

購入し、対照群を含めて4群に分け、一群5匹ずつとした。

2) 投与方法：飲用水及び固形飼料を介して塩化トリブチルスズ (TBTCI) を飼育直後から摂取させた。投与濃度は対照 (0ppm), 15ppm, 50ppm 及び 125ppm とした。15ppm, 50ppm 投与群は飲用水として、125ppm 群は固形飼料として与えた。125ppm 投与群では、この濃度になるよう TBTCI を水に溶かした場合マウスが水を摂取をしなくなるので、餌中に混ぜて投与することにした。

3) 試料採取：生まれた仔マウスのうち、オスのみを本実験の対象とした。125ppm 投与マウスについては、仔を産まなかった1匹を除き、他の4匹から1匹あたり約12匹の仔を得たが出産後、すぐに総て死亡したので仔の試料は実際には入手できなかった。対照群、15ppm 群、50ppm 群の3群については、得られた仔マウスを母乳を介して飼育し、1週目、2週目、3週目に屠殺、検体を採取した。従って仔マウスは胎盤及び母乳を介して TBTCI に曝露されたことになる。可能な限り1回の実験に5匹の仔マウスを使用し、同腹のマウスは避けることとした。脳サンプルについては、全脳から小脳と

延髄を除いた残りの部分を「大脳サンプル」として以下の結合実験に使用した。なお、3週間の実験終了時に、親マウスからも脳サンプルを採取した。

4) リガンド・受容体結合実験：大脳膜画分の調製は Ransom and Stec (1988)の方法に従った。非競合的拮抗剤と呼ばれる $[^3\text{H}]$ MK-801を放射性リガンド（比活性 24.2Ci/mmol）として使用した。膜画分に対する結合実験は室温で60分インキュベートする条件下で行った。反応液中の $[^3\text{H}]$ MK-801の最終濃度は5nMになるようにした。反応終了後セルハーベスターにて吸引濾過し、得られた濾紙ディスク中の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。総結合量から非特異的結合量を差し引き特異結合量を求めた。タンパク量はBio-Rad社のプロテインアッセイキットで測定した。統計検定は一元配置分散分析、ポストホックテストにはフィッシャーのPSLDを用いた。

C. 研究結果と考察

生後1, 2, 3週目の乳飲マウスの体重を対照群、TBT 15ppm 群、TBT 50ppm 群の3群に分けて図1に示した。各群（5匹）とも週齢が増すに従って体重は増加するが、同じ週

齢で比較すると対照群に比べて TBT 50ppm 群はいずれの週齢でも有意 ($p<0.01$) に成長が抑制された。15ppm 群も抑制の傾向は認められたが有意の差とはならなかった。これらの成績より、TBT 曝露を受けた母獣から産まれた乳飲マウスの成長は濃度依存的に抑制され、生後 3 週齢の段階でも追いつくことはなかった。このことから胎盤及び母乳を介して比較的高濃度の TBT 曝露を受けると、乳飲マウスの成長に重大な影響が発現することがわかった。事実 125ppm 投与群から生まれた仔は出生直後に総て死亡している。一方出産後 3 週目の母マウスの体重は対照群、15ppm 群、50ppm 群及び 125ppm 群で全く差は認められず (data not shown)、妊娠マウスに対する TBT 曝露の影響は母獣よりも仔に強く現れることが示された。

次に仔マウス脳内 NMDA 受容体に対する [^3H]MK-801 の結合量を調べた結果を図 2 に示した。1 週齢の 15ppm 群と 3 週齢の 15ppm 群と 50ppm 群でそれぞれの週齢の対照群と有意の差をもって結合が低下 (抑制) した。2 週齢では差は認められなかったが、3 週齢の成績からすると、記憶や行動に関与するとされる NMDA 受容体が影響を受ける可能性があり、TBT の脳・神経系に対する発達毒性は注目する必要がある。

D. まとめ

TBT 曝露を受けた妊娠マウスから生まれた乳飲マウスにおいては、その成長が抑制され、さらに大脳内の興奮性アミノ酸受容体の一つである NMDA 受容体が負の影響を受けることが示された。

