

厚生労働科学研究費補助金
食品・化学物質安全総合研究事業

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14年度 総合・総括・分担研究報告書

主任研究者 小 西 良 子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成15(2003)年 4 月

目 次

I. 平成14年度総括研究報告	1
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	3
国立医薬品食品衛生研究所 小西良子	
II. 平成14年度分担研究報告	13
1. トリブチルスズによる次世代の日和見感染抵抗性低下の機序に関する研究	15
国立医薬品食品衛生研究所 小西 良子	
2. トリブチルスズによる免疫抑制効果の発現機構の解析	39
国立感染症研究所 竹森利忠	
3. ヒト母乳中のブチルスズ類の高感度測定法の開発および測定	51
大坂薬科大学薬学部 天野富美夫	
4. トリブチル錫の生体への影響	59
香川医科大学 阪本晴彦	
5. トリブチルスズ化合物暴露による脳内神経伝達物質およびその代謝産物に対する影響	73
—母親および仔マウスへの亜急性投与実験—	
福島県立医科大学医学部 角田 正史・紺野 信弘	
6. トリブチルスズ化合物の脳・神経系に対する発達毒性	85
—一次世代マウス脳内 NMDA 受容体に及ぼす影響—	
福島県立医科大学医学部 紺野 信弘・角田 正史	
7. 脂溶性化学物質のヒト腸管での吸収と毒性	91
東京大学大学院農学生命科学研究科 清水 誠	
III. 総合研究報告	
国立医薬品食品衛生研究所 小西良子	105
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	117
V. 研究成果の刊行物・別刷（平成14年度）	124

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に関する研究組織

平成12年度

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

分担研究者

天野富美夫 国立感染症研究所 細胞化学部
杉浦義紹 東京理科大学 薬学部
鈴木嘉彦 麻布大学 獣医学部
山田章雄 国立感染症研究所 つくば霊長類センター

協力研究者

井上 智 国立感染症研究所 獣医科学部
志村純子 麻布大学 獣医学部
阪本晴彦 香川医科大学 第2病理学研究室
向井鏖三郎 国立感染症研究所 つくば霊長類センター

平成13年度

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

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

阪本 晴彦 香川医科大学 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
鈴木 嘉彦 麻布大学 獣医学部 教授
田村 慎一 国立感染症研究所 感染病理部 室長
三浦 克洋 動物衛生研究所 安全性部 部長

平成14年度

主任研究者

小西 良子

国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部

分担研究者

天野富美夫

大阪薬科大学薬学部 教授

阪本晴彦

香川医科大学教授

清水 誠

東京大学大学院教授

竹森利忠

国立感染症研究所部長

協力研究者

紺野 信弘

福島県立医科大学医学部 講師

鈴木 嘉彦

麻布大学 獣医学部 教授

角田 正史

福島県立医科大学医学部 助教授

吉岡 保

(財)倉敷成人病センター 院長

I. 平成 14 年度総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

平成14年度総括研究報告書

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 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

研究要旨

近年、新興・再興感染症やアレルギーなど、いわゆる免疫障害によるヒトの健康被害が社会不安を引き起こしているが、免疫障害を引き起こすであろう化学物質についての知見はまだ少ない。特に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の健康被害特に免疫への影響についてはほとんど研究されていない。本年度の研究は昨年度までに得られた研究結果を踏まえて、食品特に魚介類から摂取され体内の蓄積されると考えられている化学物質、トリブチルスズを用い、妊娠初期からの暴露および母乳を介しての暴露の次世代に対する影響をマウスを用いて検討した。これらの暴露形態において次世代の細菌感染への抵抗力とくに非特異的防御反応を低下させる危険性があることを見だし、日和見感染の抵抗性の指標になる免疫パラメーターの検索を行った。また、すでにトリブチルスズが病原性細菌に対する特異的防御反応を介する感染抵抗性を低下させることが昨年度までに明らかにされているが、この低下を引き起こす機序として T 細胞依存的な液性免疫応答を抑制していることが認められた。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母乳を介して次世代に移行され、次世代へ影響を及ぼすことが本研究でも明らかにされているが、ヒトの母乳においても魚介類の摂取によるブチルスズ類の移行がおこっているかを小規模であるが実態調査をおこなった。さらに、免疫毒性以外のトリブチルスズの摂取による毒性を脳神経毒性や発達毒性の分野からも検討した。また、これら化学物質は腸管から吸収されと考えられていることから、腸管からのトリブチルスズの吸収率を標識物質を用いて明らかにし、腸管への影響を腸管の有する脂溶性異物排出機能への影響を指標に検討した。

