

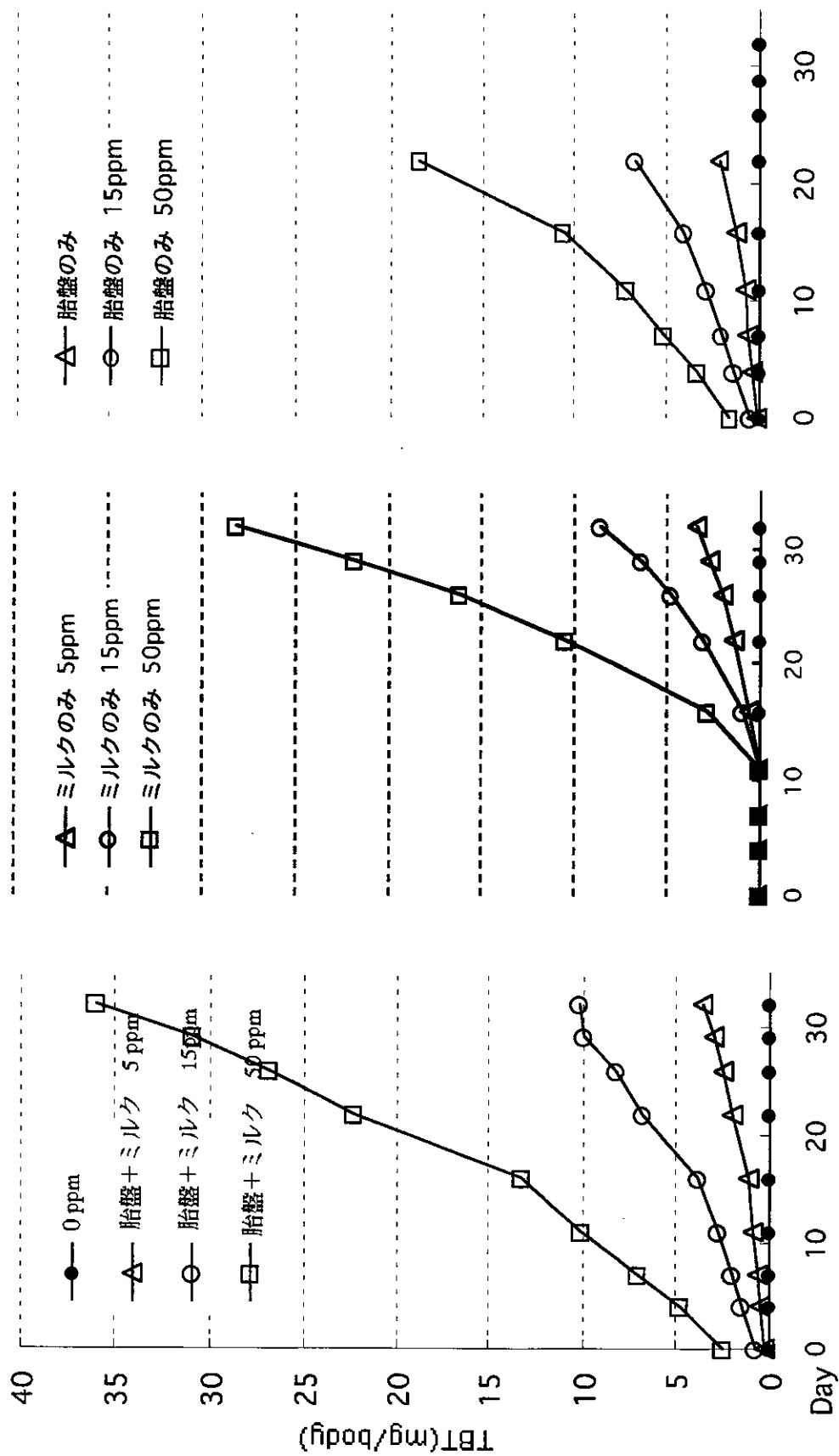


Fig. 2 Cumulation of TBTCl in mice

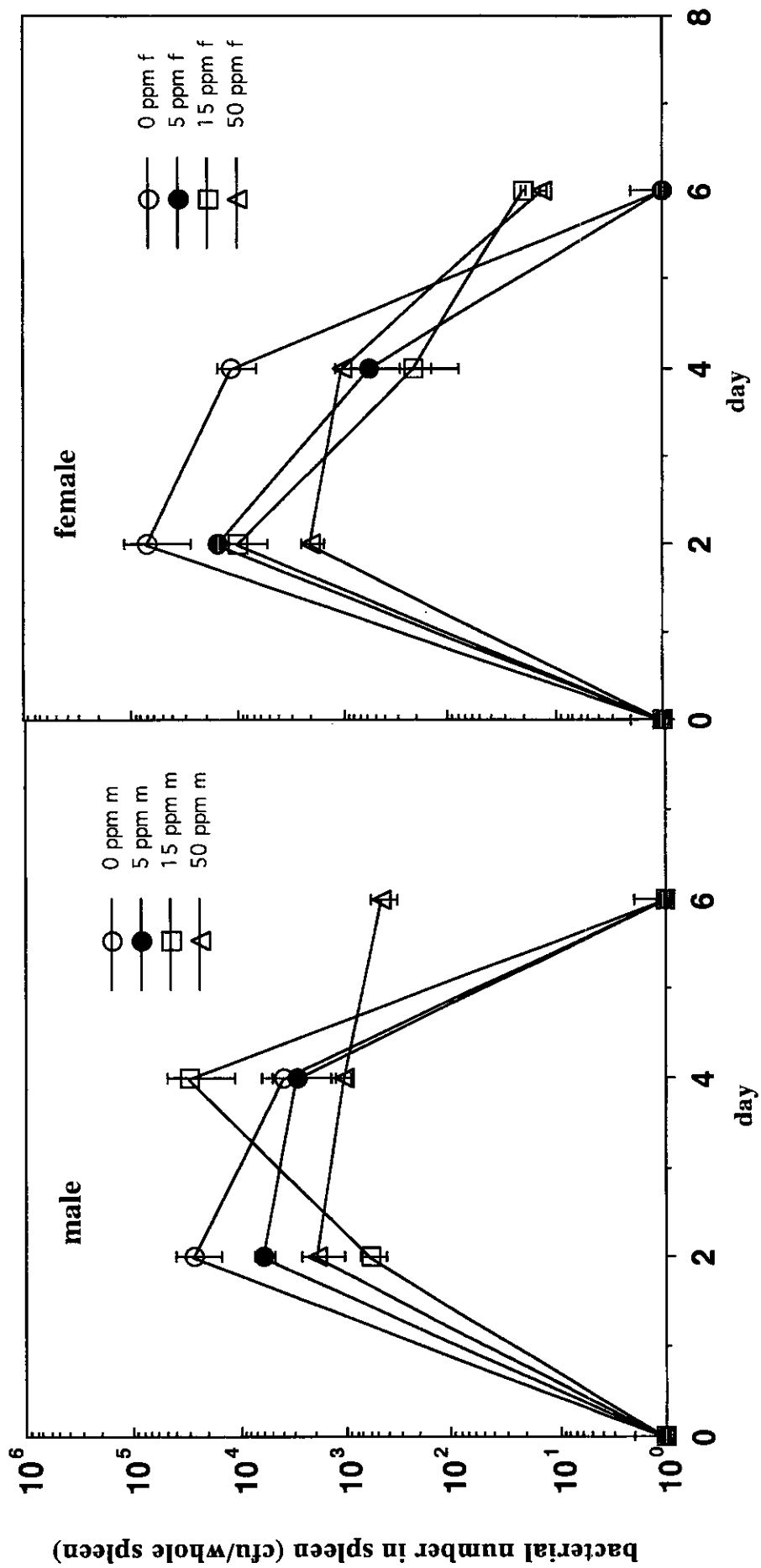


Fig. 3 Effect of TBTCI on *Listeria* infection

Table. 1 Splenocyte and thymocyte popuration in 3 type mice TBTCI eposured

Male	p p m	Weight			Spleen					Thymus		
		Body	Spleen	Thymus	CD4	CD8	Bcell	CD3	Mac	NK	CD4	CD8
Control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
milk	50				↑	↑						↑
placenta	50	↑		↑								↑
milk+placenta	50	↑		↑								↑

