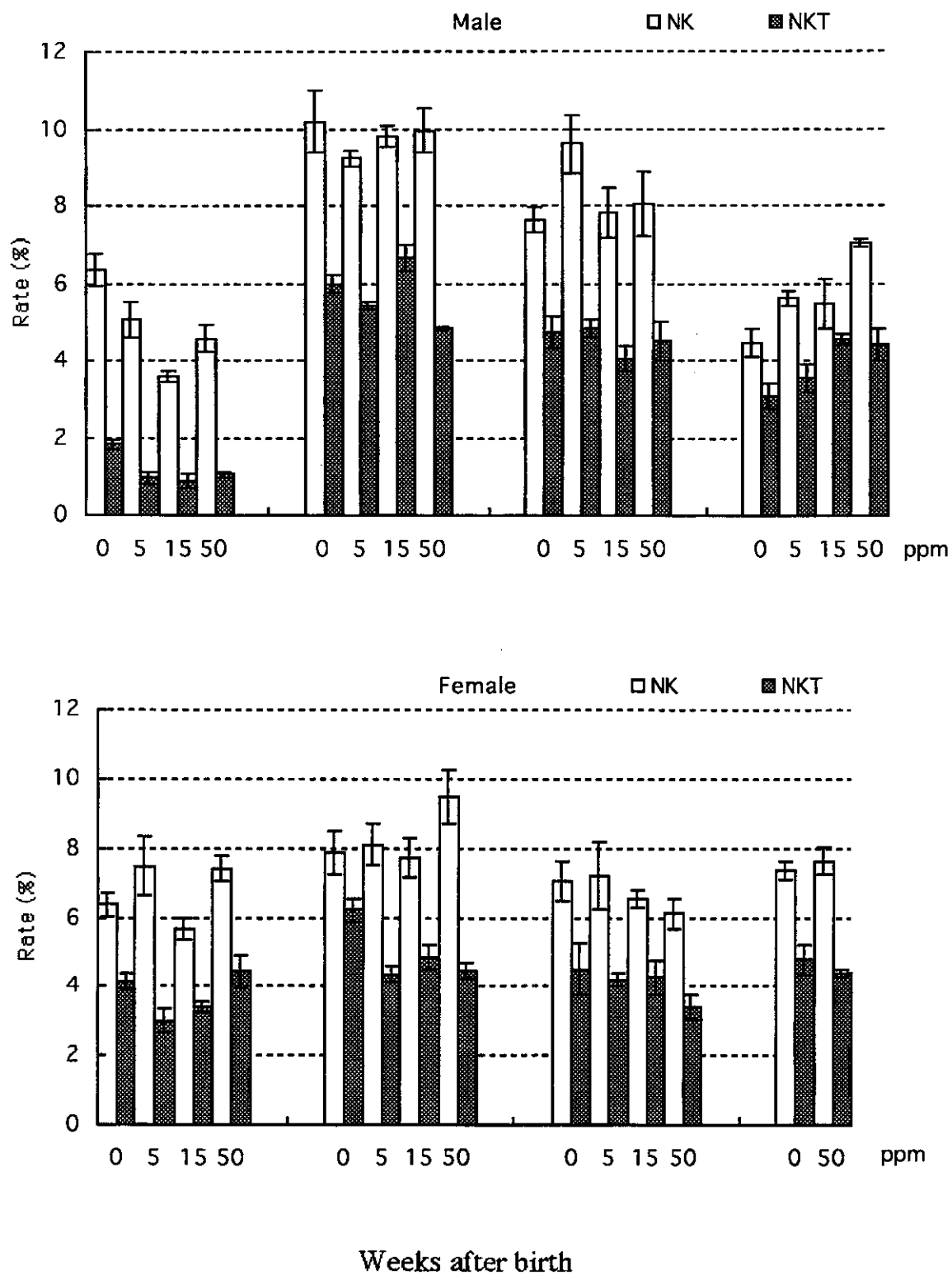


Fig. 7 NK/ NKT cell populatuins of rats offspring exposedured to TBTCI via placenta and milk.