分担研究者名

天野富美夫（大坂薬科大学）

A. 研究目的

阪本晴彦（香川医科大学）

本年度の研究の目的は次のとおりである。

清水 誠（東京大学大学院）

（1）脂溶性化学物質の胎盤および授乳

竹森利忠（国立感染症研究所）

を介しての次世代への曝露が、非特異的

防御機構にどのような影響を及ぼすかを動物実験および *in vitro* な実験での免疫細胞の機能性への影響を調べることにより解析する。(2) 化学物質の最初の入り口となる腸管への影響を詳細に検討すると同時に免疫系以外の毒性を検討する。

(3) ヒトへの健康被害を考え、小規模ながらヒト母乳への汚染実態を把握する。

伝統的に魚介類の摂取量が多い我が国において、もっとも身近でありながら毒性については不明な点も多く残されているトリブチルスズ(TBT)を脂溶性化学物質のモデルとして本研究を進めた。

B. 研究方法

(1) TBT による次世代の日和見感染抵抗性低下の機序に関する研究

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 ICR マウスに TBT (0, 15, 50ppm) を含む飲水を出産後離乳まで与え、次世代マウスの好中球、マクロファージの細菌に対する貪食能、殺菌能を測定した。また、授乳のみで TBT が暴露された場合との各機能の比較を行った。その結果、授乳の方が好中球の防御機能を低下させる

可能性があったため、C57BL マウスを用いた *in vivo* 感染実験により感染抵抗性を検討した(小西班)。

(2) TBT による免疫抑制効果の発現機構の解析

昨年度までのリステリア菌をもちいた感染実験から TBT の母乳による移行が病原性細菌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が、その機序については不明であった。今年度は、C57BL マウスを用いて授乳により TBT を暴露させ、ナチュラルキラーT細胞の応答性や、CD4 陽性T細胞の増殖性、NP ハプテン化トリ免疫グロブリンに対する NP 特異的な抗体の産生能を検討した。TBT により影響をうける免疫機能について解析を行った(竹森班)。

(3) ヒト母乳中のブチルスズ類の高感度測定法の開発および測定は、ヒト母乳中のブチルスズ類の測定およびヒトミルクタンパクによるTBTの低毒性化について検討した。ヒト母乳中のブチルスズ類の測定は倉敷成人病センター産婦人科の協力を得て妊娠婦40人をランダムに抽出して妊娠中の食生活について聞き取り調査を行った。分娩後1週間中に採取した母乳を提供してもらい、GC-FPD法で、モノブチルスズ、ジブチ

ルスズおよびTBTを測定した。ヒトミルク中のタンパクのTBTの低毒素化にはヒト単球由来のマクロファージであるU-937細胞を用いた（天野班）。

（4）TBTの生体への影響は、胎児期に多量のTBTを暴露させた場合の死因について検討した。母親マウスに125ppm濃度のTBTを含んでいる食餌を出産まで与え続けると、母親には変化が見られないにも関わらず、仔はすべて出産後1日以内に死亡する。この死因を病理切片により検討した。肝臓内のアポトーシスはTunne1法にて検出した。さらにヒトへの健康被害の予測のため、ヒト好中球への直接的な毒性を検討した（阪本班）。

（5）TBT化合物暴露による脳内神経伝達物質およびその代謝産物に対する影響は、妊娠1日目からTBT曝露を受けたICRマウスの母親からの次世代を用いて行った。仔マウスは出生後1週目、2週目、3週目にそれぞれオスを5匹ずつ取り脳を6部位（大脳、小脳、延髄、中脳、線条体、下垂体）に分割した。即座にホモゲナイズして、抽出後ドーパミン、ノルエピネフリン、セロトニンおよびその代謝物をECD付き高速液体クロマトグラフィーで測定した。TBT