Female	p p m	Weight			Spleen					Thymus		
		Body	Spleen	Thymus	CD4	CD8	Bcell	CD3	Mac	NK	CD4	CD8
Control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
milk	50				↓	↓		↓				↓
placenta	50				↓							
milk+placenta	50					↓						

Table 2 Transportion of TBTCI from Dams to neonate and milk

Dams	→	neonate
50 mg/l in water		38ng/neonate
(cummulated TBTCI =15mg/head)		(1 litter=12 heads)
Dams	→	milk
50 mg/l in water		3µg/100ml
(150µg/head/day)		(about 90ng/head/day)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合計画事業）

分担研究報告書

トリブチルスズの粘膜免疫系への免疫毒性に関する研究

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 鈴木 穂高 国立感染症研究所 食品衛生微生物部

研究要旨

脂溶性有害化学物質の多くは汚染された水や食物を介し、経口的に摂取される。このことから消化管は脂溶性有害物質に直接的に暴露される器官であると言える。消化管などの粘膜には粘膜免疫系という独自の免疫系が発達しているが、従来の免疫毒性においては粘膜免疫系への影響はほとんど考慮されてこなかった。本研究では粘膜免疫系を構成する要素の1つである小腸上皮細胞間リンパ球のsubset構成の変化を指標として、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を試みた。脂溶性有害化学物質としてトリブチル錫を用い、IEL subsetの変化を調べたところ、特に $\gamma\delta$ T細胞や $CD8\alpha\alpha^+\alpha\beta$ T細胞、 $CD8\alpha\alpha^+\gamma\delta$ T細胞の減少が顕著であった。これらのIEL subsetは非胸腺由来で、粘膜免疫系に特異的なsubsetである。本研究により、従来、免疫毒性の評価対象になっていなかった粘膜免疫系において、通常の胸腺由来T細胞よりも非胸腺由来T細胞がトリブチル錫に対し高い感受性を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

海洋防汚塗料として使用されるトリブチル錫(TBT)は、汚染された魚介類などを介し、ヒトに主として経口的に摂取される。このことは消化管がTBTに直接暴露される器官であることを意味している。

消化管などの粘膜には粘膜免疫系という特殊な免疫系が存在することが知られている。中でも小腸上皮細胞間リンパ球(IEL)は小腸の上皮細胞間に存在しており、粘膜免疫系の最前線に位置している。TBTの免疫毒性に関しては従来、胸腺、脾臓などの全身免疫系にアポトーシスを引き起こすこと等が報

告されているが、粘膜免疫系に関しては従来、免疫毒性評価の対象とされてこなかった。

本研究では、TBTの経口投与が小腸IEL subsetに与える影響について検討した。

B. 研究方法

試薬：塩化トリブチル錫は和光純薬より購入した。

マウス：5～6週齢のBALB/c♀マウスを日本クレアより購入し、1～2週間本研究所のSPF動物施設にて飼育した後、実験に供した。実験は1群6匹で行なった。

TBTの投与：TBTは蒸留水で希釈し、500 $\mu\text{g/day}$ 、50 $\mu\text{g/day}$ 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の分離：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、IELを分離した。IELの分離は、従来報告されている方法に若干の変更を加えて行った。その要点を記載すると、まず腸管内容物とパイエル板を除去した後、小腸を約2cmの断片にした。この腸管断片を1mM EDTA加Joklik-modified medium中に浮遊させ、水平往復振盪を行った。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分間振盪した。遠心分離後、再懸濁し、血球計算板で細胞数をカウントした。その後、percoll比重遠心法により、夾雑物を除去した。

IEL subsetの解析：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より購入)を用いて染色した。測定及び解析にはFACS Calibur(Becton Dickinson)を用いた。

統計解析：各濃度のTBT投与群をそれぞれのコントロール群とt検定を用いて、有意差を検討した。

C. 研究結果

TBT投与によるIEL数の減少は、TBT500 $\mu\text{g} \cdot 7$ 日間投与群でのみ認められた($P<0.05$, Fig. 1)。

subset構成については、TBT500

$\mu\text{g} \cdot 3$ 日間投与群で γ δ T細胞数の減少($P<0.05$, Fig. 3)、 α β T細胞中のCD8 α α^+ 細胞の減少($P<0.05$)、CD8 α β^+ 細胞とCD4 $^+$ CD8 α β^+ double positive細胞の増加($P<0.05$, Fig. 4)、 γ δ T細胞中のCD8 α α^+ 細胞の減少($P<0.05$, Fig. 5)が認められた。TBT500 $\mu\text{g} \cdot 7$ 日間投与群ではT細胞数の減少($P<0.01$)とnon-T non-B細胞数の増加($P<0.05$, Fig. 2)、 γ δ T細胞数の減少($P<0.01$, Fig. 3)、 α β T細胞中のCD4 $^-$ CD8 $^-$ double negative細胞とCD8 α α^+ 細胞の減少($P<0.05$, Fig. 4)、 γ δ T細胞中のdouble negative細胞とCD8 α α^+ 細胞の減少($P<0.05$, Fig. 5)が認められた。

D. 考察

古典的な免疫学ではT細胞は胸腺を經由し、胸腺で分化すると考えられてきた。しかし、近年の研究により、胸腺を經由せずに分化するT細胞が少なからず存在することが明らかになってきた。これらの非胸腺由来T細胞の多くは、通常の α β T細胞レセプター(TCR)ではなく γ δ TCRを発現しているが、 α β TCRを発現する細胞の中にもCD8 α 鎖をhomodimerとして発現するCD8 α α^+ T細胞など非胸腺由来のsubsetが存在することが明らかにされている。これらの非胸腺由来T細胞は、消化器系や呼吸器系、泌尿生殖器系などの粘膜組織に多く分布しており、通常の免疫系(全身免疫系)と異なる粘膜免疫系を構成する重要な要素となっている。また、B細胞においても粘膜組織にはIgAという特殊な免疫グロブリンを産生するB細胞が多く分布しており、近年、免疫学においては生体の免疫系は全身免疫系と粘膜免疫系の2つの

系から構成されているという概念が主流となっている。しかし、免疫毒性分野においては、依然、胸腺、脾臓を中心とした全身免疫系に対する免疫毒性のみが評価対象となっており、粘膜免疫系に対する免疫毒性はほとんど考慮されてこなかった。

小腸IELは、小腸上皮細胞間に存在し、腸管粘膜免疫系の最表層に位置するリンパ球である。小腸IELはほとんどがT細胞であり、通常、胸腺由来のT細胞 subsetと非胸腺由来で胸腺外分化するとされる特異的なT細胞 subsetとで構成されている。その役割は多様で、病原体に対する生体防御のほか、経口免疫寛容の誘導・維持・解除、あるいは小腸上皮の恒常性の維持などに幅広く関与しているとされる。

