

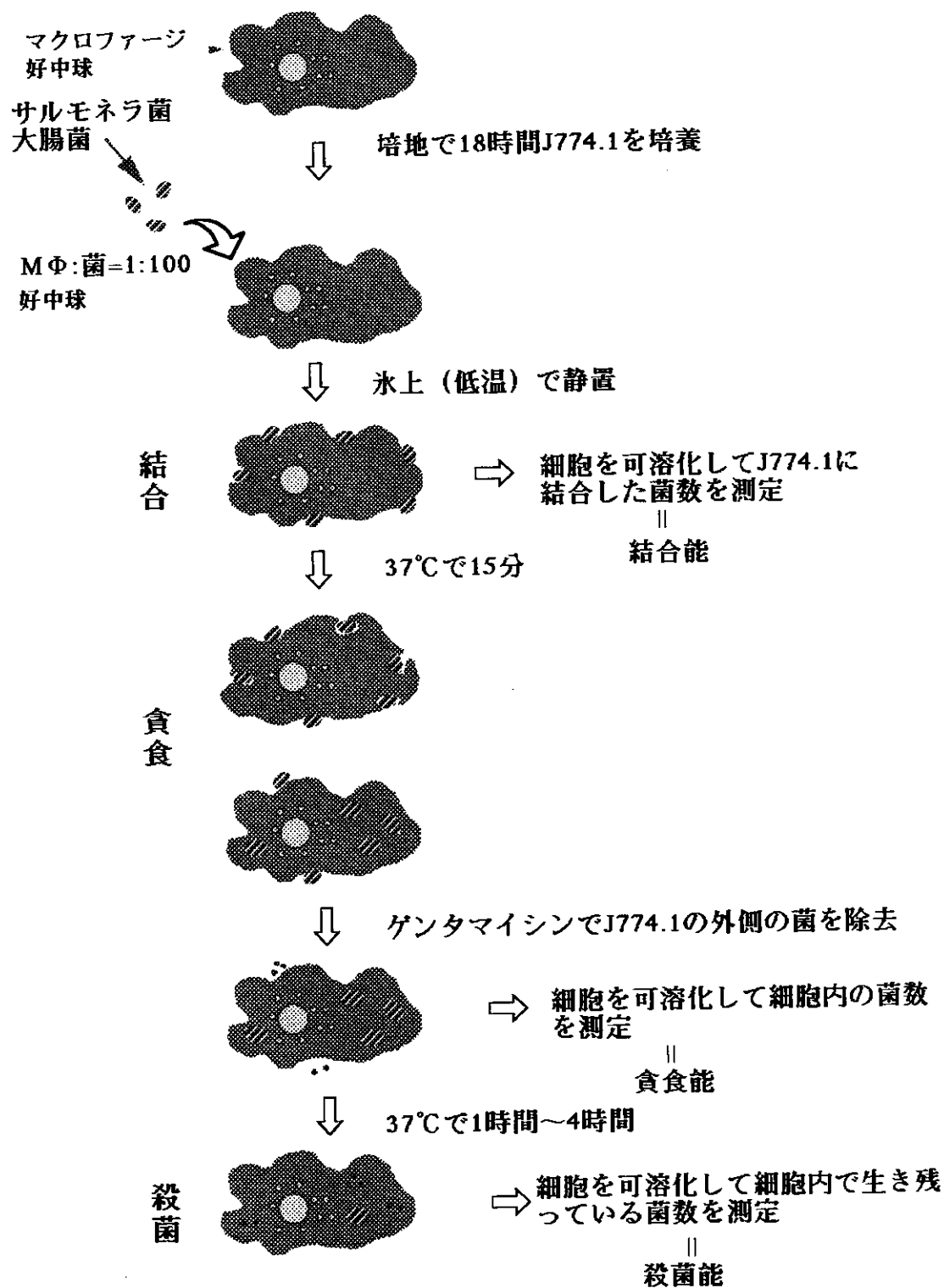


Fig.1 マクロファージおよび好中球の各機能の測定法

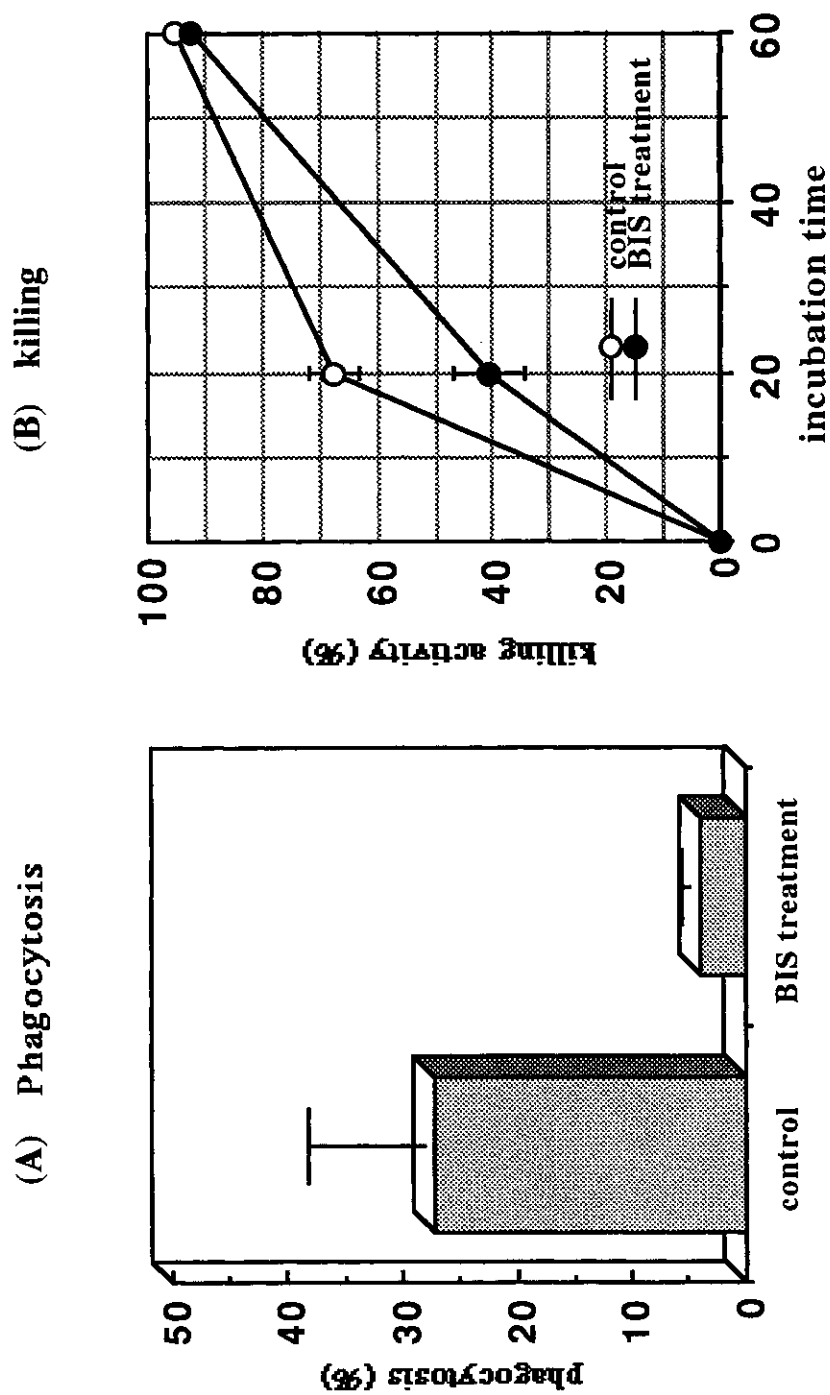


Fig.2 Effect of Bisphenol A on the defense functions of neutrophil

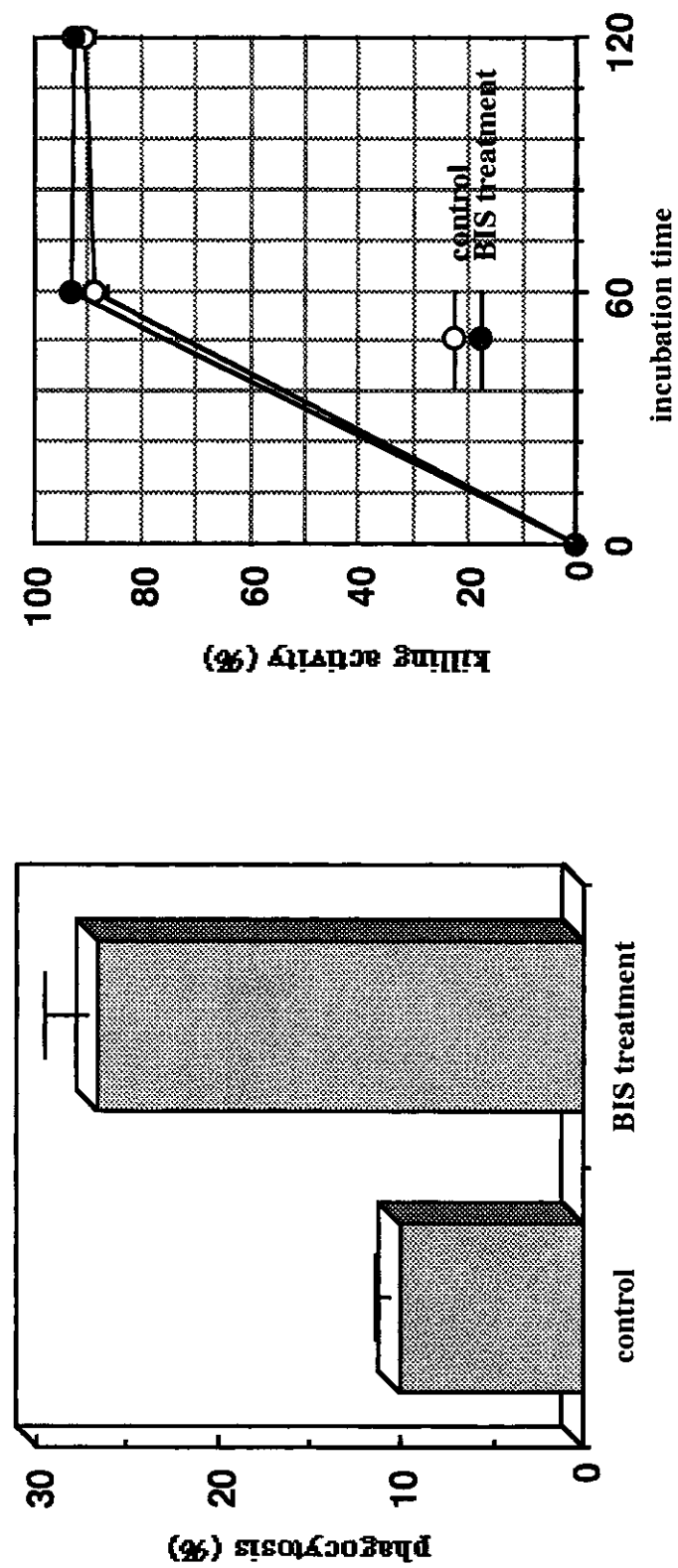


Fig. 3 Effect of Bisphenol A on defense functions of splenic macrophage activity

Table I. The weights of body, spleen and thymus in mice at Day -2 and Day 0

	Day 5		Day 7	
	Control	BIS	Control	BIS
body weight	18.97 ± 0.57	19.7 ± 0.22	18.72 ± 0.7	21.7 ± 0.176
spleen wt./b.w.	0.0056 ± 0.0002	0.0064 ± 0.0002	0.0061 ± 0.0004	0.0060 ± 0.0001
thymus wt/b.w.	0.006 ± 0.0007	0.006 ± 0.0004	0.0052 ± 0.0002	0.005 ± 0.0002

Table II. The population of the splenic T cell , B cell and macrophage in mice at Day -2 and Day 0