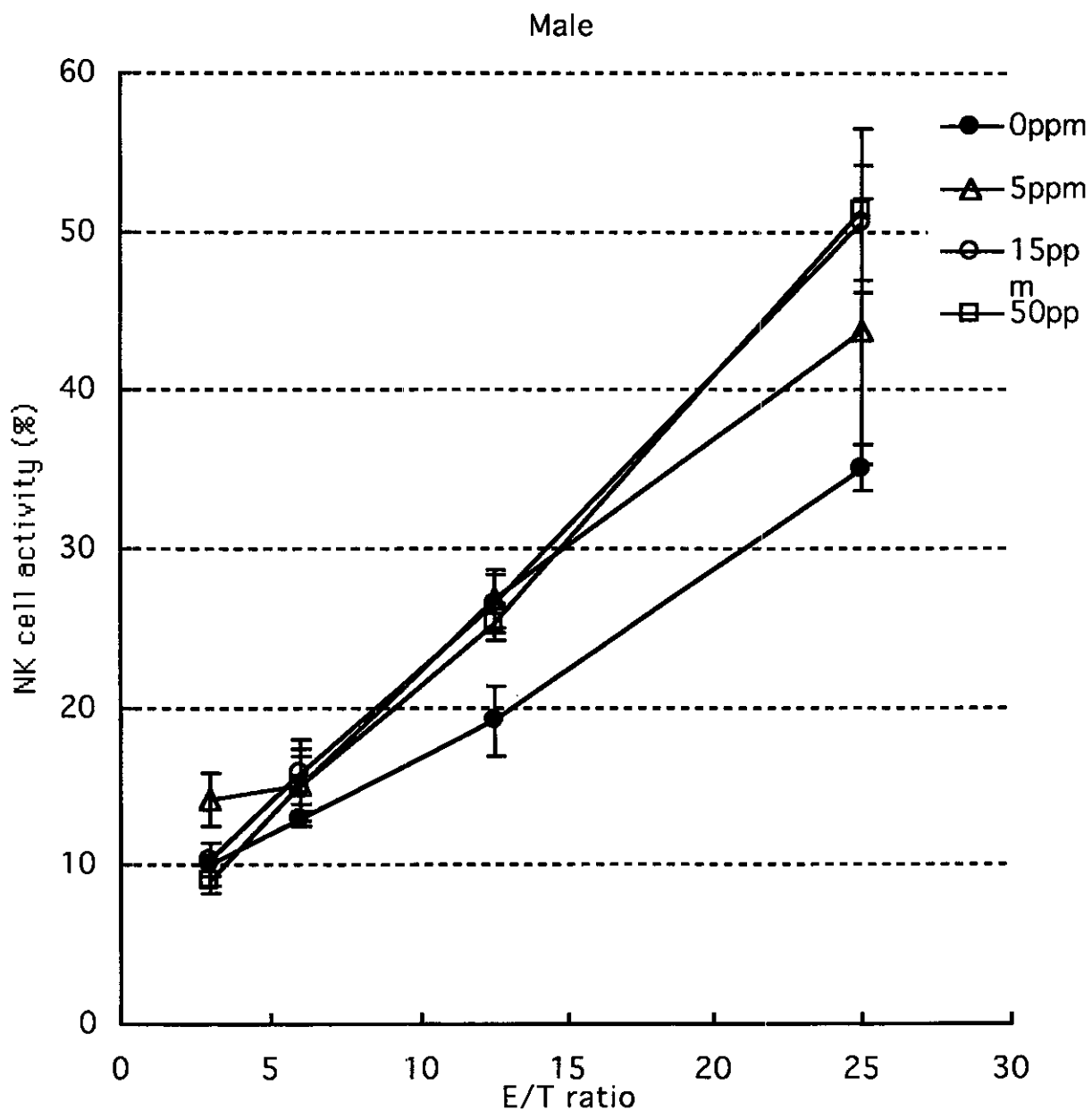


Fig.8 Effect of TBTCI via placenta and milk on Natural Killer cell activity of male rats 5 weeks old. Percentages are given as the means $\pm$ SE of four rats.

