

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

トリブチルスズによる免疫抑制効果の発現機構の解析

分担研究者 竹森利忠 国立感染症研究所・免疫部

研究要旨

乳児期マウスを母乳を介しトリブチルスズに暴露し、様々な免疫担当細胞への影響を検討した。その結果、免疫応答の始動に必要な樹状細胞やナチュラルキラーT細胞の応答性や、CD4 陽性 T 細胞の増殖性に変化は認めらず、T細胞依存的な液性免疫応答において顕著な抑制効果が認められた。これはトリブチルスズの免疫抑制効果に対する抵抗性が免疫細胞間で異なり、液性免疫応答に深く携わるB細胞や CD4 陽性T細胞は、トリブチルスズに対し高感受性である可能性を示唆する。

A. 研究目的

近年、トリブチルスズ（TBT）に代表される脂溶性有害化学物質の体内蓄積により、次世代の免疫系に異常が生じる可能性が示唆されている。本研究では、母乳を介して TBT を暴露したマウスを用い、免疫抑制効果の標的となる免疫担当細胞の同定を試みた。

B. 研究方法

試薬：塩化トリブチルスズ（TBT）は和光純薬より購入した。免疫細胞の分画に用いた蛍光標識抗体、T細胞の活性化に用いた抗 CD3、CD28 抗

体、ならびにサイトカイン測定用の抗体は BD pharmingen および eBioscience より購入した。血中抗体価の測定に用いた酵素標識抗体は Southern Biotechnology より購入した。動物および免疫：妊娠1日目のメス C57BL/6 マウスは日本 SLC より購入した。出産後、哺乳期間の母親マウスに 15 ppm、50 ppm のトリブチルスズを含む飲料水を摂取させ、母乳を介して乳児期マウスを TBT に暴露させた。生後3週で離乳する際に、一部のマウスから脾臓を摘出し免疫担当細胞の分画を行った。また残りのマウスは、液性免疫応答を測定する

目的で 100 μ g の NP ハプテン化トリ免疫グロブリンをアラムアジュバントとともに腹腔内免疫した。

免疫細胞の分画と機能評価：

生後 3 週のマウスから脾臓を摘出し、CD11c⁺細胞（樹状細胞（DC））、NK1.1⁺TCR β ⁺細胞（ナチュラルキラー T（NKT）細胞）、CD4⁺CD3⁺細胞（CD4 陽性 T 細胞）をフローサイトメーターを用いて分画した。DC と NKT 細胞の機能評価のため、100 ng/ml α ガラクトセラミドの存在下あるいは非存在下で DC と NKT 細胞を 36 時間共培養後、培養上清中のインターフェロン γ （IFN- γ ）とインターロイキン 4（IL-4）の産生量を酵素免疫測定法（ELISA 法）で測定した。CD4 陽性 T 細胞の機能評価に関しては、10 μ g/ml の抗マウス CD3 抗体 / 抗マウス CD28 抗体で 48 時間刺激後、³H-チミジンの取り込みを指標として細胞増殖を測定した。

血中抗体価の測定：生後 3 週齢のマウスを NP ハプテン化トリ免疫グロブリンで 1 次免疫し、2 週間後と 6 週間後に血清を採取した。1 次免疫から 7 週間後に追加免疫し、10 日目の血清を採取した後、NP ハプテン特異的な IgG1 抗体価を ELISA 法にて測定した。この際、NP 結合量の異なる 2 種類の NP ハプテン化牛血清アルブミン（NP2-BSA、NP24-BSA）を検

出抗原として使用し、NP 特異的な抗体の結合親和性を評価した。

C. 研究結果

樹状細胞（DC）は抗原を T 細胞に提示して活性化する機能を有し、免疫応答の始動と方向性の決定に中心的な役割を果たす。トリブチルスズが DC の T 細胞活性化機能に与える影響を調べるため、50 ppm の TBT 摂取マウス由来の DC と非摂取マウス由来の DC をナチュラルキラー T（NKT）細胞とその活性化リガンドである α -ガラクトセラミドの存在下で共培養し、NKT 細胞のサイトカイン産生を指標として DC の T 細胞活性化機能を評価した（Figure 1）。すると、TBT 摂取群と非摂取群の DC において、IFN- γ 産生誘導能に変化は認められず、IL-4 産生に関して若干の低下が認められた。しかし、NKT 細胞非添加群でも TBT 摂取群において IL-4 産生の同様な低下が観察されることから、この差は NKT 細胞非依存的な IL-4 産生を反映したものであると推察された。以上の結果から、TBT は DC の T 細胞活性化機能に影響を与えない可能性が示唆された。

NKT 細胞は免疫反応の初期においてサイトカインを大量に産生し、初期感染防御反応に重要な役割を果たす免疫細胞である。トリブチルスズが

この NKT 細胞の機能に与える影響を調べる目的で、50 ppm の TBT 摂取マウス由来の NKT 細胞と、非摂取マウス由来の NKT 細胞を α -ガラクトセラミドの存在下で DC と共培養し、上清中に産生される IFN- γ と IL-4 の量を測定した (Figure 2)。その結果、TBT 摂取群と非摂取群で IFN- γ と IL-4 の産生量に大きな差は認められず、TBT は NKT 細胞のサイトカイン産生に影響を与えない可能性が示唆された。

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 が CD4 陽性 T 細胞に与える影響を調べるため、50 ppm の TBT 摂取マウスと非摂取マウスから CD4 陽性 T 細胞を調製し、抗 CD3 抗体 / 抗 CD28 抗体の刺激に対する増殖応答を比較した (Figure 3)。抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で同時刺激した際、TBT 摂取群において増殖応答が低下する傾向が認められるものの、統計学的に有意な変化は認められなかった。よって、CD4 陽性 T 細胞の増殖応答に対し、トリブチルスズは影響を及ぼさない可能性が推察された。

トリブチルスズが液性免疫応答に与える影響を調べるため、離乳直後の

マウスを 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で免疫し、1 次、2 次免疫応答の NP ハプテン特異的な IgG1 抗体価を ELISA 法で測定した (Figure 4)。このとき、検出用の抗原として、BSA 1 分子あたり NP が 3 分子結合した NP3-BSA と 24 分子結合した NP24-BSA を用い、高親和性の抗体 (NP3-BSA、NP24-BSA に結合可) と低親和性の抗体 (NP24-BSA のみに結合可) を別々に検出した。さらに、結合親和性の平均と相関することが知られている (NP3-BSA に対する抗体価) / (NP24-BSA に対する抗体価) を算出し、結合親和性を評価した (Figure 5)。その結果、一次免疫後 2 週目の血清では TBT 摂取群と非摂取群に有意な差は認められないが、6 週目の血清では 15 ppm の TBT 摂取群において高親和性抗体価が有意に低下することが判明した (Figure 4)。さらに、50 ppm の TBT 摂取群でも抗体の結合親和性に有意な低下が認められた (Figure 5)。2 次免疫反応では、15 ppm の TBT 投与群で特に高親和性抗体価で顕著な低下が認められ、結合親和性も有意に抑制されることが判明した。しかし、興味深いことに 50 ppm の TBT 投与群では逆に結合親和性の著明な増加が認められ、TBT の摂取量により免疫抑制効果の異なる