	Day 5		Day 7					
	Control	BIS	Control	BIS				
T cell (CD3+ cell)	2971 ±	1.98	2565 ±	0.59	2440 ±	1.64	2144 ±	0.47
B cell (B220+ cell)	4075 ±	1.21	4138 ±	1.38	4989 ±	1.12	4515 ±	1.52
CD4	2105 ±	1.35	1747 ±	0.8	2125 ±	1.64	1898 ±	0.65
CD8	1015 ±	0.53	820 ±	0.3	826 ±	0.65	675 ±	0.41
Macrophage (Mac1+)	665 ±	0.32	452 ±	0.39	644 ±	0.2	534 ±	0.21

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

潜伏型 HIV 感染実験とその評価

分担研究者 天野 富美夫 国立感染症研究所細胞化学部主任研究官
(大阪薬科大学薬学部教授)

研究要旨 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、トリブチルスズ(TBT)を用いて調べた。その結果、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、発がんプロモーターとして知られるホルボールエステル(PMA)による強力な再活性化に対しては促進的に作用した。一方、ヒトの神経細胞およびマクロファージに感染して潜伏化することが知られるヘルペスウイルス 1 (HSV-1)のヒト単球系細胞株 U937 細胞への感染に対しては、TBT は感染ウイルス数が少ない時には促進的、多い場合には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。

A. 研究目的：

環境中に拡散し、再び食品等を通じて摂取されて生体内で濃縮され、様々な毒性を発現する可能性が示唆されている脂溶性化学物質のヒトに対する生物影響を把握してその危険性を回避することは、国民の健康を維持し次世代への悪影響を除くために緊急に必要である。本研究では、主課題としてこれらの化学物質の免疫系に及ぼす作用に注目し、「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」を研究することを目的とする。その中で、本研究は本年度の分担研究課題として「潜伏型 HIV 感染実験とその評価」を目標にして、マクロファージ／単球に対する脂溶性化学物質の影響を調べ、細胞内に潜伏感染したウイルスの再活性化に及ぼす影響を評価することを目的とする。

昨年度の研究に続き、脂溶性化学

物質のうちのトリブチルスズ(TBT)を研究対象にした。従来、TBT は有害な環境汚染有機金属化合物として注目されてきたが、本研究課題が目指すような免疫系に及ぼす作用に関する研究は欧米諸国を中心に報告されているものの報告数はそれほど多くない。また、その大部分が T-リンパ球系に対する細胞障害性に関連するもので、マクロファージ/単球に関するものはほとんどない。まして、HIV-1 等の潜伏感染ウイルス再活性化やヒトヘルペスウイルス 1 の潜伏感染に関する報告はなく、本研究の結果は国内外に多くの影響をもたらすものと期待される。

B. 研究方法：

(1) U1 細胞の培養と HIV-1 遺伝子の再活性化：

ヒト単球系細胞株の HIV-1 潜伏感染株 U1 細胞は、RPMI1640+10%FBS 中で培養し、増殖状態の良い状態で集め、 2×10^5 cells/ml に懸濁した。これを Costar48 穴プレートに 0.25ml ずつ分注し、TBT のエタノール溶液を終濃度 1-100 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 1ng/ml TNF- α を添加して 37℃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。

(2) U937 細胞の培養と HSV-1 の感染実験：

ヒト単球系細胞株 U937 の亜株 Cl.1-4 を RPMI1640+10%FBS 中で培養、継代した。HSV-1(strain F)の感染実験に際して、細胞を 1×10^5 cells/ml に懸濁したのち Costar12 穴プレートに 1ml ずつ分注し、これに 0.1-100 nM PMA または 0.1-1000 nM All-trans retinoic acid (ATRA)を添加して 37℃で 20 時間培養した。新鮮な培地と交換した後、HSV-1 を 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℃で 20 時間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄して細胞を回収した。なお、HSV-1 を MOI=10 で感染させる実験系では、細胞を一つずつに分散させ、これを、あらかじめ 96 穴プレートに飽和するまで培養した Vero 細胞に添加し、抗 HSV-1 中和抗体存在下で 37℃で 48 時間培養した。また MOI=0.01 で感染させた実験系では、細胞を洗浄した後に遠心によって回収し、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。

C. 研究結果：

（１）U1 細胞における HIV-1 遺伝子の再活性化に及ぼす TBT の影響：

昨年度の研究結果に基づき、U1 細胞の実験で用いる TBT の濃度を、U1 細胞に直接的な細胞障害作用を示さない 1-100 nM にした。図 1 に示すように、培地交換による細胞増殖シグナルだけで低レベルの自然活性化が起こり p24 の産生を誘導したが、これを TBT が濃度依存的に阻害した。TBT 無添加に比べ、3 nM 以上の TBT で有意な阻害が見られ、p24 産生量が約 1/3 に低下した（図 1A）。

これに対し、1 ng/ml TNF- α は単独では p24 産生促進効果が認められなかったが、TNF- α 存在下での TBT は 1A と同様に、p24 産生に対して用量依存的な阻害を示した（図 1B）。

一方、U1 細胞からの HIV-1 遺伝子を強力に再活性化することが報告されている PMA を 10 nM 添加した結果、無添加の対照に比べて約 40 倍の p24 産生を誘導した。次に PMA 存在下に TBT を添加した結果、TBT の濃度に

依存した促進と阻害が認められた。最大の促進活性は TBT=3 nM で認められ、100 nM では阻害した（図 1C）。これらの結果は、PMA のような発がんプロモーター作用をもつ薬物や化合物が低濃度の TBT と協調的に作用して、ヒト単球／マクロファージに潜伏感染している HIV-1 の遺伝子を再活性化する可能性があることを示唆する。

（２）U937 細胞における HSV-1 の感染におよぼす TBT の影響：

1. 感染ウイルス数が多い場合： 20 時間の PMA あるいは ATRA を添加した前培養によって、U937 細胞は単球からマクロファージに機能分化することが知られている。この条件下で MOI=10 で HSV-1 を U937 細胞に感染させた場合、Vero 細胞の障害によるプラーク形成で定量したウイルス感染細胞数は、PMA 添加群(P0.1-P100)では無添加対照群(N)よりも低下した。これに対し、ATRA 添加群(A0.1-A1000)は ATRA=10 nM をピークとするウイルス感染細胞数の増加を示した。しかし、無添加、PMA あるいは ATRA 添加のいずれにおいても、TBT は用量依存的にウイルス感染細胞数を減少させた（図 2）。この結果は、感染させるウイルス数が多い場合には、TBT は HSV-1 の単球／マクロファージへの感染を阻害する

