

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 (Fig. 5)。

5) 好中球およびマクロファージ培養上清中のサイトカインの産生

好中球やマクロファージと大腸菌が出会う時にはマクロファージはいろいろなサイトカインやケモカインを産生して他の免疫担当細胞とクロストークをすることはよく知られている。そこで大腸菌との反応におけるサイトカイン産生能を培養上清において測定を行った。Fig. 6 に、マクロファージから産生されるサイトカインの結果を示したが、前炎症性サイトカインと呼ばれている IL-6、TNF- α 、IL-1 β は、同じパターンを取り、トリブチルスズを 15ppm 投与した母親の次世代群において有意に高い傾向が見られた。この機序については不明であるが、内分泌かく乱物質によく観察される事象として、用量依存性がないことが指摘されているが、次世代に移行する用量の違いによってこのようなサイトカインの反応性の差が出てくるものと考えられた。Fig. 7 は好中

球から産生されるサイトカインである MCP-1 の産生量を示したものである。やはりトリブチルスズを 15ppm 投与した母親の次世代群において高い傾向が見られたが、有意差は認められなかった。

6) 授乳経路暴露による成長への影響

トリブチルスズ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た (表 2)。母親においてはトリブチルスズ投与の影響は体重には反映せず差違は認められなかった。しかし次世代ではトリブチルスズを 15ppm 以上投与した母親に授乳をうけた群から、体重の増加に影響が見られた。この結果から、母乳に移行するであろうトリブチルスズ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。

7) 授乳経路暴露における好中球の細菌との結合能、食食能および殺菌能

C57BL マウスを用いて授乳のみの暴露された次世代の腹腔好中球と細菌との結合能、食食能および殺菌能を検討した。細菌との結合能は、トリブチルスズを 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。食食能はトリブチルスズを15ppm以上投与した母親から授乳をうけた次世代群で共に低下していた (Fig. 8)。殺菌能は、対照群とトリブチルスズを50ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群では20分まで高い殺菌能を保持していたが、60分経過するとトリブチルスズを50ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群では殺菌能の低下が見られた。トリブチルスズを15ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群では20分経過した時点から、殺菌能の低下が見られその回復は認められなかった。

8) 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、食食能および殺菌能

C57BLマウスを用いて授乳のみの暴露された次世代の腹腔マクロファージと細菌との結合能、食食能および殺菌能を検討した。結合能は好中球のそれとは異なりトリブチルスズを50ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群では亢進されていた。食食能および60分後の殺菌能は対照群のそれと有意差がなかった (Fig. 10)。

9) 好中球およびマクロファージ培養上清中のサイトカインの産生

Fig. 11にマクロファージによる前炎症性サイトカインの産生量を示したが、トリブチルスズを50ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群では、IL-6およびIL-1 β の産生を亢進する傾向が見られた。TNF- α は対照群と差違は見られなかった。好中球の産生するMCP-1ではトリブチルスズを15ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群ではやや産生が亢進している傾向が認められた (Fig. 12)。

10) 日和見感染実験

トリブチルスズを胎盤経由から授乳を通して暴露した場合と、授乳のみの暴露の場合とで好中球およびマクロファージの機能がどのように影響を受けるかを比較検討した結果、授乳暴露のみで好中球の食食、殺菌能が有意に低下することが明らかになった。そこで、大腸菌を用いて日和見感染モデルを作成し、in vivoでの感染抵抗性を検討した。感染モデルは、非病原性大腸菌を授乳のみでトリブチルスズ暴露をうけた次世代群が離乳し

た直後に腹腔に感染させ、腹腔内および脾臓内のクリアランスを測定する方法で行った。Fig. 13には腹腔内のクリアランスを示したが、対照群が最も早くクリアランスをおこない、トリブチルスズを15ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群で最も遅かった。脾臓中のクリアランスにおいても腹腔内のクリアランスと連動しており、感染24時間においてトリブチルスズを15ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群で最も多くの生菌が検出された。48時間後では、対照群およびトリブチルスズを50ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群では生菌数は検出限界以下となったが、トリブチルスズを15ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群では2万CFUの生菌が検出された。

11) 日和見感染によって産生されるサイトカイン

一般に全身感染により腹腔に存在するマクロファージをはじめとする常在性免疫細胞からTNF- α が産生されるが、この産生によってマクロファージの殺菌能が高まり、クリアランスが促進されると考

えられている。本感染実験において感染6時間後の血液中および腹腔浸出液中のTNF- α を測定し、その産生能を検討した。Fig. 15 は、血清中と腹腔浸出液中のTNF- α を表している。血清中のTNF- α は対照群に比べてトリブチルスズ投与群は産生が低下していたが、腹腔中のTNF- α はトリブチルスズを50ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群が最も亢進していた。この結果はトリブチルスズを50ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群においては好中球の貪食能や殺菌能等は低下しているが、TNF- α の産生が高まることによって、クリアランスが加速されトリブチルスズを15ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群に比べて体内からのクリアランスがスムーズに行われるためと考えられた。

D. 考察

感染抵抗性に関与する免疫系は大きくわけて、獲得免疫と呼ばれる特異性免疫反応と自然免疫と呼ばれる非特異性免疫がある。昨年までの研究でトリブチルスズの暴露は胎盤、授乳を介し次世代まで移行し、感染抵抗性に影響を与えることを病原性細菌や

ウイルス、真菌などを用いた感染実験から明らかにしたが、これらの感染に対する防御機構は主に特異性免疫反応である。本研究では今まで明らかにされていなかった非特異的免疫機構へのトリブチルスズの影響を明らかにした。

非特異的免疫機構は、補体や粘膜免疫など多く存在するが、特に日和見感染の防御機構をモデルとして、好中球およびマクロファージに焦点をあててその機能を検討した。

トリブチルスズの暴露の方法も胎盤および授乳経路での長期間暴露と授乳のみの短期間暴露による影響の違いも検討した。これら低分子の有害物質の場合、容量依存的に毒性が出ることが少ないことが数多くの研究結果から指摘されてきた。そのメカニズムとして考えられているのが内分泌かく乱物質の排泄機構に関する問題である。これら脂溶性の低分子物質の排泄は細胞膜にあるp糖タンパクと呼ばれるレセプターが大きく関わっていると考えられ、このレセプターの発現は暴露量が増加するとそれにもなって発現量が増加することが観察され