可能性が推察された。

D. 考察

TBT を母乳を介して暴露した乳児ラットやマウスでは、免疫機能が低下した結果リステリアなどの細菌感染症に対する抵抗性が低下すると報告されている。TBT の次世代マウスへの免疫抑制効果の発現機構を調べるため、本研究において免疫抑制効果の標的となる免疫担当細胞の同定を試みた。すると、獲得免疫反応の始動段階と免疫応答の方向決定に重要とされている DC や NKT 細胞に大きな変化は認められず、また CD4 陽性 T 細胞の増殖応答にも変化は認められなかった。しかし、T 細胞依存的な抗原刺激に対する抗体産生応答は、特に低濃度の TBT 暴露によって顕著に抑制されることが判明した。T 細胞依存的な抗体産生応答には、CD4 陽性 T 細胞、B 細胞両方の活性化が必要となるが、CD4 陽性 T 細胞の増殖応答に対して変化が認められなかったことは B 細胞の機能が障害された可能性を支持する。しかし、CD4 陽性 T 細胞が産生するサイトカインの種類 (IFN- γ vs IL-4) が B 細胞の活性化・分化制御に重要であることが知られており、抗 CD3 抗体 / 抗 CD28 抗体に対する T 細胞の増殖性に影響が認められなくても、サイトカイン

産生パターンが変化している可能性は否定できない。実際、リステリアに対する抵抗性の強弱は CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生パターンに大きく依存しており、TBT 暴露がこの抵抗性にも影響を与えることを考慮すると、これが TBT 暴露による免疫抑制効果の一つの標的である可能性は考えられる。さらに、低濃度 (15 ppm) と高濃度 (50 ppm) の TBT 暴露では液性免疫応答に対する効果が異なり、低濃度の TBT 暴露がより強い抑制効果を発揮した。これは、高濃度の TBT 暴露では TBT の吸収段階などで耐性が生じるなどいくつかの可能性が考えられるが、その詳細については今後のさらなる検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yoshizawa, Y., Mizuochi, T., Ogata, A., Murakami, M., Yagita, H., Takahashi, Y., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota, Y. Studies on the generation and maintenance of mucosal CTL against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice.

Aids Res. Hum. Retro. in press, 2003

- (2) Kondo, E., Wakao, H., Koseki, H., Takemori, T., Kojo, S., Harada, M., Takahashi, M., Sakata, S., Shimizu, C.,

Ito, T., Nakayama, T. Taniguchi, M.
Expression of recombination-
activating gene in mature peripheral T
cells in Peyer's patch.

***Int. Immunol.*, 15: 393-402, 2003**

- (3) Tamura, Y., Kawaguchi, J., Serizwa,
N., Hirahara, K., Shiraishi, A., Nigi,
H., Taniguchi, Y., Toda, M., Inouye,
S., Takemori, T. and Sakaguchi, M.
**Analysis of sequential
immunoglobulinE-binding epitope of
Japanese cedar pollen allergen (Cry j
2) in human, monkeys and mice.**

***Clin. Exp. Allergy* 33: 211-217, 2003**

- (4) Toyama, H., Okada, S., Hatano, M.,
Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H.,
Takemori, T., Kuroda, Y. and
Tokuhisa, T. Generation of memory B
cells independent of germinal center
formation.

***Immunity* 17: 329-339, 2002**

- (5) Tsunetsugu-Yokota, Y., Tamura, H.,
Tachibana, M., Ogata, K., Honda, M.
and Takemori, T. Selective expansion
of perforin-positive CD8⁺ T cells by
immature dendritic cells infected with
live *Bacillus Calmette-Guérin*
mycobacteria.

***J. Leuk. Biol.* 72: 115-124, 2002**

- (6) Toda, M., Kasai, M., Hosokawa, H.,
Nakano, N., Taniguchi, Y., Inouye, S.,
Kaminogawa, S., Takemori, T. and
Sakaguchi, M. DNA vaccine using

invariant chain gene for delivery of
CD4⁺ T cell epitope peptide derived
from Japanese cedar pollen allergen
inhibits allergen-specific IgE response.

***Eur. J. Immunol* 32: 1631-1639,
2002**

- (7) Takasuka, N., Enami, M., Kuroda, K.,
Itamura, Y. and Takemori, T.
Intranasal inoculation of a
recombinant influenza virus
containing the exogenous nucleotides
in the NS segment results in immune
response against the exogenous gene
product within the respiratory
immune system.

***Vaccine* 20: 1579-1585, 2002**

2. 学会発表

- (1) Y., Takahashi, J., Inamine, T.,
Takemori. "Ras-mediated signaling
pathway is required for the
selection of high affinity memory B
cells." Keystone Symposia, B cells
and Antibodies, 2003
- (2) T., Takemori, S., Hashimoto. "The
search for cell surface molecules
associated with memory B cell
maintenance"

The Awaji International Forum on
Infection and Immunity, 2002

- (3) Y., Takahashi, E., Shimanuki, E.,
Yoshioka, S., Hashimoto, Y., Wang,
T., Suda, T., Takemori. "Regulatory

- molecules for the maintenance of memory B cells” 第 32 回日本免疫学会総会、2002
- (4) T., Takemori, Y., Takahashi, J., Inamine, S., Hashimoto, R., Abe. “Requirement of p21ras in B cell response”_第 32 回日本免疫学会総会、2002
- (5) 高橋宜聖、稲嶺絢子、吉岡絵美、薄井正義、Wang Yatao、須田貴司、安達貴弘、鏑田武志、竹森利忠、“Regulatory molecules for the maintenance of memory B cells” 第 32 回日本免疫学会総会、2002
- (6) 稲嶺絢子、高橋宜聖、手塚克成、竹森利忠、安部良、「AILIM/ICOS による抗原特異的 B 細胞産生・分化の制御」、第 32 回日本免疫学会総会、2002
- (7) 横田（恒次）恭子、磯貝まや、立川（川名）愛、岩本愛吉、竹森利忠、Brigitte Autran、「HIV-1 感染者の CD8 陽性 T 細胞の機能に関する解析」、第 32 回日本免疫学会総会、2002
- (8) 橋本修一、竹森利忠、「記憶 B 細胞に特異的に発現する細胞表面分子の探索」、第 32 回日本免疫学会総会、2002
- (9) 桑原一彦、藤村睦、高橋宜聖、竹森利忠、阪口雅弘、「B 細胞特異的 GANP 欠損マウスにおける B 細胞分化異常」、第 32 回日本免疫学会総会、2002
- (10) 磯貝まや、大竹かおり、藤井陽一、竹森利忠、横田（恒次）恭子、「HIV-1 Nef の発現が抗原提示細胞の機能に及ぼす影響の解析」、第 50 回日本ウイルス学会、2002 年