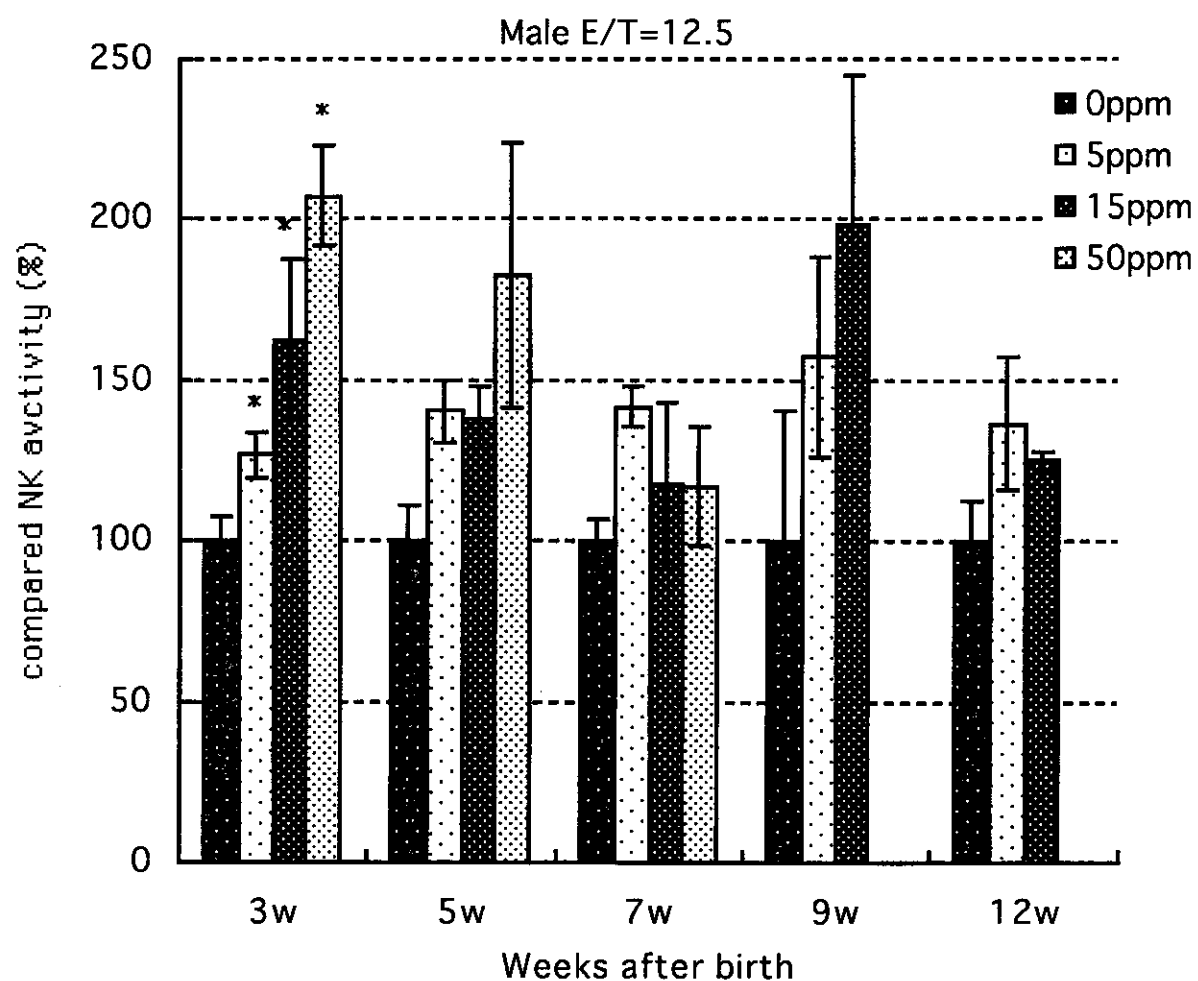


Fig. 9 Effect of TBTCI via placenta and milk on Natural Killer cell activity (E/T=12.5) of male rats offsprings.

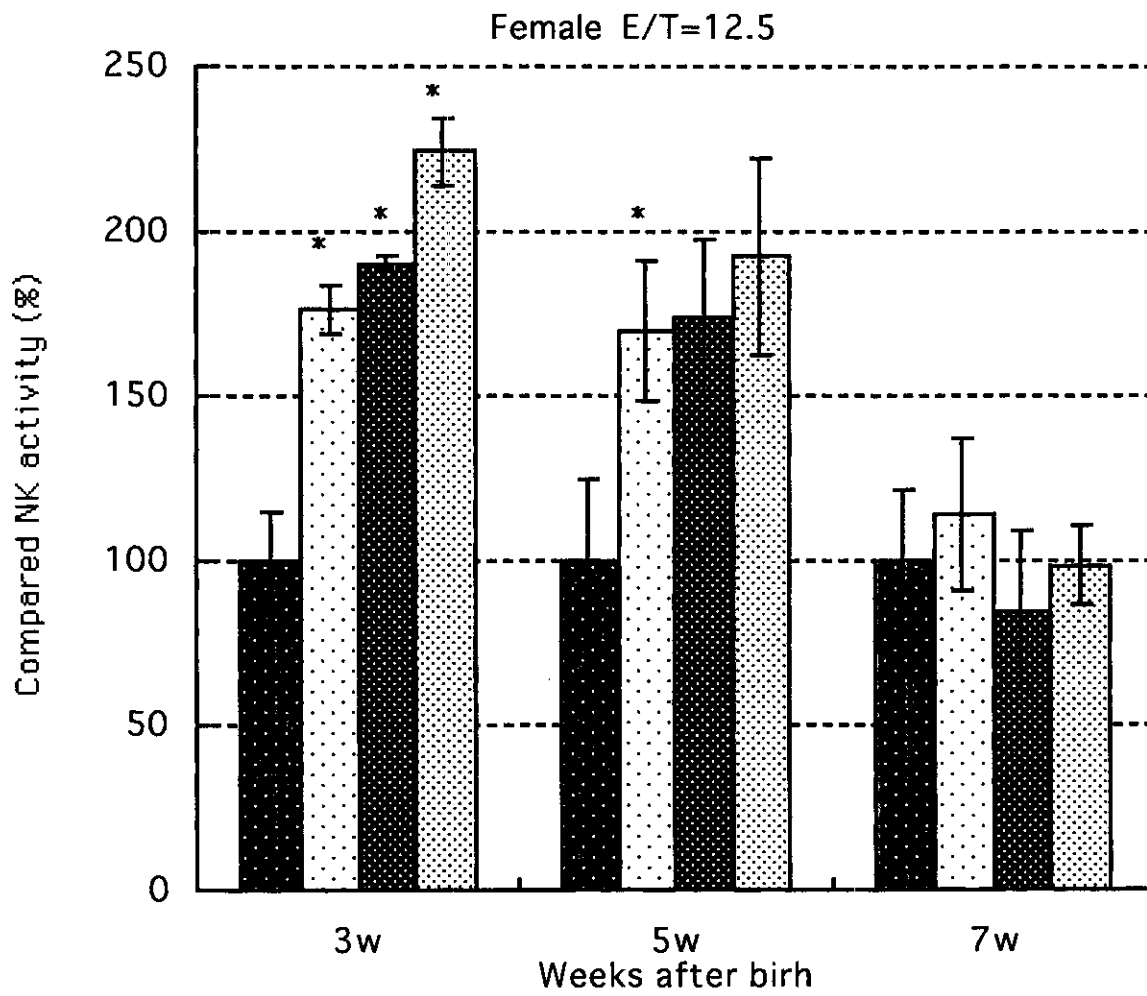


Fig. 10 Effect of TBTCI via placenta and milk on Natural Killer cell activity (E/T=12.5) of female rats offsprings.