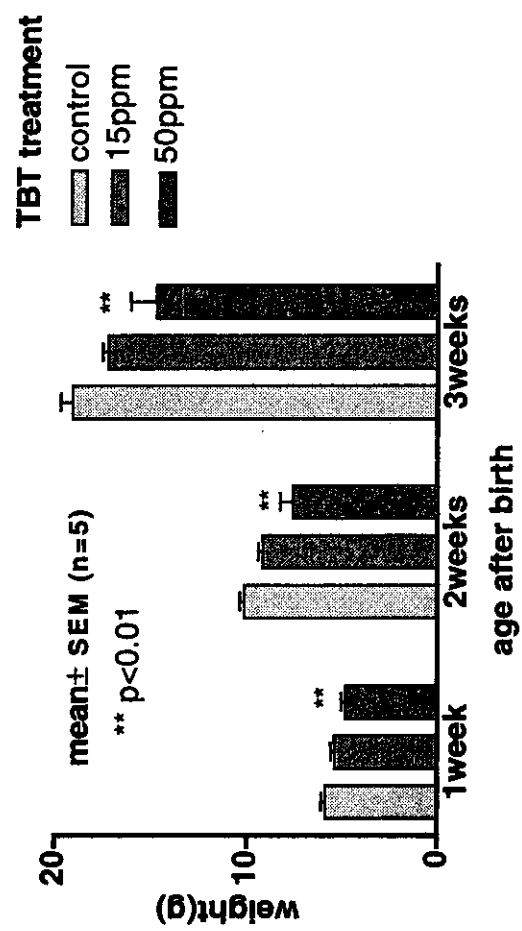


Fig.1 Effect of TBT on weight of pre-weanling mouse

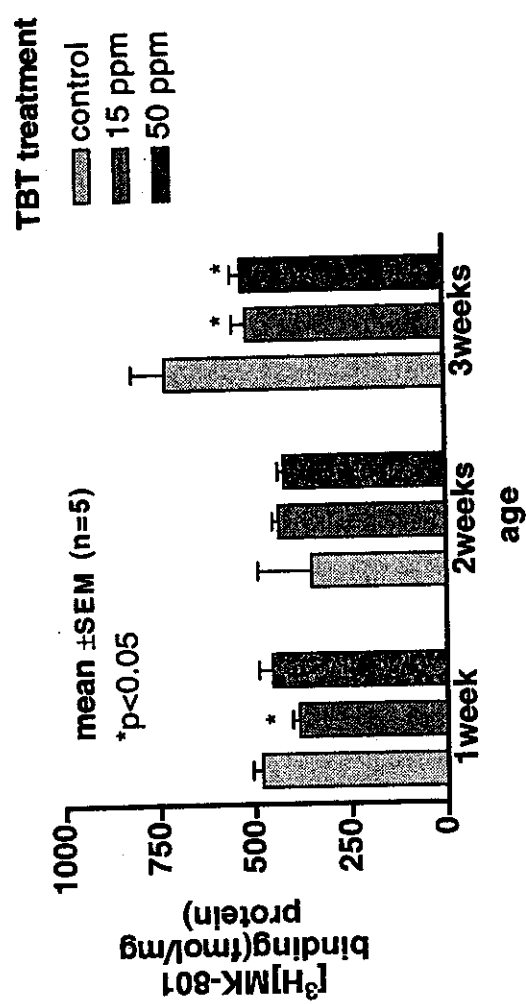


Fig.2 Effect of TBT on NMDA receptor binding sites in brain of pre-weanling mouse

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

低濃度の TBT(1nM～)は、ヒト腸管上皮細胞 Caco-2 の酵素活性等には影響を及ぼさなかったが、Caco-2 単層のバリアー機能を低下（タイトジャンクション透過性を亢進）させた。しかし同時に、脂溶性異物排出機能を担っているトランスポーターである P-糖タンパク質(MDR1)の活性が上昇することも認められた。TBT によって誘導される P-糖タンパク質の活性上昇は遺伝子の転写レベルで起こっていることも確認され、TBT のような脂溶性異物の侵入に対してそれを排除する機構が腸管上皮で誘導され得ることが示された。

トリチウム標識 TBT を用いて、ヒト腸管上皮細胞 Caco-2 単層における TBT の透過性測定を行い、粘膜側に添加した TBT(10 nM)が容易に基底膜側へ透過することを見出した。また、この透過はある種の食品由来ペプチドの共存によって抑制されることが見出され、TBT の腸管透過を食品因子によって制御できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

トリブチルスズ（TBT）は、藻類、貝類といった水生生物の防除活性を持つことから、漁網や船底の防汚剤などに使用されてきた。その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。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て経口的に摂取されたものであると考えられている。

食品由来のルートで摂取された TBT は腸管から吸収されと考えられる。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。

我々は、昨年度までの研究で、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てきた。その結果、細胞に発現するペプチダーゼやアルカリホスファターゼなどの酵素の活性は TBT 処理によってもほとんど影響を受けないが、腸管細胞層の物理的バリアー(経上皮電気抵抗: TER)は損傷を受けること、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; MDR1)の活性は TBT 短期処理(高濃度)で低下、長期処理(低濃度)で上昇することを見出した。本年度は、この TBT による P 糖タンパク質の制御の解析を進めるとともに、腸管上皮における TBT の透過性(吸収性)の食品因子による制御を解析した。

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[1]。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。

TBT 処理

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。TBT 処理した細胞はハンクス液(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) 細胞層の経上皮電気抵抗(TER)

腸管上皮細胞間の接着構造(タイトジャンクション)の変化やバリアー障害の程度を評価するために、Transwell 中で培養して透過性膜上に単層を形成させた Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗(TER)を Millicell-ERS(ミリポア社)を用いて測定し、細胞層の健全性の指標とした。

(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 daunomycin(トリチウム標識)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、細胞

内に蓄積した daunomycin 量を液体シンチレーションで測定した。

ノーザン分析

Caco-2 細胞に TBT を加え、一定時間後の MDR1 の mRNA 発現量を測定した。

Caco-2 細胞層透過性試験

透過性膜 (Transwell) 上に Caco-2 細胞を 2 週間単層培養した。細胞層の粘膜側 (容量 0.5 ml) にトリチウム標識 TBT (10 nM) を加え、2 時間インキュベート後の基底膜側 (容量 1.5 ml) への透過量を測定した。また、この時、粘膜側に各種サンプルを終濃度 0.1% になるように加え、TBT の透過に及ぼす食品因子の影響を観察した。食品因子としては、乳画分、乳タンパク質とその分解物、鶏卵タンパク質分解物、食物繊維等を用いた。

C. 研究結果と考察

TBT による Caco-2 細胞の長期間処理が細胞機能に及ぼす影響

TBT を含む培地中で 2 週間培養して分化させた Caco-2 細胞を用い、ペプチダーゼやアルカリホスファターゼなどの各種酵素活性、TER (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, 1, 5, 10, 50, 100nM で検討した。