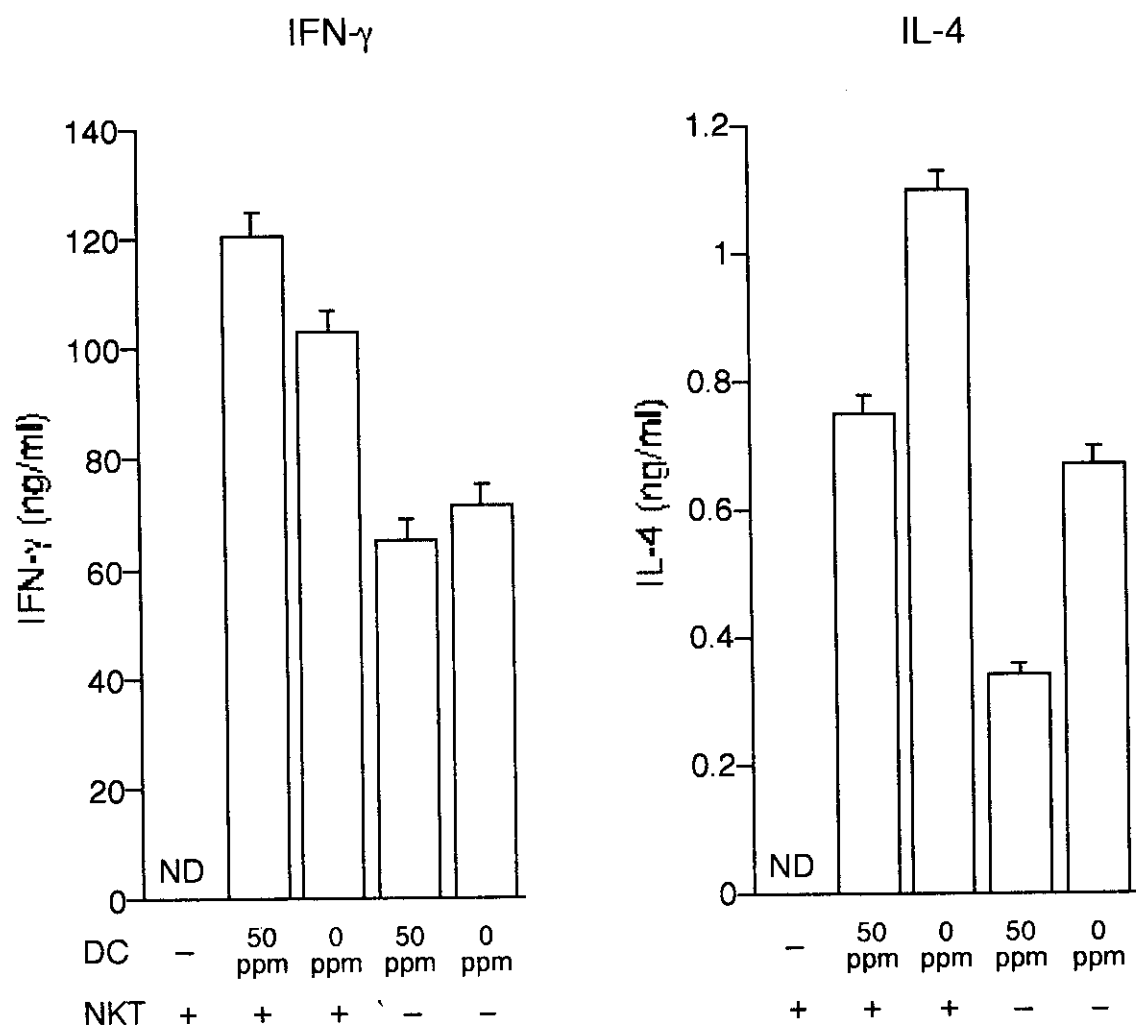


Figure 1. The effect on antigen-presentation of dendritic cells from TBT-treated mice
 ND; Not detected

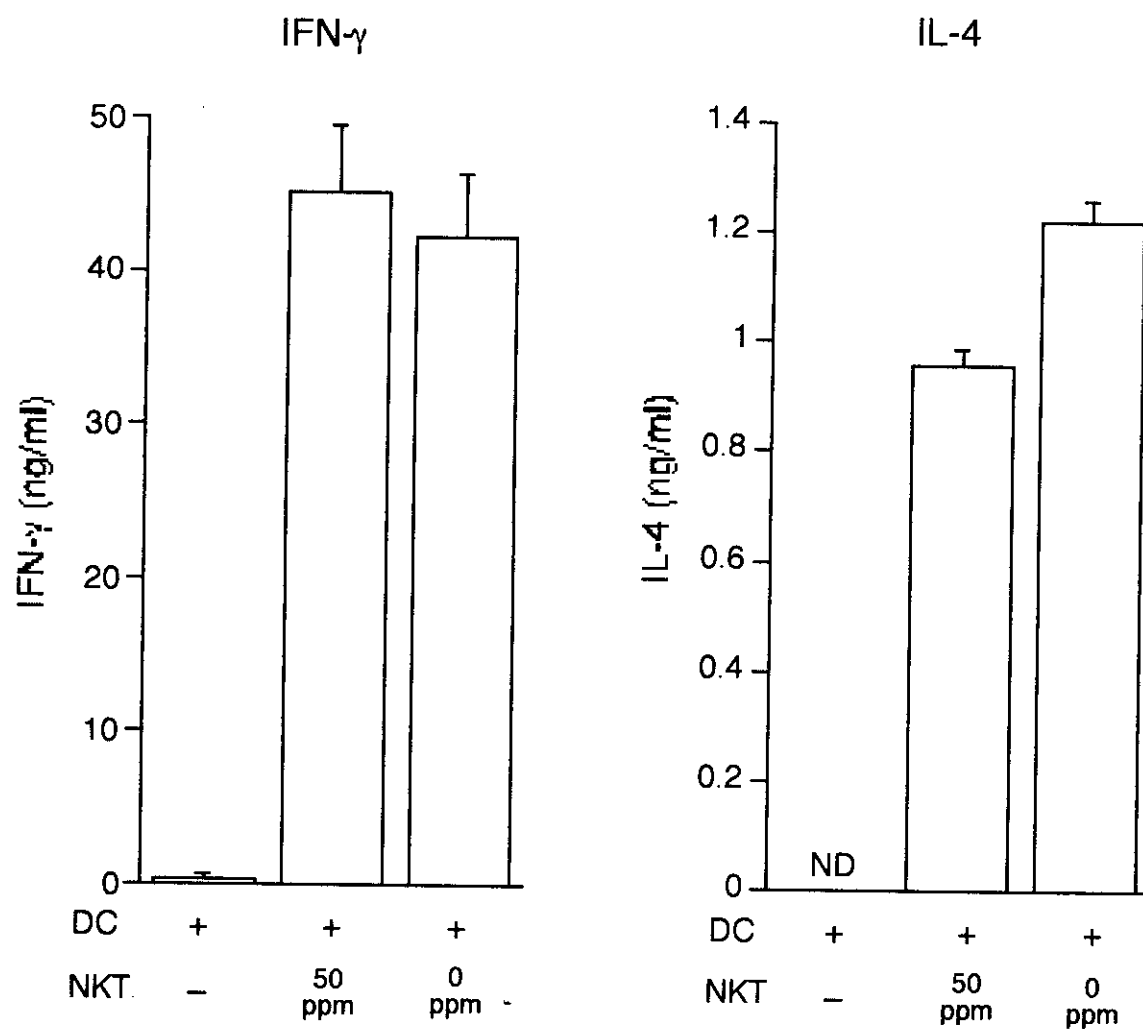


Figure 2. The effect on cytokine production of NK T cells from TBT-treated mice
ND; Not detected