トリブチルスズが次世代の脾臓及び胸腺アポトーシスに及ぼす影響

小西 良子 (国立感染症研究所)

阪本 晴彦、松本 晃一、田中 澄子 (香川医科大学第二病理学教室)

妊娠中に摂取したトリブチルスズが子供の免疫機能にどのような影響を与えるかを、ラットを用いて免疫臓器(胸腺、脾臓)の組織学的検討により調べることにした。母ラットへの TBT 低濃度投与(5 ppm)では、生後0日の仔ラットの胸腺皮質、脾臓のアポトーシスの増加を、また、高濃度投与(50 ppm)では仔ラットの胸腺皮質、髄質および脾臓でのアポトーシスの減少をもたらした。胸腺皮質のアポトーシスの変化は胸腺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る。

研究目的

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

研究方法

材料

妊娠時より出産後4週目まで飲水中にTBT-Cl(0ppm, 5ppm, 15ppm, 50ppm)を加え飼育した母ラットから生まれた仔ラットを雄は生後0日、7日、13日、19日、26日、雌は生後0日、7日、14日、21日、28日に各々4匹ずつ屠殺し、胸腺及び脾臓を摘出した。これらの臓器はブアン固定後にパラフィン包埋し、厚さ3 μ mの切片を作成した。

Apoptosis の検出

ApopTag peroxidase in situ apoptosis detection kit(Intergen)を使用してTUNEL法により染色し、光学顕微鏡

にて観察した。胸腺のタネル染色では、25 μ m $\times$ 25 μ mあたりの陽性細胞数と有核細胞数を各臓器について胸腺皮質で48箇所、胸腺髄質で72箇所カウントし、有核細胞1000個あたりの陽性細胞数を調べた。脾臓赤脾髄のタネル染色では、250 μ m $\times$ 250 μ m当りの陽性細胞数をカウント、有核細胞1000個あたりの陽性細胞数を調べた。

それぞれの測定値について相関係数を求め、Student Ttestを用いて有意差の検定をおこなった。

免疫染色

Histofine(Nichirei)を使用し、ペルオキシダーゼ標識間接法にて免疫染色を行った。一次抗体としては抗マウス Fas、家兎抗体($\times$ 500: Wako)および抗ラット FasL、家兎抗体($\times$ 100: Santa Cruz)をそれぞれ PBS に希釈して使用した。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。胸腺皮質、胸腺髄質、脾臓赤脾髄の Fas,FasL について、光学顕微鏡を用いて $250\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$ 当りの陽性細胞数をそれぞれ4視野づつかウントし、4視野の平均を陽性細胞数とした。

それぞれの測定値について相関係数を求め、Student Ttest を用いて有意差の検定をおこなった。

結果および考察

タネル染色

胸腺タネル染色では、皮質よりも髄質により陽性細胞が多い傾向があり、又皮質と髄質の境界付近に陽性細胞が目立つものがみられた。胸腺では細胞密度や large cell 数は TBT の濃度による変化は認めなかった。

脾臓のタネル染色では、白脾髄よりも赤脾髄により陽性細胞が多い傾向があり、又白脾髄では marginal zone を含む辺縁部に陽性細胞が目立つものがみられた。

0 ppm(コントロール)ではタネル陽性細胞は日齢が進むにつれ減少する傾向がみられた。これに対して TBT 投与群と 0 ppm (コントロール) との比較では、タネル陽性細胞は胸腺皮質、髄質、脾臓のいずれにおいても、5 ppm 及び 15ppm においては完全な増減一定の傾向を示さなかったが、50ppm 投与群では減少の傾向を示し、特に、雄で明らかであった。これは、母ラットへの 50ppm 投与は仔ラットにとって高濃度であると考えられ、アポトーシスを起こせないような細胞機能の障害によりアポトーシスの

減少が生じている可能性も考えられる。また、生後 0 日の胸腺皮質および脾臓の 5 ppm 投与群ではコントロール群に比し、タネル陽性細胞の増加する傾向がみられた。(図 1)

免疫染色

胸腺の Fas 陽性細胞はコントロール群との比較では一定の違いはみられなかった。胸腺の FasL では皮質、髄質ともに陽性細胞がほとんど認められなかった。(図 2)

脾臓では Fas 陽性細胞はコントロール群、TBT 投与群とも生後 0 日で高値を取り、以後漸減し、ほぼ同様の動きを示した。TBT の影響は明らかでなかった。FasL はコントロール群、TBT 投与群とも生後 14 日或いは 19 日頃に高値を示したが、コントロール群、TBT 投与群の値の関係は一定ではなかった。(図 2)

タネル陽性細胞と臓器重量の関係

TBT は胸腺において apoptosis を惹起し、臓器重量を減少させるという報告がなされており、又 apoptosis を増加させ得る至適濃度の存在も示されている。今回の研究では母ラットの飲水中に投与した TBT の経胎盤的及び母乳を介する仔ラットへの影響を調べている為、TBT の母ラットの摂取量や仔ラットへの移行量は明らかではないが、タネル陽性細胞と臓器重量は負の相関を示すものがみられた(脾 21, 28 日、胸腺皮質 7 日、13, 19, 26, 28 日は相関係数が -0.6 以下を示す)。(図 3, 4) しかしながら、脾臓では正の相関を示すもの

(脾 14, 26 日は相関係数が 0.6 以上を示す) も認められており (図 4)、ある程度の一定した相関を示すものは胸腺皮質タネル染色と胸腺重量との関係であった。又、この相関は雄ラットでより顕著であった。

