

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) K.Sawaki et al. (2003) *In Utero* through Lactational Exposure to Ethinyl Estradiol Induces Cleft Phallus and Delayed Ovarian Dysfunction in the Offspring. *Toxicol. Sciences* 75, 402-411
- 2) M. Yoshida et al. (2002) Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose *p*-*t*-octylphenol for different periods. *Carcinogenesis* 23, 1745-1750
- 3) KD. Doehler et al. (1998) The Influence of Hormones and Hormone Antagonists on Sexual Differentiation of the Brain. *J. Clean Technol., Environ. Toxicol. & Occup. Med.* 7, 195-220
- 4) K.Kubo et al. (2001) Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 304, 73-76

Table 1
Experimental group and treatment

Groups	Chemicals	Dose of DES (ng/kg/day)	Treatment			
			No. of animals			
			Autopsy days (days after birth)		Estrus cycle observation	
			6	10	21	
1	Corn oil add.	0	male 4	male 4	male 4	
	10 vol%DMSO		female 4	female 4	female 4	female 3
2		0.2	male 4	male 4	male 4	
			female 4	female 4	female 4	female 3
3	DES	2.0	male 4	male 4	male 4	
			female 4	female 4	female 4	female 3
4		20	male 4	male 4	male 4	
			female 4	female 4	female 4	female 3

Table 2

Body weight of new born during lactation period after treated with DES

	Vehicle control (DMSO)	Diethylstilbesterol (ng/kg/day)		
		0.2	2.0	20
Male				
Day 1	7.05 ± 0.47 (12)	7.23 ± 0.69 (12)	7.20 ± 0.56 (12)	7.23 ± 0.56 (12)
Day 6	14.47 ± 1.49 (12)	14.66 ± 1.88 (12)	14.37 ± 1.64 (12)	14.68 ± 1.43 (12)
Day 10	23.63 ± 2.05 (8)	23.87 ± 2.31 (8)	23.71 ± 2.16 (8)	23.30 ± 2.35 (8)
Day 21	50.92 ± 3.53 (4)	53.64 ± 0.16 (4)	52.54 ± 0.87 (4)	51.32 ± 4.56 (4)
Female				
Day 1	6.86 ± 0.62 (15)	6.96 ± 0.57 (15)	6.91 ± 0.57 (15)	6.93 ± 0.68 (15)
Day 6	14.19 ± 1.27 (15)	14.23 ± 1.49 (15)	14.32 ± 1.40 (15)	13.93 ± 1.77 (15)
Day 10	22.86 ± 1.80 (11)	22.88 ± 2.73 (11)	23.07 ± 1.66 (11)	22.66 ± 2.17 (16)
Day 21	50.39 ± 3.95 (7)	50.41 ± 5.03 (6)	49.21 ± 3.70 (7)	49.33 ± 4.17 (7)

Mean ± SD, (): No. of used animals

Table 3
 Body weight and vaginal opening of female animals after treatment of
 DES during new born

Group	Vaginal Opening		Body Weight(g)							
	Body weight (g)	Day	Days							
			1	21	28	35	63	91	119	
Control (3)	132.7 ± 7.9	34.3 ± 2.1	7.62 ± 0.56	52.7 ± 5.2	91.0 ± 7.4	134.8 ± 5.3	236.4 ± 18.6	283.6 ± 27.5	303.1 ± 33.3	
DES 0.2 (2)	129.6	34.0	7.10	54.6	93.4	135.2	234.2	275.8	296.5	
DES 2.0 (3)	128.1 ± 8.0	33.7 ± 0.6	7.20 ± 0.27	51.3 ± 2.9	89.7 ± 6.7	137.2 ± 7.1	228.9 ± 4.1	279.7 ± 6.4	307.9 ± 6.6	
DES 20 (3)	131.0 ± 8.3	33.7 ± 0.6	7.01 ± 0.36	52.4 ± 2.1	92.1 ± 3.7	141.0 ± 4.5	225.9 ± 22.2	273.5 ± 15.7	293.6 ± 11.1	

Values in parentheses represent the number of rats used

2) 免疫

5. 周産期化学物質暴露による免疫異常発現メカニズムの解明

研究分担者 林 良夫

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔分子病態学分野 教授

研究協力者 石丸直澄

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔分子病態学分野 准教授

研究要旨

多くの自己免疫疾患の発症には性差があり、性ホルモンがその病態に深く関与していることが知られている。本研究では生体内で女性ホルモンが著しく変動する妊娠期におけるTCDDの暴露による母体の免疫学的影響及び自己免疫病変の発症との関係をシェーグレン症候群のモデルマウスを用いて検討したところ、妊娠後期にTCDDを投与されたマウスは出産、授乳を経た後、6ヶ月齢において唾液腺に局限した炎症性病変が観察された。

A. 研究目的

シェーグレン症候群は涙腺・唾液腺を中心とする外分泌器官を標的臓器として発症し、ドライアイ・ドライマウスなどの乾燥症状を臨床的特徴とする原因不明の難治性自己免疫疾患であるが、極めて高率に女性優位に発症することから性ホルモンとの関連が指摘されている。当研究室ではNFS/*sld*ミュータントマウスを用いてシェーグレン症候群疾患モデルを開発し、その病因・病態解析を実施してきた。NFS/*sld*マウスは生後3日目の胸腺摘出(3d-Tx)を施すことにより4週目以降、涙腺・唾液腺に局限する自己免疫病変を必発し涙液・唾液分泌障害を伴うヒト・シェーグレン症候群に極めて類似した病態を呈することから、薬剤などの治療効果の判定に有用な疾患モデルマウスである。平成16-18年度において、内分泌かく乱化学物質が免疫機能に及ぼす影響を検討するために、NFS/*sld*ミュー