化合物の脳・神経系に対する発達毒性は、放射能リガンドと検体から調製した大脳膜画分との結合実験を行い、リガンドと脳内のNMDA受容体との結合への影響を解析した（小西班）。

（6）脂溶性化学物質のヒト腸管での吸収は、ヒト腸管培養細胞であるCaco-2細胞を用いた透過性試験により行った。十分にタイトジャンクションが形成されたCaco-2細胞の粘膜側にトリチウム標識TBTを加え、2時間インキュベート後の基底膜側への透過量を測定した。腸管に対する毒性は、TBTと共培養したCaco-2細胞の細胞層の経上皮電気抵抗の変化や、P糖タンパク質の排出活性を指標に影響を解析した（清水班）。

C. 研究結果および考察

（1）胎盤・授乳経路暴露または授乳経路暴露による成長への影響
ICRマウスにおいて行ったTBTの胎盤および授乳による継続的な暴露は、新生児の成長にやや影響をおよぼすことが明らかになった。なお、母親での体重の差は認められなかった。出生時にはTBT投与群と対照群とで体重の差は認められなかったが、離乳近くなるとTBTの投与量に比例して体重の増加が抑制された。この結果から、TBT

の成長への影響は新生児として成長する際にうける影響の方が胎児中にうけるそれより大きいことが示唆された。

次にTBTを直接暴露された母親と授乳によって暴露された次世代の体重を離乳時において比較してみると母親においては体重の差は認められなかったが、次世代ではTBTを投与した母親に授乳をうけた群から、離乳時の体重に影響が見られた。この結果から、母乳に移行するであろうTBTは次世代の成長に影響をおよぼす可能性があることが明らかになった。

(2)胎盤および授乳によるTBTの移行については、母親に50ppmのトリブチルスズを投与した場合は、妊娠1日目から投与されても、授乳期のみ投与されても母親の肝臓にはppbレベルのTBTが検出された。しかし、その仔の肝臓には暴露条件の違いに係わらずすべて検出限界以下であった(検出限界5ppb)。母親に15ppmのTBTを投与した場合は、母親の肝臓も仔の肝臓もTBTは検出限界以下であった。この結果は、TBTの胎盤および授乳を介しての移行は物質的には確認がとれなかったが、次世代に影響が現れていることから、非常に微量なTBTが次世

代において影響を与えている可能性が示唆された。

(3)胎盤・授乳経路暴露の場合、殺菌能の低下が認められたが結合能、貪食能に関しては有意な差はなかった。

一方、授乳のみの暴露された場合では、結合能は、TBTを50ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群で低下している傾向が見られた。貪食能および殺菌能は、TBT投与群では低下が見られた。

マクロファージの細菌との結合能、貪食能および殺菌能は、胎盤・授乳経路暴露では、TBT投与群において結合能は亢進が認められた。貪食能においても同様な傾向が認められた。しかし、殺菌能はやや減退していく傾向が見られた。しかし、好中球の殺菌能低下に比べるとその傾向はわずかのものであった。これらの結果から、授乳暴露の方が好中球の感染防御機能に対する影響が大きいことが示唆されたので、授乳暴露の条件下で日和見感染実験を行った。大腸菌を用いて日和見感染モデルを作成し、腹腔内のクリアランスおよび脾臓中のクリアランスで抵抗性への影響を解析した。その結果TBTを15ppm投与した母親から授乳をう