ている。すなわち、長期間の暴露が必ずしも大きな影響をもたらすとも言い切れないのである。そのため、本研究では、受胎から離乳期までの長期間暴露と授乳期間のみの短期間暴露を比較検討したのである。その結果、長期間暴露ではトリブチルスズの影響が好中球の機能にはあまり影響をおよぼさなかったが、短期間暴露では好中球の貪食能、殺菌能を低下させることがあきらかになった。マクロファージへの影響は、暴露の期間によつての違いは認められなかったが、いずれの場合も対照群と比べて機能が亢進する傾向が見られた。前炎症性サイトカインの産生をみると、長期間暴露の方が亢進する傾向が認められた。これらの結果から、短期間暴露の方が、非特異的免疫反応を中心とする感染抵抗性に影響を与える可能性が高いと判断し、非病原性大腸菌を用いた感染実験を授乳暴露の次世代マウスを用いておこなった。その結果、最も好中球の機能が低下していたトリブチルスズを15ppm投与した母親から授乳をうけた次世代群において有意な感染抵抗性の低下が認められた。トリブチルスズを50ppm投与し

た母親から授乳をうけた次世代群では、好中球の機能の低下は見られたものの、感染時に産生されるTNF- α の産生が亢進する等、菌のクリアランスを亢進する多面的な要因が働いてくる可能性も示唆される。

本研究の目的として、未知の化学物質の感染症抵抗性への影響を予測するパラメータを探索することがあるが、これらの結果から好中球の日和見菌に対する貪食能および殺菌能などの機能を測定することがパラメータとして有効であることが示された。

E. 研究発表

1. 誌上発表

- 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) 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 NF κ B. *J. Biol. Chem.*, 277, 24049-24056 (2002).
- 3) Takeshi Takahashia, Yumi Yoshidaa, Seiko HatanoMasako Yajima, Tadashi Kojima, Takahiro Kanno, Akie Yonekubo, Takaji Yajima, Tamotsu Kuwata, Yoshiko Sugita-Konishi, Shizunobu Igimi, *Biology of the Neonate*, (2002) The reactivity of secretory IgA antibodies in breast milk from 107 Japanese mothers to 20 environmental antigens. *Biology of*

the Neonate, 82, 238-242.

- 4) Yoshitsugu Sugiura, Yoshiko Sugita-Konishi, Susumu Kumagai, and Errol Reiss, Experimental murine hyalohyphomycosis with soil-derived isolates of *Fusarium solani* *Medical Mycology*, in press
- 5) Yoshiko Sugita-Konishi, Sumiko Shimura, Tomo Nishikawa, Fujiko Sunaga, Hiroyuki Naito, Yoshihiko Suzuki, (2003) Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli* *Tox.Let.* 36, 217-227
- 6) Yoshiko Sugita-Konishi, Kazuo Kobayashi, Hiroyuki Naito, Katuhiro Miura and Yoshihiko Suzuki (2002) Effect of lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the susceptibility to *Listeria* infection. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 67, 89-93.
- 7) Yoshiko Sugita-Konishi¹, Shusaku Yamashita², Fumio Amano and Makoto Shimizu², Effects of carrageenans on the binding, phagocytotic and killing abilities of macrophages to *Salmonella*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press, 2003

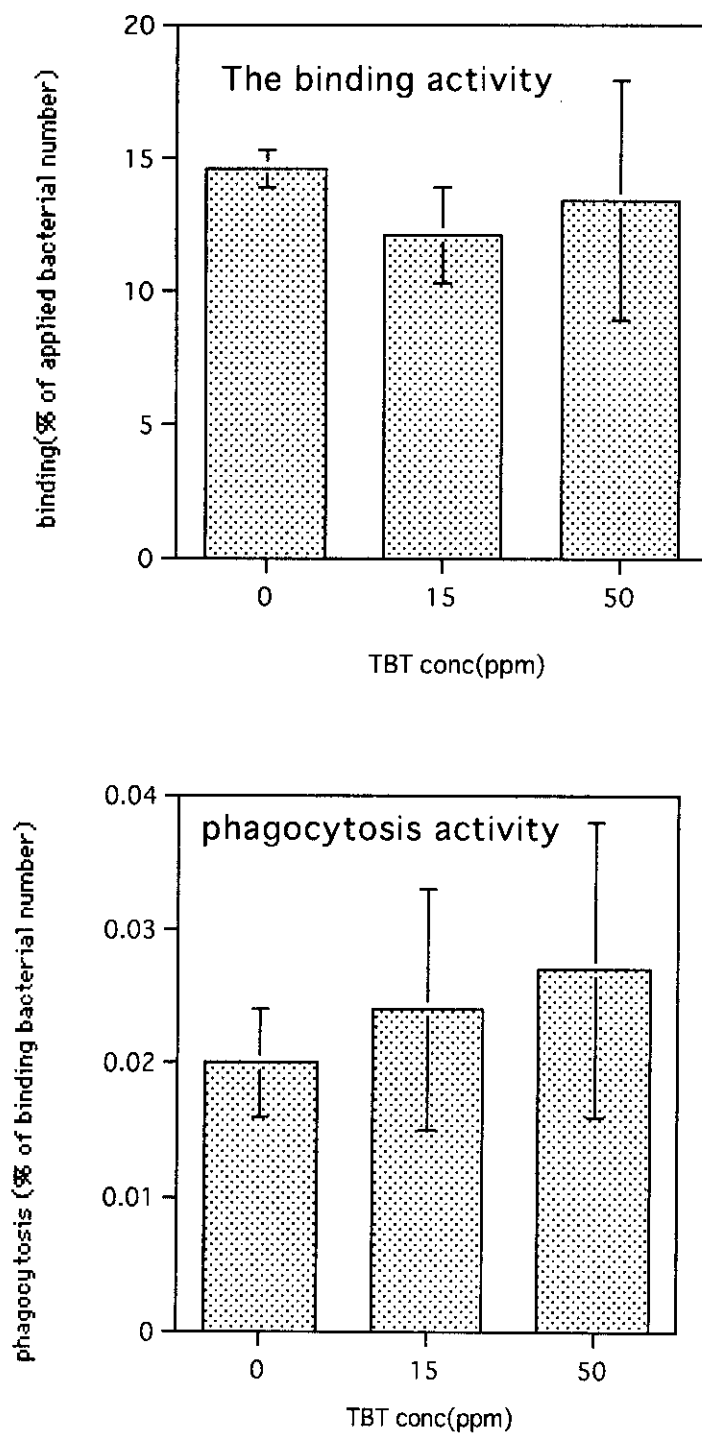


Fig. 2 The binding and phagocytosis activity of neutrophils obtained from offspring exposed to TBT via placenta and milk