本研究では脂溶性化学物質としてTBTを用い、小腸IELのsubset構成の変化を指標とした脂溶性有害化学物質の粘膜免疫毒性評価系の確立を試みた。

TBT投与による影響は、TBT500 μ g・3日間投与群、7日間投与群で認められた。IEL数の変化はそれほど大きなものではなかったが、subsetに関しては、特に $\gamma\delta$ T細胞、CD8 $\alpha\alpha^+\alpha\beta$ T細胞、CD8 $\alpha\alpha^+\gamma\delta$ T細胞の減少が顕著であった。これらのsubsetは上述したように非胸腺由来であり、粘膜免疫系に特異的なsubsetである。これら非胸腺由来のsubsetが選択的に減少した原因については、subsetによるTBT抵抗性の違いの他、小腸粘膜固有層に存在し、非胸腺由来IELの分化部位とされているクリプトパッチがTBTにより障害されたことも考えられる。この点については今後さらに検討が必要である。今回はIELのsubset構成の変化

を中心に検討したが、今後、IELの細胞障害性やサイトカイン産生能などを機能面の変化を検討する必要がある。また、特に $\gamma\delta$ T細胞は自然免疫から獲得免疫への橋渡しとして、感染早期の生体防御に重要であることから、消化管感染症の経過への影響についても今後検討したい。

E. 結論

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細胞の減少が顕著であった。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。