けた次世代群では、クリアランスが滞り感染抵抗性が低下していることが明らかになった。

(4) TBTがリステリア菌に対する感染抵抗性を低下させることはすでに明らかにしているが、その機序に関して詳細な研究を行った。免疫応答の指導と方向性の決定に中心的な役割を果たす樹状細胞へのTBTの影響は、若干IL-4産生に対して影響を及ぼしたものの有意な影響は及ぼさないと判断された。次にナチュラルキラーT細胞は免疫反応初期においてサイトカインを大量に産生し、初期の感染防御反応に縦横な役割を果たす免疫細胞である。TBTのナチュラルキラーT細胞への影響を調べた結果、TBTはナチュラルキラーT細胞のサイトカイン産生に影響を及ぼさないことが示された。CD4 陽性T細胞は免疫後期においてサイトカイン産生や細胞表面分子を介した他の免疫細胞との相互作用により、細胞性・液性免疫応答の制御に中心的な役割を果たすリンパ球である。TBTのCD4 陽性T細胞増殖応答に対する影響を調べた結果、統計的に有意な差は認められなかった。そこで、液性免疫応答に与える影響を、T細胞依

存性抗原であるNPハプテン化トリ免疫グロブリンを用いて測定した。NPハプテン化トリ免疫グロブリンは、産生された抗体の親和性を評価する抗原として良く使用されている。その結果、TBTを15ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群では高親和性抗体価の顕著な低下が見られ、結合親和性も有意に抑制されることが判明した。しかし、TBTを50ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群では、逆に結合親和性の増加が認められたため、投与量により免疫抑制効果が異なる可能性が示唆された。

(5) ヒト母乳中の有機スズの分析結果は、36検体測定したがすべてにおいて検出限界以下であった。検出限界は、TBT、ジブチルスズ、トリフェニルスズで1.3 ng/ml以上、モノブチルスズで2.5ng /ml以上であった。この結果は魚介類の摂取の多寡に関わらず、日常の食生活であればヒト母乳を介した新生児への有機錫汚染の可能性は低いことを示唆している。

さらにヒト母乳のTBTの低毒素化について、検討を行った。昨年度までの研究成果からTBTはヒト単球由来のマクロファージ培養細胞U937に細胞障害性を有し

ているが、この毒性を指標に、母乳の低毒素化を検討した。その結果、母乳（成乳）は顕著な低毒素効果を示した。母乳と標識TBTとの結合実験を行ったところ、母乳中にTBTと結合することが確かめられたことから、母乳の起こす低毒素化は、母乳成分がTBTに結合し、細胞内に毒性を起こすことを阻害してしたものと考えられた。

（6）高濃度のTBTは胎児の発育障害を起こすことが本年度の研究から明らかにされたが、この死因について病理学的考察をおこなった。その結果肝臓、胆道系の明らかな異常が認められ、対照群と比較してTunel陽性細胞、Fas陽性細胞が多く認められた。

つぎに昨年度までの成果から、TBTの免疫毒性が感染抵抗性を低下させることが明らかになったことを受けて、ヒトへのリスク評価の一環として、ヒト好中球の食食能に対する影響を調べた。その結果、TBTは単独では高濃度（ $1\mu\text{g/ml}$ ）でヒト好中球のFc受容体を介する食食を亢進させることが判明した。しかし、白血球食食能を亢進させる血小板放出物質とともに加えるとその亢進作用は抑制され

た。これらの結果から、TBTは生体内においては他の亢進物質と結合しその働きを抑制する可能性が示された。

（7）TBT投与による次世代の脳内神経伝達物質およびその代謝産物は、離乳直後の仔マウスにおいて大脳中のドーパミンの代謝物homovanillic acidが有意に低い値を示した。このことはニューロンの神経活動の低下の可能性を示唆している。さらに脳内の興奮性アミノ酸受容体の一つであるN-メチル-Dアスパルテート

（NMDA）受容体に影響があらわれるかをリガンド受容体結合実験法によって検討した。その結果、離乳直後の仔マウス脳内NMDA受容体とリガンドとの結合がTBTによって有意な差をもって低下した。これらの結果から、TBTの胎盤・授乳曝露次世代は成長するにつれてNMDA受容体に関与する記憶や行動になんらかの影響が出てくる可能性が示唆された。

（8）ヒト腸管培養細胞を用いたTBTの透過性実験の結果、TBTを粘膜側に添加して60分後には添加量の約80%が基底膜側に透過していることが明らかになった。さらに脂溶性物質の排泄機構を担っているP糖タンパク質の阻害剤を加えるとTBT