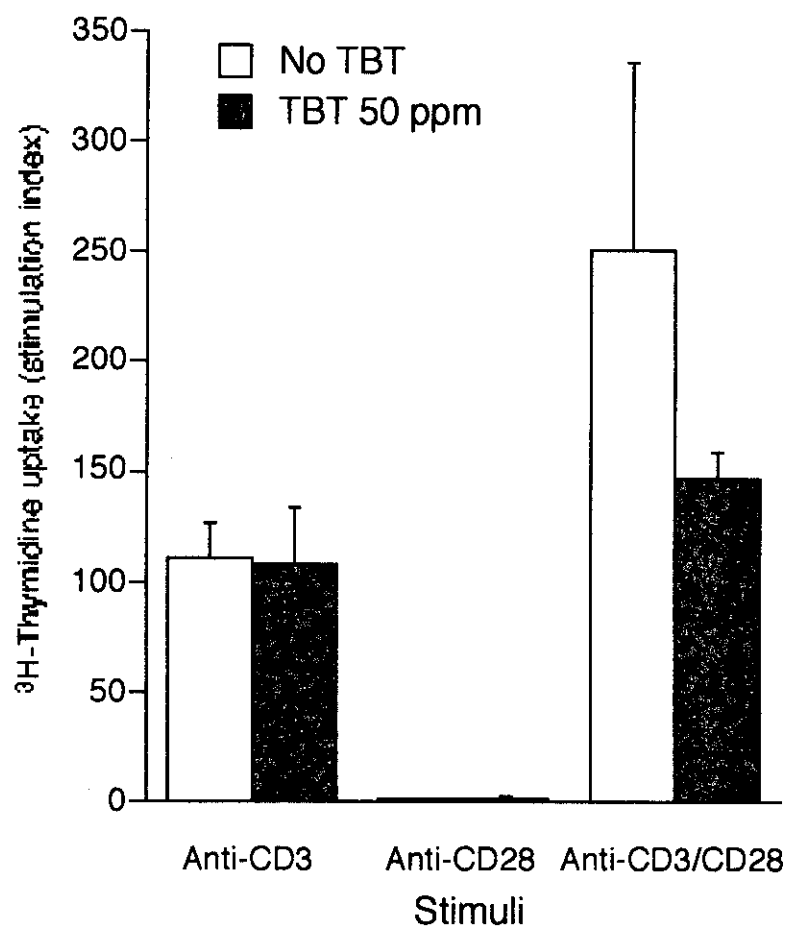
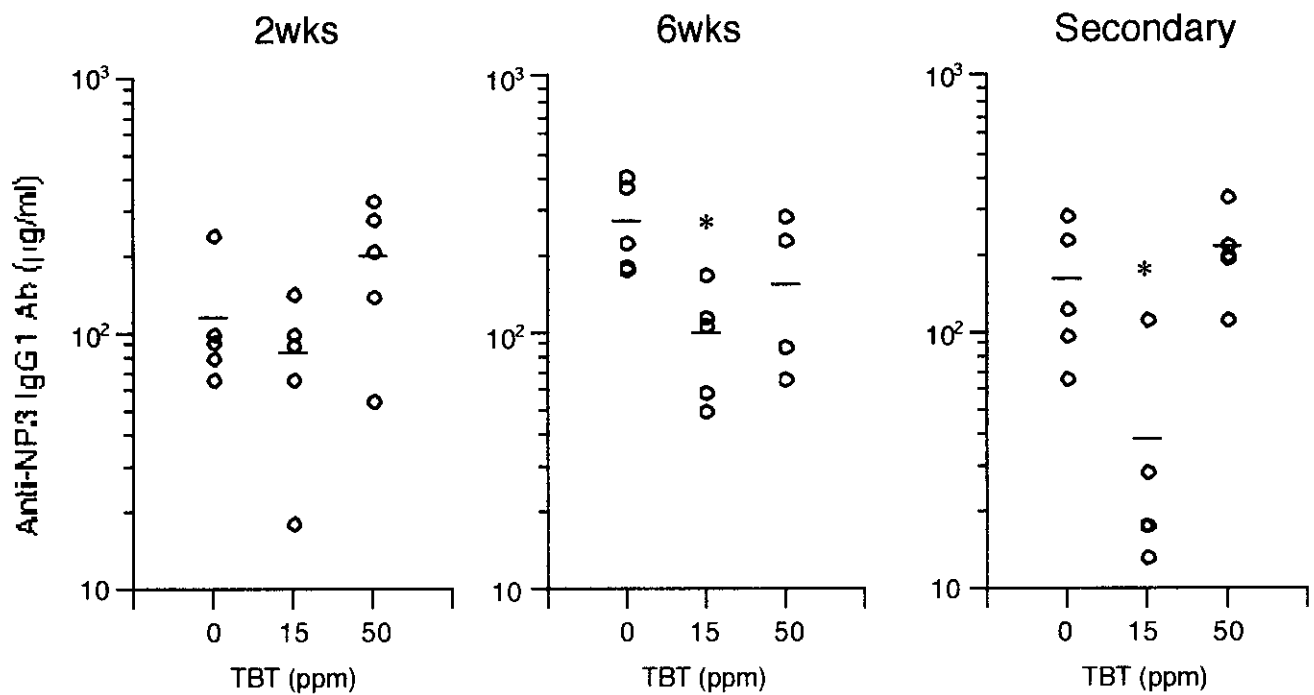


Figure 3. The effect on the proliferation of CD4 cells in response to anti-CD3 / CD28 monoclonal Ab.