Fig. 1 TBT投与によるIEL数の変化

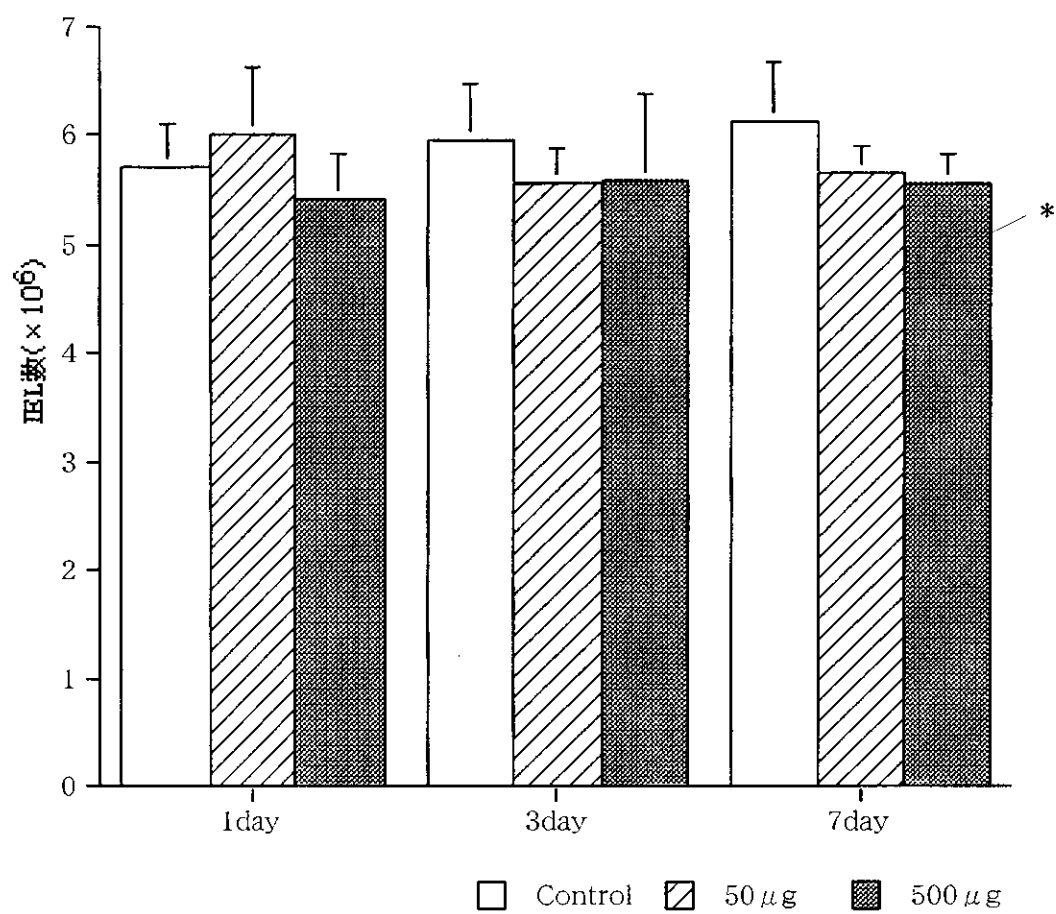


Fig. 2 TBT投与によるT細胞、B細胞、non-T non-B細胞数の変化

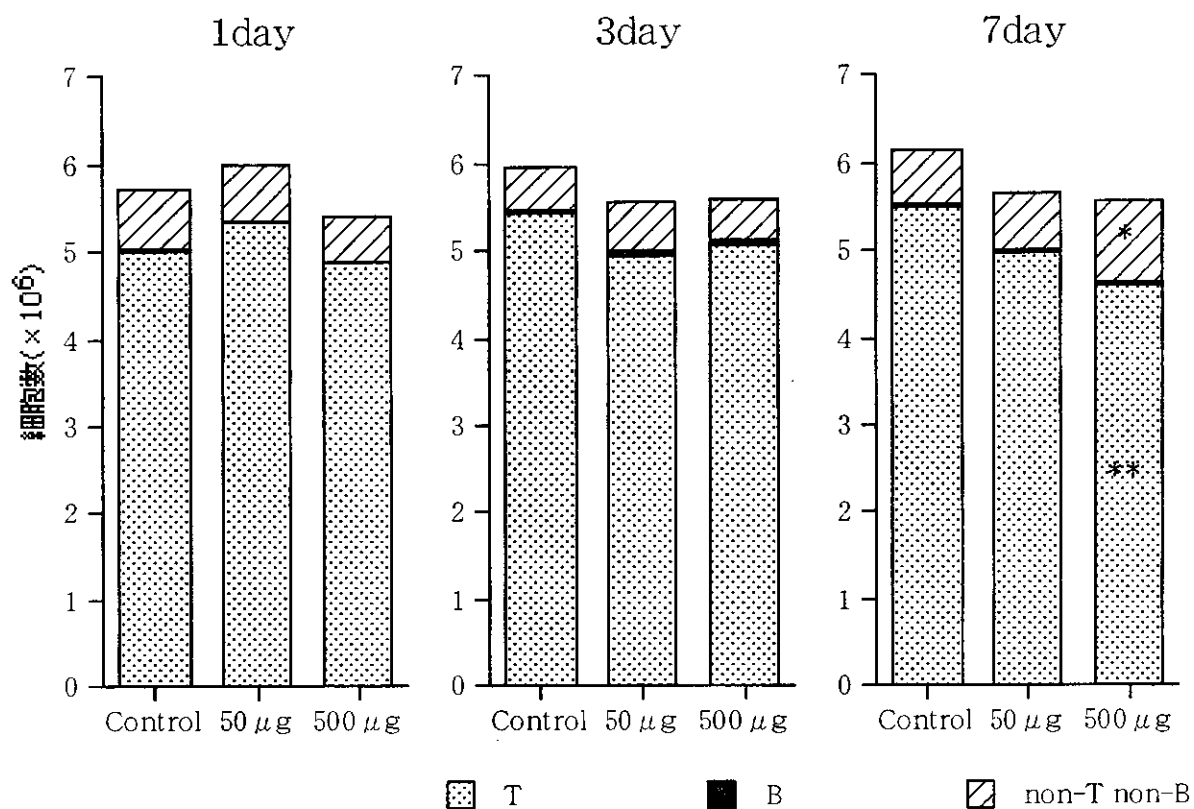


Fig. 3 TBT投与による $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞数の変化

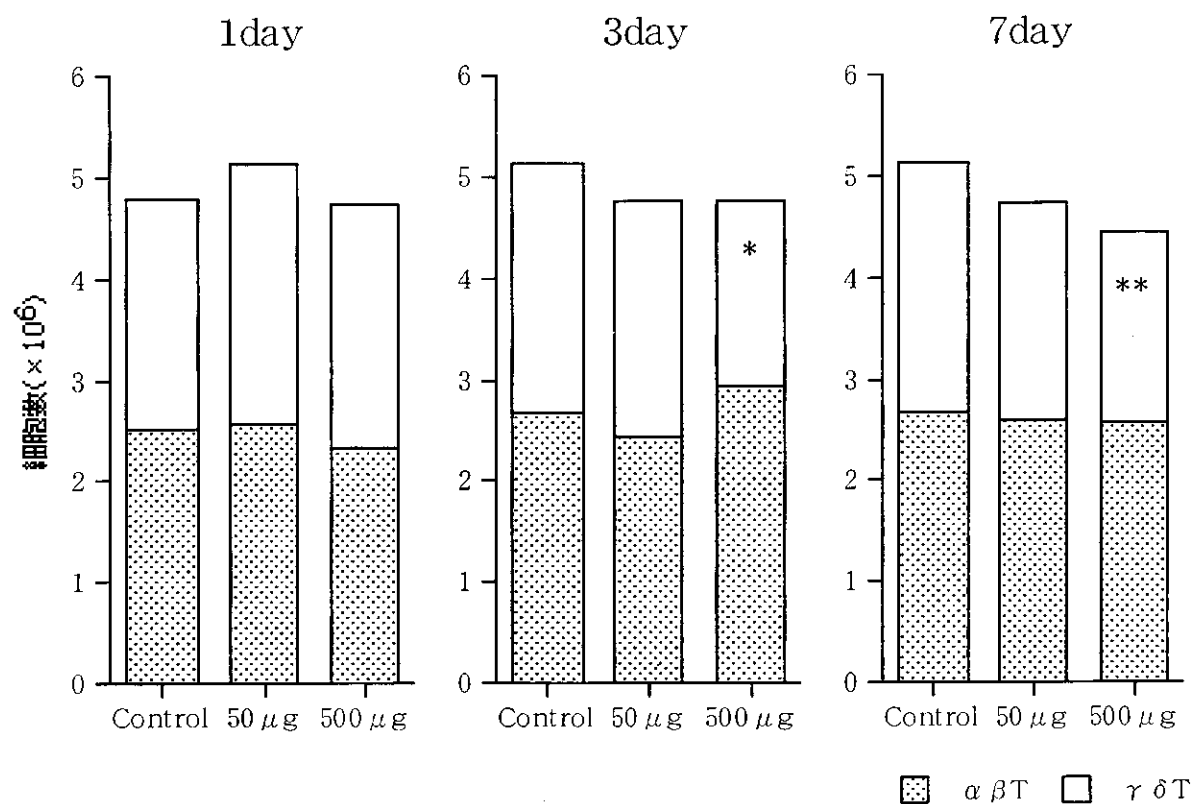


Fig. 4 TBT投与による $\alpha\beta$ T細胞各subsetの細胞数の変化

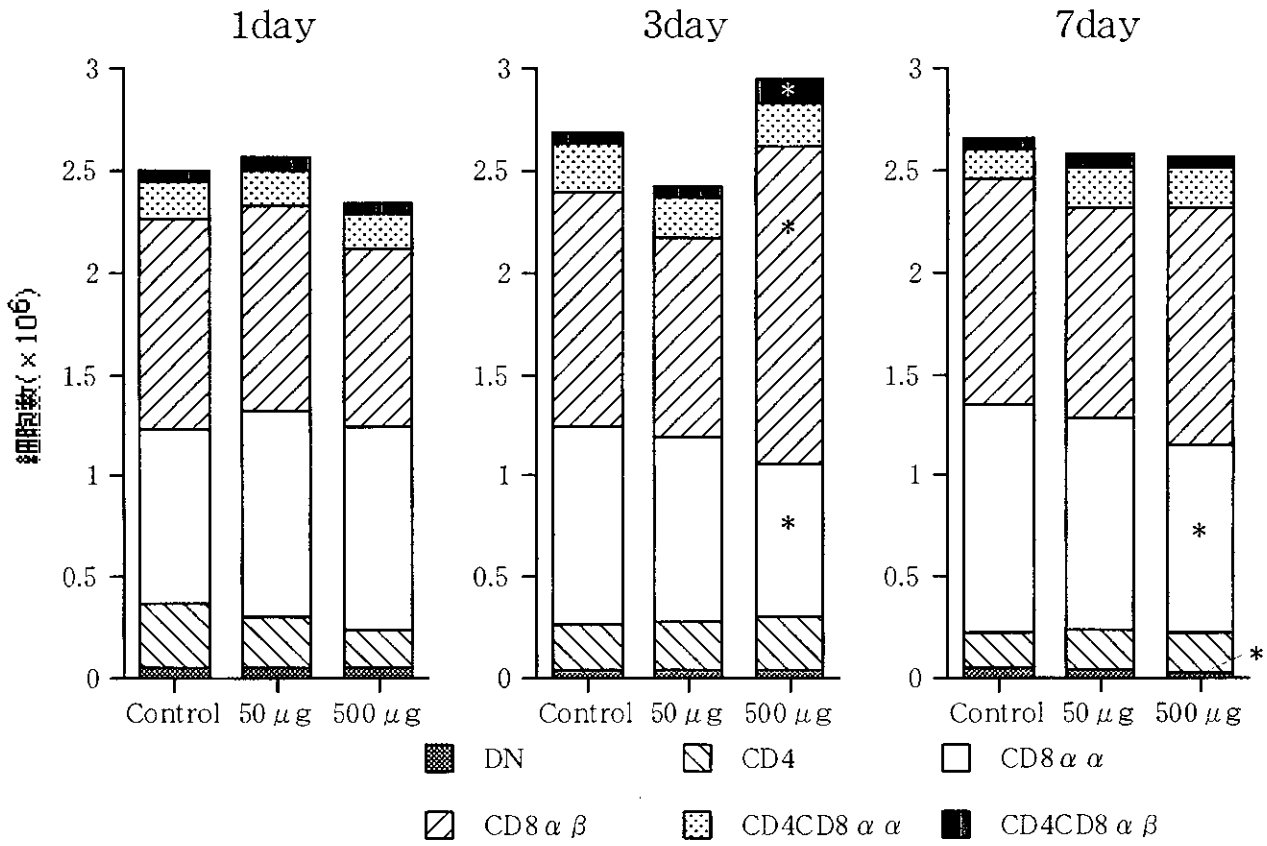
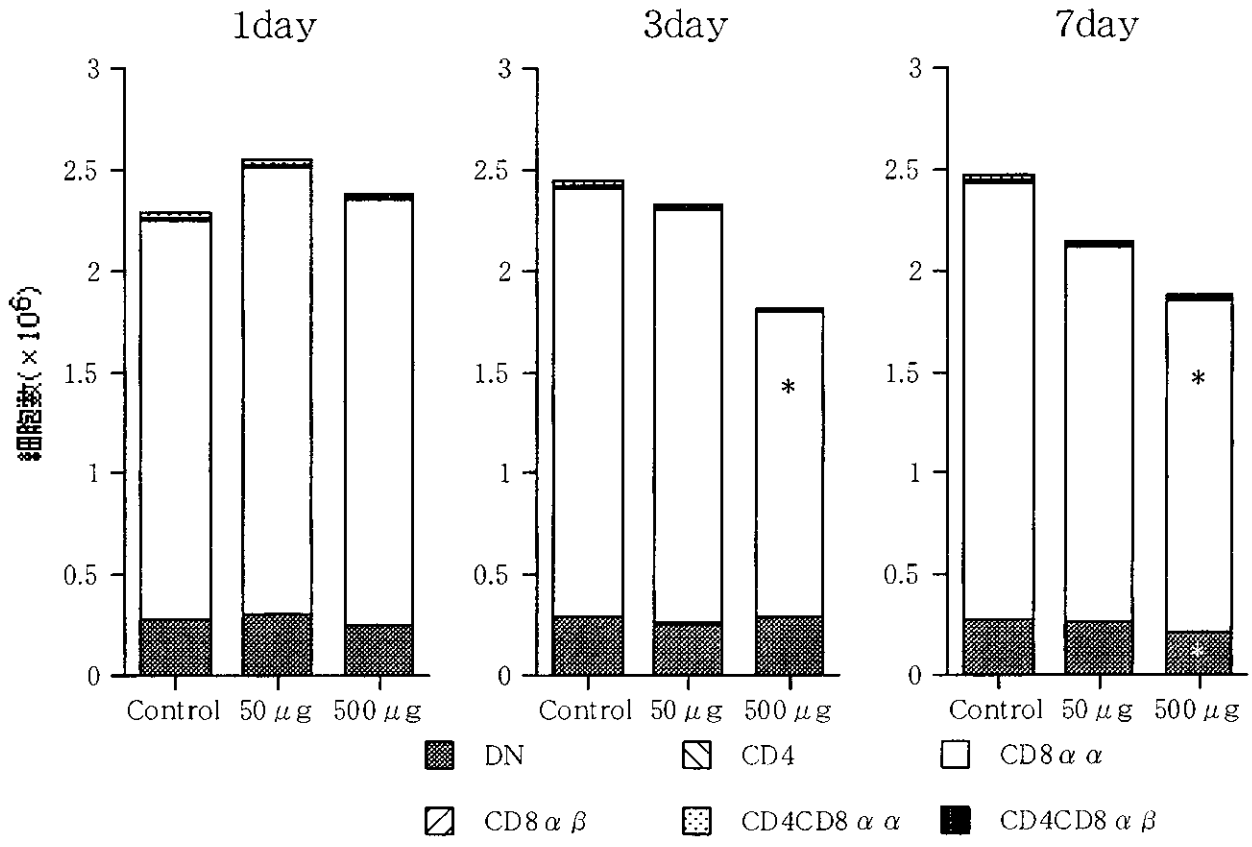