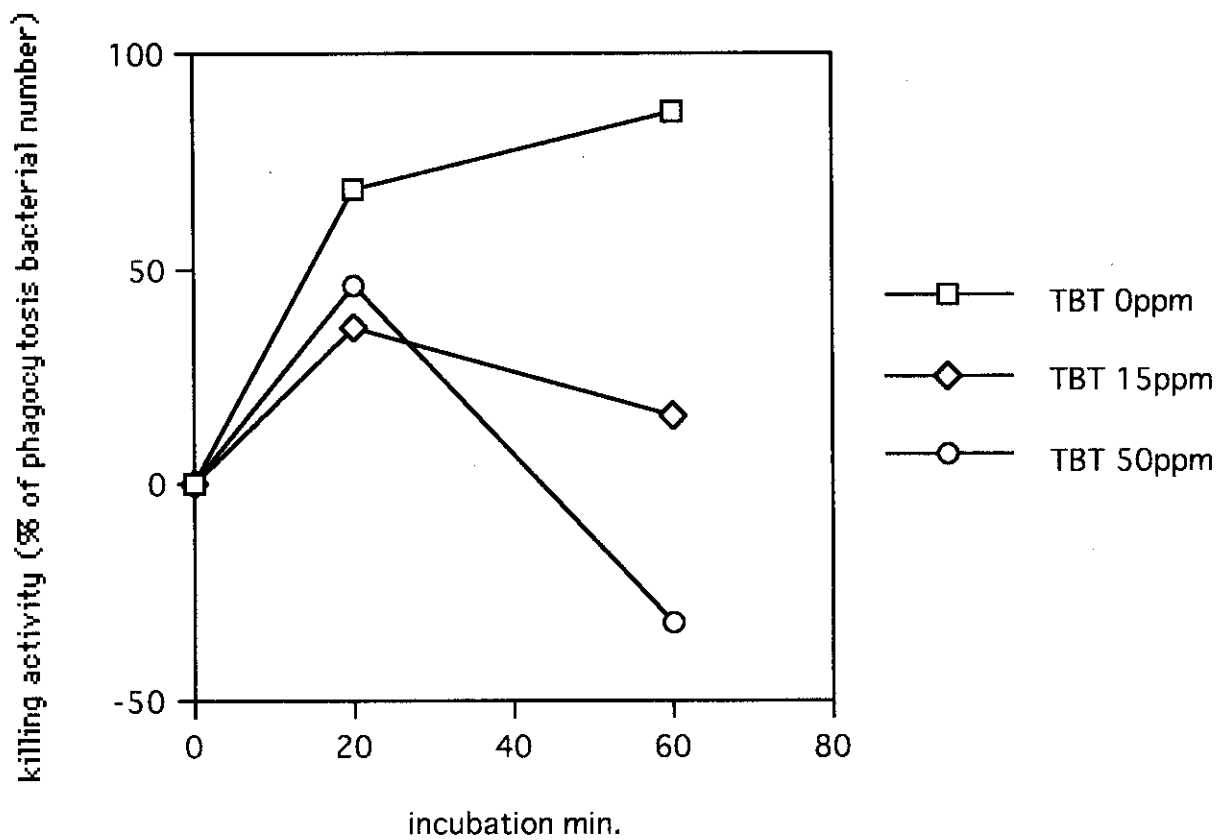


Fig. 3 The killing activity of neutrophil obtained from offspring exposed to TBT via placenta and lactation

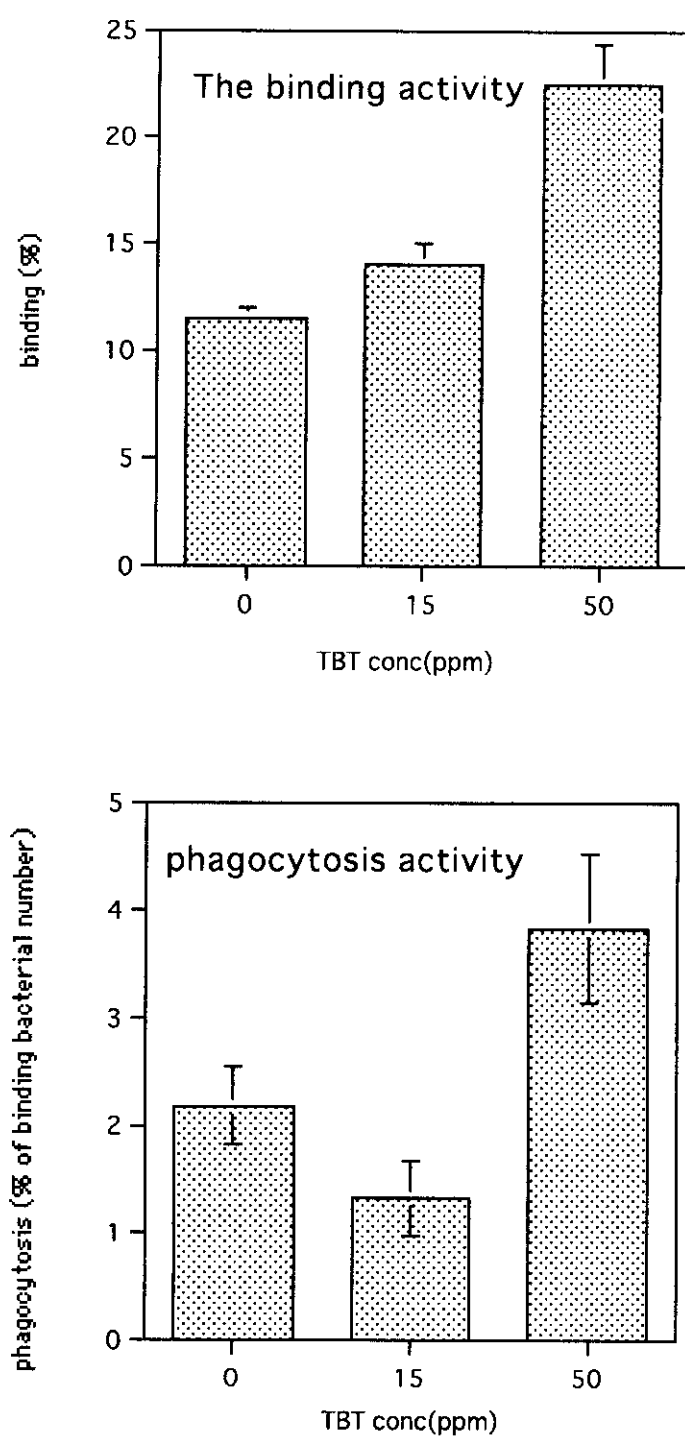


Fig. 4 The binding and phagocytosis activity of macrophage obtained from offspring exposed to TBT via placenta and lactation