ことを示唆する。

2. ~~感染ウイルス数が少ない場合：~~

U937 細胞に感染させる HSV-1 を MOI=0.01 に低下させた場合、感染細胞の抽出液を Vero 細胞に加えて細胞障害性を調べた結果、無添加対照 (N) に比べ、PMA 添加群は 1 nM 以上でウイルス感染を増加させた。また、PMA=0 あるいは 0.1 nM では 1 または 10 nM TBT がウイルス感染を増加させたが、PMA=1 nM 以上では有意に抑制した (図 3)。この結果は、感染ウイルス数が少ない場合、ヒト単球/マクロファージに対して TBT は単独で HSV-1 の感染を促進することを示唆する。また PMA でこの感染が強力に促進されると (PMA $\geq$ 1 nM)、TBT は逆にこれを抑制する傾向があることを示す。

D. 考察：

本年度の研究の結果、ヒト単球/マクロファージに潜伏感染した HIV-1 の再活性化に対して、PMA 添加等により再活性化を強く促進するような条件下では、TBT が 3-30 nM で対照の 2-3 倍、再活性化をさらに促進した。100 nM TBT が p24 産生の量を元のレベル以下に減少させたが、顕微鏡観察の結果、この濃度では TBT 単独も、また PMA 単独も細胞障害性に大きな変化を与えなかったが、両

者を共存させたことによって細胞への障害性が増したことを示唆するような細胞形態の変化が認められた。

従来の報告によれば、T リンパ球のアポトーシスを起こす高濃度 (1 μ M) において、TBT は細胞内の quin-2 に感受性の free Ca^{++} の上昇を誘導することが知られている。本研究の結果は、TBT 濃度がこれよりも 1/300-1/30 の低い濃度において、PMA の作用を増強することを示唆するものと思われる。今後、今回用いた低濃度の TBT が、細胞内に局在して高濃度になって作用する可能性や、また、その他の TBT の標的物質との特異的な作用を介して未知の機能を発現する可能性について検討する必要がある。

一方、本年度新たに行った HSV-1 の U937 細胞への感染に及ぼす TBT の影響に関する実験結果は、多くの重要な示唆を含むものと思われる。すなわち、感染するウイルス数が少ない場合には TBT が単独で感染を促進した (図 3) ためである。これは、1-10 nM という低濃度の TBT が低濃度のウイルス感染を促進する可能性を示唆するからである。この点については、他のウイルスの感染系においても検討する必要があると思われる。HSV-1 は膜をもつ構造をしており、宿主細胞への感染時にウイルス膜と宿主細胞膜の融合が起こること

が知られている。TBT の化学的な性状が脂溶性であることは、このように生体膜が介在する多くの反応系に影響する可能性を示唆するので、今後も感染の宿主－微生物相互作用の研究の中で、TBT の影響を検討していきたいと考えている。

また、高濃度の TBT が HSV-1 感染を阻害する機構については、ウイルスの細胞表面への吸着と侵入の過程を分けた解析が必要になり、それによって TBT の新たな作用機作が明らかになる可能性があると期待される。とくに、ウイルス数が多いためにウイルスの吸着・侵入のシグナルが強くなる状況下では、これらが細胞に取っ手のストレスとなり、そのストレスに応答するような細胞側の反応に対して TBT が調節的な役割を果たす可能性が考えられるので、今後は細胞内のストレス応答機構に焦点を当てた解析が重要になると思われる。

E. 結論：

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 Ca⁺⁺

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。

F. 研究発表：

1. 論文発表

1. Ikegami, R., Sugimoto, Y., Segi, E., Katsuyama, M., Karahashi, H., Amano, E., 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.

2. Tanaka, Y., Igimi, S., Amano, E.

Inhibition of prostaglandin synthesis by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages. Arch. Biochem. Biophys. **391**, (2001) 207-217.

3. 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.

4.. 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.