Fig. 5 TBT投与による $\gamma\delta$ T細胞各subsetの細胞数の変化



トリブチルスズの真菌感染抵抗性に及ぼす影響

分担研究者 杉浦 義紹 神戸市環境保健研究所

研究要旨 マウスを用いて母親から哺乳を介してトリブチルスズを摂取した子における真菌感染への影響をその生死、あるいは生体内臓器（腎臓）に残存する接種菌数で調べた。その結果、トリブチルスズはメスの仔マウスに対して曝露濃度依存的に真菌感染に対する抵抗性の低下を示すことが有意に認められた。一方、オスの仔マウスの場合は曝露群の間で統計的な有意差は得られなかったが、腎臓に残存した接種真菌数ではメスと同じ結果が得られた。従って、哺乳を介したトリブチルスズ曝露は仔マウスに影響を与え、特にメスで真菌感染の抵抗性に影響することが判明した。

A. 研究目的

新興および再興感染症の出現が近年頻発し、わが国や諸外国で社会問題となっている。環境汚染化学物質のうち、内分泌攪乱物質の一つである有機スズ（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年多くの国で使用されてきた。近年船底に塗布された有機スズ類が溶出して海洋を汚染したため、貝類（特にメス）に異変を引き起こしている。このことは同時に有機スズ類が魚介類の体内で濃縮される食物連鎖が懸念されている。わが国は魚介類の消費量が多いため、摂取した有機スズ類による健康被害が心配される。本研究では今なお海洋汚染が問題となっているトリブチルスズ曝露による真菌感染に対する抵抗性を調べ、人への健康被害の評価に役立てることを目的とす

る。研究ではマウスモデルを用い、トリブチルスズに曝露された母親から哺乳を介して次世代である仔の免疫機能に及ぼす影響を *Candida albicans* 接種に対する感染抵抗性を指標として検討した。

B. 研究方法

ICR 系妊娠（16 日目）マウス 9 匹を購入し、出産後各親から産まれた仔マウスの匹数から親を 3 群に分け、それぞれの群に(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を飲料水として与え、3 週令と 5 週令目に真菌の接種を行った。なお、仔マウスは 3 週令目に雌雄を調べてそれぞれ別のゲージに各 5 匹ずつ 3 週令実験用、5 週令実験用として分けて入れ、以後飼育用の水を飲料水として与えた。

ージに分けた翌日に *C. albicans* IFO1594 株を 3 群のオス、メス各 5 匹ずつ (計 10 匹 x 3) に 2.1×10^6 blastoconidia 尾静脈接種した。

実験②：5 週令目の仔マウスに実験 1 と同様に各群のオスおよびメスに *C. albicans* IFO1594 株を 1×10^6 blastoconidia 接種した。

判定：実験①および②における各群仔マウスの真菌感染後の経過を 30 日間観察し、生死で判定した。本実験は再実験を行い、50ppm 塩化トリブチルスズ投与群の代わりに 5ppm 塩化トリブチルスズ投与群を設けて低濃度摂取による差を調べた。なお再実験は 3 週令メス仔マウス群のみで行った。真菌感染の抵抗性は仔マウスの生死で判定した。

次に真菌感染の抵抗性評価を仔マウスの生死ではなく、腎臓における残存生菌数を指標としてトリブチルスズ摂取の影響を検討した。購入した ICR 系妊娠マウスが出産後、仔を集めて任意に 4 群に分け、母マウスに (1) 精製水 (2) 5ppm 塩化トリブチルスズ水溶液 (3) 15ppm 塩化トリブチルスズ水溶液 (4) 50ppm 塩化トリブチルスズ水溶液を飲料水として与え、3 週令目の仔マウスに *C. albicans* IFO1594 株を 1×10^6 blastoconidia 接種した。接種後、3 日目に半数、7 日目に残り全てのマウスを解剖し、腎臓を摘出した。腎臓は無菌的に 5ml の生理食塩水とともにホモジナイズし、各群の検体毎に順次生理食塩水で段階希釈を行った。 10^{-2} と 10^{-3} 希釈

溶液から各 2ml ずつ取り、2 枚の滅菌済みシャーレに 1ml ずつ入れ、クロラムフェニコール (100mg/L) 入り滅菌ポテトデキストロース (PDA) 寒天培地を注ぎ、十分に混和後、平板とした。得られた PDA 培地は 35℃ で 2 日間培養し、出現した *C. albicans* の集落数を計測した。再実験では (1) 精製水 (2) 5ppm 塩化トリブチルスズ水溶液 (3) 15ppm 塩化トリブチルスズ水溶液の 3 群で行い、3 日目と 6 日目に仔マウスを解剖して腎臓から真菌の回収を行った。なお、*C. albicans* は同様に 1×10^6 blastoconidia 接種した。