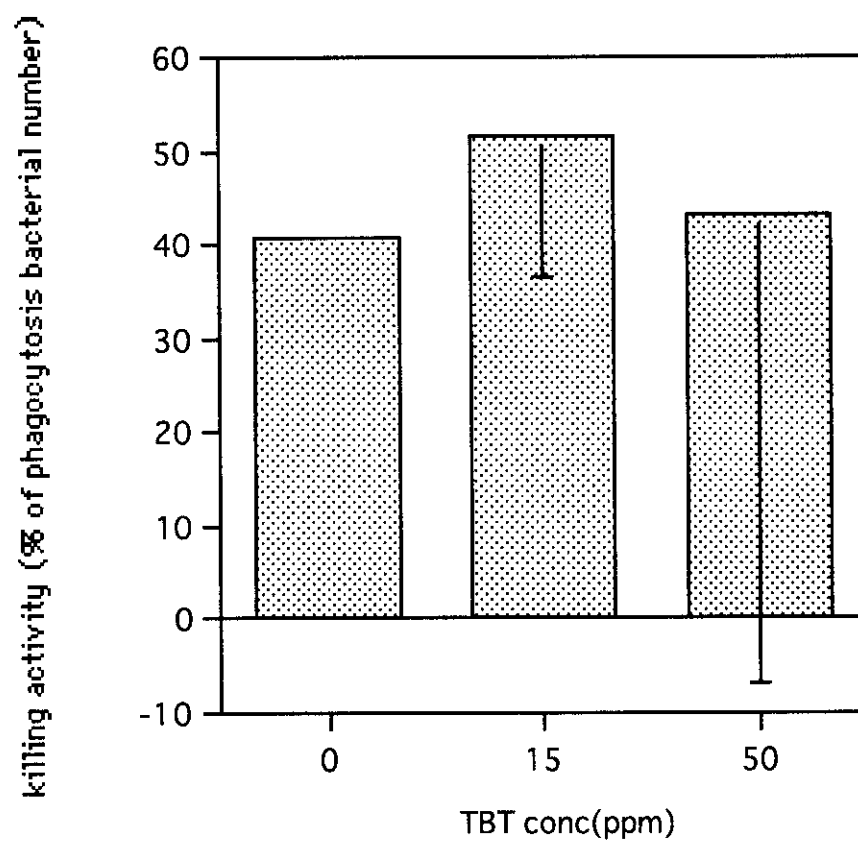


Fig. 5 The killing activity of macrophage obtained from offspring exposed to TBT via placenta and lactation

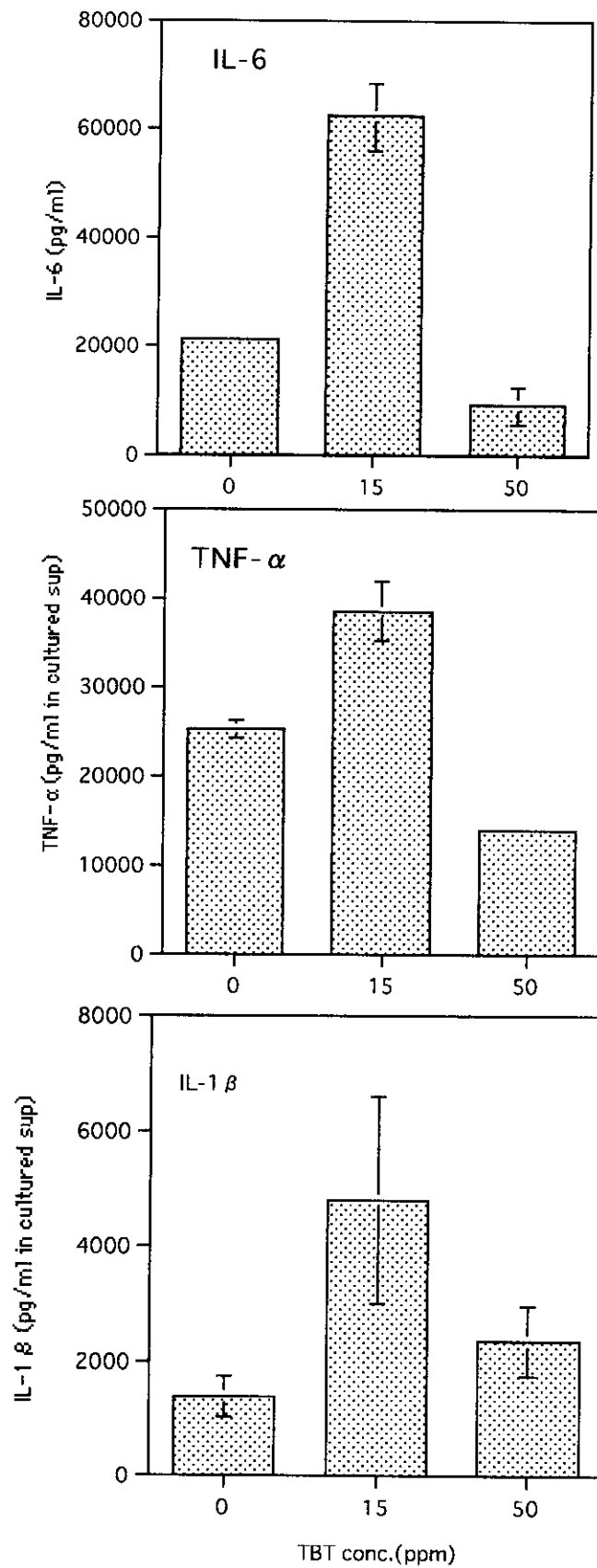


Fig. 6 Cytokines production of macrophage obtained from offspring exposed to TBT via placenta and lactation