Fas、FasL、タネルの関係

胸腺の Fas とタネルの間には一定の関係は明らかでないと考えられた。又、胸腺の FasL では陽性細胞がほとんど認められず、胸腺では Fas/FasL 系を介さないアポトーシスの関与も示唆される。

脾臓の Fas、FasL、タネルの間には高い相関を示すものも認められるが、一定の相関は明らかでないと考えられた。又、Fas に関しては 20%未満の増減を示すものが多いことから、TBT の影響は明らかでないと考えら

れた。

まとめ

母ラットへの TBT 低濃度投与 (5 ppm) では、生後 0 日の仔ラットの胸腺皮質、脾臓のアポトーシスの増加を、また、高濃度投与 (50 ppm) では仔ラットの胸腺皮質、髄質および脾臓でのアポトーシスの減少をもたらした。胸腺皮質のアポトーシスの変化は胸腺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。

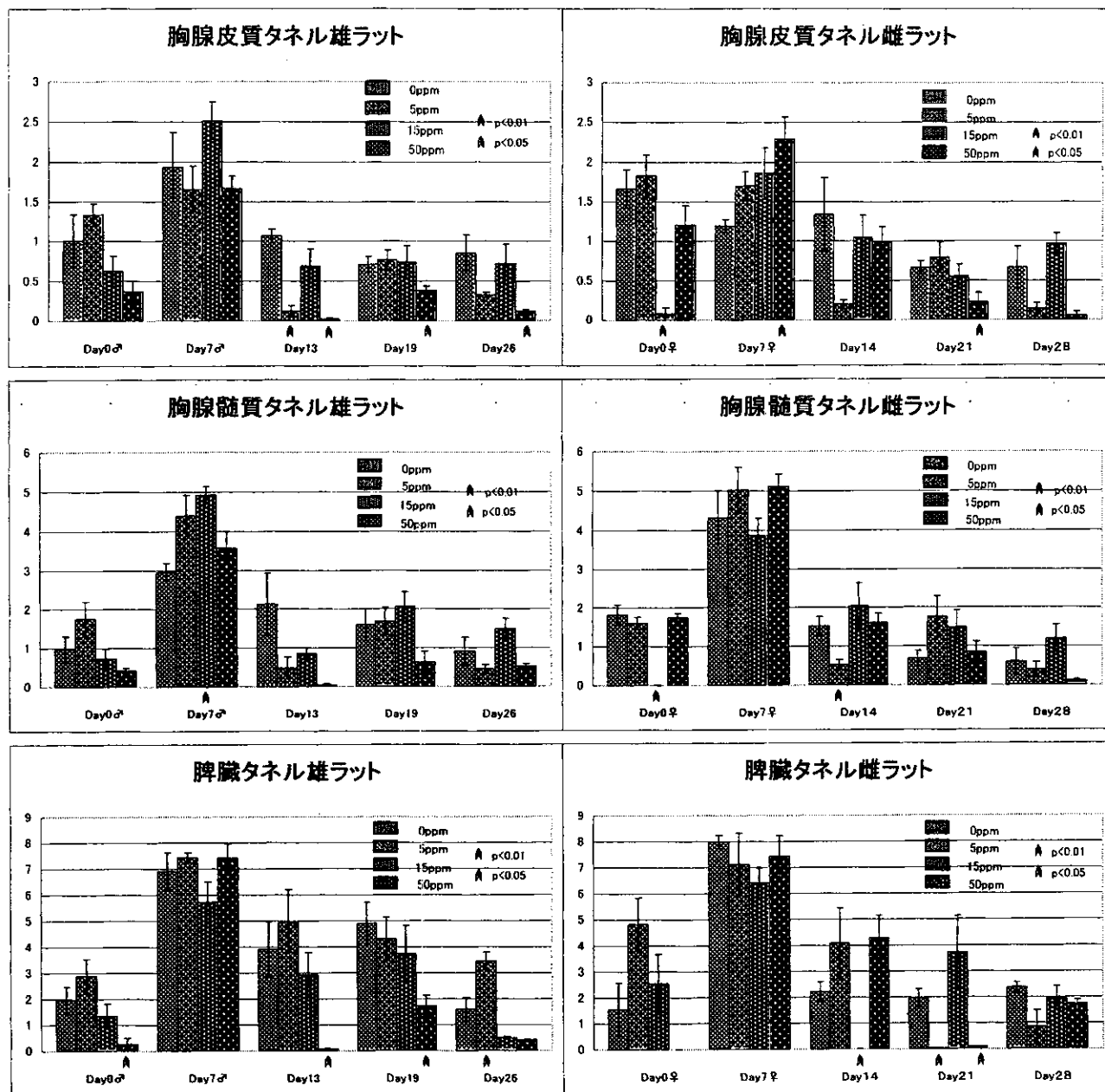


図1. 胸腺・脾臓のタネル染色

横軸は日齢、縦軸は陽性細胞率(%)を示す。Student Ttestにて有意差の検定をおこなっている。

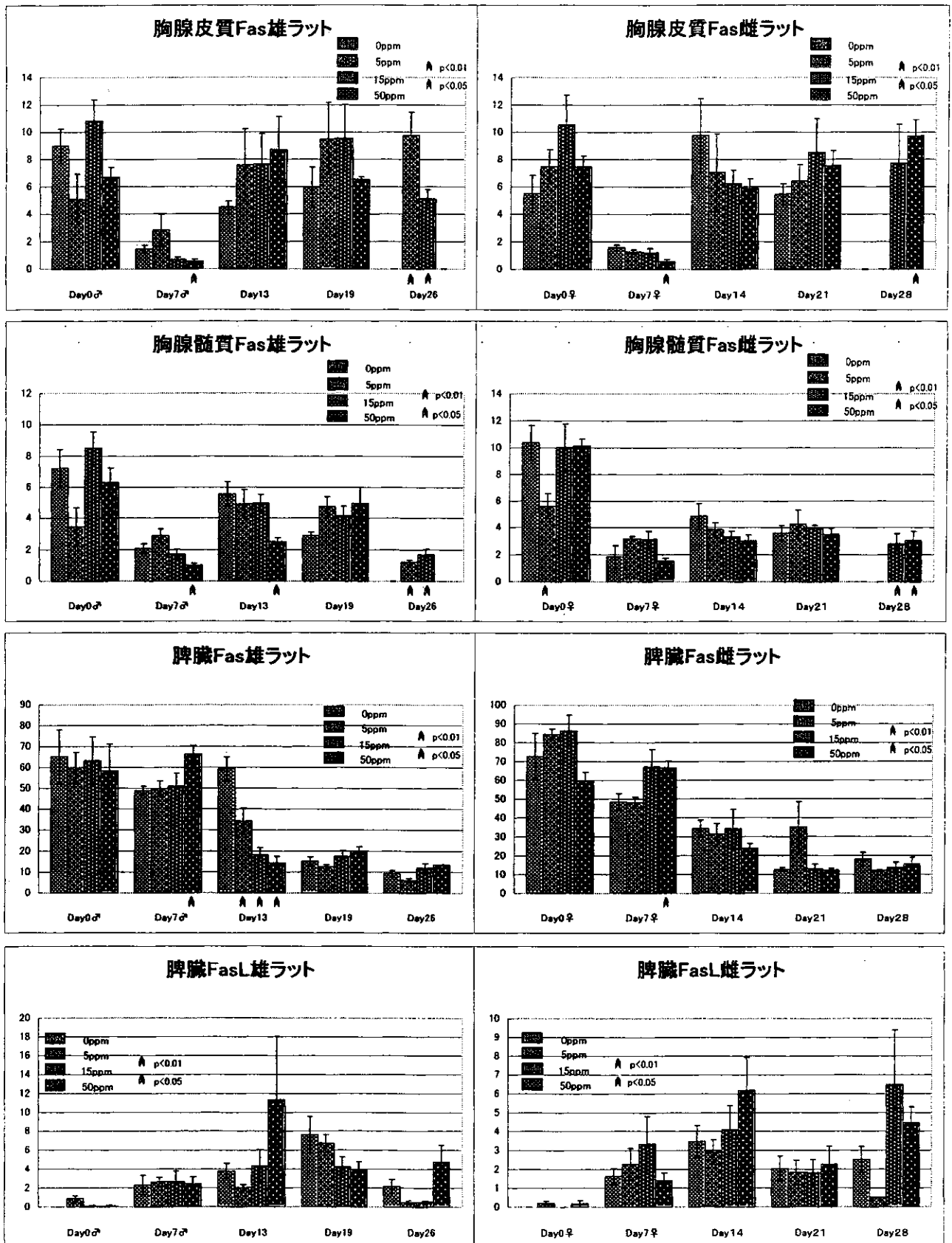


図2. 胸腺・脾臓のFas・FasL染色

横軸は日齢、縦軸は陽性細胞数を示す。StudentTtestにて有意差の検定をおこなっている。

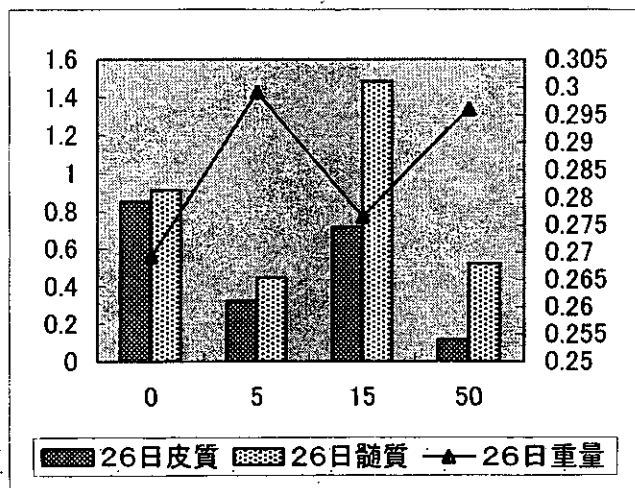


図3. 胸腺皮質・髄質のタネル染色と胸腺重量

横軸はTBTの濃度(ppm)、縦軸は右が胸腺重量(g)、左が陽性細胞率(%)を示す。

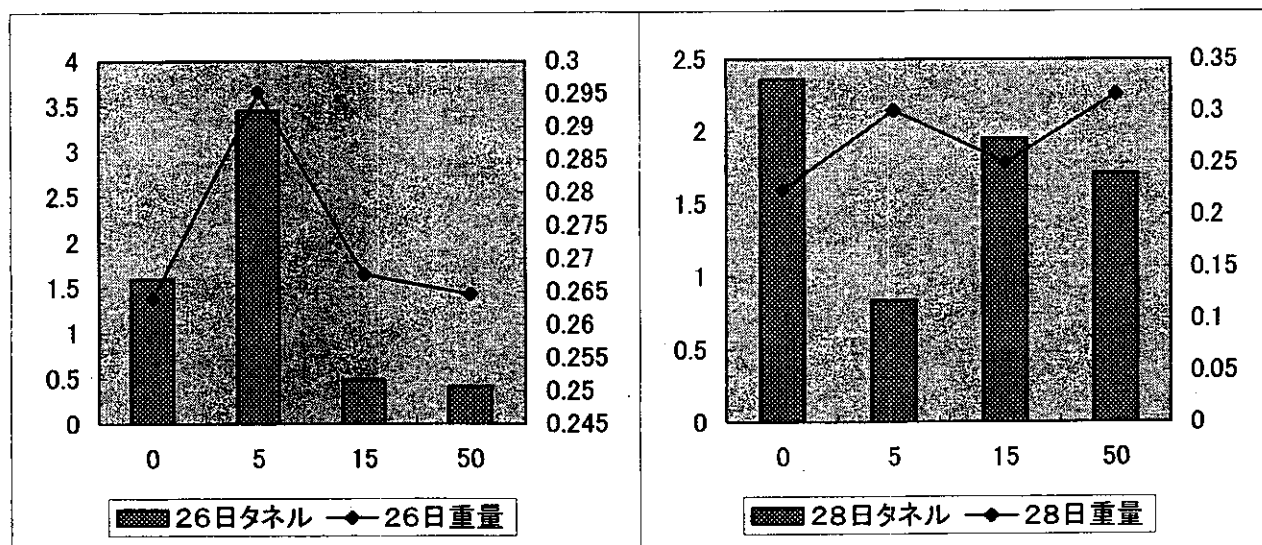


図4. 脾臓のタネル染色と脾臓重量

横軸はTBTの濃度(ppm)、縦軸は右が脾臓重量(g)、左が陽性細胞数を示す。

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