(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

3 週令メスマウスの場合、濃度依存的に生存率に差が認められ、50ppm 摂取群では接種後 18 日目に 80% 死亡した ($p < 0.05$)。オスの場合は 18 から 22 日目までにトリブチルスズ摂取群が 40% 死亡となり濃度による差はなく、対照群の死亡率が 60% であった。5 週令では雌雄マウスの生存率にスズ濃度の影響が認められたが、15ppm トリブチルスズ摂取群のオスは 50ppm 群より高い死亡率を示し、メスと異なる感受性を示した。再実験でもメスマウスで同様の結果が得られた。以

上の結果から、メスマウスでは 50ppm トリブチルスズ摂取で接種したカンジダ菌に対する抵抗性が有意 ($p<0.05$) に低下し、影響があることが認められた。

次に接種した真菌を腎臓から回収した実験では 3 日目で菌数が減少するものの 6、7 日目には再び菌数の増加傾向があった。この場合、最初に行った実験ではトリブチルスズ摂取量と腎臓での真菌残存数との間に明瞭な濃度依存関係を判断しにくかったが、再実験では雌雄で 0、5、15ppm の摂取量に応じた濃度依存的な影響が明確に認められた。

D. 考察

トリブチルスズは内分泌攪乱物質として現在養殖貝のメスにペニス形成（インボセックス）を生じさせ、次世代へ種の保存を妨げる問題を引き起こしている。共同研究者による免疫毒性の実験から、ラットではトリブチルスズ摂取により CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞の減少が認められており、真菌に対する防禦機構である細胞性免疫機能の低下が示唆されている。マウスの場合、3 週令と 5 週令メスとともに高濃度（50ppm）のトリブチルスズ摂取の場合カンジダ感受性を示したが、オスはトリブチルスズ摂取の影響を濃度依存的に受けていないように思われた。対照群で比較すると今回用いた接種量では 3 週令のオスはカンジダ感染に弱く、メスは抵抗性を示した。次に腎臓に残る

真菌数を接種後 3 日目と 6 あるいは 7 日目に調べて見たところ、生死判定と同様にトリブチルスズの摂取量と真菌回収数との間で相関性がメスにおいて認められた。興味あることに生死ではオスの場合トリブチルスズ摂取の影響が判別しにくかったが、腎臓より残存真菌を回収してみるとトリブチルスズ摂取の影響が現れていることが判明した。このことから、母マウスから哺乳を介してトリブチルスズに曝露された仔マウスはメスにおいて強くその影響が残り、侵入したカンジダ真菌を排除する細胞性免疫機能が低下したと推測された。一方、オスは臓器レベルでは影響を受けているが、致命的な影響を受けるほどではなく、真菌に対する免疫機構の調節にメスと異なる作用メカニズムが存在することが示唆された。

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子にどのような影響を及ぼすかは人の疾病と環境との因果関係を明らかにする上で非常に重要な課題の一つである。前年度の実験結果を受けて、今年度は化学物質に対して感受性の高い ICR 系マウスを用いて母マウスにトリブチルスズ水を飲ませ、哺乳から仔マウスにトリブチルスズを曝露させたところ、メスマウスにおいて有意に真菌感染に対して抵抗性が低下することが明らかになった。一方、オスマウスではメス

とは異なった感受性を示し、有意差のある結果は得られなかったが、生体内臓器に残存する真菌数の評価ではトリブチルスズ曝露の影響が認められることが判明した。マウスの生死から見ると、50ppm のトリブチルスズ曝露がなければ影響が認められなかったが、生体内では 15ppm で雌雄ともにトリブチルスズ曝露の影響を受けていたことが判明した。

以上マウスモデル実験から得られた結果から、トリブチルスズ曝露が養殖メス貝においてインボセックスを引き起こしたのと同様な生理系の異常現象はマウスの場合でも当てはまることが示唆された。この結果を人の場合に当てはめて考えることはまだ出来ないが、幼児の場合は哺乳を介してトリブチルスズ曝露を受けた際、真菌に対する疾病防禦機構に影響があるかもしれない可能性が見出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 杉浦 義紹:トリブチルスズの *Candida albicans* 感受性に及ぼす影響 日本医真菌学会雑誌 第 42 巻 増刊 1 号 p93 (2001).

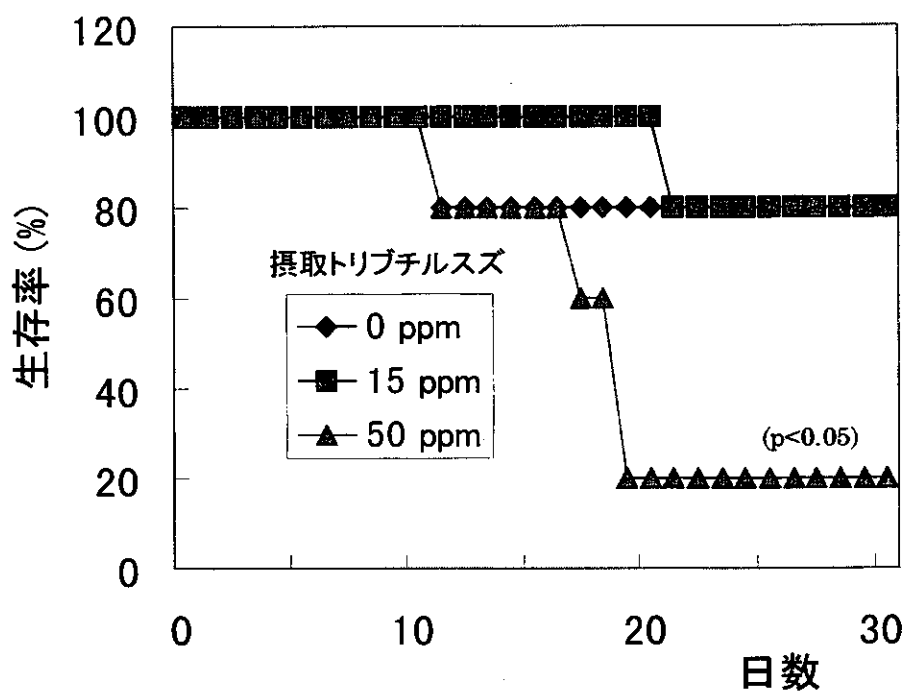
G. 知的所有権に取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