タントマウスの胎児期及び新生児期にTCDDを投与することにより、自己免疫疾患の発症の有無を解析したところ、新生児期にTCDDに暴露されると、涙腺、唾液腺を中心とした自己免疫性病変が誘導された。本年度は妊娠期のNFS/*sld*ミュータントマウスに内分泌かく乱物質ダイオキシン(TCDD)を投与することによって母体側の免疫機能の異常の有無及び自己免疫疾患の発症の有無を検討した。

B. 研究方法

1) マウスおよび投与方法

雌NFS/*sld*マウスを使用(有効匹数雌49匹)。NFS/*sld*マウスは舌下腺粘液細胞に分化異常をきたすミュータントマウスとして樹立され、当施設にてSPF (specific pathogen-free)下で繁殖飼育されている。雌NFS/*sld*マウスは生後3日目の胸腺摘出を施すことにより4週目以

降、涙腺・唾液腺に限局する自己免疫病変を発症し、ヒト・シェーグレン症候群類似の病態を呈する。代表的なダイオキシン類として2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, Cambridge Isotope Lab. Ins.) を各濃度(100, 1000ng/kg体重)にて妊娠マウス(膈内プラーク確認3日目及び15日目)に腹腔内投与後、出産、授乳及び離乳後、6ヶ月齢での変化を非妊娠対照群と比較した。基剤としてコーンオイルが用いられた。各々のマウスにつき体重測定を実施した。なお、TCDDを用いた動物実験は国立医薬品食品衛生研究所毒性部(菅野純部長)との共同研究のもとで同研究所内特殊実験施設において実施した。

2) 病理組織学的検索

全身諸臓器は臓器重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、有機溶媒に浸染したのち軟パラフィン包埋後4 μ の組織切片を作成してヘマトキシリン・エオジン染色を施した。唾液腺における炎症性病変の組織学的評価は以下の分類にて評価した。Slight:変化無し及びごく軽度のリンパ球浸潤、Moderate:中等度のリンパ球浸潤、Severe:著明なリンパ球浸潤及び腺組織破壊。

3) フローサイトメトリ解析

各群における全てのマウスから頸部リンパ節、胸腺および脾臓を摘出し、ホモジナイズ、溶血、洗浄後各種抗体(CD4, CD8; e-Biosciences)と反応させた後に3%パラホルムアルデヒドにて固定し、有機溶媒に浸染したのち細胞自動解析装置(FACSCanto, BD)にて解析した。

4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

実験マウスにおける血清中の各種サイトカインの測定を実施した。TCDD投与マウスの脾細胞を用い、抗CD3抗体(1 μ g/ml)及び抗CD28抗体(20 μ g/ml)を固相化した96穴培養プレートに、 1×10^5 個のT細胞を24時間培養した。培養上清中の各種サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ)の濃度をELISAにて定量化した。即ち、96穴マイクロタイタープレートに各抗サイトカイン抗体を固相化後、1%子牛血清アルブミン(BSA)でブロッキングし、希釈した培養上清($\times 5$)及び標準サイトカインを加え反応させた。洗浄後、ビオチン標識各サイトカイン抗体を添加反応させ、ストレプトアビジン標識ホースラディッシュペルオキシダーゼを加えた後、基質としてo-phenylenediamineを用い発色させ、マイクロプレートリーダー(BioRad)にて490nmにおける吸光度を検出した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会および国立医薬品食品衛生研究所において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。

C. 研究結果

8-10週齢の妊娠NFS/*sld*マウス(3日目、15日目)及び非妊娠マウスにTCDD(100, 1000ng/Kg体重)を腹腔内投与した後、妊娠マウスに関しては出産、授乳、離乳後6ヶ月齢にて解析した。非妊娠マウスにおいても6ヶ

月齢にて解析した。

1) 体重および臓器湿重量に対する影響

非妊娠マウスにおける TCDD の投与による体重の変化は無かった。また、妊娠群においても TCDD の投与による体重変化は無かった。さらに、非妊娠群と妊娠群を比較すると、TCDD1000ng/kg 投与にて非妊娠群の方がやや体重の減少が認められた。脾臓の重量に関しては、非妊娠群では TCDD の投与量に依存して重量の減少が見られるのに対し、妊娠群では逆に TCDD の投与により重量の増加傾向が見られた。胸腺の重量に関しては、非妊娠群では TCDD100ng/kg 投与で重量の減少が見られるが、1000ng/kg 投与では対照と変化はなかった。一方で、妊娠群では TCDD の投与量に依存して重量の増加が観察された(図1)。

2) 免疫担当細胞への影響

TCDD の投与による免疫担当細胞への影響について明らかにするため、脾細胞、頸部リンパ節細胞及び胸腺細胞を分散し、フローサイトメトリーによる解析を実施した。脾臓、リンパ節において、非妊娠群、妊娠群ともに TCDD の投与により CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の分画に変化は無かった。胸腺において、非妊娠群で高濃度の TCDD 投与により CD4 シングル陽性 T 細胞への分化がやや減少していた、一方で、妊娠群では TCDD 投与により CD4 シングル陽性 T 細胞の分化が促進していることが明らかとなった(図2)。さらに、プレートに固相化した抗 CD3 抗体で刺激された T 細胞の培養上清中に産生されるサイトカインの濃度を ELISA にて検討すると、IL-2 の産生に関して、非妊娠群では TCDD の投与濃度に依