の透過量はさらに増加した。このことからTBTの吸収はP糖タンパク質の働きによって調節されていることが明らかになった。また、TBTの吸収は牛乳のカゼイン、乳清タンパク質により抑制させることを見い出した。昨年度までの研究により、P糖タンパク質はTBTの長期間低濃度の曝露によりその機能が亢進されることが解っていたが、この機序としてP糖タンパク質をコードしているMDR1の発現量がTBTの曝露によって転写レベルで亢進することが確認された。

D. まとめ

最終年度である今年度は、昨年度までに得られた研究成果に基づき行われた。感染抵抗性に及ぼす影響は、昨年度までの研究で病原性細菌、ウイルス、真菌に対する抵抗性のうち、TBTは細菌に対する抵抗性を著しく低下させることを見い出している。そこでその機序に関して詳細な研究を行った結果、T細胞依存的な液性免疫反応の低下が機序の一つであることが見い出された。

しかし、細菌に対する感染抵抗性は病原性細菌に対する防御機構だけでない。そこで、非病原性細菌に対する抵抗性、

いわゆる非特異的免疫反応が関与する日和見感染実験を行い、TBTがその感染抵抗性を低下させることを明らかにした。その機序として好中球の貪食能と殺菌能の低下が重要な因子となっていることを見い出した。さらに、曝露の条件を検討した結果、妊娠時から離乳期まで暴露されている条件より、授乳期のみ暴露されている条件の方が感染抵抗性の低下を導きやすいことが示された。

授乳期の曝露が免疫毒性を導きやすいという結果を受けて、ヒトへのリスク評価としてヒト母乳中のTBT汚染の実態調査を小規模ながら実施した。その結果魚介類の摂取の多寡に関わらず、母乳中にはTBTが検出されなかった。これは現在のところ新生児に有機スズ汚染の可能性は低いことを示している。

感染抵抗性の低下以外のTBTの毒性を検討した結果、高濃度のTBT（125ppm）を妊娠中に摂取することにより、胎児が肝障害を起こし、出生した直後に死亡することが分かった。

TBTの吸収と腸管への毒性であるが、TBTの吸収率は非常に高く容易に体内に入っていくことが本研究から明らかにな

った。その吸収を制御しているP糖タンパク質は腸管を暴露する脂溶性物質の量と期間によってその排出機構を変化させる。これら、吸収と排泄の複雑な相互作用は、脂溶性化学物質の毒性が濃度依存性で解析できない要因の一つになっていると考えられる。

TBTが予想以上に吸収率が高いことから、免疫毒性以外の毒性で次世代の発達に関わっている毒性を検討する必要があると考えられた。そのため、次世代での発達障害および神経毒性を検討した。その結果、50ppmの濃度のTBTを母親が暴露した場合において次世代の発育障害および知能や行動に関与する脳内レセプターの発育に影響が出ることが本研究によって見い出された。これらの結果は、脂溶性化学物質の毒性は、次世代への影響を重要な項目として評価しなくてはいけないこと、健康被害の範疇を脳毒性の部分にまで広げて考える必要があることを提言している。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugita-Konishi, Y., Amano, F., and Sugiura, Y., The effect of tributyltin on

microbial infections of mice. Toxicol. Sci., suppl. 66, p189, 2002.

- 2) Y. Sugita-Konishi, S. Sakanaka, K. Sasaki, L. R. Juneja, T. Noda and F. Amano.: Inhibition of bacterial adhesion and Salmonella infection in BALB/c mice by sialyloligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk. J. Agric. Food Chem., 50 3607-3613. (2002)

- 3) A. Kanayama, J. Inoue, Y. Sugita-Konishi, M. Shimizu and Y. Miyamoto, Oxidation of IkBa at the 45th methionine is one cause of taurine chloramines-induced inhibition of NFκB. J. Biol. Chem., 277, 24049-24056 (2002).