3週令メスマウス



3週令オスマウス

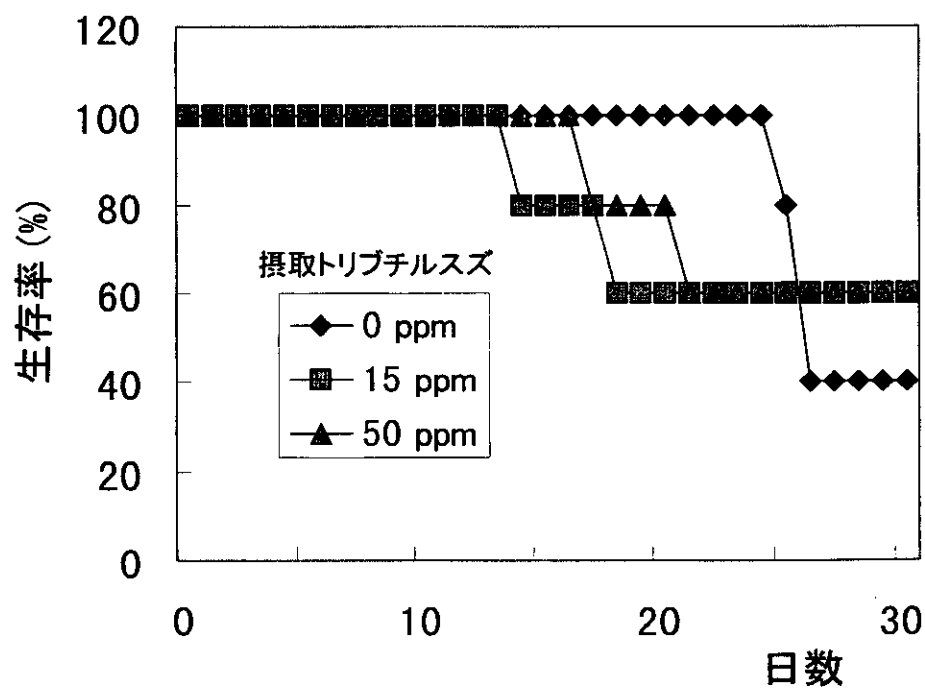


図1 3週令仔マウスへの *Candida albicans* 感染

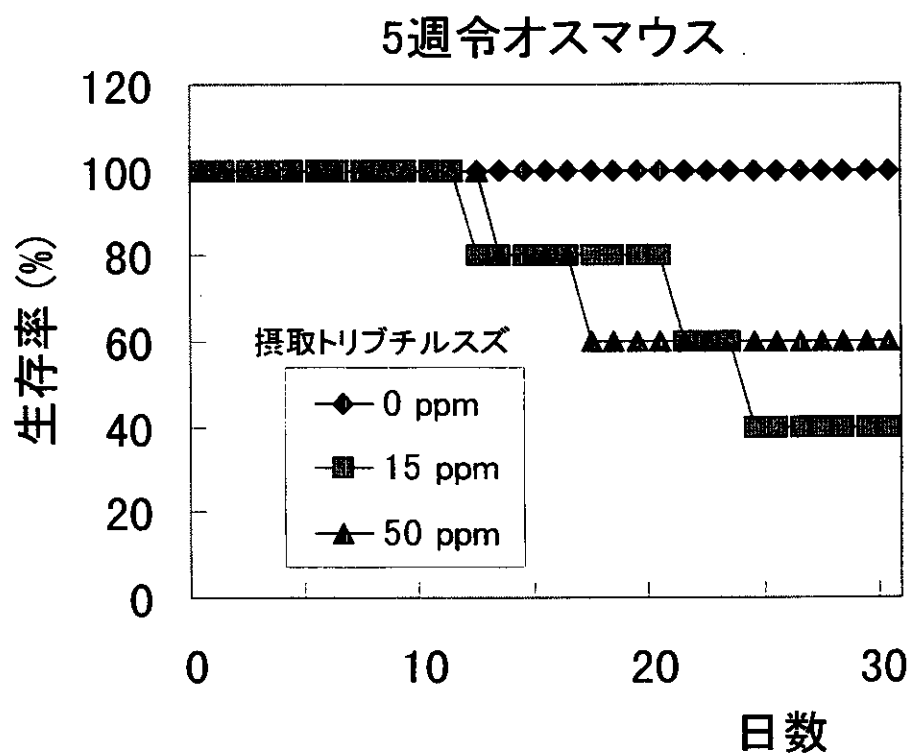
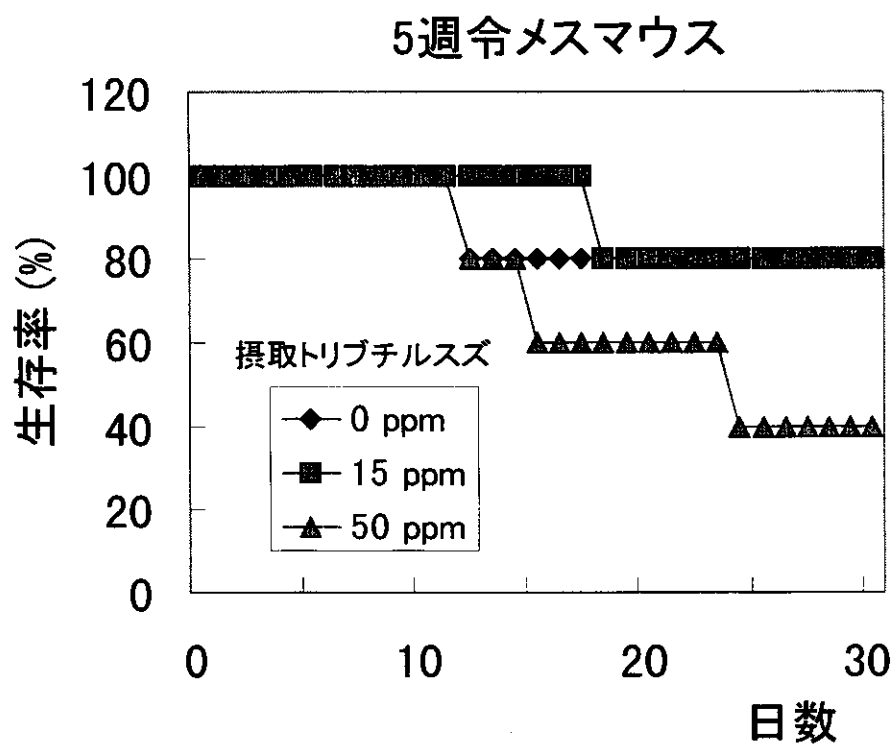


図2 5週令仔マウスへの *Candida albicans* 感染

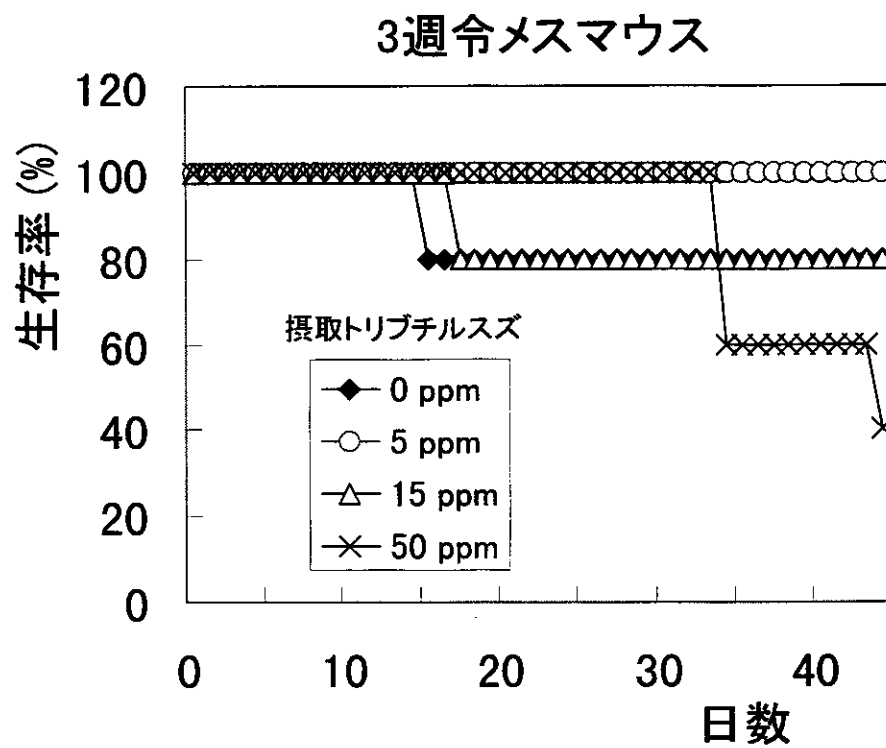
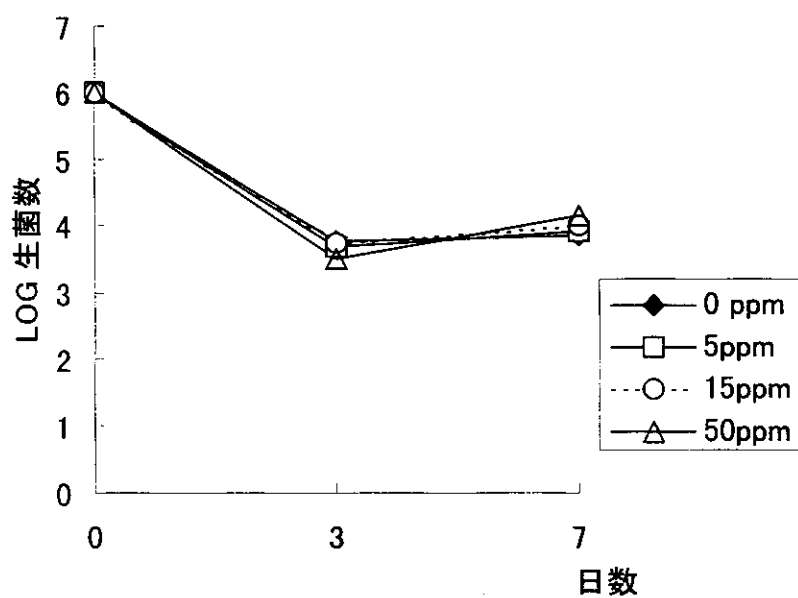