存して IL-2 の産生が減少し、TCDD1000ng/ml 投与では検出限界以下であった。一方で、妊娠群では TCDD の投与により IL-2 の産生が亢進することが判った。IFN- γ の産生に関しては、非妊娠群で低濃度 TCDD 投与(100ng/kg)では対象に比較して IFN- γ の産生は増加しているものの、高濃度 TCDD 投与(1000ng/kg)では減少していた。また、妊娠群に関しては TCDD の投与により IFN- γ の産生に変化は認められなかった。IL-4 の産生に関しては、非妊娠群ではいずれの群でも検出限界以下かわずかの産生しか見られなかったが、妊娠群では IL-4 の産生が見られ、TCDD 投与により対象に比して IL-4 の産生は亢進していた。

3) 病理組織学的変化

全身諸臓器について固定後、有機溶媒に浸染したのち組織切片を作成して病理組織学的検討を実施した。その結果、唾液腺(顎下腺)を中心に妊娠群の TCDD 投与により炎症性病変が認められ、特に妊娠15日目の投与にてその病変は顕著に認められた。

唾液腺: 非妊娠マウスへの TCDD 投与により唾液腺(顎下腺)に軽度のリンパ球浸潤が認められたが、その頻度は低かった。それに対して、妊娠15日目に TCDD を投与すると激しい炎症性病変が高率に見られ、高濃度投与群では半数以上が強い炎症性病変を呈していた。炎症性病変は導管周囲の巣状単核細胞浸潤および腺房細胞の萎縮、破壊として観察された。一方、涙腺炎の出現はいずれの実験群でもほとんどみられなかった。

その他の臓器: それぞれの群で肺、腎、肝にごく軽度のリンパ球の浸潤像が認められたが

TCDD投与による有意な所見ではなかった。

D. 考察

昨年度までにNFS/*sld*マウスの新生仔期でのダイオキシン投与により、唾液腺を中心とした炎症性病変が誘導されることを確認した。また、妊娠15日目にTCDDを母体に投与することによる自己免疫性病変の誘導を試みたが、軽度の病変は観察されたものの新生仔期のTCDD投与によって誘導された病変よりも軽度であったことから、新生仔期のTCDDの暴露が自己免疫性病変の発症に関わる可能性が示された。今年度の実験では、TCDD暴露による母体側の免疫系への影響を検討した。妊娠前期及び後期でのTCDDの腹腔内投与あるいは非妊娠マウスへのTCDD投与を比較した。従来、内分泌かく乱化学物質の免疫機能に及ぼす影響が*in vitro*の解析に基づいて指摘されているが実験動物を用いた詳細な検討は為されていないことから、本研究の実験結果は妊娠期におけるTCDDの暴露による母体への免疫系への影響を理解する上で極めて重要な所見であると言える。

内分泌かく乱化学物質の非妊娠、妊娠マウスへの投与による体重への影響は無かったが、免疫系臓器である脾臓と胸腺に関しては妊娠期でのTCDD投与により臓器重量が増加していた。一方で、非妊娠マウスへの投与では脾臓、胸腺とも重量が減少している傾向があることから、非妊娠マウスと妊娠マウスにおける生体内でのTCDDの反応性あるいは感受性は大きく異なっていることが予想された。また、リンパ節及び脾臓における非妊娠、妊娠

マウスへのTCDD投与でCD4及びCD8陽性T細胞への分化への影響は観察されなかった。しかし、胸腺において、非妊娠マウスへのTCDD投与によりCD4シングル陽性T細胞への分化が抑制され、逆に、妊娠マウスへのTCDD投与によりCD4シングル陽性T細胞の分化が亢進していたことから、末梢リンパ組織よりも胸腺細胞の分化にTCDDの影響が大きく関与しており、妊娠期における特殊な生態環境がTCDDの感受性を変化させている可能性が示唆された。

T細胞のサイトカインの産生に関しても、非妊娠マウスと妊娠マウスへのTCDD投与で全く異なった実験結果が得られた。即ち、Th1型のサイトカイン、とりわけIL-2に関しては非妊娠マウスではTCDDの投与により大きく抑制されるのに対し、妊娠マウスへのTCDD投与では逆にIL-2の産生は亢進していることが判明した。IFN- γ の産生に関しては、非妊娠マウスで低濃度および高濃度TCDD投与で結果が異なっていたことから、TCDDの濃度によりサイトカインの産生機構に対する影響が相違している可能性が考えられた。また、IL-4に関しては妊娠マウスという条件のみで産生が見られ、さらに、TCDD投与によりその産生量の増加が認められたことから、Th2型サイトカインの産生に関しても、妊娠という特殊な生態環境が大きく関与しているものと考えられた。Th2型のサイトカインであるIL-10に関してはいずれのサンプルも検出限界以下であった。T細胞のサイトカインの産生は免疫抗原の種類や抗原提示細胞の主要組織適合複合体(MHC)のハプロタイプ、T細胞

