

食品汚染物質トリブチルスズの免疫系への影響

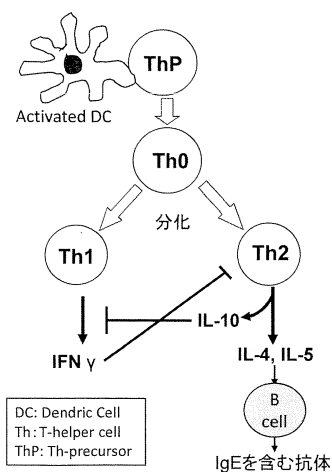
管理栄養学科 及川 佐枝子

1. はじめに

わが国は、近海の豊富な海産物を古くから食事として利用してきた。しかし近年、環境化学物質による生活環境汚染の拡大が重大な問題となり、魚介類に残留する環境化学物質についてもヒトへの健康影響が懸念されている。有機スズ化合物のトリブチルスズ (Tributyltin; TBT) は、軟体動物や藻類に対する毒性を有することから、1960 年代より漁網や船底の防汚剤として日本をはじめ世界中で広く使用されてきた。しかし、1970 年代に入り、フランスにおける養殖カキの生育異常¹⁾、さらに 1980 年から 1990 年代には世界各地の沿岸で巻貝類の雌に雄性生殖器官が形成され発達するインボセックスが多く認められるようになり、船底塗料や漁網から海水に溶け出した TBT が、防汚対象外の生物にまで影響を及ぼすことが明らかにされた²⁾。これらを踏まえ、多数の国で TBT の使用規制がなされ、日本でも平成 2 年に使用禁止措置がとられた。その結果、TBT の海水濃度においては減少傾向にあるが、依然として海底質中では TBT の残留が認められている³⁾。また有機スズは生物濃縮され、タラやカレイ、ニシンなどの海産物、カモ類、アザラシなどに汚染が確認されており⁴⁾、日本人の食事経由の摂取量に関する報告では、TBT は魚介類に継続的に微量検出されている⁵⁾。従って、海産物に混入した TBT は食品汚染物質としてヒトに曝露する可能性が考えられる。これまで TBT のヒトに対する健康影響に関しては、高濃度曝露により皮膚の炎症がおこる急性毒性作用が明らかになっている。また、ラットを高濃度の TBT に曝露することにより、アポトーシスを介した胸腺萎縮が誘導されること、同様にヒト T 細胞株を高濃度の TBT に曝露することでアポトーシスが誘導されることから、TBT の高濃度曝露は胸腺萎縮とそれに引き続く T 細胞依存性免疫応答の全般的な抑制を誘導する免疫毒性作用を発揮することが示唆されている^{6,7)}。しかし、魚介類摂取などを介した TBT の低濃度曝露によるヒトへの健康影響については明らかではない。

2. Th1/Th2 バランスとアレルギー

T 細胞は、病原体による感染症から身体を守る免疫応答において重要な役割を果たしている。生体内に異物が侵入すると、異物は樹状細胞などに取り込まれて抗原未感作のナイーブ CD4⁺ T 細胞に抗原提示され、ナイーブ CD4⁺ T 細胞を感作し活性化させる。活性化した T 細胞は、ヘルパー T 細胞の Th1 (T helper 1) あるいは Th2 (T helper 2) に分化する (図 1)。分化した Th1 は、主にインターフェ



ロン- γ (IFN- γ) を産生し、細胞性免疫や感染防御に参与する。Th2 は主にインターロイキン 4 (IL-4) を産生し、B 細胞に抗体産生を促すことにより、細胞外病原体の排除に重要な役割を果たしている。

Th1/Th2 細胞は、それぞれが産生する IFN- γ と IL-4 によってたがいを制御し、Th1/Th2 バランスが均衡することで生体内の免疫系は正常に保たれている。このバランスが崩れ (Th1/Th2 インバランス)、Th1 優位性が誘導されると自己免疫疾患が、逆に Th2 優位性が誘導されるとアレルギー疾患が引き起こされる (図 2)。

先進諸国では、戦後 50 年の間に喘息やアトピー性皮膚炎、鼻炎などのアレルギー疾患が 10 倍以上増加している。

図 3 にわが国の学校種別のぜん

息の者の推移を示す。アレルギー疾患は、複数の遺伝的要因と複数の環境要因の相互作用により発症するいわゆる多因子疾患であると考えられている。しかし、ヒト遺伝子がわずか半世紀足らずで急激に変化するとは考えにくいことから、アレルギー疾患の急増と重症化には環境要因が深く関与していると考えられている⁸⁾。

その原因の 1 つとして、1989 年に疫学者の Strachan が提唱した、近年の少子化や清潔志向による家庭内での同胞 (きょうだい) 間の感染の機会の減少がアレルギー疾患の増加に影響しているという「衛生仮説」が挙げられる⁹⁾。この理由として、通常新生児の免疫応答は、IFN- γ の産生が抑制されたいわゆる Th2 型免疫応答が優位になっていることが知られており、過度の衛生状態におかれ微生物による刺激が不十分であると成長しても Th2 が過剰のままとなり、結果的にアレルギー疾患を引き起こしやすくなると考えられている。さらにアレルギー疾患の増加については、近年、意図的・非意図的に環境中に放出された化学物質の影響も指摘されている。我々は、免疫毒性作用を有する TBT が、Th1/Th2 インバランス誘導を引き起こし、アレルギー疾患の増悪に参与するという可能性に注目し検討を行った。