図3 3週令仔マウスへの真菌感染（再実験）

カンジダ感染(メス:3週令)



カンジダ感染(オス:3週令)

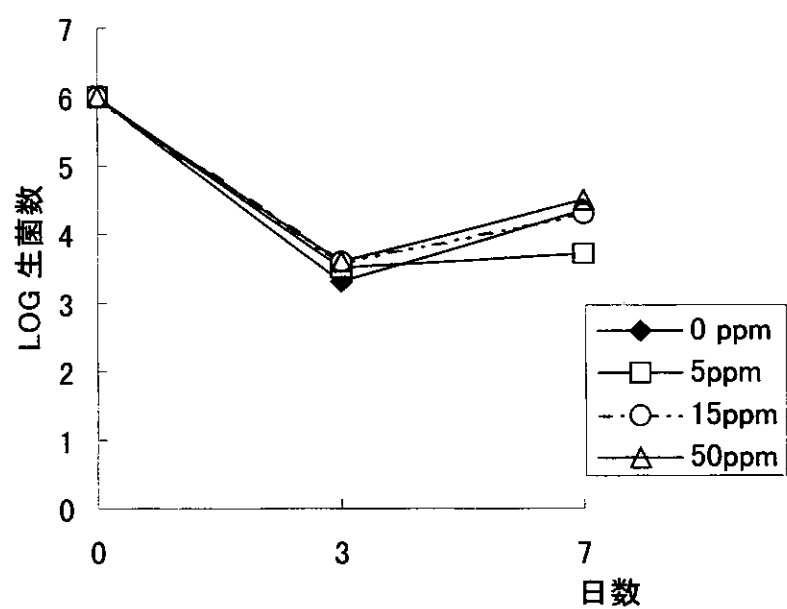
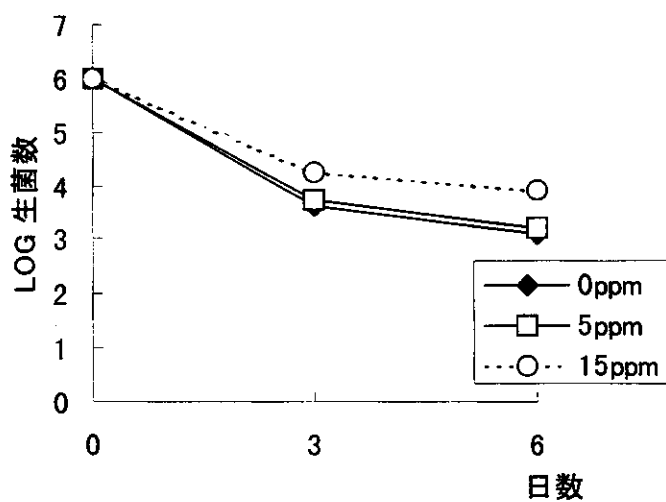


図 4 接種 *Candida albicans* の腎臓残存数

カンジダ感染(メス:3週令)



カンジダ感染(オス:3週令)

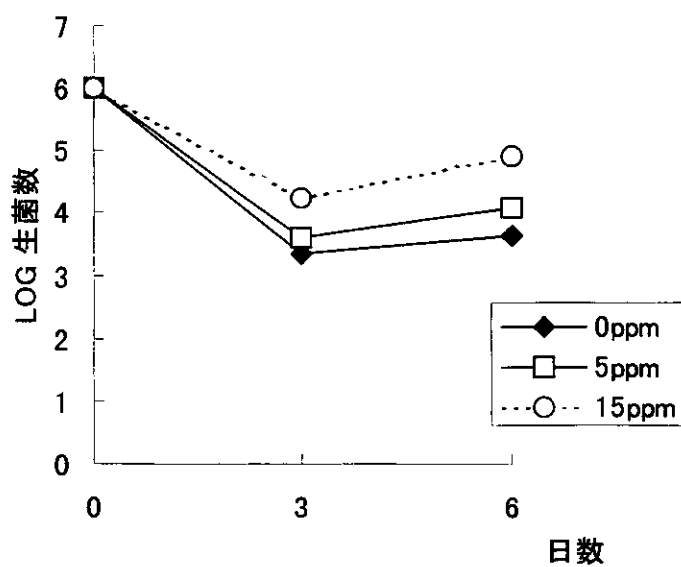


図5 接種 *Candida albicans* の腎臓残存数 (再実験)

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

サルにおけるトリブチルスズの免疫毒性

分担研究者 向井鏐三郎 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター、
検査健康管理室 室長

研究要旨 生活環境中の脂溶性有害物質が食品や水などを介して生体に暴露した時の宿主の感染症に対する抵抗性に及ぼす影響を調べるにあたり、本研究では、サル類を用いてその評価を行うことを目的とした。昨年度は、国立感染症研究所筑波霊長類センターで飼育されているサルの常在ウイルス感染の状況を抗体検査により調査し、抗体陽性サルからのウイルスの検出法の確立を行った。今年度は、トリブチルスズ（TBT）のサルへの経口投与法を確立し、TBT 投与前後の免疫状態の検討や血液学的検査をおこなった。その結果、投与後3週目までの解析ではNK（Natural Killer）活性に低下傾向がみられたが、その他の検査値には有意の差は認められなかった。さらに、投与前のサル血中 TBT の測定により、筑波霊長類センターで飼育されているサルは本化学物質によりヒトと同程度汚染されていることが明らかになった。今後、TBT の継続投与のサルへ及ぼす影響を調べるとともに、保存検体を用い、投与前後の血中ウイルス量や血清抗体価の変動を検討する予定である。

A. 研究目的

TBT (Tributyl Tin)をはじめとする生活環境中の脂溶性化学物質は体内に蓄積され、その慢性毒性として免疫毒性があることが報告されている。TBT は海草の付着防止剤として船舶や漁網に塗布されたり、防腐剤として工業用冷却水へ添加され、大量に

生産されていた。現在はその使用が主要7カ国および西欧諸国では中止されているが、魚類、肉類、乳製品等にその蓄積と汚染がみられている。現在までの研究で、魚類、齧歯類での免疫抑制作用や、ヒトのリンパ球を用いた in vitro でのNK（Natural Killer）細胞活性の阻害が報告されて