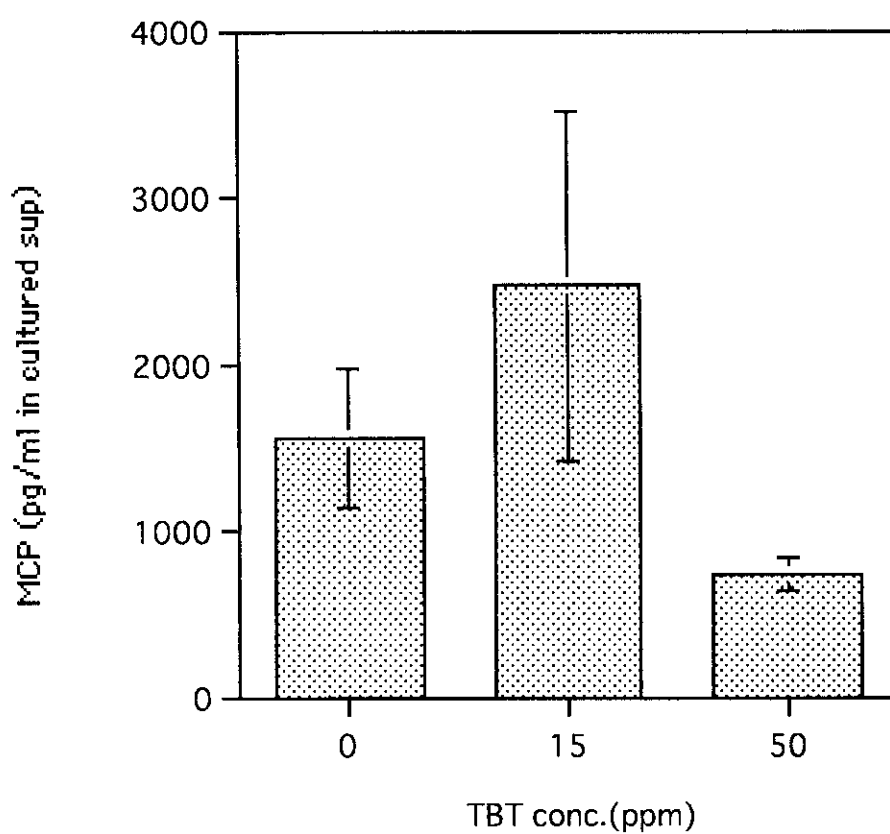


Fig. 7 MCP production of neutrophil obtained from offspring exposed to TBT via placenta and lactation

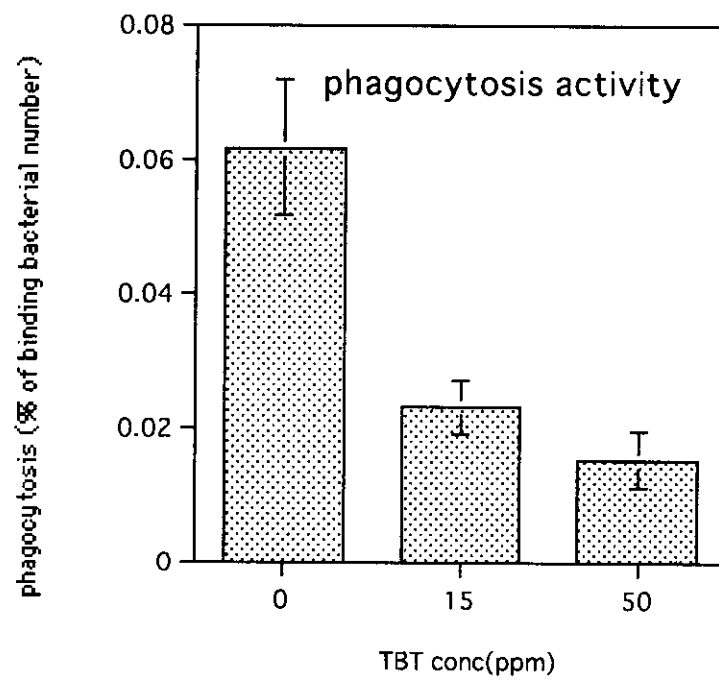
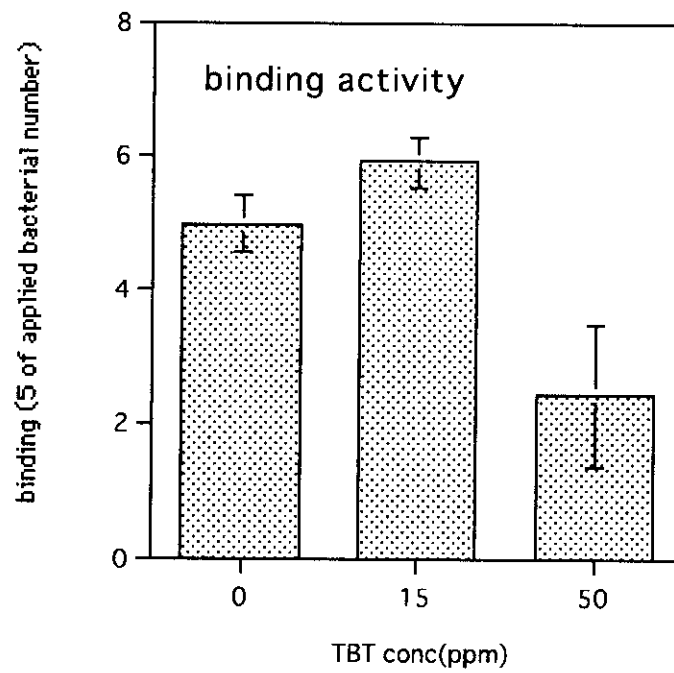


Fig. 8 The phagocytosis activity of neutrophils obtained from offspring exposed to TBT via lactation