2. 学会発表

1. 唐橋久恵、天野富美夫：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。

G. 知的所有権の取得状況：

特になし

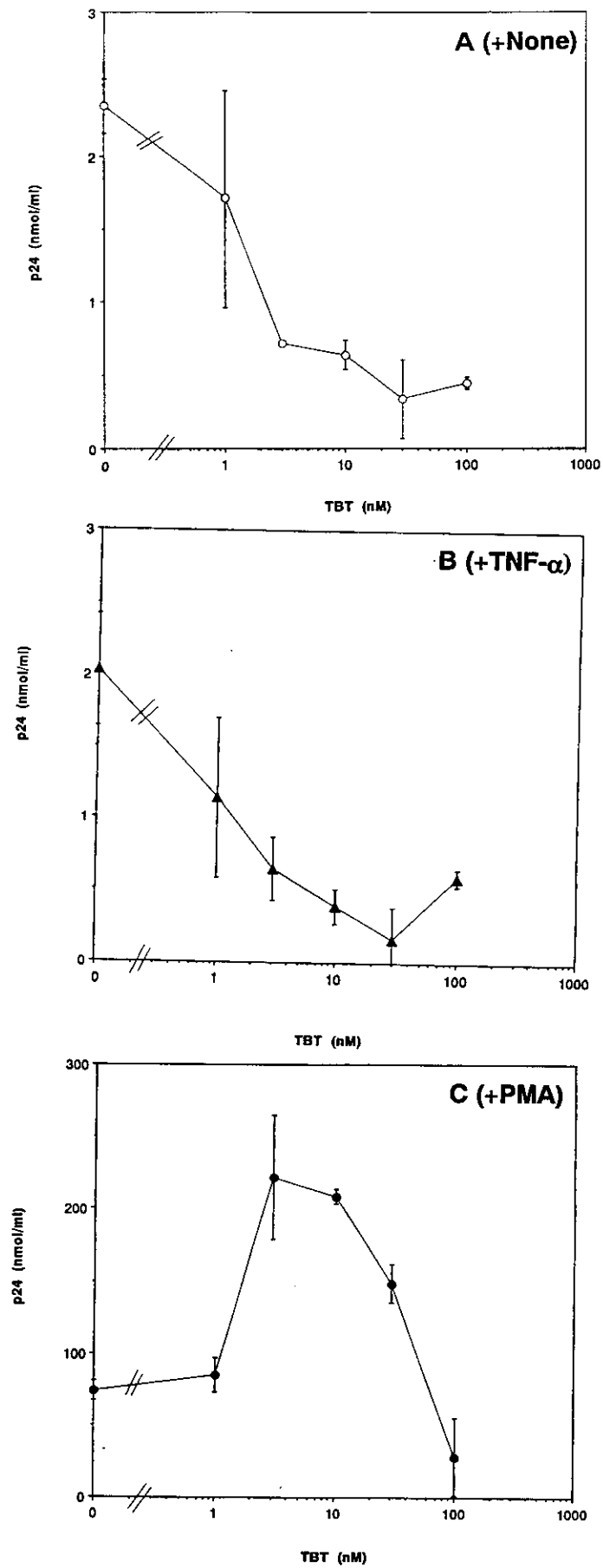


図1. U1細胞における HIV-1 遺伝子の再活性化に及ぼす TBT の影響

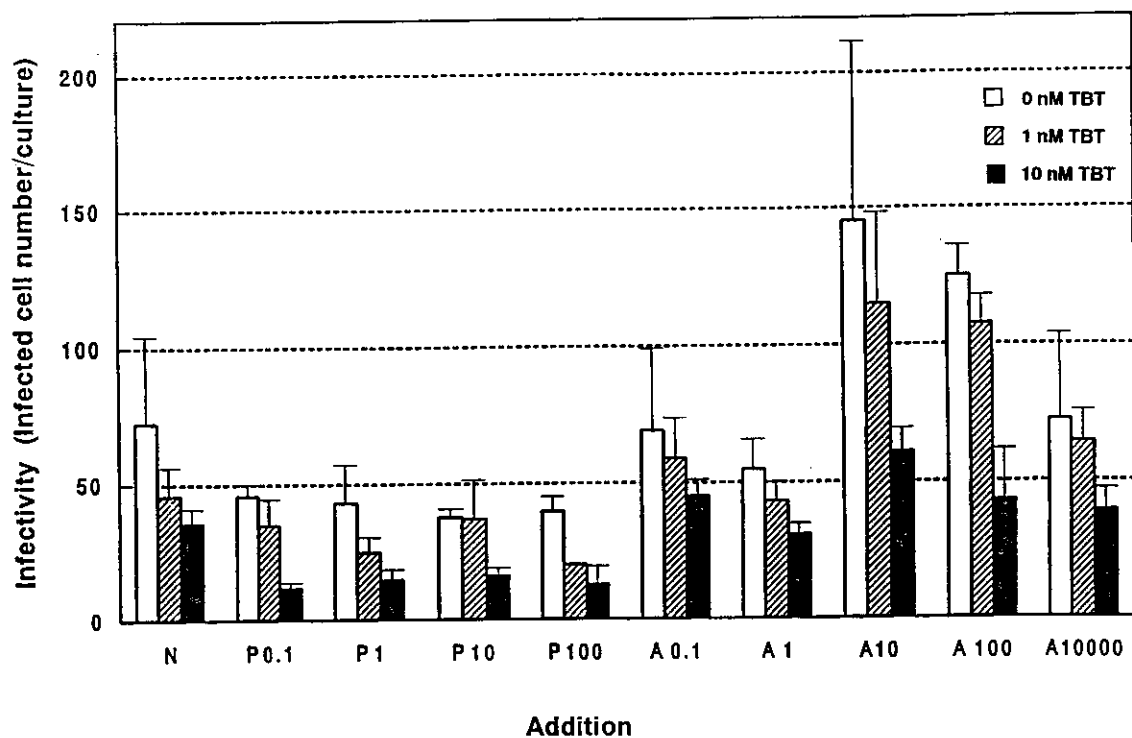


図2. HSV-1 の U937 細胞への感染に対する TBT の影響(MOI=10 PFU/cell)

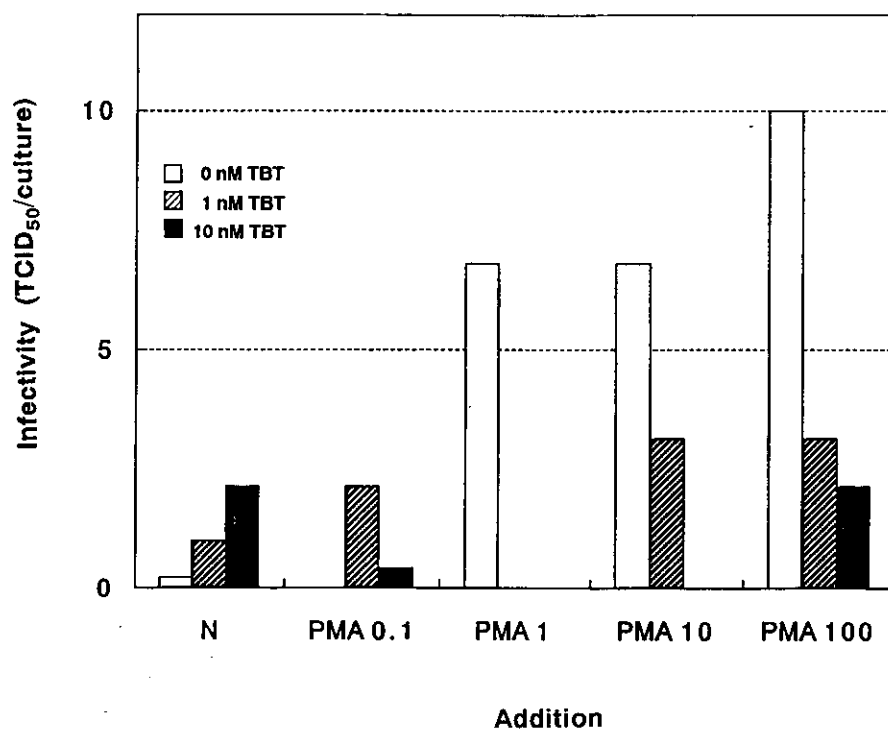


図3. HSV-1 の U937 細胞への感染に対する TBT の影響(MOI=0.01 PFU/cell)