内のシグナル伝達経路、各種転写因子の機能などにより大きく影響を受けていることが知られている。特に、Th1及びTh2型のサイトカインにはT-betあるいはGATA3といった転写因子の活性化機構が大きく関与している。TCDDは細胞内のレセプター(AhR)と結合し、核内に移行した後、AhR nuclear translocator (ARNT)と複合体を形成し、プロモーター領域にXenobiotic response elements(XRE)を有する標的遺伝子の転写調節をすることが知られている。また、その標的遺伝子にはNF- κ Bなどのサイトカインの調節に重要な遺伝子も含まれており、TCDDのサイトカイン産生制御機構が存在することが考えられる。

全身諸臓器の病理組織学的検索の結果、妊娠15日目にTCDD投与することにより、唾液腺の導管周囲を中心とした炎症性細胞浸潤が見られ、特に高濃度のTCDD投与では激しい炎症性病変が高率に観察されたが、非妊娠マウスへの投与では少数のマウスの唾液腺において軽度あるいは中等度の炎症性病変が認められるものの、TCDD投与によって炎症性病変は目立たなかったことから、妊娠期におけるTCDDの暴露によって自己免疫性病変を誘起する機序が働いている可能性が示された。なお、妊娠3日目のTCDD投与に関しては現在解析中であり、妊娠期内の投与時期の違いによる炎症性病変への影響に関しては、最終的な結論に至っていない。一方で、新生仔期のTCDD投与で見られたような肺、腎、肝での炎症性病変は今回の母体マウスでの解析では観察されなかったことから、それらの臓器におけるTCDD暴露による末梢トランスの破

綻までには至らなかったものと考えられる。

今回の実験により、NFS/*sld*マウスを用いた妊娠期におけるTCDD暴露により母体側に自己免疫性唾液腺炎が高率に誘導されることが判明した。NFS/*sld*マウスは生後3日目に胸腺を摘出することにより4週齢以降の雌優位に自己免疫性唾液腺炎、涙腺炎が誘導され、ヒトシェーグレン症候群疾患モデルとして知られている。本モデルでは新生仔期での胸腺組織を外科的に摘出することによって、胸腺における中枢性免疫寛容システムを破綻させることで臓器特異的な自己免疫疾患の誘導が可能となると考えられる。病変が誘導される臓器の特異性はマウス種、MHCのハプロタイプ、マウスの遺伝的背景など様々な要因が関与しているものと考えられる。今回の実験では妊娠期という特殊なホルモン環境において外部よりTCDDが投与されると、すでに分化成熟段階を経ている成獣マウスにおいても免疫系を大きく変化させ、自己免疫性炎症病変を惹起する要因となりうることを示された。胎児期に低用量TCDDを暴露されたラットの免疫関連臓器への影響が検討されている。すなわち、妊娠15日のHoltzmanラットを用い12.5-800 ng/kg体重のTCDDを1回経口投与、生後5日から120日まで解析されている。胸腺細胞の数及びCD4とCD8を指標とした胸腺細胞分画はいずれの時期においても投与による影響はみられていないが、脾細胞数は生後49日の12.5 ng/kg以上の実験群で用量依存性に減少が認められるという報告がなされている。今回の実験においては、非妊娠マウスへのTCDD投与では脾臓の重量の低下が認められ

るが、妊娠マウスへのTCDD投与ではむしろ重量の増加傾向が認められた。ラットとマウスにおける妊娠期間の違いや有効投与用量の相違などが実験結果に反映しているものと考えられる。

現在までに内分泌かく乱化学物質の免疫機能に及ぼす *in vitro* における影響が検討されている。ヒト末梢リンパ球への影響についてはリンパ球を刺激するマイトージェン（コンカナバリンA）に内分泌かく乱化学物質を加え、リンパ球増殖反応が検討されている。その結果によるとノニルフェノール、ビスフェノールAなどの内分泌かく乱化学物質が末梢リンパ球の増殖反応を抑制すると報告されている。また、マクロファージの分化能への影響についてビスフェノールAがマクロファージ前駆細胞からの分化誘導能を促進する作用のあることが報告されている。ヒトを含めた哺乳類の免疫系は胎児期も含め、生後まもない時期に完成することが知られている。この時期に胸腺内T細胞分化を中心とする自己と非自己の識別機構に何らかの障害が生じることによって免疫異常を基盤とした自己免疫疾患の発症に至ることが推定される。

ダイオキシン類は発がん作用をはじめとした様々な毒性作用を持つ環境汚染物質であり、エストロゲン攪乱作用が注目されてきた。エストロゲンの生理作用はエストロゲン受容体（ER α 、ER β ）を介した標的遺伝子の転写制御により発揮される。一方、ダイオキシン類はダイオキシン受容体（AhR）に結合して同様に遺伝子の転写を制御する作用を持ち、転写制御の段階でダイオキシンとエストロゲンのシグ

ナルが相互作用している可能性が検討された。ダイオキシンを結合して活性化したダイオキシン受容体が、エストロゲンを結合していない状態のエストロゲン受容体に直接結合することにより、不活性状態のエストロゲン受容体を活性化するという分子機構が明らかにされている。即ち、ダイオキシン依存的なダイオキシン受容体との複合体形成が起こると、エストロゲンと結合していない状態でもエストロゲン受容体が活性化され、正常なエストロゲンシグナル伝達を攪乱することが報告された。