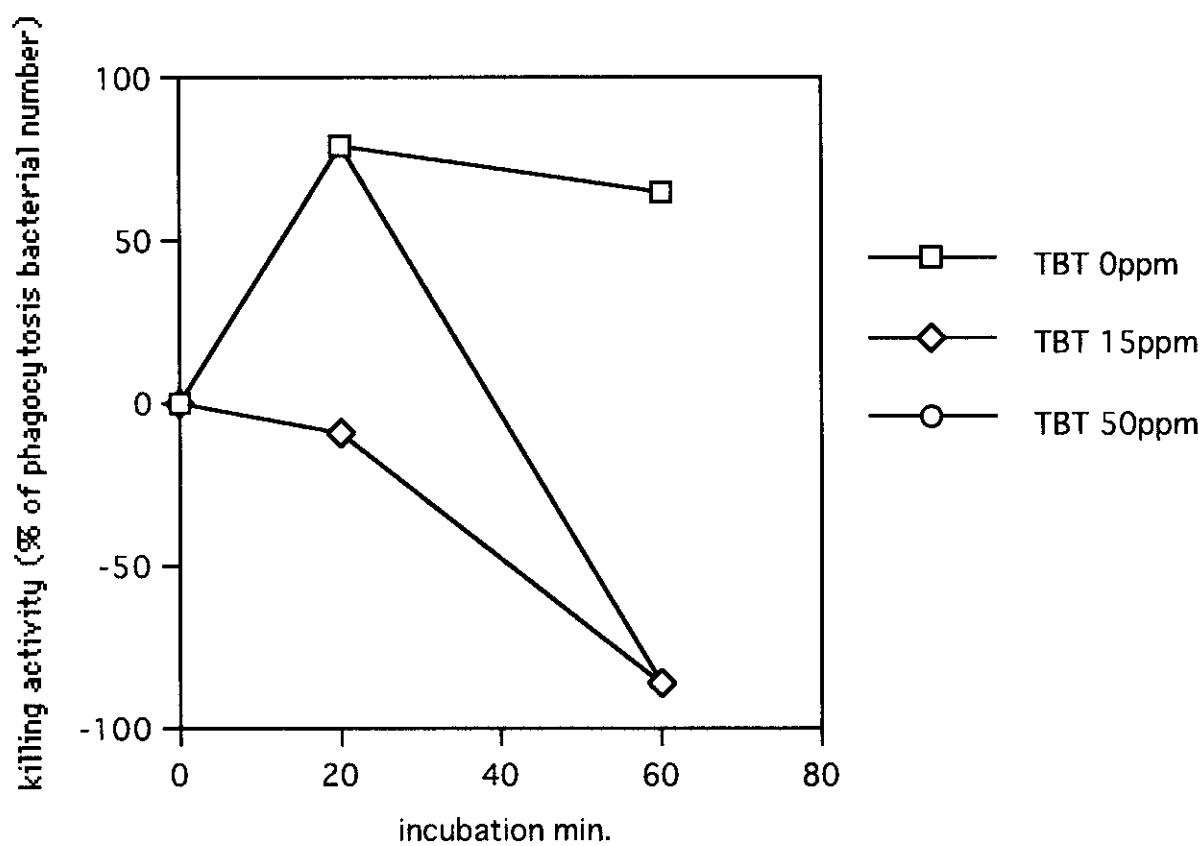


Fig. 9 The killing activity of neutrophil obtained from offspring exposed to TBT via lactation

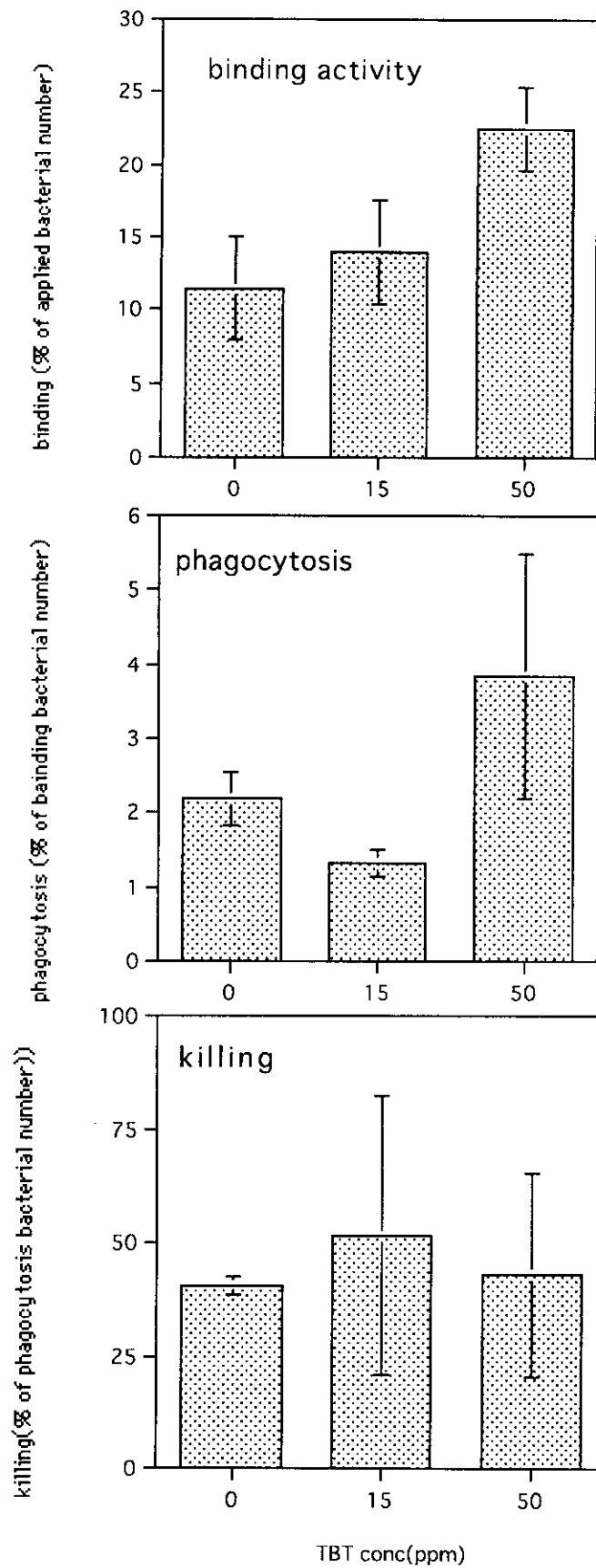


Fig.10 The binding, phagocytosis and killing activity of macrophage obtained offspring exposed to TBT via lactation