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

脂溶性化学物質のヒト腸管での吸収と毒性

（分担）研究者 清水 誠 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

研究要旨

ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 を用いて、TBT が腸管上皮細胞の機能に及ぼす影響を調べた。2 週間培養して分化させた Caco-2 細胞層を高濃度（ $\sim 1000\text{nM}$ ）の TBT で短期間（24 時間）処理した場合、細胞層の酵素活性等には変化は見られなかったが、TBT による細胞毒性がわずかながら観察され、細胞層のタイトジャンクション透過性の亢進が観察された。また、異物排出トランスポーターである P 糖タンパク質の活性の顕著な阻害が認められた。一方、より低濃度（ $\sim 100\text{nM}$ ）の TBT 存在下で 2 週間培養し、分化させた Caco-2 細胞層では、やはり酵素活性の変化は認められなかったものの、タイトジャンクション透過性の顕著な上昇がみとめられ、細胞層の損傷が進行しているものと思われた。しかし、同時に P 糖タンパク質の活性が顕著に上昇していたことから、TBT が異物排出機能を持つこのタンパク質の基質となっているらしいこと、TBT により腸管上皮の異物排出メカニズムが亢進するという防御的な適応反応の存在が示唆された。

A. 研究目的

脂溶性の環境汚染物質の代表例であるトリブチルスズ（TBT）は、藻類、貝類といった水生生物に対して特に強い毒性を示すことから、1960 年代頃から漁網や船底の防汚剤などに使用されてきた。環境汚染物質としての実態が明らかになるにつれ、日本では使用が自粛され、平成 9 年以降

は国内での製造が取りやめられているが、魚介類には TBT が平成 12 年度で最大 $0.16\mu\text{g/g-wet}$ 含まれており、この濃度はおおむね横ばいの傾向である（これらのデータの詳細は環境省「化学物質と環境」<http://www.env.go.jp>からも見ることができる）。日本人における TBT の平均摂取量は $1.73\mu\text{g/日}$ と報告され

ており（平成 11 年）、そのほとんどは魚介類を介したものであると考えられている[1]。

食品由来のルートで摂取された TBT は腸管から吸収されると考えられる。したがって、腸管における TBT の挙動を調べることは、その人体への影響を考える上で重要であると思われる。しかし、TBT の腸管吸収の制御要因に関する研究は少なく、また、生体の異物に対するバリアーとして重要な役割を果たしている腸管上皮細胞層が TBT のような物質に暴露された場合にどのような影響を受けるかについても明確にされていない。そこで、本研究では、経口的に摂取された TBT が腸管上皮細胞の機能(酵素活性、細胞間接着構造、物質輸送活性など)に与える影響を、ヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 をモデル系として用いて検証した。特に、腸管細胞層の生物学的バリアーの主体として異物排出に関わる P 糖タンパク質(異物排出トランスポーター)の活性に及ぼす TBT の影響に着目して研究を進めた。

B. 研究方法

細胞培養

Caco-2 は、常法によりプラスチックディッシュ中で 14 日間単層培養して上皮様に分化させたものを用いた[2]。透過実験等に使用する場合は、透過

性膜を装着した培養容器(Transwell)中で培養し、単層を形成させた。

T B T 処理

短期間処理の場合には、上記のように培養して分化させた細胞層に TBT を含む培地を加えて 24h 培養した。一方、長期間処理の場合には、TBT を含む培地中で Caco-2 細胞を 2 週間培養して分化させた。T B T 処理した細胞はハンス液 (HBSS) で洗浄し、さらに同溶液中で 30 分間平衡化した後に各種実験に供した。

細胞機能の測定

(1) 酵素活性

アルカリホスファターゼ (ALP)、アミノペプチダーゼ (AP) -N、ジペプチジルペプチダーゼ (DPP) -IV のそれぞれの基質溶液を Caco-2 細胞層に加えて一定時間インキュベートし、反応生成物を吸光光度計で測定してそれぞれの酵素活性を算出した[3]。

(2) P 糖タンパク質の排出活性

P 糖タンパク質の基質である蛍光物質 Rhodamine-123 の溶液を細胞層の粘膜側に加え 120 分インキュベートしたのち、細胞を PBS ・ NaN₃ で 2 回洗浄した。その後、蛍光プレートリーダーを用いて細胞内に蓄積した Rhodamine-123 量を測定した。

(3) タイトジャンクション透過性

の評価

透過性膜(Transwell)上に Caco-2 細胞を単層培養した。細胞間のタイトジャンクションの開閉状態を示す指標として用いられている経上皮電気抵抗 (TER: Transepithelial electrical resistance) を Millicell ERS (ミリポア社) を用いて測定した。TER 測定の後、細胞層の粘膜側に透過マーカー物質として Lucifer Yellow (LY) を加え、基底膜側への 60 分間の透過量を蛍光測定によって算出した。

(4) 毒性試験

アラマーブルー溶液を細胞層に加えて 90 分～120 分程度インキュベートし、その後、溶液の色の変化を分光光度計で測定した。

TBT と P 糖タンパク質基質との競合実験

14 日間培養した Caco-2 単層を PBS で 2 回洗浄し、次いで HBSS で 10 分間平衡化した。P 糖タンパク質の基質として知られている Adriamycin, Verapamil, Vinblastine, Daunomycin, Rhodamine-123 (各 100 μ M) の存在下で [3 H]TBT 10nM を細胞に加え、2 時間インキュベートした。細胞層を PBS (NaN₃ 含) で 2 回洗浄した後、0.1% Triton X-100 で細胞を可溶化させ、液体シンチレーションカウンターで