新生仔胸腺の摘出により誘導されるシェーグレン症候群類似病変が胸腺摘出を施すこと無く、妊娠期にTCDDの投与により激しい病変を誘導した今回の実験は、周産期における内分泌かく乱化学物質の暴露による母体側への免疫障害の機序を理解する上で有用なモデルと考えられる。

自己免疫疾患が性ホルモンの影響によってその発症が複雑に制御されていることが知られており、性ホルモンのシグナルカスケードにTCDD/AhR/ARNTの経路がクロストークすることにより、正常な免疫系が障害を受けてしまうことが想定される。今後、詳細なシグナルカスケードを明らかにすることにより、内分泌かく乱化学物質の免疫系への危険性を評価する重要な分子機序を解明できるものと考えられる。

E. 結論

生後3日目の胸腺摘出(3d-Tx)を施すことにより成立するシェーグレン症候群疾患モデル

NFS/*sld*雌マウスを用いて妊娠期に内分泌かく乱化学物質としてダイオキシンTCDDを投与した結果、出産、授乳、離乳を経て6ヶ月齢に胸腺の分化異常、T細胞のサイトカイン分泌異常が認められ、唾液腺に激しい炎症性病変が観察された。

F. 健康危惧情報

現在の時点で該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K, Noji S: Atelocollagen-mediated local and systemic application of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Therapy* in press, 2008.
- 2) Kohashi M, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y: Effective treatment with oral administration of rebamipide in a mouse model of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatism* 58: 389-400, 2008.
- 3) Ohtani N, Imamura Y, Yamakoshi K, Hirota F, Nakayama R, Kubo Y, Ishimaru N, Takahashi A, Hirao A, Shimizu T, Mann DJ, Saya H, Hayashi Y, Arase S, Matsumoto M, Kazuki N, Hara E. Visualizing the dynamics of p21 (Waf1/Cip1) cyclin-dependent kinase inhibitor expression in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15034-15039, 2007.
- 4) Izawa T, Ishimaru N, Moriyama K, Kohashi M,

Arakaki R, Hayashi Y: Crosstalk between RANKL and Fas signaling in dendritic cells controls immune tolerance. *Blood* 110: 242-250, 2007.

- 5) 石丸直澄、岸本英博、林 良夫: T細胞レセプターシグナルとNF- κ B 臨床免疫・アレルギー科 48:29-35, 2007.

2. 学会発表

- 1) The effect of TCDD administration on murine model for Sjogren's syndrome 日本免疫学会総会学術集会記録、37巻 p.116, 2007
- 2) Analysis of NF- κ B in T cell activation in murine autoimmune models 日本免疫学会総会学術集会記録、37巻 p.119, 2007
- 3) Crosstalk between RANKL and Fas signaling in dendritic cells controls immune tolerance 日本免疫学会総会学術集会記録、37巻 p.133, 2007
- 4) T cell functions with aging in NF- κ B1-deficient mice. 日本免疫学会総会学術集会記録、37巻 p.174, 2007
- 5) IFN- γ -producing epithelial cells links autoimmune exocrinopathy resembling SS in RbAp48 TG mice 日本免疫学会総会学術集会記録、37巻 p.263, 2007
- 6) Role of estrogen deficiency for aberrant MHC classII expression in the exocrine gland cells 日本免疫学会総会学術集会記録、37巻 p.265, 2007
- 7) Immunoregulatory role of RANKL-stimulated dendritic cells on autoimmune arthritis in MRL/*lpr* mice. Abstract supplement

ACR/ARHP scientific meeting, p.105, 2007
8) Development of autoimmune exocrinopathy
resembling Sjogren's syndrome in RbAp49
transgenic mice. . Abstract supplement
ACR/ARHP scientific meeting, p.441, 2007

9) 新生仔マウスへのダイオキシン投与による
免疫系への影響 日本病理学会会誌 第96
巻 p. 224, 2007

10) シェーグレン症候群モデルマウスにおけ
るレバミピドの病態抑制効果 日本病理学

会誌 第96巻 p. 295, 2007

11) シェーグレン症候群類似RbAp48遺伝子導
入マウスにおける病態形成の解析 日本病
理学会会誌 第96巻 p. 295, 2007

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

本年度該当なし

図説明

図-1 TCDD投与による体重および臓器湿重量に対する影響

非妊娠群、妊娠群においてTCDDの投与により体重(g)の変動は観察されない。脾臓重量(mg)では非妊娠群においてTCDD投与により重量の低下する傾向が見られ、妊娠群ではTCDDの投与により重量の増加する傾向があった。胸腺重量(mg)に関しては、非妊娠群ではTCDD100ng/kg投与にて重量減少が見られるが、1000ng/kgTCDD投与では対照と変動はなかった。妊娠群へのTCDD投与では投与濃度に依存して胸腺重量の増加が認められた。

図-2 TCDD投与によるT細胞サブpopulationへの影響

脾臓、頸部リンパ節、胸腺におけるCD4及びCD8T細胞の分画をフローサイトメーターにて解析した。脾臓、頸部リンパ節では非妊娠群、妊娠群においてTCDDの投与によりT細胞分画に変動は認められない。胸腺において、非妊娠群ではTCDD投与によりCD4シングル陽性細胞への分化が抑制され、逆に、妊娠群ではCD4シングル陽性細胞への分化が亢進していた。