小西 良子 国立感染症研究所 食品衛生微生物部
田村慎一 国立感染症研究所 感染病理部

トリブチルスズを胎盤経由と母乳経由で暴露させ、どちらが感染抵抗性への影響が強いかを検討した。その結果母乳経由の方が細菌感染に対する抵抗性が低下することが認められた。しかしウイルス感染に対しては対照群と両群とも差は認められなかった。

A. 研究目的

昨年度の研究の結果から母乳経由でトリブチルスズ(TBT)が暴露された次世代仔では、リステリアおよび真菌感染への抵抗性が低下することが明らかになった。しかし、トリブチルスズは胎盤を経由して胎児に移行することも報告されており、胎盤経由の影響を明らかにすることも重要な問題となってきた。そこで本年度では母乳経由暴露と胎盤経由暴露のどちらが感染抵抗性に影響を及ぼすかを明らかにする目的で、両方の暴露マウスの細菌感染抵抗性とウイルス感染抵抗性を比較することとした。

B. 研究方法

1) 実験動物：妊娠1日目のICRを日本SLCより購入した。一群4匹ずつとして4群に分けトリブチルスズを0, 5, 15, 50 ppmを含む飲料水を与えた。
2) 投与方法：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(Fig.1)。

3) リステリア感染実験：新生児が生後21日目の時にそれぞれにより群に分け、 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。

4) インフルエンザウイルスの感染実験：ウイルス感染は、感染が上気道で局限して起こるように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。この感染条件で用いられたウイルス量は、麻酔条件下で20マイクロリットル経鼻投与した時得られたLD50の40倍量であった。この投与条件では、通常感染3-5日に鼻洗浄液中のウイルス増殖が最大になり、感染10日目には鼻洗浄液中にウイルスが検出されなくなる。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。