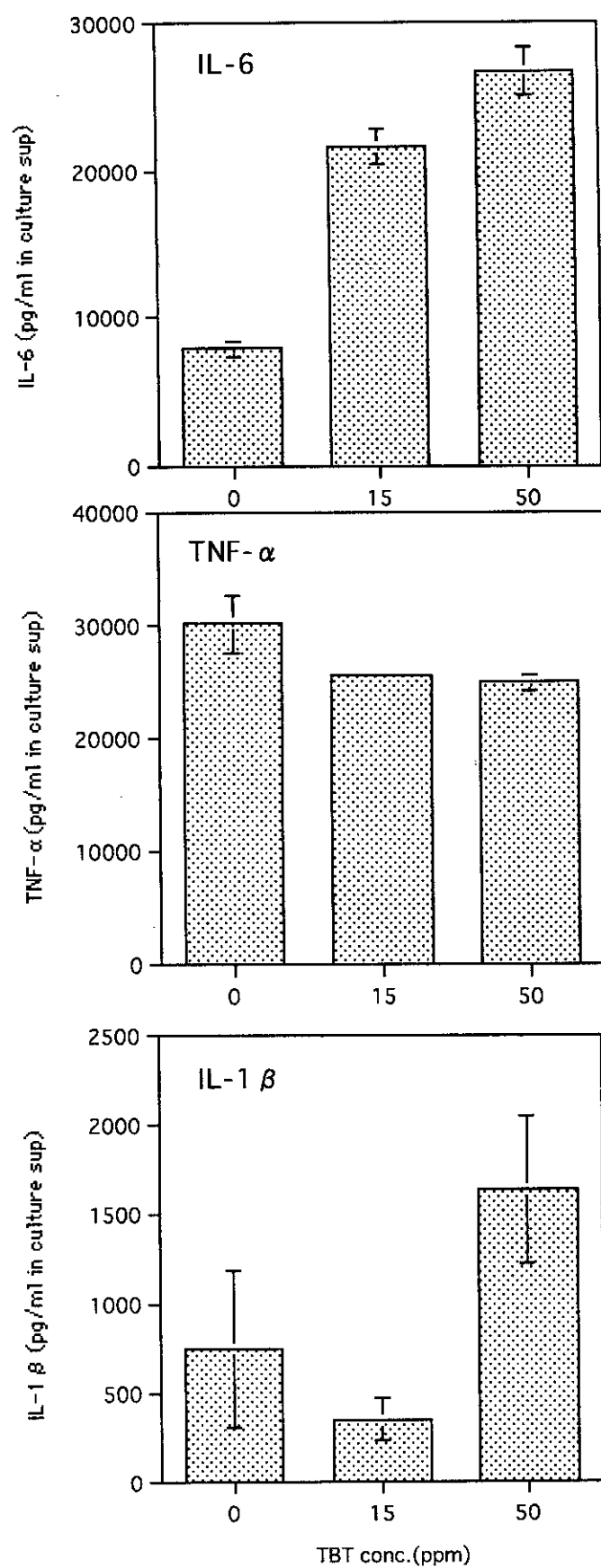


Fig.11 The cytokines production of macrophage obtained from offspring exposed to TBT via lactation

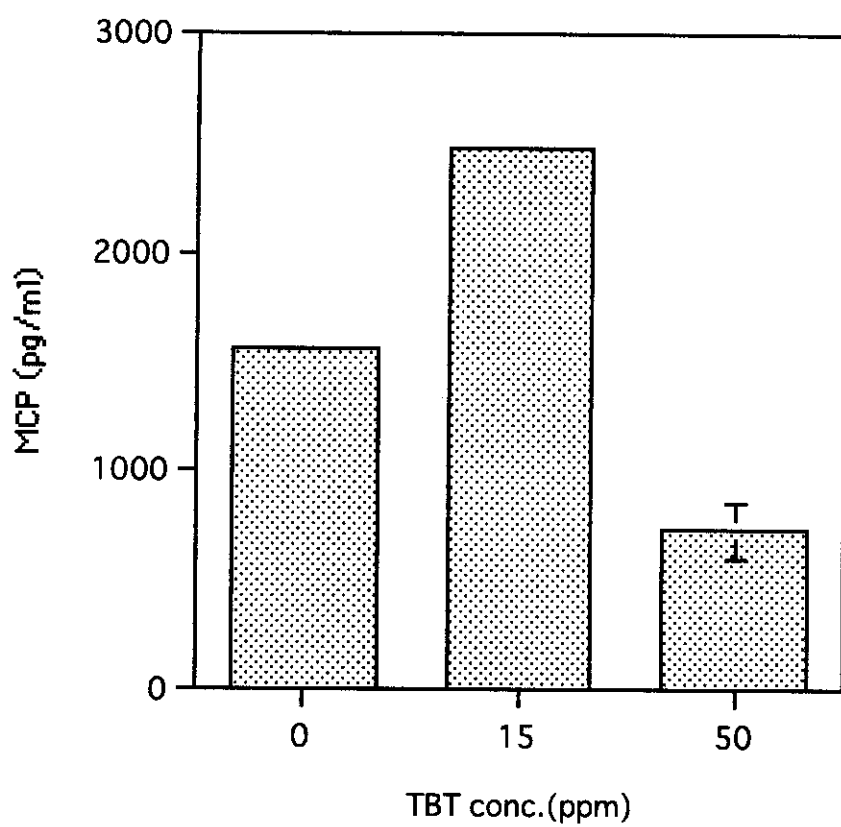


Fig. 12 MCP production of neutrophil obtained from offspring exposed to TBT via lactation

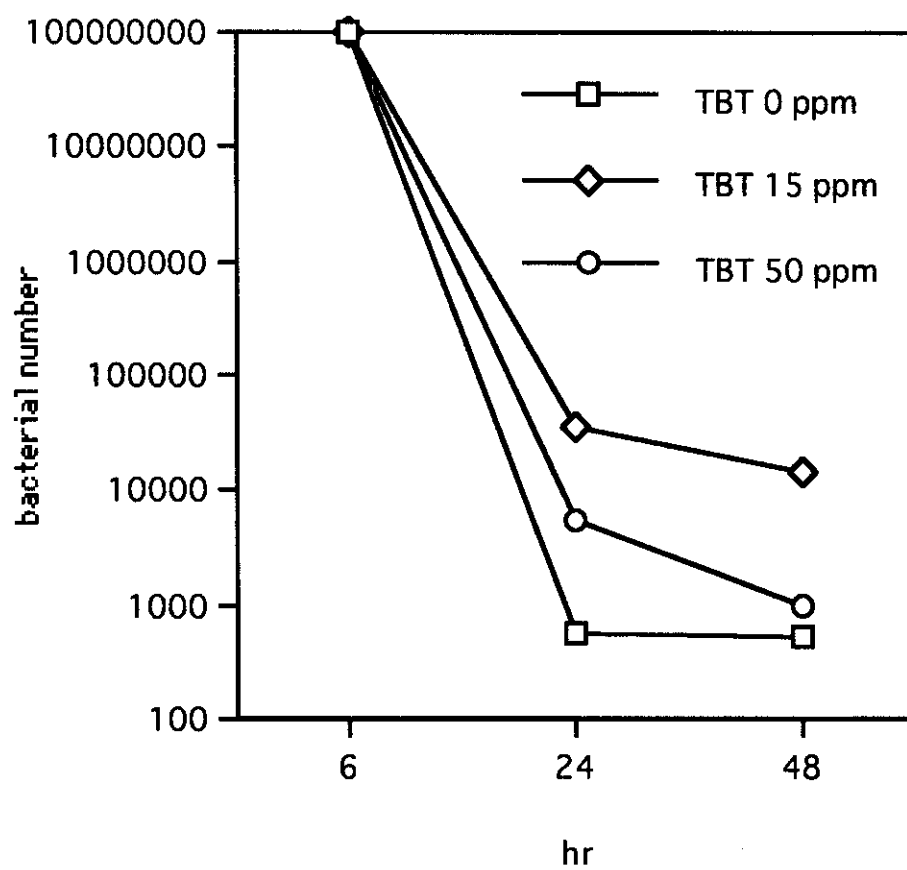


Fig. 13. The clearance activity in perioral cavity of offspring exposed to TBT via lactation