15 日間の TBT 処理により、各種酵素の活性には有意な影響はみられなかったが、TER は TBT 濃度依存的に低下した (図 1)。これは、長期間の TBT 処理によって Caco-2 細胞が何らかの機能的な変化を引き起こし、細胞骨格の変化などを介して細胞層のタイトジャンクションの状態が変わったことを示している。タイトジャンクションは有害な成分による細胞の損傷にいち早く応答して変化することが知られており [2, 3]、この変化は TBT が細胞層に対してある種の毒性を示し、そのバリアー機能を破綻させる前段階を反映していると考えられる。

我々は昨年度、このような長期間の 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ることを見出した。この現象は Caco-2 細胞の異物排出トランスポーターである P-糖タンパク質活性が TBT によって上昇することを示唆している。本年度はより精度の高い測定が可能な放射活性 daunomycin を基質として同様の実験を行ったところ、TBT の濃度 (1nM~100nM) に依存的に daunomycin の蓄積量は減少することを確認することができた (図 2)。また、P 糖タンパク質をコードして

いる MDR1 の mRNA 発現をノザン分析によって解析したところ、TBT 処理 (50nM, 100nM) により MDR1 の発現量の増加が見られ (図 3)、TBT 存在下で培養することによって MDR1 の発現が転写レベルで亢進していることが明らかになった。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転写レベルで上昇する」という合目的な生体の防御機構が腸管上皮に存在することが確認された。

TBT の腸管上皮細胞層透過性の測定と食品因子による透過の制御

Transwell 中で単層培養した Caco-2 細胞の粘膜側 (上層) に、トリチウム標識した TBT (10nM) を加え、一定時間後に基底膜側 (下層) の放射活性を測定するという実験系を用いて TBT の腸管上皮透過性を評価した。

TBT の細胞層透過量は経時的に変化し、その透過量は P-糖タンパク質の阻害剤として用いられる vinblastine や verapamil を共存させることにより増加した (図 4)。このような実験系において、食品試料 (終濃度 0.1%) を TBT とともに上層に加え、下層に移動する TBT の量を測定した結果を図 5 に示した。

食物繊維、脱脂乳は TBT の透過性

に影響を及ぼさなかった。一方、牛乳のカゼイン、乳清タンパク質は有意に TBT の透過量を減少させた。しかし、カゼインの分解物はその効果を示さなかった。また、卵白タンパク質分解物であるプロフィックス、発酵乳の上清も有意な抑制効果を示した。

この抑制効果の機構を明らかにするために、透過実験の後の Caco-2 細胞内に蓄積している TBT 量を測定した。その結果、透過量を減少させたプロフィックス、発酵乳上清、カゼインおよび乳清タンパク質では、細胞層に保持されている TBT 量が増加していることが明らかになった (図 6)。この結果から、透過抑制作用は TBT の細胞層への保持作用によるものであることが示唆された。これが TBT の細胞表面への吸着によるものなのか、細胞内での蓄積によるものなのかは現在の所不明である。また、どのような成分がこの作用を担っているかについても現在検討中である。

D. 結論

TBT は腸管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増加することが観察された。また、腸

管上皮細胞層における TBT 透過は食品因子によって制御され得ることが示唆された。

G. 知的所有権の取得状況
なし

E. 参考文献

- [1] Hashimoto, K., and Shimizu, M.,
Cytotechnology, 13: 175-184
(1993)
- [2] Narai, A., Arai, S., and Shimizu, M.
Toxicol. in Vitro, 11: 347-354
(1997)
- [3] Okada, T., Narai, A., Matsunaga, S.,
Fusetani, N., and Shimizu, M.
Toxicol. in Vitro, 14: 219-226
(2000)

F. 研究発表

1. 論文発表

Upregulation of MDR1 in human intestinal epithelial cells, Caco-2, by a long-term culture with tributyltin(TBT) (論文作成中)

2. 学会発表

(1) 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)の透過・吸収の食品成分による制御. 2003 年度日本農芸化学会大会、講演要旨集、p. 53