- 4) T. Takahashi, Y. Yoshida, S. Hatano, M. Yajima, T. Kojima, T. Kanno, A. Yonekubo, T. Yajima, T. Kuwata, Y. Sugita-Konishi, S. Igimi, The reactivity of secretory IgA antibodies in breast milk from 107 Japanese mothers to 20 environmental antigens. Biology of the Neonate, 82, 238-242., (2002)

- 5) Y. Sugiura, Y. Sugita-Konishi, S. Kumagai, and E. Reiss, Experimental murine hyalohyphomycosis with soil-derived isolates of *Fusarium solani* Medical Mycology, in press

- 6) Y. Sugita-Konishi, S. Shimura, T. Nishikawa, F. Sunaga, H. Naito, Y. Suzuki, Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli* Tox. Lett. 36, 217-227, (2002)

- 7) Y. Sugita-Konishi, K. Kobayashi, H. Naito, Katuhiro M. and Y. Suzuki Effect of lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the susceptibility to *Listeria* infection. Biosci. Biotech. Biochem.,

67, 89-93. (2002)

8) Y. Sugita-Konishi, S. Yamashita, F. Amano and M. Shimizu., Effects of carrageenans on the binding, phagocytotic and killing abilities of macrophages to *Salmonella*.

9) Y. Sugita-Konishi., Effect of trichothecens on host resistance to bacterial infection. *Mycotoxins*, 53, in press

10) Shinobu, N., Iwamura, T., Yoneyama, M., Yamaguchi, K., Suhara, W., Fukuhara, Y., Amano, F. and Fujita, T., Involvement of TIRAP/MAL in signaling for the activation of interferon regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. *FEBS Lett.* 517, (2002) 251-256.

11) Yamasaki, M., Igimi, S., Katayama, Y., Yamamoto, S. and Amano, F., Effects of anaerobic preculture on aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni*. *Biosci. Microflora* 22, (2003) 21-25.

12) Konno, N., Tsunoda, M., Nakano, K., Liu, Y., effect of tributyltin on the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the mouse brain. *Arch. Toxicol.*, 75 (2001) 549-554