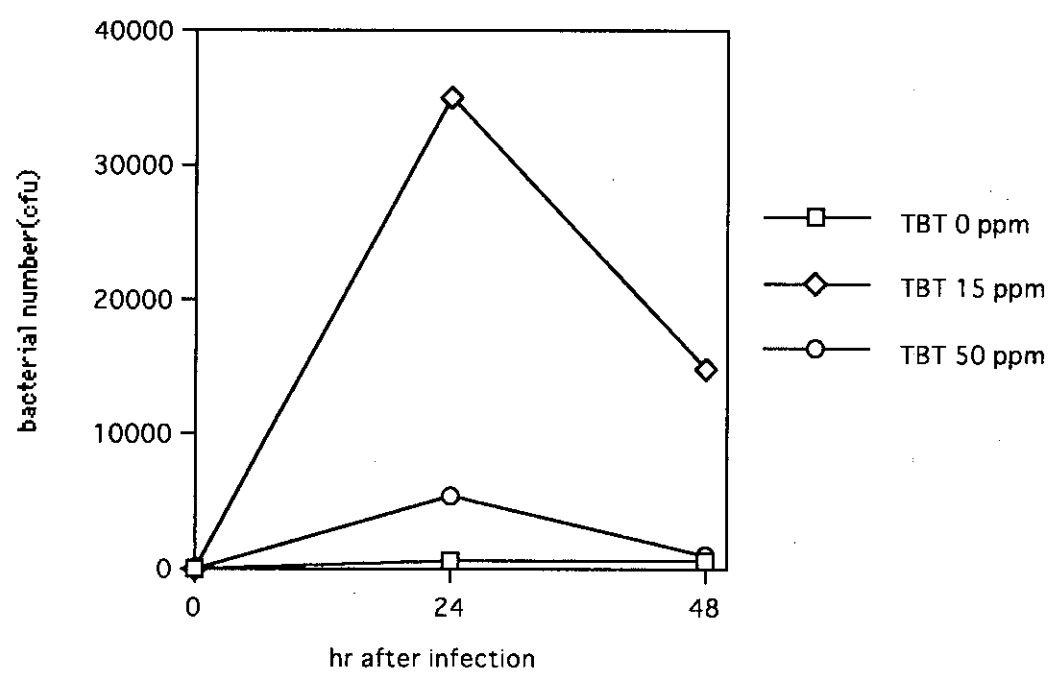


Fig. 14 The clearance activity in spleen of offspring exposed to TBT via lactation

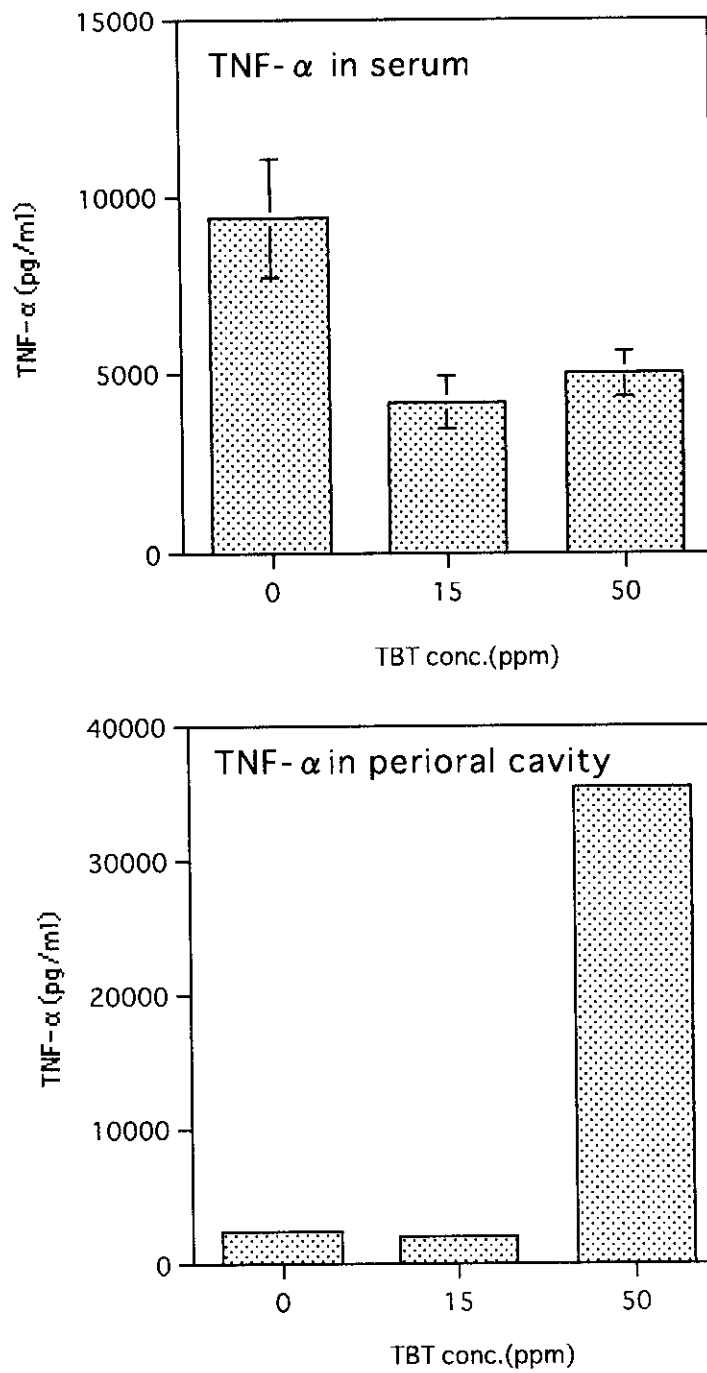


Fig.15 The cytokine production at 6 hrs after E.coli infection

Table I. TBT concentration of liver in mother and offspring

Condition	mother of offspring	TBT conc. (water, ppm)	TBT concentration (liver)
Placenta and lactation	mother	15	ND*
		50	7
	offspring	15	ND
		50	ND
lactation	mother	15	ND
		50	10
	offspring	15	ND
		50	ND

* ND: not determined

Table II Body weights of mother and offspring at weaning

	TBT concentration of exposure (ppm)	Body weight (g)
Mother	0	27.92±1.25
	15	27.33±1.81
	50	27.41±1.32
Offspring	0	9.17±0.33
	15	7.76±0.36*
	50	7.21±0.23*

* $p < 0.05$