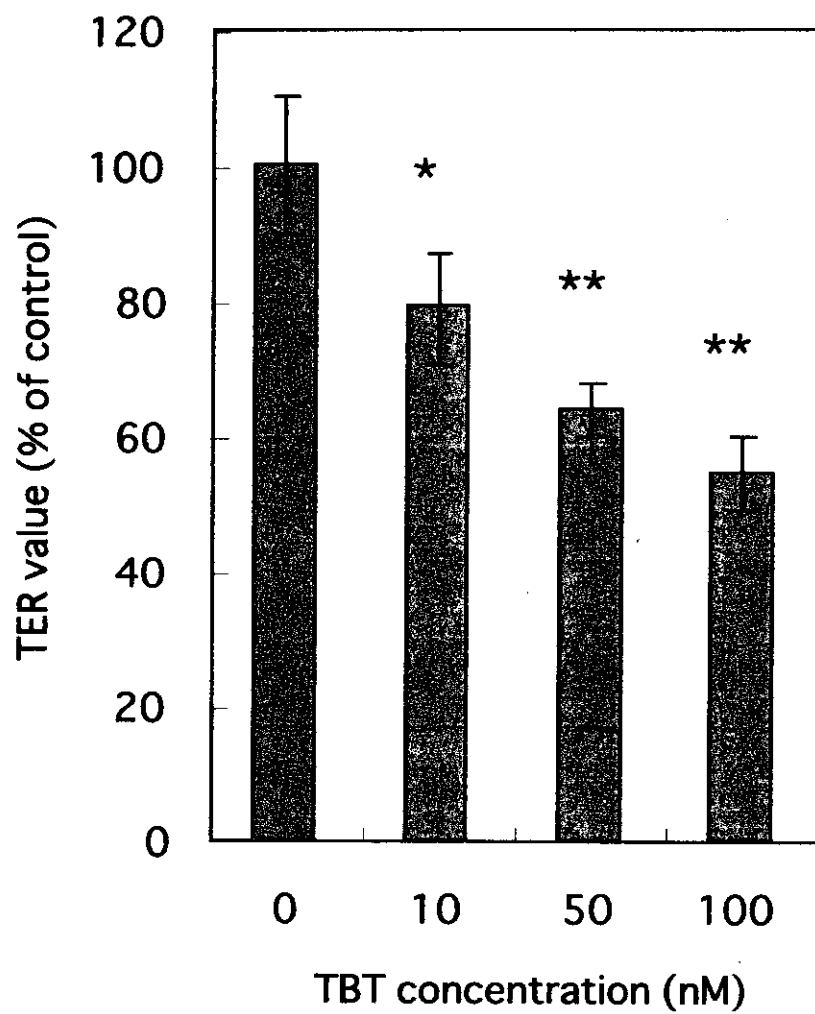


図 1 TBTがCaco-2細胞層のTERに及ぼす影響

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

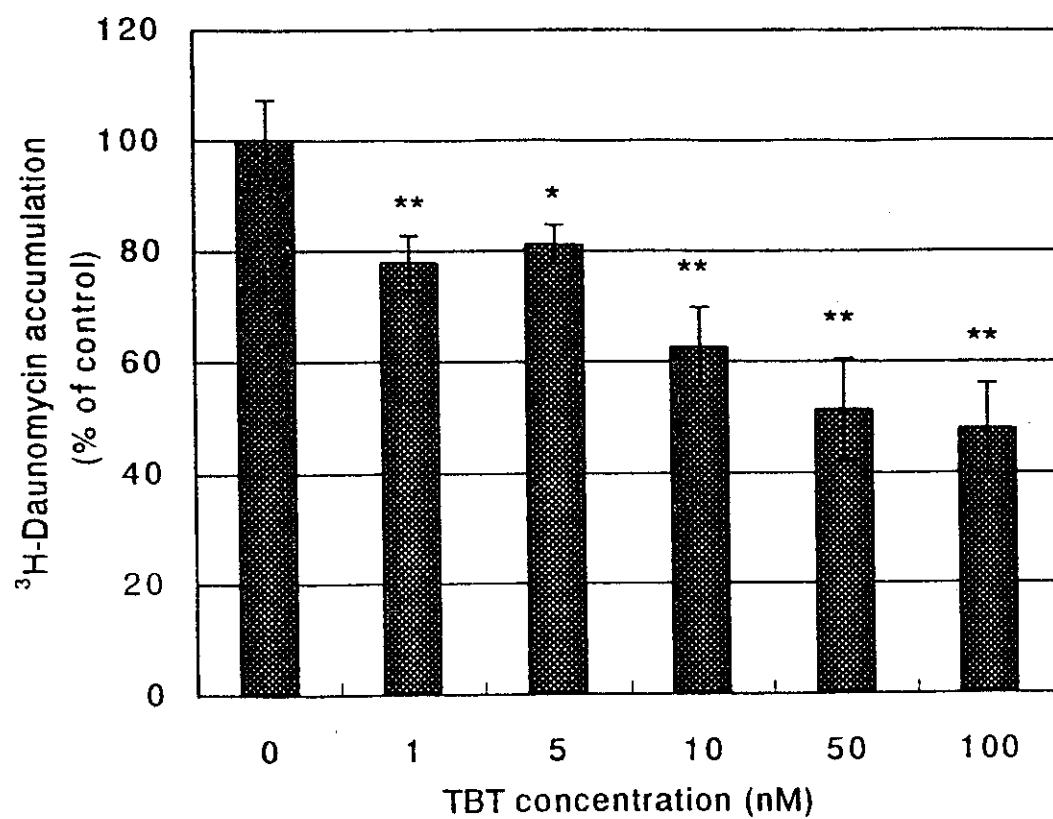


図2 TBTの長期処理がCaco-2におけるP-糖タンパク質の活性に及ぼす影響

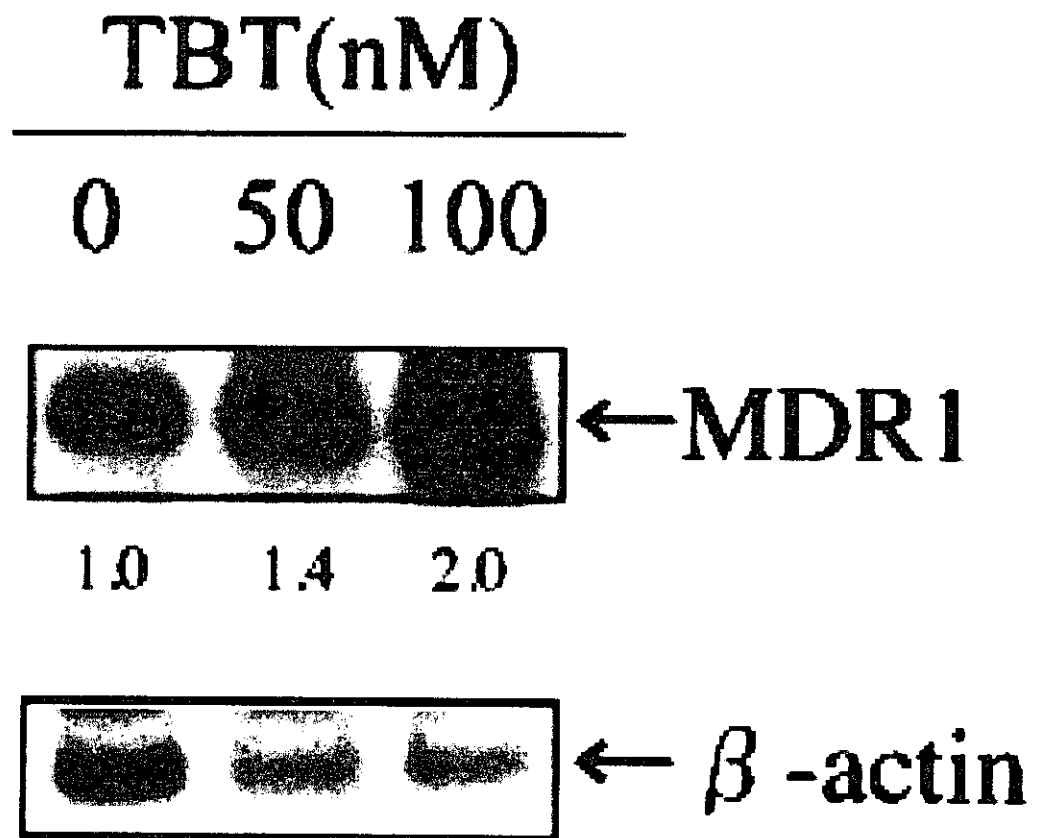


図3 TBTの長期処理はCaco-2におけるP-糖タンパク質 (MDR1)の発現を亢進する (Northern analysis)