る制御 日本農芸化学会大会、2003年、東京

2. 学会発表

1) 小西 良子、小林 一夫、鈴木 嘉彦 授乳を介したダイオキシンの曝露がリステリア感染に及ぼす影響 第9回日本免疫毒性学会 平成14年9月 静岡

2) 天野富美夫： ヒト単球系細胞株U937の細胞増殖ならびに細胞死に及ぼすトリブチルスズ(TBT)の影響 第75回日本生化学会大会 2002年10月、京都

3) 三野芳紀、楠木季実子、柴野真喜雄、天野富美夫、吉岡保：GC-FPD法による母乳中の有機スズ化合物の定量 日本薬学会第123年会 2003年3月、長崎

4) 塚崎 匡、薩 秀夫、小西 良子、清水 誠、腸管上皮細胞Caco-2におけるトリブチルスズ(TBT)に透過・吸収の食品成分によ

訂 正

この頁の表は
24頁の前に入ります。

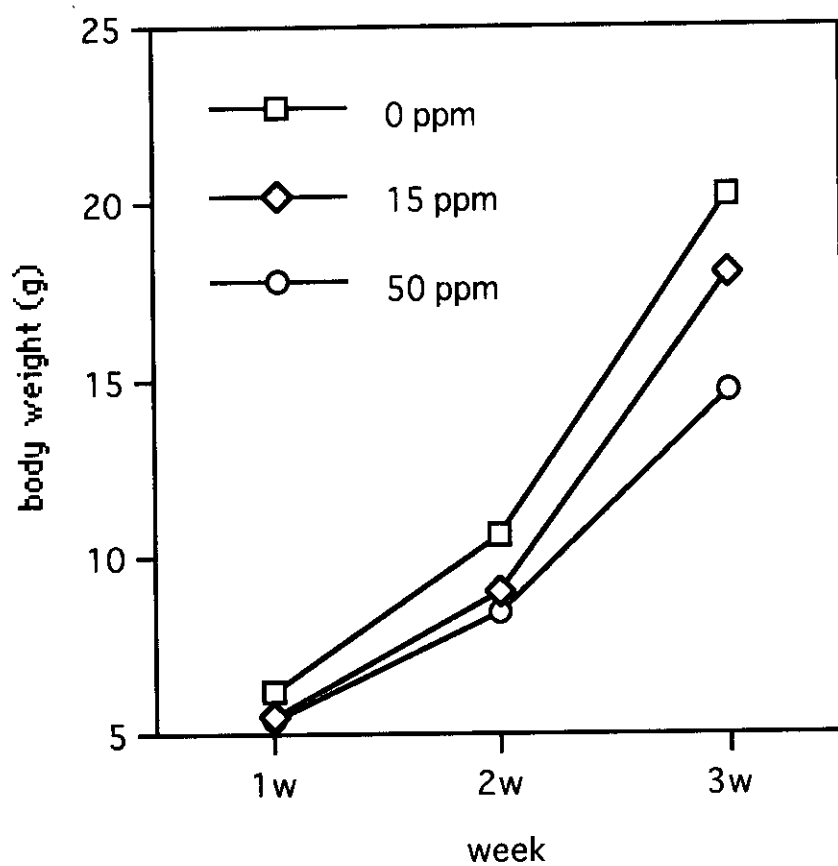


Fig. 1 Body weight of ICR female F1 exposed to TBT via placenta and lactation

II. 平成 14 年度分担研究報告

厚生科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

トリブチルスズによる次世代の日和見感染抵抗性低下の機序に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所 小西 良子
麻布大学獣医学部 鈴木嘉彦

トリブチルスズの日和見感染に対する感染抵抗性を低下させる機序を解明する目的で、ICRマウスおよびC57BLマウスにトリブチルスズを母親から次世代へ胎盤経由および授乳経由、または授乳経由だけの暴露を行い、次世代の腹腔内好中球の貪食能および殺菌能および腹腔内マクロファージの貪食能および殺菌能を検討した。また、授乳経由で暴露された次世代の日和見感染抵抗性を非病原性大腸菌を用いた感染実験でも検討した。その結果、対照群と比較して好中球およびマクロファージの殺菌能が低下していることが認められた。

A. 研究目的

昨年度までの研究においてトリブチルスズ
の母親への暴露が胎盤および母乳を介して
次世代へ暴露され、次世代の病原細菌に対
する感染抵抗性の低下を示すことがリステ
リア感染モデル実験において明らかになっ
た。しかし病原細菌に対する感染抵抗性は
主にT細胞やB細胞に代表される特異的免疫
反応が担っていることから、本研究では、非
特異的免疫反応が関与している日和見感染
に対する抵抗性および感染抵抗性の低下の
機序を明らかにするため本研究を行った。

B. 研究方法

1) 実験動物および細菌：妊娠1日目の
ICR マウスを日本 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,
15, 50 ppmを含む飲料水を与えた。C57BL
マウスは、妊娠16日目で日本 SLC より購
入し、出産予定日1日前からトリブチルスズを
0, 15, 50 ppmを含む飲料水を与えた。
細菌：非病原性細菌としては大腸菌 k-12
株の標準品を用いた。細菌の培養には LB
培地 (Gifco) を用いた。生菌数の測定に
はトリプソイドソイビーン寒天培地 (日

水) を用いた。

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ICRマウスを用い、妊
娠1日目から離乳までトリブチルスズ[®] を0, 15,
50 ppmを含む飲料水を与えた。母乳経由で
の暴露群はC57BLマウスを用い、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。

3) 食食能の測定： 5×10^5 /ml に調整
した好中球およびマクロファージは、 5×10^7
/ml の大腸菌k-12株と4℃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℃
で1時間反応させた。その後、貪食されて
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から細胞内に貪食された
菌の数を測定した。また、4℃で反応させ
たあとの細胞に結合した菌数を測定し、そ
の割合から貪食率（貪食された菌数/細胞に
結合した菌数 $\times 100$ ）を計測した。

4) 殺菌能の測定：3) で貪食能を測定する
課程で得られた貪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殺菌能を測定した。好中球の場合は貪食した細胞を用意した時間を0時間とし、その後20分、60分後の細胞内細菌数を測定した。マクロファージは60分後の細胞内細菌数を測定した。