A. High affinity Ab



B. High+Low affinity Ab

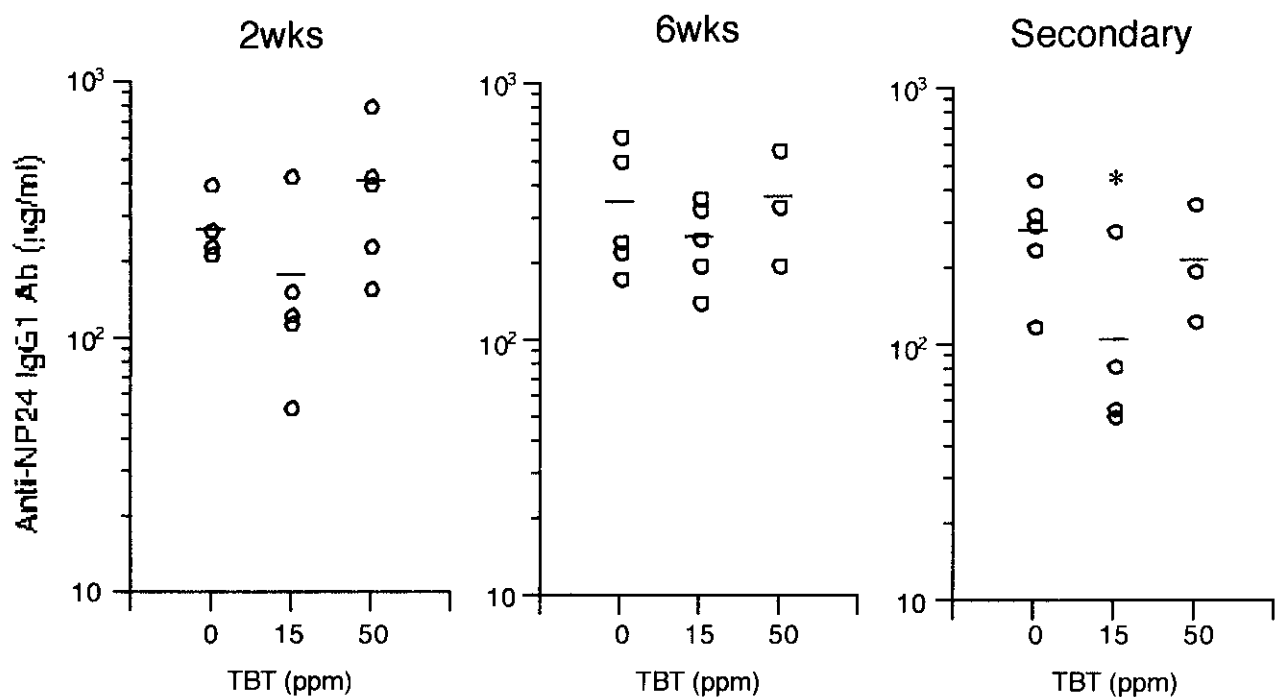


Figure 4. The effect on anti-NP IgG1 Ab titer in the primary and secondary response of TBT-treated mice. $p < 0.05$

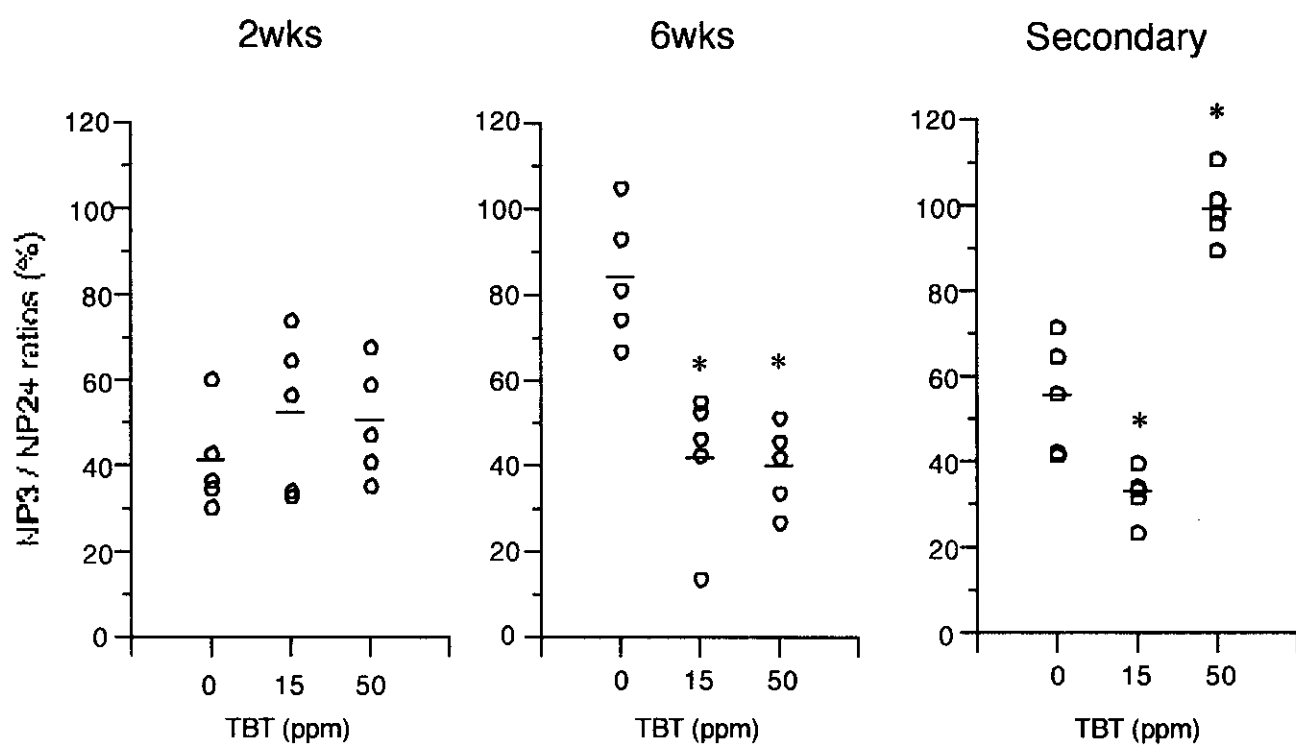


Figure 5. The effect on affinity maturation of anti-NP IgG1 Ab in primary and secondary response of TBT-treated mice $p < 0.05$

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

ヒト母乳中のブチルスズ類の高感度測定法の開発及び測定

分担研究者 天野 富美夫 大阪薬科大学薬学部教授

研究要旨 魚介類を汚染したトリブチルスズ(TBT)、ジブチルスズ(DBT)、モノブチルスズ(MBT)、トリフェニルスズ(TBT)などの有機スズ化合物が、母乳を通じて新生児の体内に取り込まれると考えられる量を測定し、健康被害に影響を及ぼす可能性について検討するため、分娩後 1 週間以内に採取された母乳（初乳）を分析した。まず、母乳からの抽出法及び定量分析法を改良し、回収率 80%（MBT は 50%）以上、検出感度 1.3ng/ml（MBT は 2.5ng/ml）以上の条件を設定した。次に、倉敷市内の産婦人科の協力の下、母親への魚介類摂取に関する聞き取り調査の結果と共に提供された 36 検体を分析した結果、全ての検体において、これらの有機スズはいずれも検出限界以下であった。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母乳を通じた新生児への有機スズ汚染の可能性は低いことを示唆する。さらに、分娩 1 ヶ月目の母乳（成乳）を用いた *in vitro* の実験の結果、ヒト単球系細胞株 U937 に及ぼす高濃度の TBT の細胞障害性が、母乳によって軽減されることを見い出した。

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「ヒト母乳中のブチルスズ類の高感度測定法の開発及び測定」を目標にして、まず有機スズ化合物の母乳からの抽出法の改良と高感度検出法の開発を行い、次に産院の協力の下、母親への

魚介類摂取に関する聞き取り調査の実施と母乳の提供を受け、検体を分析した。さらに、母乳と TBT の相互作用について調べるため、分娩 1 ヶ月目の母乳（成乳）を用いた *in vitro* の実験を行い、及ぼす高濃度 TBT のヒト単球系細胞株 U937 に対する細胞障害性への母乳の影響について検討を加えた。