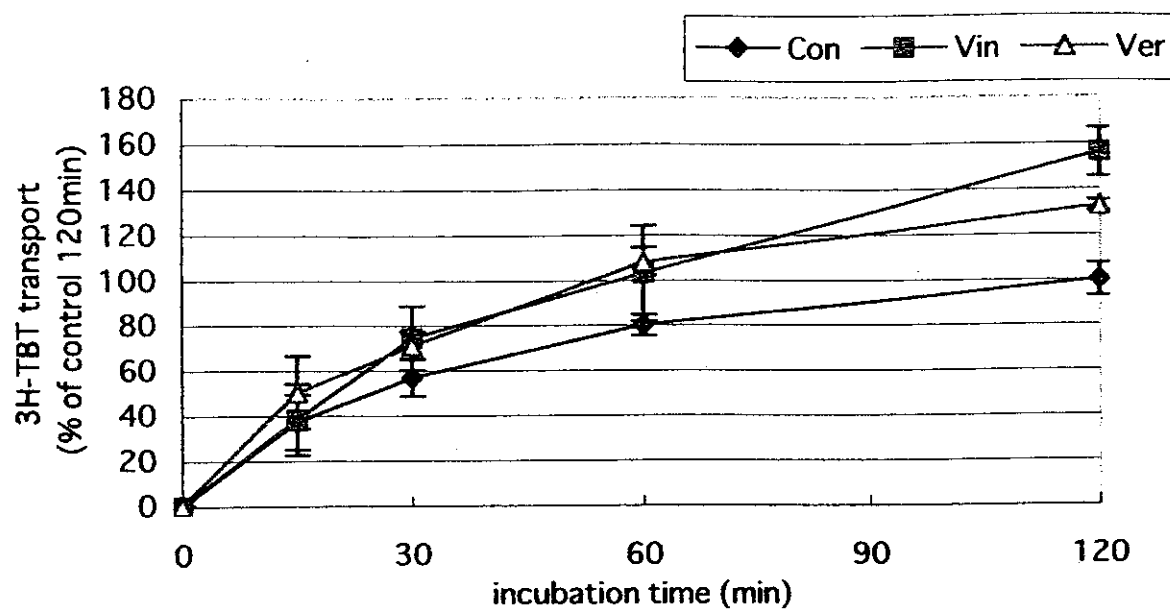


図4 TBTのCaco-2細胞層透過の時間依存性

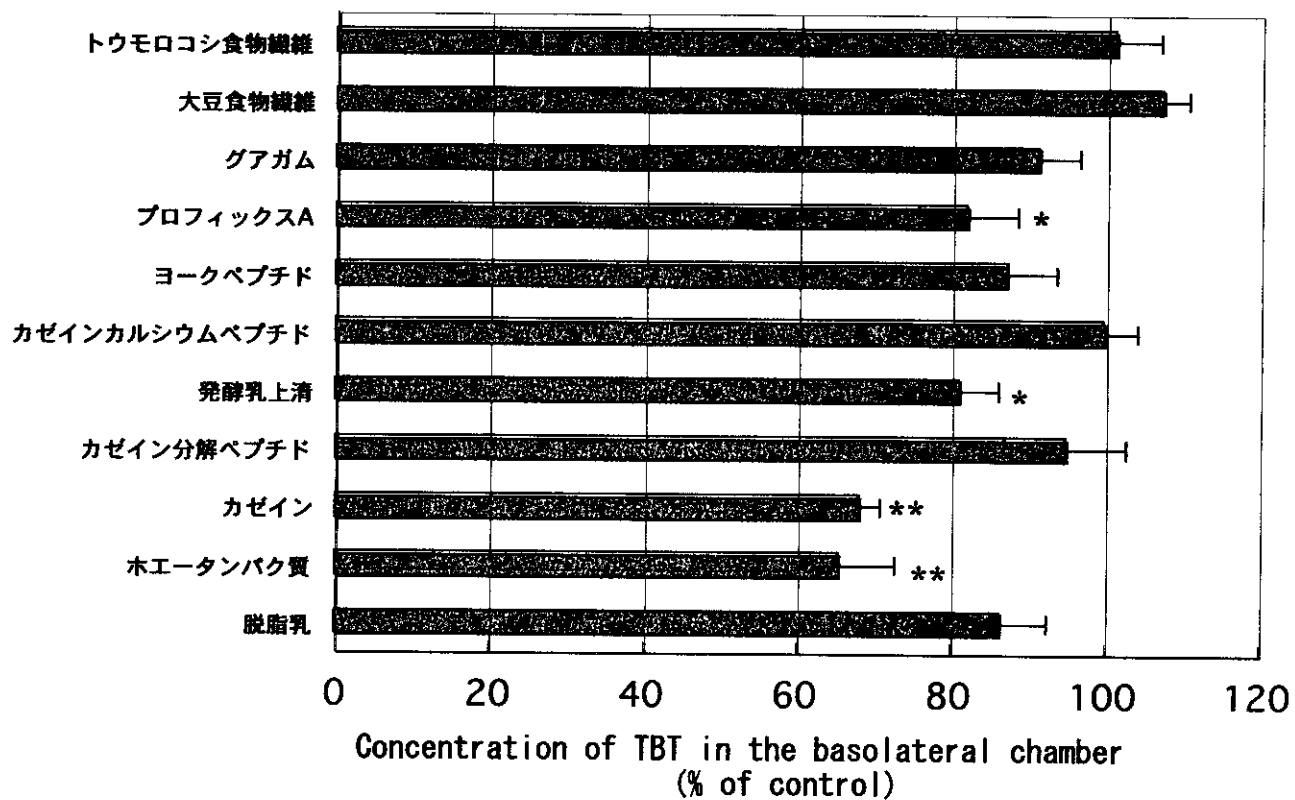


図5 TBTのCaco-2細胞層透過性に及ぼす食品因子の影響

* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