5) 免疫担当細胞のポピュレーションの測定：暴露群および対照群の生後21日目の新生児から脾臓および胸腺を採取し、定法により抗CD3, CD4, CD8, B220抗体で染色しFACS SCANにより各細胞のポピュレーションを測定した。

C. 研究結果

妊娠1日目から出産までまたは出産

から離乳までに母親が暴露したトリブチルスズの積算量をFig.2に示した。両群とも5ppm投与群では3-4mg/匹、15ppm投与群では5-7mg/匹、50ppm投与群では17-27mg/匹のTBTを暴露されたことが分かった。母親におけるTBTの暴露量は、妊娠中の方が哺乳中より少ないことがわかった。これは哺乳による水分摂取の増加が原因と考えられた。それぞれの新生児の体重、臓器重量においては胎盤経由で暴露されたオスで、胎盤及び哺乳中を通して暴露された場合と同様に、体重、胸腺の増加が認められた(Table 1)。ミルク経由の暴露では顕著な増加または減少は見られなかった。

Fig.3は、胎盤を介してのTBTの移行と母乳中への移行を示したものである。50ppm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を指標に細菌感染抵抗性を検討したが、母乳経由の群からの新生児はFig.3に示したように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(data not shown)。

インフルエンザウイルスに対する感染抵抗性は、感染11日目、胎盤経由、母乳経由に関わらずPFUは検出されず、トリブチルスズがウイルス感染に影響を与えないことが示唆された(data not shown)。

免疫担当細胞のポピュレーションの変化は、胎盤経由または母乳経由で暴露された新生児群の間での差はみられなかったが、両者とも対照群と比べてCD8 T細胞の減少が観察された(Table 1)。