B. 研究方法：

（1）母乳の採取：

倉敷市の倉敷成人病センター産婦人科の協力を得て、妊産婦 40 人をランダムに抽出し、妊娠中の食生活に関するアンケートおよび聞き取り調査を行った。特に食事における魚介類の摂取量および摂取頻度について尋ねた。分娩後 1 週間の入院中に母乳（初乳）を 4-5ml 提供してもらい、-20℃にて凍結保存した。なお、これらの調査は、大阪薬科大学、国立医薬品食品衛生研究所および倉敷成人病センターにおけるそれぞれの倫理規定に準拠して実施された。

（2）母乳中の有機スズ分析：

母乳（分娩 1 ヶ月後の成乳）4ml にそれぞれサロゲート物質 200ng(MBT d-9, DBT d-18, TBT d-27, TPT d-15)を添加後、HCl 及び NaCl を加え、ether/hexane (6:4; v/v)で抽出した。これを陽イオン交換樹脂(Amberlite CG-

120)で処理した後、グリニャール反応でエチル化し、1ml にメスアップしたものを GC-FPD 法（島津 GC-2010, capillary column: CP-SIL 8CB）の試料とした。

（3）U937 細胞の培養と TBT による細胞障害性の測定：

ヒト単球系細胞株の U937 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 $1 \mu\text{M}$ となるように添加した。この時、同時にヒト母乳（成乳）を 3000rpm、5 分間遠心した後、その上清を直径 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターをろ過したものを添加した。これらを CO_2 インキュベーター中で 37°C で 20 時間培養した後、培養上清中に遊離した乳酸脱水素酵素(LDH)の活性を LDH アッセイキット（極東製薬）で定量した。なお、細胞内の総 LDH 活性は無添加の対照に最終濃度 0.1% Triton X-100 を添加して遊離した LDH 活性から求めた。結果は総 LDH に対する遊離 LDH の相対的な割合(%)で表示した。

また、母乳中のタンパク質量は Bradford の方法に従い、ウシ血清アルブミン(BSA)を標準にしておこなった。

(4) 母乳中の成分と TBT の相互作用の測定：

母乳中の成分が TBT と実際に相互作用をするか否かを測定するため、 $[^3\text{H}]$ TBT を母乳と混合し、 37°C で 15 分間加温した。そののち、Amersham-Pharmacia 社の PD_{10} カラムにかけて PBS で溶出した。溶出液を約 0.5ml ずつ回収し、その各分画に含まれる $[^3\text{H}]$ の放射活性を測定した。

C. 研究結果：

(1) 母乳中の有機スズ分析：

今回確立した分析法（図 1）による抽出を含めた全過程における各有機スズ化合物の回収率は、TBT、DBT、TPT では 80% 以上、MBT では約 50% であった（図 2）。また、母乳（成乳）に添加した場合の検出限界は、TBT、DBT、TPT では 1.3ng/ml 以上、MBT では 2.5ng/ml 以上であった。これらの結果は、この分析法が母乳中に含まれる有機スズを定量的かつ高感度に検出する方法であることを示す。

次に、倉敷成人病センターで採取した母乳（初乳）中の有機スズを調べた結果、36 検体の全てが、これら TBT、DBT、TPT、あるいは MBT に関して検出限界以下であった。なお、40 検体中の残る 4 検体については、有機スズ測定のための初期条件の設定の過程で器具が汚染したため、デ

ータなし(no data)として取り扱った（表 1）。

以上の結果は、魚介類の摂取の多寡に関わらず、日常の食生活であれば母乳（初乳）を通じた新生児への有機スズ汚染の可能性は低いことを示唆する。

(2) U937 細胞の TBT による細胞障害性に及ぼすヒト母乳（成乳）の影響：

平成 12 年度の本研究報告において、ヒト単球系細胞株の U937 細胞が TBT によって濃度依存的に細胞障害性を受け、 $1\mu\text{M}$ 以上の高濃度領域では細胞のネクロシスを誘導して LDH の細胞外への遊離を起こすことを示した。本年度は、この実験系を応用して、U937 細胞の培養系に母乳（成乳）を添加して培養し、TBT の細胞障害性に及ぼす影響を調べた。その結果、TBT は用量依存的に TBT の細胞障害性を抑制した（図 3）。さらに、この母乳の細胞障害性抑制作用の発現には、あらかじめ TBT と母乳を共存させ、 37°C で 15 分間加温する必要があることが示された（図 4）。

以上の結果は、母乳（成乳）には TBT と加温することによって相互作用する性質があり、その結果、TBT の U937 細胞に対する細胞障害性を抑制することが示唆された。

(3) 母乳中の成分と TBT の相互作

用の測定：

実際に TBT と母乳が相互作用するか否かをさらに詳しく解析するため、 $[^3\text{H}]\text{TBT}$ を母乳と混合して、 37°C で 15 分間加温し、 PD_{10} カラムにかけて PBS で溶出した。その結果、放射活性は母乳非添加群に比べて、添加した群では溶出のピークが前方にずれ、分子サイズが若干大きくなったことが示唆された (図 5)。この結果は、母乳の成分が TBT と何らかの相互作用をした可能性を示すものと考えられる。

D. 考察：

本年度は、(1)ヒトの母乳に含まれるトリブチルスズ(TBT)の定量、を行うと共に、(2)TBT の U937 細胞株に対する細胞毒性に対する母乳の影響、ならびに、(3)TBT と母乳の相互作用に関する研究を行った。

(1)の研究では、倉敷成人病センターの協力を得て、分娩後 1 週間以内の「初乳」を集め、その TBT 含量を GC/MS で定量した。それに先立って、ヒトの母乳 (成乳) に各種の有機スズ化合物を添加し、抽出過程ならびに GC/MS による定量の過程を通じて、総回収率が 80%以上 (TBT、DBT、TPT) あるいは約 50% (MBT) という成績を得た。これは実験室で比較的多量の検体を処理する方法として

は、簡便かつ高収率であると考えられる。また、母乳中に添加した各有機スズの検出限界も TBT、DBT、TPT が 1.3ng/ml (0.0013ppm)、MBT が 2.5ng/ml (0.0025ppm) という値を得たので、高感度検出法ということができる。実際にこの方法を用い 36 検体の初乳中の有機スズを定量した結果、いずれも検出限界以下であった。同時に行った母親の食生活における魚介類の摂取頻度に関する聞き取り調査の結果とあわせると、魚介類の摂取頻度の多寡に拘らず、初乳中の有機スズ含量は直ちに新生児の健康に対して影響を及ぼすものではないと考えられる。

(2)の研究では、ヒト単球系細胞株、U937 に対する TBT の細胞障害性をヒト成乳が用量依存的に阻害し、保護的な作用を持つことが示唆された。現在、この成乳中の成分の同定を進めているところである。

また、(3)の研究では、ヒトの成乳と $[^3\text{H}]\text{TBT}$ が相互作用をし、ゲルろ過カラムの溶出位置が若干早くなることが示されたが、溶出位置の変動がさほど大きく無く、実際にどのような相互作用が起きているのかについては今後の検討を必要とする。(2)の研究と併せ、母乳中の成分を同定し精製してから、さらに詳しい解析を行う必要があると思われる。

E. 結論：

本年度の研究成果をまとめると以下のようになる。

(1)ヒトの母乳からの有機スズ (TBT、DBT、MBT および TPT) の高収率による抽出法および高感度定量法を確立した。

(2)ヒトの母乳 (初乳) 中のこれらの有機スズ含量は、母親の魚介類摂取量の多寡に関わらず、いずれも検出限界以下であった。

(3)ヒトの母乳 (成乳) は用量依存的に TBT の U937 ヒト単球系細胞株に及ぼす細胞障害性を抑制した。その作用発現には TBT と母乳をあらかじめ加温する必要があった。

(4)ヒトの母乳 (成乳) は [^3H]TBT との加温によって相互作用をし、ゲルろ過の溶出位置を早めた。

F. 研究発表：

1. 論文発表

1. Sugita-Konishi, Y., Sakanaka, S., Sasaki, K., Raj Juneja, Lekh, Noda, T., and Amano, F. 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**, (2002) 3607-3613.