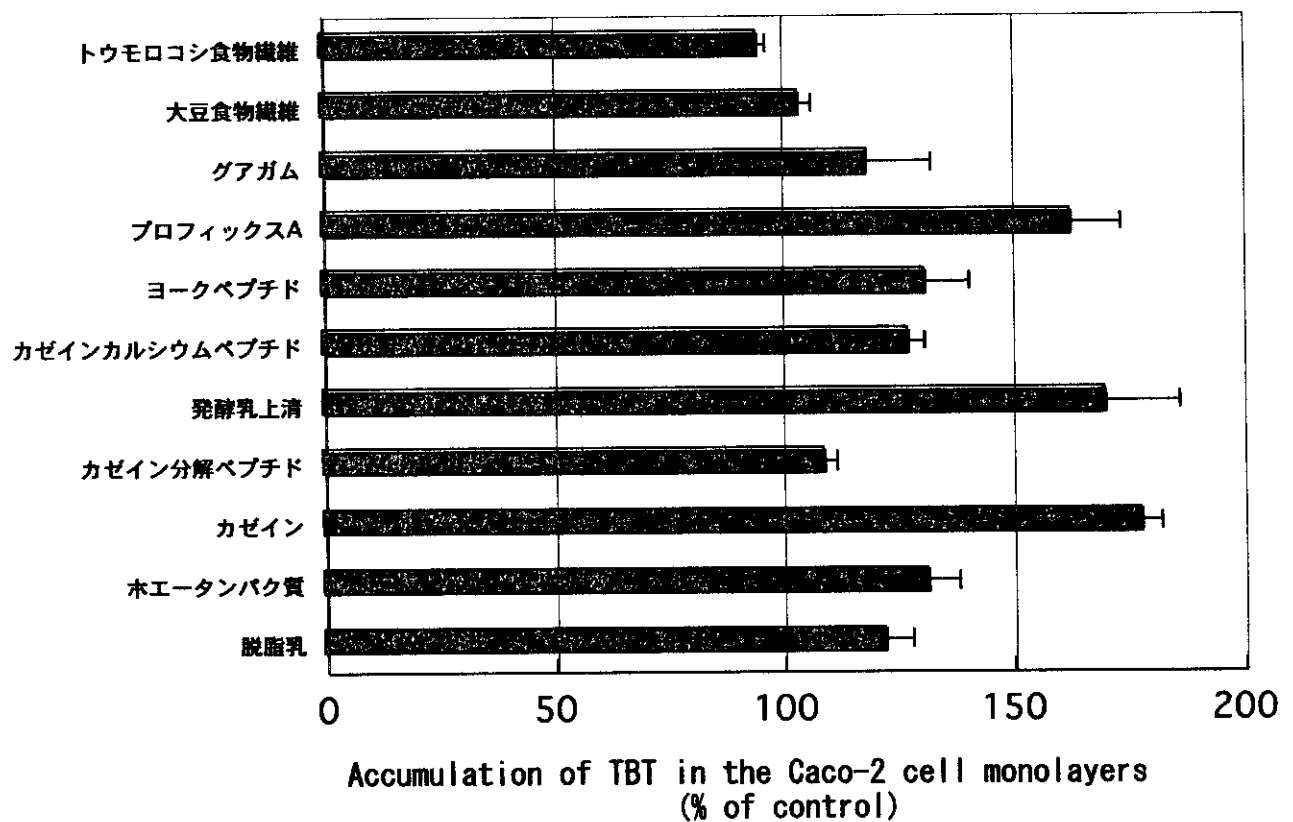


図6 TBTのCaco-2細胞層透過性に及ぼす食品因子の影響

* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

III. 総合研究報告

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 研究成果の刊行物・別刷 (平成 14 年度)