D. 考察

TBTは胎盤および母乳を介して次世代に移行することは数多く報告されているが、どのような健康被害に結びつくかは不明であった。本研究では感染抵抗性を健康被害の一つとしてその影響を検討した。昨年度の成果から、TBTは母乳を介して次世代の細菌、真菌感染症に対する抵抗性を低下させることが明らかになっている。しかしダイオキシンなどの免疫毒性を有する脂溶性化学物質は胎盤を介して胎児の免疫機能に影響を与えることが報告されていることから、本研究では胎盤を介した暴露と母乳を介した暴露ではどちらの方が感染抵抗性に影響を与えるかを検討した。その結果、母乳を介した暴露の方が細菌感染に対する感染抵抗性を低下させることが明らかになった。インフルエンザに対しての感染抵抗性には影響がなかったが、これはNK細胞の活性が生後3週間から5週間目に欠けて亢進されるというラットで得られた知見〔本報告書〕に裏付けられると考えられる。母乳を介する方が細菌感染に対する感染抵抗性へ

の影響が出やすい理由としてはいくつか考えられる。1) TBT の胎児期の T 細胞を損傷する事により NK 細胞活性の早期の活性化を誘導する。

2) 母親が摂取する TBT の量が哺乳期間中の方が多く、次世代への暴露量も新生児の方が多いこと。3) TBT の免疫毒性は可逆的であり、ある程度の休止期間をおくとその影響が現れないこと。そのため、これらの検証にはさらなる研究が必要とされるが、本研究から、TBT の次世代への暴露では母乳を通じて暴露されている場合に健康被害がしやすい傾向があることが明らかになった。

E.研究発表

1. 誌上発表

Sugita-Konishi, Y., Amano, F., Sugiura, Y.,
“ Effect of Tributyltin on microbial
infections on mice” Toxicology Sci.,
supple, 66 (2002)

2. 学会発表

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

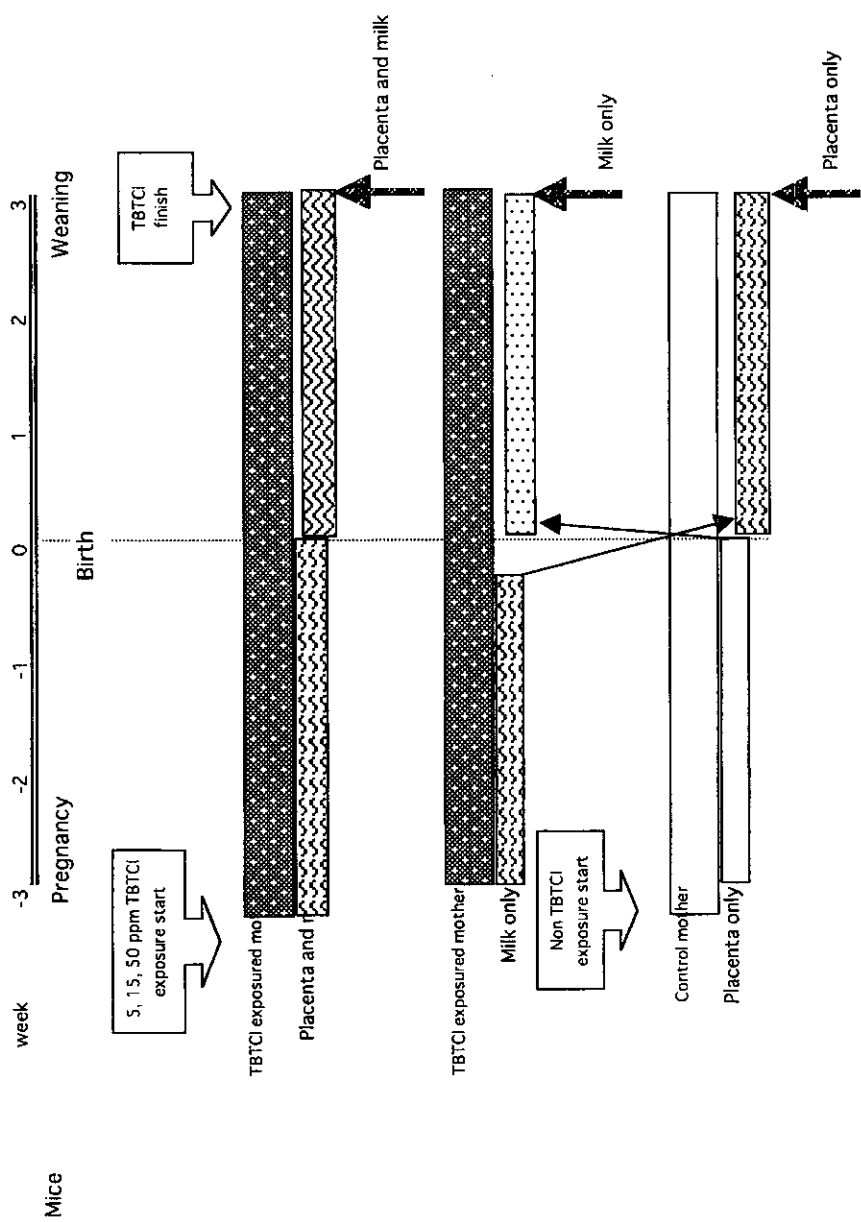


Fig. 1 TBTCI exposure schedule. Mother mice of pregnancy day 1 were began to drink water containing TBTCI (5, 15, 50 ppm) freely until weaning. Others drunk normal water. Newborn mice were exchanged from thier mother to other mothers. Offsprinf mice wer