2. 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.

3. 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.

2. 学会発表

1. 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。

2. 三野芳紀、楠木季実子、芝野真喜雄、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。

G. 知的所有権の取得状況：

特になし

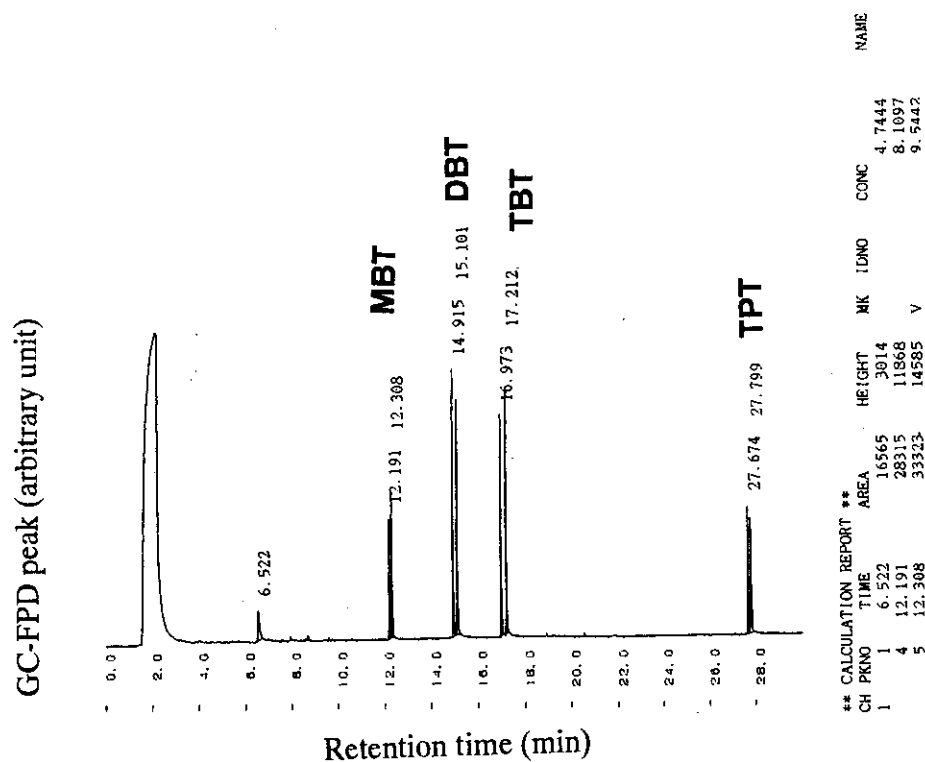


図1. GC-FPD による有機スズの分離

それぞれ 200ng を添加した。各ピークの 2 本のうち、前のピークはサロゲートのピークを示す。

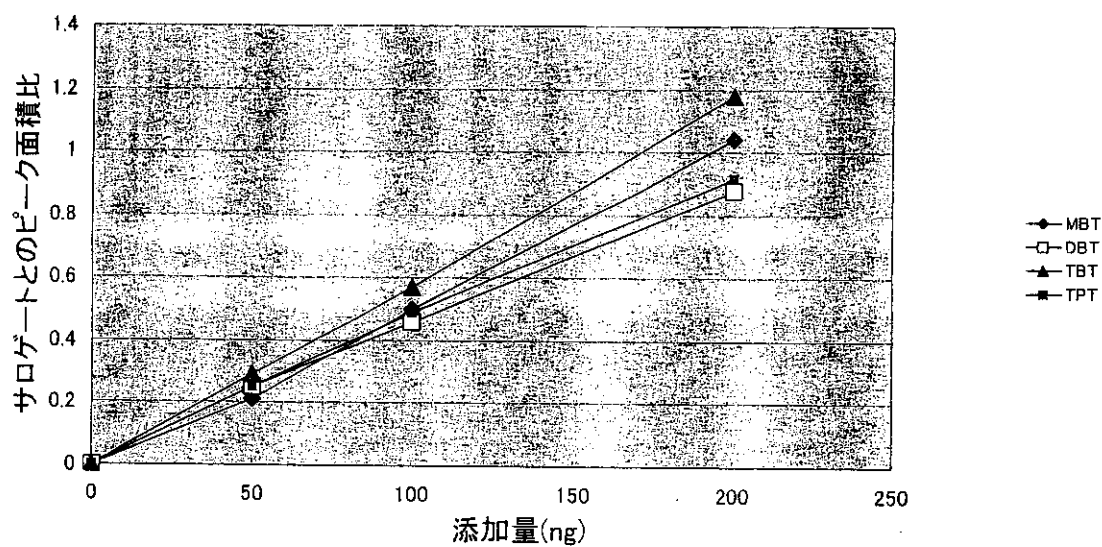


図2. 有機スズの定量のための検量線

母乳中に横軸に示す各有機スズを添加し、サロゲート(200ng)とのピーク面積比を縦軸にとった。

sample No.	results	sample No.	results	sample No.	results	sample No.	results
1	no data	11	ND	21	ND	31	ND
2	no data	12	ND	22	ND	32	ND
3	no data	13	ND	23	ND	33	ND
4	no data	14	ND	24	ND	34	ND
5	ND	15	ND	25	ND	35	ND
6	ND	16	ND	26	ND	36	ND
7	ND	17	ND	27	ND	37	ND
8	ND	18	ND	28	ND	38	ND
9	ND	19	ND	29	ND	39	ND
10	ND	20	ND	30	ND	40	ND