図-3 TCDD投与によるサイトカイン産生への影響

脾細胞を固相化した抗CD3抗体にて24時間刺激した後、培養上清中の各種サイトカイン濃度をELISAにて定量化した。IL-2に関しては、非妊娠マウスにTCDDを投与により産生の減少が観察され、妊娠群ではTCDD投与によりIL-2の産生は亢進していた。IFN- γ に関しては、非妊娠群では低濃度TCDD投与にて産生の増加が見られるが、高濃度投与では産生低下が観察された。妊娠群ではIFN- γ の産生に有意な変動は認められなかった。IL-4の産生に関しては非妊娠群ではほとんど検出されなかったが、妊娠群では有意に検出され、TCDD投与によりその産生は亢進していた。

図-4 TCDD投与による唾液腺における炎症病変

唾液腺における炎症性病変を材料と方法にて記載された評価法にて検討した。非妊娠マウスにおいては中等度の炎症性病変がTCDD投与により4割ほど誘導されたのに対し、妊娠15日目のTCDD投与により、ほぼ全例に中等度から高度な炎症性病変が観察された。妊娠3日目の結果に関しては現在実験中である。

图-1

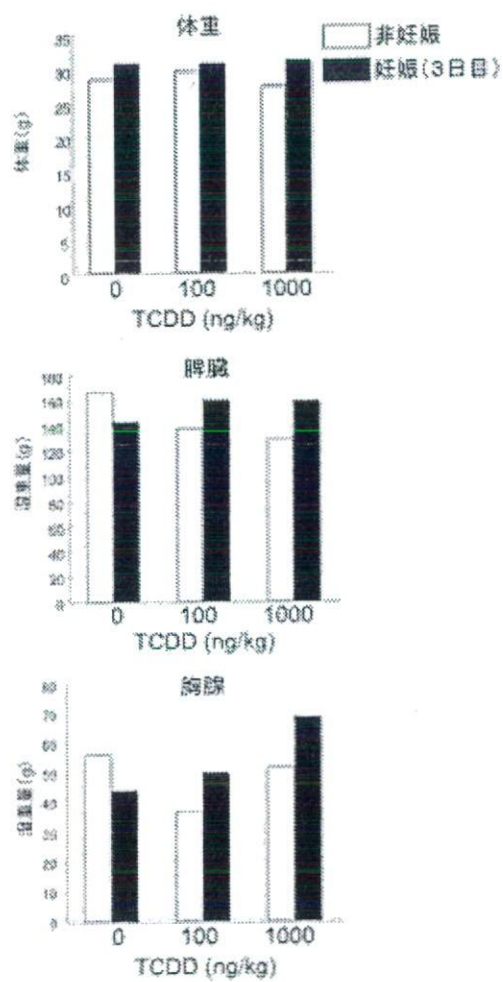


図-2

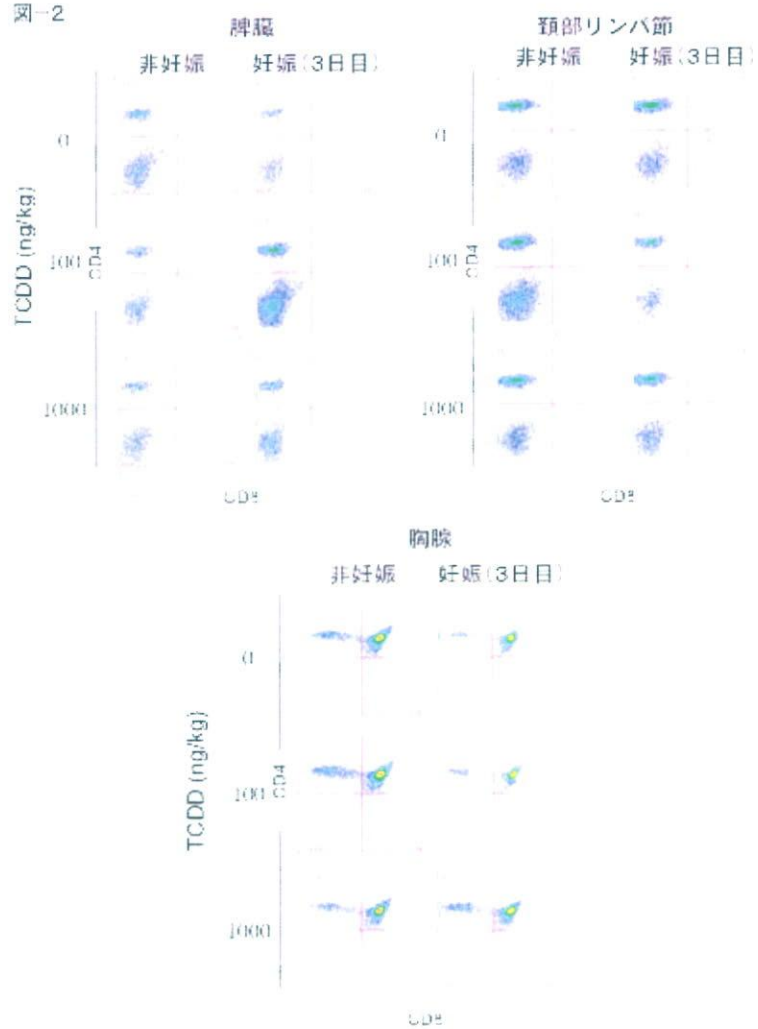