TBT の細胞内蓄積量を測定した。

C. 研究結果と考察

TBT による Caco-2 細胞の短期間処理

短期間の暴露実験には、14 日間単層培養して十分に小腸上皮様に分化した Caco-2 細胞を用いた。この細胞層を、TBT を含む培地中で 24 時間培養した後、細胞の機能を測定し、TBT 無処理の場合と比較した。TBT 濃度は 0, 100, 500nM とした。

ALP やペプチダーゼ類の活性は TBT 処理によっても変化しなかった(データ省略)。一方、細胞層の TER は TBT 処理によって有意に低下し、それに伴って LY の細胞層透過性が上昇する傾向が認められた (図 1)。TER 値は細胞間接着装置であるタイトジャンクションの物質(イオン)透過性を反映するが、同時に毒性物質による上皮細胞の損傷をきわめて鋭敏に検出する指標ともなることが報告されている[4]。上記の結果は、100nM 以上の TBT による短時間処理で Caco-2 細胞に何らかの損傷が引き起こされていることを示唆している。一方、TBT の短期間処理においては、TBT の濃度 (100nM～1000nM) 依存的に Caco-2 細胞への Rhodamine-123 の蓄積量が増加することがみられた (図 2)。すなわち TBT 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を阻

害していることが示唆された。

P糖タンパク質の阻害が見られたことから、TBTはP糖タンパク質の基質であって Rhodamine-123 の輸送(排出)を競合阻害したのではないかと考えられた。そこで、トリチウム標識した TBT を用いて、P糖タンパク質の各種基質との競合実験を行ったところ、TBT と Vinblastine を共存させた時に、TBT の蓄積量の増加(即ち排出の抑制)が見られた(図3)。また、TBT の蓄積量は Vinblastine の濃度依存的(0.1~100 μ M)に増加し、TBT と Vinblastine が競合阻害を起こしていることが示唆された(図3)。しかし、Vinblastine 以外のP糖タンパク質基質ではこのような競合が認められなかったことから、TBT がP糖タンパク質の基質となっているかどうかを判断するにはさらに検討が必要であると思われる。

TBT による Caco-2 細胞の長期間処理

TBTを含む培地で15日間培養し分化させた Caco-2 細胞を用いて、その各種酵素活性、タイトジャンクションの状態、P-糖タンパク質の活性などを測定し、TBT 無処理の場合と比較した。TBT 濃度は0, 10, 50, 100nMで検討した。

各種酵素活性については15日間のTBT処理による有意な影響はみられな

かったが(データ省略)、TER や細胞間物質透過性については、TBT 処理によって顕著な変化認められた。すなわち、TER は TBT 濃度依存的に低下し、同時にLYの透過性が有意に上昇した。これは、長期間の TBT 処理が Caco-2 細胞に対してある種の毒性を示し、細胞層に損傷を与えていることを示している。

一方、長期間の TBT 処理によって、Caco-2 細胞における Rhodamine-123 の蓄積量の減少がみられた。その減少は処理した TBT の濃度(1nM~100nM)に依存的であり(図4)、また期間(7~15日間)に依存的であった。すなわち高濃度・短期間の TBT 処理とは反対に、低濃度・長期間の TBT 処理では、P糖タンパク質の活性が亢進していることが示唆された。さらに、P糖タンパク質をコードしているMDR1の発現をRT-PCRで解析したところ、TBT処理(50nM, 100nM)によりMDR1の発現量の増加が見られた(図5)。TBT存在下で培養することによってMDR1の発現が上昇したことは、TBTがP糖タンパク質の基質であることを示唆している。すなわち、「TBTのような環境汚染物質に長時間暴露されることにより、その排出を促すP糖タンパク質の細胞における発現が上昇する」という合目的的な生体の防御機構が腸管上皮に存在すること

が示唆された。

今後は、TBT 処理により腸管上皮細胞におけるサイトカイン産生などの機能がどのような影響を受けるのかを明らかにするとともに、腸管上皮細胞層における TBT の透過・吸収のメカニズムの解明と、その吸収調節機能を持つ食品因子の探索を本実験系を用いて検討していく予定である。

D. 結論

TBT は腸管上皮細胞に対して毒性を示し、上皮細胞層のバリアー機能に傷害を与えることが示唆された。しかし、腸管上皮の異物排出トランスポーターである P 糖タンパク質は、長期間の TBT 処理によって発現が上昇することが観察された。

E. 参考文献

- (1) 豊田正武、酒井 洋他 食
衛誌、41(4): 280-286 (2000)
- (2) Hashimoto, K., and Shimizu,
M., *Cytotechnology*, 13: 175-184
(1993)
- (3) Shimizu, M., Tsunogai, M.,
and Arai, S., *Peptides*, 18(5):
681-687 (1997)
- (4) Narai, A., Arai, S., and
Shimizu, M. *Toxicol. in Vitro*,
11: 347-354 (1997)

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
(1) 塚崎 匡、薩 秀夫、小西良子、
清水 誠、トリブチルスズ (TBT) が
腸管上皮細胞 Caco-2 の機能に及ぼす
影響、2002 年度日本農芸化学会大会、
講演要旨集、p. 20