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）

総合研究報告書

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

我々を取り巻く生活環境中には 2 万以上の化学物質が存在すると言われている。しかし、現在までに、その毒性が比較的明らかになっている化学物質は数える程しかない。特に食品や飲料水などを介して生体に直接摂取される生活環境中の脂溶性化学物質は、低濃度を長期間摂取することにより蓄積され、健康被害を及ぼす可能性が高い。蓄積性の高い脂溶性化学物質は、摂取する個体だけでなく胎盤や授乳を介して次世代までもその健康被害を及ぼすことが懸念される。本研究は、蓄積性の高い脂溶性化学物質に焦点を当て、これらの免疫毒性、特に感染抵抗性への影響を明らかにし、未知の化学物質における感染抵抗性に及ぼす影響を予測できるパラメーターの検索を目的に行われた。毒性は個体への作用を検討するに留まらず、妊娠、授乳を通しての曝露による次世代における健康被害まで検討を行った。本研究で検討した脂溶性化学物質は、ダイオキシン、ビスフェノール A、トリブチルスズであった。特にトリブチルスズは魚介類を好んで食する我が国における最優先懸案と判断し、感染抵抗性、発達毒性、神経毒性、腸管からの吸収など研究範囲は多岐に及んだ。その結果、ダイオキシンは現在の汚染状況では授乳を介する曝露で次世代の感染症抵抗性を低下させる可能性はほとんどないこと、ビスフェノール A は個体レベルにおいて日和見感染に対する感染抵抗性を低下させること、トリブチルスズは授乳を介する曝露で次世代の細菌感染抵抗性を低下させることを明らかにした。その毒性発現機序としてビスフェノール A は好中球の貪食および殺菌能を低下させることトリブチルスズにおいては、T 細胞依存性液性免疫反応の低下および好中球の貪食能および殺菌能の低下が感染抵抗性の低下の要因になっていることを見出した。またこれらの要因は、未知の化学物質の感染抵抗性への影響を予測するパラメータになり得ることが示唆された。

分担研究者（あいいうえお順）

平成 12 年度

天野富美夫（国立感染症研究所 主任研究官）

杉浦義紹（東京理科大学薬学部助手）

鈴木嘉彦（麻布大学 獣医学部教授）

山田章雄（国立感染症研究所 つくば
霊長類センター長）

平成 13 年度

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)
向井鐸三郎 (国立感染症研究所室長)

平成14年度

天野富美夫 (大坂薬科大学教授)
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)

A. 研究目的

本研究の目的は次のとおりである。

(1) 体内蓄積が懸念される生活環境中の脂溶性化学物質の長期間低濃度の曝露が、免疫系および感染症に対する宿主抵抗性にどのような影響を及ぼすかを動物実験およびヒト由来培養細胞を用いて明らかにする。

(2) 感染機序の異なる数種の感染症に対する宿主抵抗性低下と定量的な相関関係のある免疫関連パラメーターを解析決定し、未知の化学物質の安全性評価方法の確立を行う。

(3) トリブチルスズおよびダイオキシンに関しては、個体レベルの毒性に留まらず、胎盤および授乳を介しての次世代への感染抵抗性やその他の毒性を明らかにし、ヒトへのリスク評価に役立てる。

本研究では、脂溶性有害化学物質のモデルとしてトリブチルスズ、ビスフェノールA、ダイオキシンなどを用いた。ビスフェノールAは低蓄積性であることから、次世代への影響はあまり大きな問題にはならないため、曝露された個体に対しての感染抵抗性を非特異的防御機構に焦点を当て検討した。また、これらは、食品や飲料水を介して体内に吸収される化学物質であることから、吸収器官である腸管の防御システムに及ぼす影響をも検討した。

B. 研究方法

(1) 脂溶性化学物質の免疫担当細胞がピュレーションに及ぼす影響

ビスフェノールAおよびTBTを曝露されたマウスから脾臓、胸腺を採取し、ホモゲナイズしたあと単細胞とした。

細胞を抗CD3, CD4, CD8, B220, Mac-1抗体 (pharmingen) で染色し、フローサイトメトリーにより測定した。

(2) TBTのNK細胞活性への影響

胎盤および母乳移行によるTBTの影響によるNK細胞活性を調べた。NK細胞活性は標的細胞を蛍光標識して測定する方法を用いた。

(3) TBTの定量

TBT含量はFPD-ガスクロマトグラフィーを用いて定量した。TBT投与の母親ラットから移行する乳中のTBT量、母親および次世代マウスの肝臓中のTBT量、サル血液、尿、糞中のTBT量を定量した。

(4) リステリア感染実験

リステリア感染実験はTBTを暴露した母親から生まれた新生児が生後21日目の時にメスにより群に分け、 5×10^4 個/一匹のリステリアを腹腔感染させた。感染後2, 4, 6日にそれぞれの群から4匹ずつの脾臓を採取しホモゲナイズした後、段階希釈を行い生菌数を測定した。

ダイオキシンの次世代へのリステリア感染抵抗性を検討するためには以下の実験を行った。初回妊娠19日目のC57BL/6NCrjマウスを対照群、低濃度暴露群、高濃度暴露群の3群に分け、一群8匹ずつとした。出産までは対照群と同様に水道水を与えたが、出産から20日間は低濃度暴露群では2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) をDMSOに溶解後最終濃度が1.8ng/lになるように溶かした飲料水を、高濃度暴露群では18ng/lの濃度に溶かした飲料水を自由摂取で与えた。対照群ではダイオキシン投与群と同等のDMSO溶液を加えた飲料水を与えた。細菌感染実験は、母乳中にダイオキシンを投与した仔は、生後21日にメス、メスにわけ、水道水を飲料水として与えた。感染条件は上記と同様に行った。感染後2, 4, 6, 9日目に4匹ずつ脾臓および血液を採取した。脾臓はホモゲナイズしたあと段階希釈をし