图-3

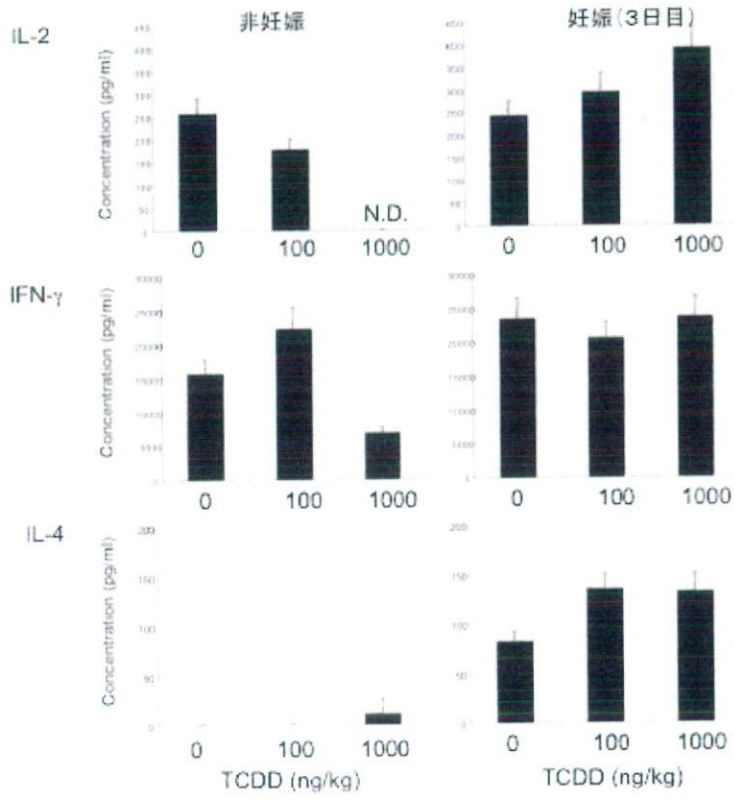
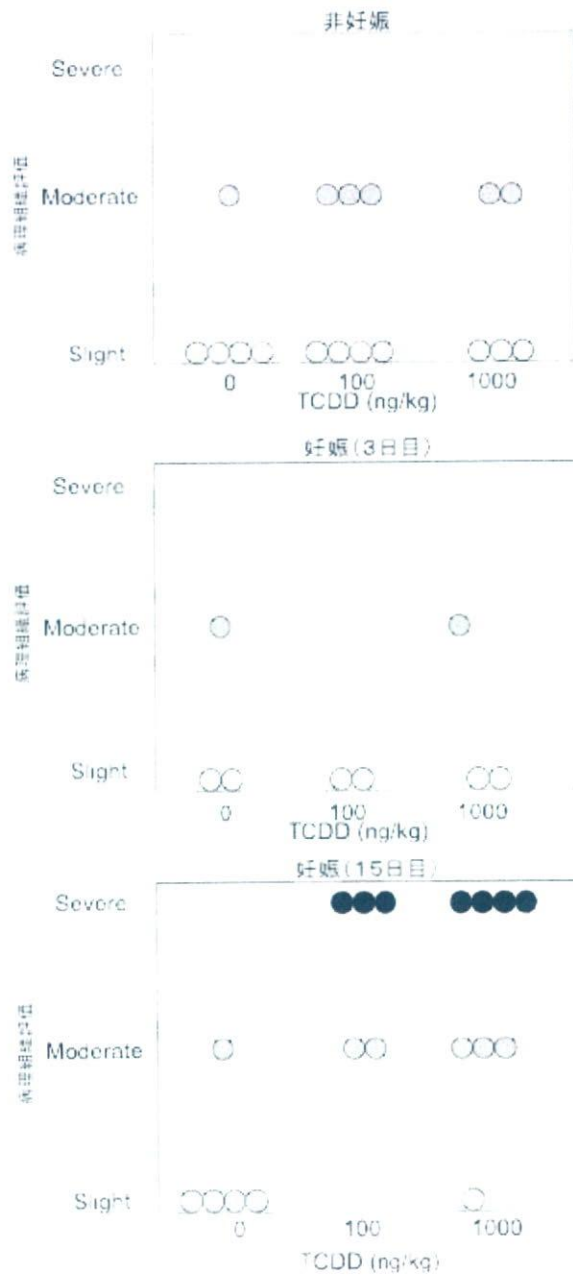


图-4



6. 化学物質の周産期暴露及び*in vitro*暴露の初期免疫応答に対する影響評価

研究分担者 武吉正博

財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 研究第一部第二課 課長

研究協力者 山中秀徳、宮浦英樹

財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

研究要旨

前研究班での研究で内分泌かく乱物質が初期免疫応答能の変調を引き起こす可能性が示唆された。本研究ではヒト単球系細胞株を用いた実験系により抗原提示過程に関わるタンパク質をプロテオミクス技術を用いて網羅的に解析し、化学物質が生体の初期免疫応答能に与える影響を評価するための有効なマーカータンパク質の検索を検討した。

nanoLC-ESI-Q-TOF-MSを使用し、既知感作性物質2種の暴露により共通して増加または減少したスポットのMS/MS測定を行った。得られたMS/MSデータの検索により、マーカー候補タンパク質6種を同定した。