G. 知的所有権の取得状況

なし

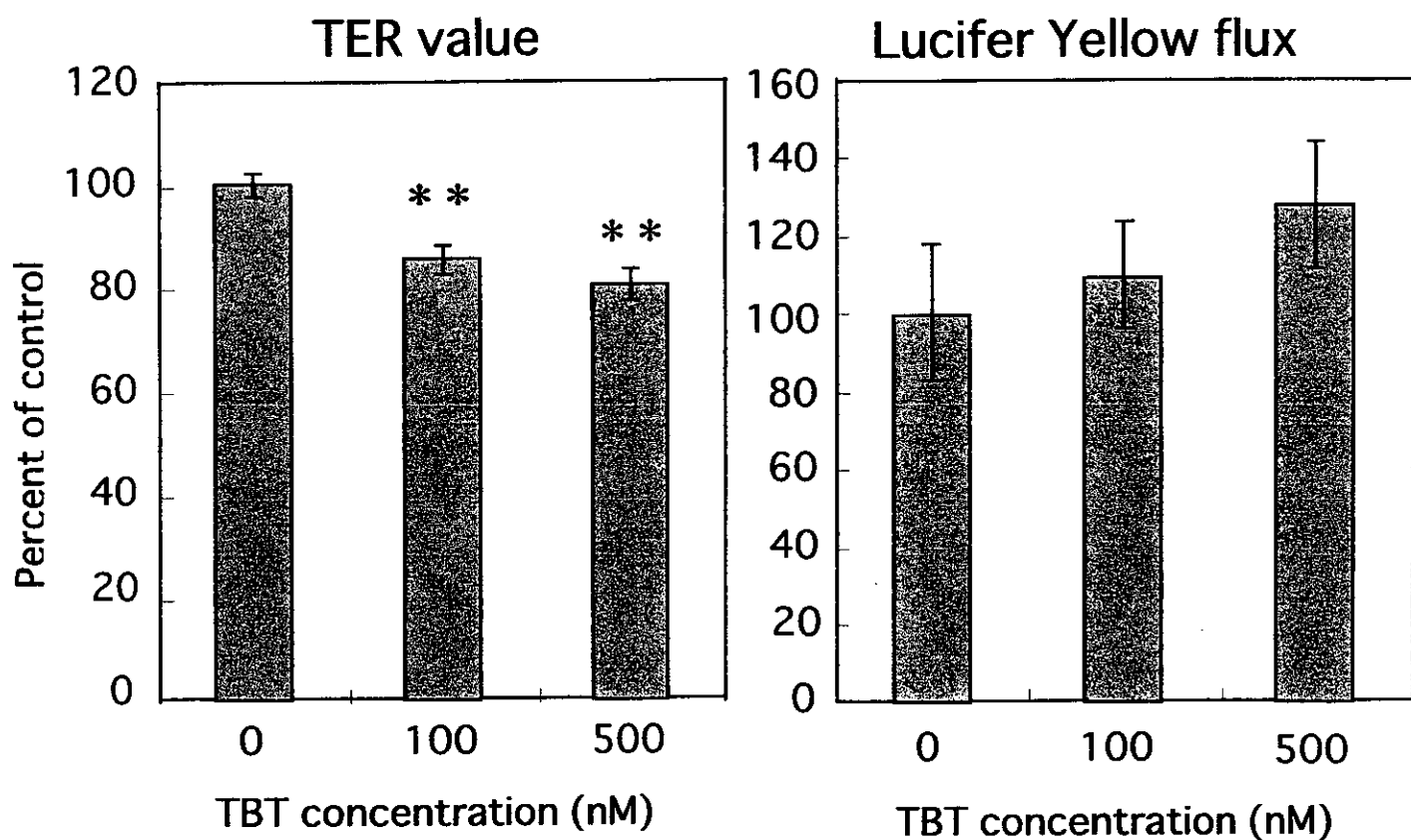


図1 TBTがCaco-2のタイトジャンクションの状態（タイトジャンクション透過性に及ぼす影響（処理時間：24h）

**、 $P < 0.001$

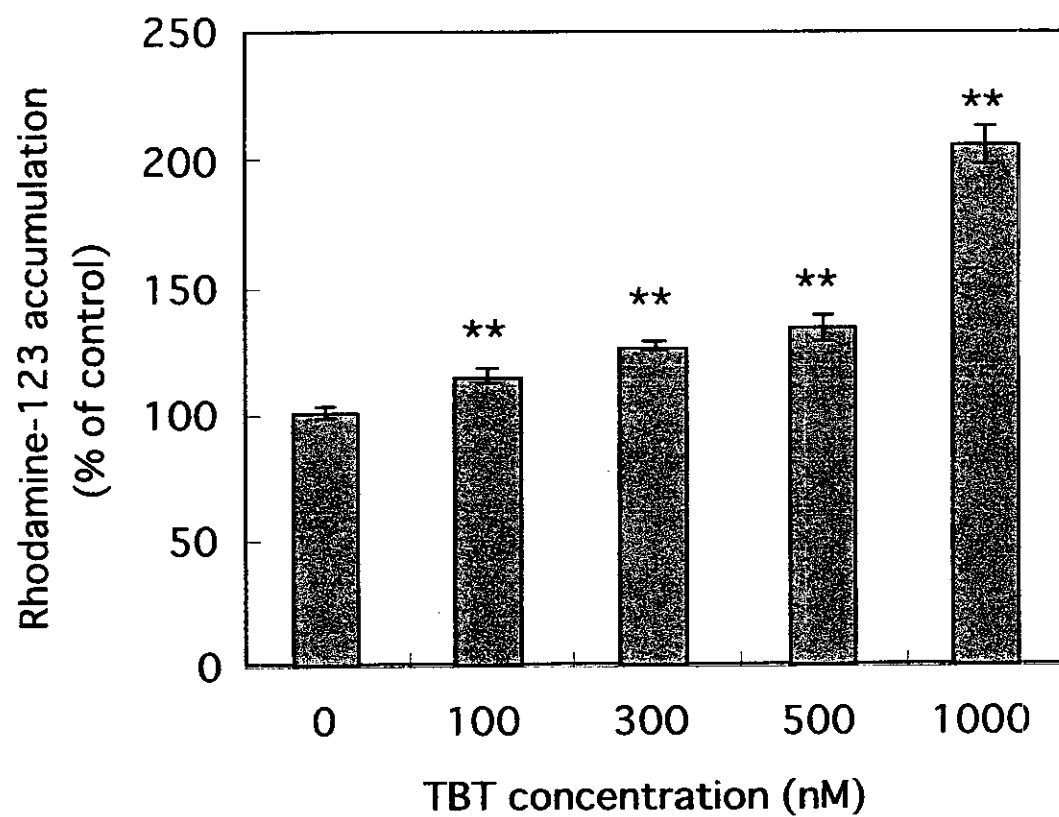


図2 TBTがCaco-2へのRhodamine-123の蓄積量に及ぼす影響
(処理時間：24 h)

**、 $P < 0.001$