生菌数を測定した。同時に血液を採取し血清中のサイトカインを測定した。

(5) インフルエンザウイルスの感染実験

インフルエンザウイルスの感染実験は、感染が上気道で限局して起こるように1 μ lのウイルス液を左右鼻孔に全2 μ lずつ滴下することによって行った。感染11日後の鼻洗浄液中のウイルス増殖はMDCK細胞を用いたPFU assayにより定量した。

(6) 真菌感染実験

授乳の次世代マウスを用いて真菌感染実験を行った。条件は昨年度の結果に従った。真菌菌種は*Candida albicans* IF01594を用い、抵抗性を生死判定および感染3日後、7日後の腎臓に残存している生菌数を指標とした。

(7) TBT による免疫抑制効果の発現機構の解析

細菌感染実験から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で数回免疫を行い、NP特異的な抗体の産生能を検討し、TBT煮より影響をうける免疫機能について解析を行った。

(8) 日和見感染実験

日和見感染のモデルとなる感染実験系の確立を目的に、非病原性細菌として大腸菌 k-12 株の標準品を用い、感染抵抗性の指標を検討した。感染実験は 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投与し、経時的に腹水、脾臓を採取し生菌数を測定した。血液および腹水は、サイトカインの測定に供したビスフェノールの宿主抵抗性の検討は、Balb/c SPF マウス4週令を用いた。それぞれ 340 mg/kg/day および 5.0 mg/kg/day を少量のエタノールで溶解した後、コーン油で希釈し、0.2 ml/

マウスを背部に投与した。投与期間は5日間とし、最終投与から2—3日後、大腸菌 K-12 を感染させ、0、24、98時間後の腹水、血液、脾臓を採取し、腹水中の細胞数および生菌数の測定、脾臓中の生菌数の測定、サイトカインの測定を行った。TBT の授乳曝露による日和見感染実験には C57B マウスを用い、感染条件はビスフェノール A と同様な方法で行った。

(9) 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

(10) サルへの TBT 投与実験

サルへの TBT 長期間投与を行い、ヒトへのリスク評価の知見を得る目的で以下の実験を行った。ヒトに対する危険度分類表で、P4にランクされる B ウイルス抗体が陰性で、サルレトロウイルス (SRV/D) やγヘルペスウイルス抗体陽性のカニクイザルを4頭選別した。選別したカニクイザルは K1; 20歳3.10kg♀, K2; 13歳5.10kg♂, K4; 6歳3.88kg♂, K5; 6歳3.98kg♂の4頭である。

K1 カニクイザルには 117.8 mg, K2 カニクイザルには 194.6 mg の TBT を経口投与したところ、その急性毒性のため、嘔吐や鼻汁がみられたため、2週目にはその1/2量を投与したが、やはり鼻汁がみられたため、3週目の投与時にはその1/4量を投与し、以降 K1 カニクイザルには 29.5mg、K2 カニクイザルには 48.7mg を週1回のペースで投与を続けた。また、1回に経口投与

する TBT は少量であるので 2.5ml の乳酸菌飲料(ヤクルト)で希釈して与えた。また、サル K1 と K2 においては、体重 1kg あたり 38mgTBT を経口投与した後、24 時間および 48 時間後には糞を採取し、TBT の濃度を定量した。カニクイザル K1 においては糞とともに尿の採取も行い、TBT の定量を行った。末梢血球検査は、Sysmex MICROCELLCOUNTER F-800 により赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)、小型白血球数(W-SCC)、大型白血球数(W-LCC)を TBT 投与前後、定期的に測定した。NK 活性の測定は標的細胞としては、ヒト白血病細胞株 K562 を用い、放射性クロム酸ナトリウム法を用いた。Effector 細胞は、上述の末梢血リンパ球をターゲット(K562)細胞に対し 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2.5:1, 1.25 の比になるように加えた。リンパ球サブセットの解析は、ファイコールにより、末梢血リンパ球を分離した後、B 細胞, T 細胞, CD4+, CD8+, CD16+ の検出にはそれぞれ蛍光色素標識モノクローナル抗体 (Leu-16, α /CD3 FN-18, Leu3a, Leu2a, Leu11a) を用いて染色し、末梢血中の量比をフローサイトメトリーにより測定した。リンパ球幼若化反応は、末梢血リンパ球を $1 \times 10^5/0.1\text{ml}$ ずつ 96 穴平底プレートに加え、12.5 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A (ConA) 10 $\mu\text{g/ml}$ Phytohemagglutinin P (PHA), 1/100 Pokeweed Mitogen (PWM) の 3 種のマイトジェンを加え、48 時間刺激後、24 時間の H3 チミジンのリンパ球への取り込みを測定した。

(11) ヒトでの HIV ウイルス感染への抵抗性への影響を調べる指標を検討するため、ヒトマクロファージを用い HIV 潜伏感染のウイルス再活性化を検討した。細胞はヒト単球系細胞株 U-937 細胞由来の HIV-1 潜伏感染細胞株、U1 を用いた。トリブチルスズのヒトマクロファージに対する致死毒性は U-937 細胞を用いて検討した。アポトーシスの検出にはカスパーゼ 3 の活性化を指標に用いた。カルシウム依存性のトランス

ポーターMDR1 の阻害剤としてベラパミルを用いた。

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、

HSV-1 (strain F) の感染実験に際して、細胞を $1 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ に懸濁したのち 12 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°C 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°C で 20 時間培養した。その後、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、Vero 細胞に添加し、抗 HSV-1 中和抗体存在下で 37°C で 48 時間培養した。また MOI=0.01 で感染させた実験系では、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。

(12) TBT の神経毒性

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の