5) サイトカイン産生能の測定：腹腔好中球およびマクロファージを大腸菌k-12株と3時間反応させたのち、培養上清を採取した。マクロファージから採取した上清では、IL-6, TNF- α , IL-1 β を測定した。好中球から採取した上清では、MCP-1を測定した。これらサイトカインの測定はすべてOpt ELIA KIT (ParMingen社)を用いた。

6) 日和見感染実験

日和見感染実験は、授乳暴露した C57BL の次世代メスを用いて行った。大腸菌感染には5週令のマウスを用いた。感染細菌として大腸菌 K-12 株を用いた。大腸菌は LB 培地を用いて18時間前培養したのち、濁度 (OD 550nm) 0.05 になるように阪口フラスコに接種し 105 分から 120 分 37℃ で振とう培養を行った。遠心により菌を回収後、 2.0×10^8 — 3.0×10^8 /マウス の濃度

に生理食塩水を用いて調整し腹腔に摂取した。経時的に腹水、脾臓を採取し、生菌数を測定した。血液は採取後血清とし、サイトカインの測定に供した。

C. 研究結果

1) 胎盤経由暴露による成長への影響

ICRマウスにおいて行ったトリブチルスズの胎盤および授乳による継続的な暴露は、新生児の成長にやや影響をおよぼすことが明らかになった (Fig. 1) . なお、母親での体重の差は認められなかった。出生時にはトリブチルスズ投与群と対照群とで体重の差違は認められなかったが、離乳近くなるとトリブチルスズの投与量に比例して体重の増加が抑制された。この結果から、トリブチルスズの成長への影響は新生児として成長する際にうける影響の方が胎児中にうけるそれより大きいことが示唆された。

2) 胎盤および授乳によるトリブチルスズの移行

表1に、母親および離乳時における次世代マウスの肝臓中のトリブチルスズの濃度の測定結果を示した。母親に50ppmの

トリブチルスズを投与した場合は、妊娠1日目から投与されても、授乳期のみ投与されても母親の肝臓にはppbレベルのトリブチルスズが検出された。しかし、その仔の肝臓には検出されなかった（検出限界5ppb）。母親に15ppmのトリブチルスズを投与した場合は、母親の肝臓も仔の肝臓もトリブチルスズは検出限界以下であった。この結果は、トリブチルスズの胎盤および授乳を介しての移行は物質的には確認がとれなかったが、次世代に影響が表れていることから、非常に微量なトリブチルスズが次世代において影響を与えている可能性が示唆された。

3) 胎盤および授乳経路暴露における好中球の細菌との結合能、貪食能および殺菌能

トリブチルスズ投与群および対照群から得られた腹腔好中球と大腸菌K-12株との結合能および貪食能はFig. 2に示した。結合能に関してはトリブチルスズ暴露の影響は見られなかった。貪食能はややトリブチルスズの投与量に比例して増加する傾向が見られたが、有意差は認められ

なかった。Fig. 3は、好中球の殺菌能を測定したものであるが、対照群では時間に比例して細胞内の殺菌は進んでいき、60分後には100%近い菌が殺菌されてしまうが、トリブチルスズを15ppm以上投与した母親の次世代においては20分までは殺菌能はあるが、その後なくなってしまう、細胞内で菌の増殖が起ることが示された。この機序としては、好中球内の殺菌に関わる酵素等の働きが衰えていることが考えられるがさらなる研究が必要であらう。

4) 胎盤および授乳経路暴露におけるマクロファージの細菌との結合能、貪食能および殺菌能

トリブチルスズ投与群および対照群から得られた腹腔マクロファージと大腸菌K-12株との結合能および貪食能はFig. 4に示した。大腸菌との結合能はトリブチルスズを50ppm投与した母親の次世代群で最も高かった。貪食能においても同様な傾向が認められた。しかし、反応60分後の殺菌能の結果から、50ppm投与した母親の次世代群の殺菌能はやや減退していく傾