no data: 器具汚染

ND: 1.3ng/ml(母乳) DBT,TBT,TPT
2.5ng/ml(母乳) MBT

表1. 母乳(初乳)中の有機スズの分析結果

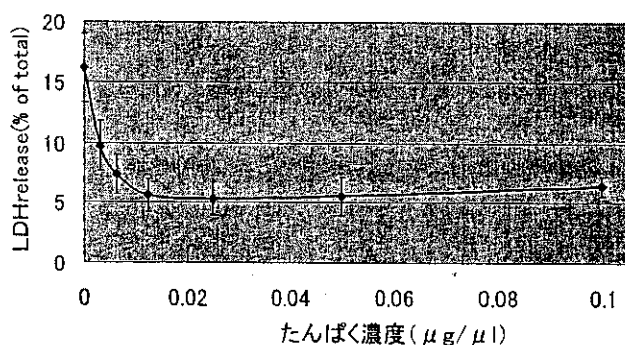


図3. 母乳(成乳)がTBTのU937細胞障害性に及ぼす影響

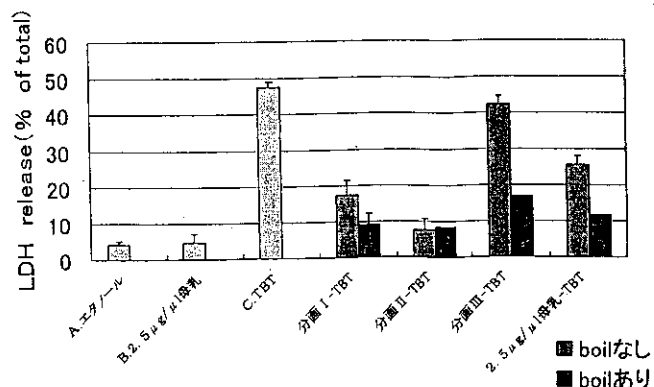


図4. 母乳のTBTへの作用
発現に及ぼす前処理(加温)の影響

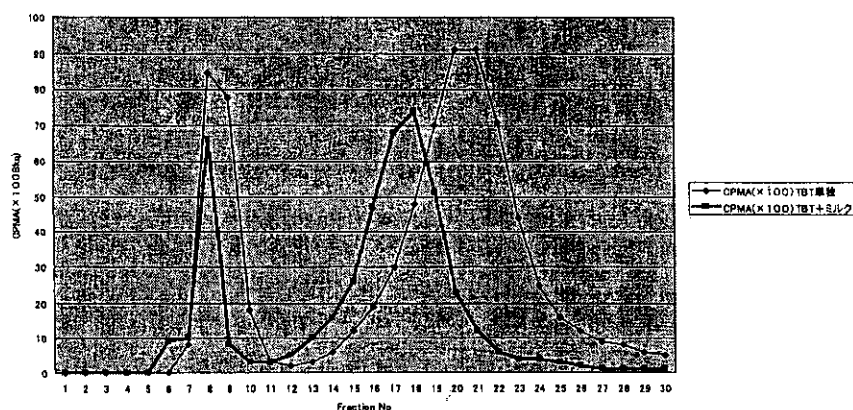


図5. PD₁₀カラムによる³H]TBTの溶出パターンに対する母乳の影響

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

トリブチル錫 (TBT)の生体への影響

分担研究者 香川医科大学炎症病理学教授 阪本晴彦

研究要旨

トリブチル錫 (TBT) の経胎盤的な影響を調べる目的で、TBT 含有資料で飼育された母マウスから生まれた仔マウスについて検索が行われたが、このうち高濃度(125ppm)投与群では出産直後に仔マウスが死亡することより、仔マウスの病理解剖学的、組織学的な異常の有無について検索した。肝臓内での造血細胞の apoptosis がコントロールに比べ高頻度であることや胆栓が多数見つかる例のあることは、無効造血や溶血があった可能性を示した。

また、TBT がヒトへの感染抵抗力に対してどのような影響を及ぼすかを知るため、その準備として、ヒト好中球の貪食能に対する影響について調べてみた。

A.研究目的

トリブチルスズは、魚介類等に蓄積され食物連鎖によって濃縮され、ヒトや家畜に摂取される環境中の脂溶性有害化学物質である。現在までの研究によると成獣ではかなり高濃度にならないと毒性をあらわさないと考えられていた。しかし、胎盤経由で移行する物質であることから、次世代への発達障害へのリスクは懸念されている。そこで本研究は母親には直接的に影響が出ない濃度であるが比較的高濃度(125ppm)である TBT 含有飼料の仔マウスへの発達障害への影響を明らかにするために、生後直後の新生児を剖検し、その検討を

行った。

また、TBT 摂取による感染抵抗性を実験動物を用いて検討してきたが、最終年度ではヒトの好中球を用いてヒトへのリスク評価を行うための基礎実験をおこなった。

B. 研究方法

(1)高濃度(125ppm)TBT 含有飼料投与による影響

高濃度(125ppm)TBT 含有飼料を妊娠1日目が確認されている ICR マウスに自由摂取させた。出産直後に新生児をホルマリン固定した。

(2) ヒト好中球の貪食能に対する影響
ヘパリンを添加したヒト末梢血から

の好中球を分離し、microplate上でIgG感作羊赤血球の貪食を観察した。また、ヒト血小板をガラス試験管内で Ca^{++} 存在下で37°Cでincubate後遠心し、血小板放出物質を含む上清を得た。

C. 研究結果

(1) 高濃度(125ppm)TBT 含有飼料投与による影響

外表所見：外表上の明らかな異常(奇形)はみられない(図1)。肝臓表面等の漿膜面に出血を認める。

内臓の肉眼および顕微鏡所見：

心臓：肉眼的には明らかな奇形は認められない。(大動脈、上大静脈、下大静脈、肺静脈は確認できた)。心肥大なし。顕微鏡観察により両心室の拡張がみられた。また、心室壁の血管の著明な拡張をみとめた。

肺：肉眼的異常なく、水に沈んだ。しかし、顕微鏡的には肺胞は空気にて軽度を開いていた。炎症の所見は認められなかった(図2)。

肝臓：肉眼的には白色調で腫大、柔らかく凹凸を伴っていた(図3)。組織学的には死後変化が強い。被膜下に出血(図4)、肝内血管の拡張、肝細胞は脂肪変性を示す。肝臓を観察した3匹の内2匹では多数の胆栓を認めタ(図5、矢印し)。管内の胆道は減少しているのに対し肝外には明らかな胆道が認められた。他の1匹では胆道系の明らかな異常は見られ

なかった。

髓外造血を示す幼弱な血球ではTBT投与されていない母マウスから生まれた仔マウスと比較してTunel陽性(図6)、Fas陽性(図7)の細胞が多く認められた。

(2) ヒト好中球の貪食能に対する影響

TBTは単独では高濃度(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)でヒト好中球のFc受容体を介する貪食を亢進させる。血小板放出物質もヒト好中球のFc受容体を介する貪食を亢進させるが、TBTと血小板放出物質共存下ではヒト好中球の貪食を亢進はみられなくなった。この反応は中性および乳酸酸性化の何れの条件においても見られた。

D. 考察

125ppm投与母マウスから生まれた仔マウスは分娩直後に死亡することが観察されている。肺の所見としてわずかな空気含量のあることから、分娩後少数回の呼吸は行なったと思われるが、炎症の所見は見られなかった。新生児呼吸窮迫症候群に対応する様な状況が想定されるところであるが、硝子膜の形成等の組織学的にそれを支持する所見や明らかな異常は現在のところ見つからない。うっ血や、出血が強いことから、心不全、造血機能の異常、凝固線溶系の異常も想定される。肝臓内での