A. 研究目的

昨年度までの研究により内分泌かく乱物質が初期免疫応答能の変調を引き起こす可能性が示唆されている。今年度の研究では、培養細胞を用いた実験系により初期免疫応答、特に抗原提示過程に関わるタンパク質をプロテオミクス技術を用いて網羅的に解析し、アレルギー反応のキーとなる初期免疫応答能を評価するための有効な分子候補を選定することとした。次年度以降、これらの候補を数種の既知感作性物質にて検証すると共に周産期暴露でのマーカー応用を検討する予定である。

B. 研究方法

1. 被験物質暴露及びサンプリング

10%FBSを含むRPMI1640完全培地で継代培養したヒト単球系細胞株THP-1を24 well plateに 1×10^6 cells/mL/wellで播種し、媒体DMSO、既知マーカー膜タンパク質CD86の発現がみられる濃度とその1/10濃度の各2用量で強度感作性物質Dinitrochlorobenzene (DNCB) 0.3及び

3 μ g/mL、中程度感作性物質Eugenol (EUG) 10及び100 μ g/mL並びに非感作性物質Propylene glycol (PG) 100及び1000 μ g/mLをn=3で暴露し、3、6及び24時間後に経時的にサンプルを採取した。

2. フローサイトメトリーによるCD86の発現確認

サンプルの一部をPE標識した抗CD86抗体で染色し、フローサイトメーターEpics XL(ベックマン・コールター社製)にてCD86発現を媒体暴露群に対する相対蛍光強度(Relative Fluorescence Intensity ; RFI)を指標として、RFI=120を境に感作性/非感作性を判定した。

3. 2D-DIGEによるディファレンシャル解析

プロテオミクス手法の一つである2D-DIGEによるディファレンシャル解析を実施し、感作性物質暴露による変動スポットを抽出した。

4. 変動スポットのLC-Q-TOF-MSによる同定

変動スポットの同定を nanoLC-ESI-Q-TOF-MSにて実施した。

C. 研究結果

1. フローサイトメトリーによるCD86の発現確認

3及び6h暴露では、いずれの群でもRFIは120未満であった。24h暴露の強度感作性物質DNCB 0.3及び3 $\mu\text{g/mL}$ 、中程度感作性物質EUG 10及び100 $\mu\text{g/mL}$ でRFIが120以上となった。非感作性物質PGでは、いずれの時点でも100及び1000 $\mu\text{g/mL}$ 共にRFIが120未満であった(図1)。

2. 2D-DIGEによるディファレンシャル解析

変動スポット数は、強度感作性物質DNCBが最も多く、中程度感作性物質EUG、非感作性物質PGの順に少ない傾向が見られた。また、各物質のサンプリングポイント間で比較すると感作性物質2種では6h暴露後に最も多かった。2倍以上増加、1/2倍以下に減少したスポット数(P 値 <0.01)を図2、表1に示した。また、各物質投与により共通して増加または減少したスポット数を表2、3および図3、4に示した。

3. 変動スポットのLC-Q-TOF-MSによる同定

強度感作性物質DNCB、中程度感作性物質EUGで共通して増減し、非感作性物質PGで変動しないスポットをマーカー候補としてMS/MS測定を実施した。同定された6種のタンパク質の機能および細胞内局在などの情報を表4に、発現データを表5-10および図5-10に示した。

D. 考察

ヒト単球系細胞株を用いた感作性物質暴露

に対するプロテオーム解析では、感作性の強度に応じて発現変動を示すタンパク質の数が多くなった。また、既知マーカー膜タンパク質CD86では暴露6hでは殆ど検出されず24hで検出されるのに対して、プロテオーム解析では暴露6hで最も多くのタンパク質において発現変動がみられた。以上からCD86の発現に到る過程の感作性に関連するタンパク質が検出された可能性が高く。同定したタンパク質は既知マーカー膜タンパク質CD86と比較してより単時間に感度よく感作性物質を検出可能なマーカーであることが示唆された。

E. 結論

ヒト単球系細胞株に2種の感作性物質DNCB、EUGを暴露した実験系におけるプロテオーム解析から、既知マーカー膜タンパク質CD86よりも短時間に感作性物質を検出可能なマーカー候補タンパク質6種類を同定した。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takeyoshi M, Noda S, Yamasaki K. Differences in responsiveness of mouse strain against p-benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay. *Exp Anim.* 2004, 53(2):171-3.

Takeyoshi M, Noda S, Yamazaki S, Kakishima H, Yamasaki K, Kimber I. Assessment of the skin sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 2004, 24(1):77-81.

2. 学会発表

M. Takeyoshi, H. Miyaura, Y. Minobe, M.

Takatsuki: EFFECTS OF *IN UTERO* THROUGH
LACTATIONAL EXPOSURE OF
ETHYNYLESTRADIOL ON IMMUNE SYSTEM
IN F1 MICE, 11th International Congress of
Toxicology 2007 (ICT XI), July 15 - 19, 2007

9月20日～9月21日

宮浦英樹、武吉正博：エチニルエストラジオ
ールを用いたマウスにおける経胎盤・経乳汁
暴露による出生仔の免疫系への影響、第14回
日本免疫毒性学会各術大会(JSIT2007)、2007年

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

化学物質のアレルギー性強度推定法

出願番号：特許出願2003-333984

公開番号：特許公開2005-95080

Non-RI LLNA法の感度上昇法

出願番号：特許出願2004-230151

公開番号：特許公開2006-42702