3. TBT による Th2 型免疫応答の誘導

我々は、TBT の Th1/Th2 バランスに及ぼす影響について検討を行うため、*in vitro* における Th サブセット分化誘導系に TBT を添加し、生じてくる Th サブセットをサイトカイン

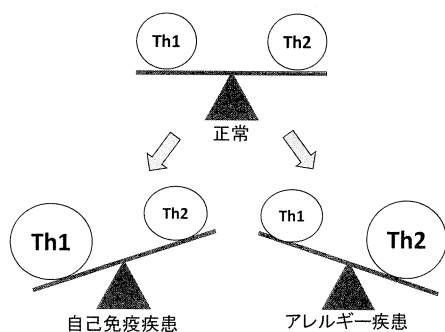
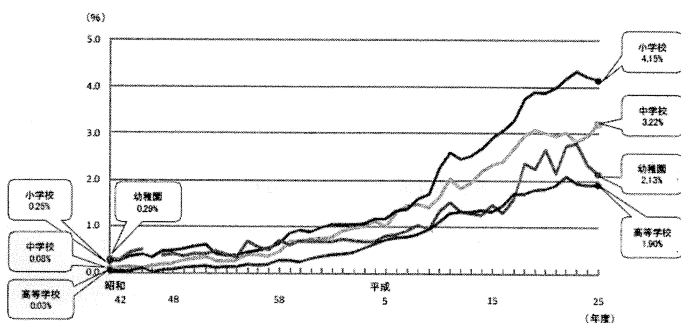


図2. Th1/Th2 バランス



(注) 1. 昭和42年度から調査を実施している。
2. 幼稚園 (5歳) については、昭和46年度は調査していない。

図3. 学校種別 ぜん息の者の推移

(文部科学省 学校保健統計調査-平成25年度(確定値)の結果の概要;
http://www.mext.go.jp/b_menu/toukei/chousa05/hoken/kekka/k_detail/1345146.htm)

産生パターンから解析した。その結果、TBT はナイーブ T 細胞からの Th1 分化を抑制し、Th2 分化を促進することが明らかとなった。さらにマウスを用いた *in vivo* 投与においても Th2 優位性が誘導されることが示された¹⁰⁾。

次に我々は、マウスから複数の Th1 および Th2 クローン細胞を樹立し、Th1 および Th2 細胞に対する TBT のアポトーシス感受性の異同に関する解析を行った。BDF1 マウスを ovalbumin (OVA) を含むアジュバント（抗原性補強剤）で免疫した後、リンパ節を取り出して T 細胞を精製し、脾臓由来の CD4⁺T 細胞を用いて OVA と共に抗原刺激を行った。その後 T 細胞を、Th1 クローン作製のために IFN- γ と抗 IL-4 抗体の存在下 (Th1 condition) で、一方 Th2 クローン作製のため IL-4 と抗 IFN- γ 抗体の存在下 (Th2 condition) で増殖させた後、限界希釈法にてクローンを作製した。サイトカイン産生パターンから、Th1 クローンについては 5 クローン、Th2 クローンは 8 クローンを樹立した。これらのクローン細胞を用い、TBT のアポトーシス感受性の違いによる Th2 優位性誘導への関与について検討を行った。アポトーシス誘導細胞の割合は、Annexin V/ propidium iodide (PI) 染色法にてフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、TBT 処理によりアポトーシス誘導細胞を示す Annexin V 陽性率 (Annexin V(+)/PI(-) および Annexin V(+)/PI(+)) は、Th1 クローンの方が Th2 クローンより高い割合で認められた (図 4 A)。

次に我々は、以前 TBT が過酸化水素 (H_2O_2) 生成を介してアポトーシスを誘導する事を明らかにしたことから、TBT に対する Th1 と Th2 のアポトーシス感受性の違いが細胞内抗酸化剤のグルタチオン (glutathione:GSH) 量に起因する可能性を調べるため、Th1 クローンと Th2 クローンにおける GSH 量を解析した。その結果、細胞内 GSH 量は、Th2 では Th1 より高いことが認められ (図 4 B)、Th1 と Th2 の TBT に対するアポトーシス感受性の違いは、細胞内の GSH に起因することが示唆された¹¹⁾。

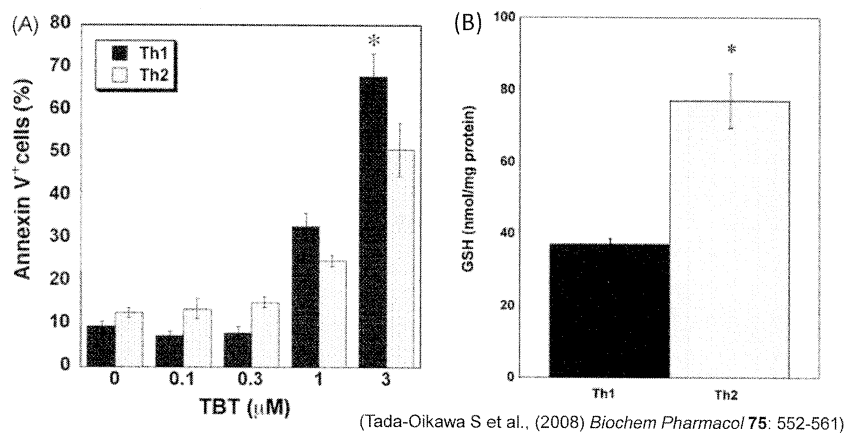
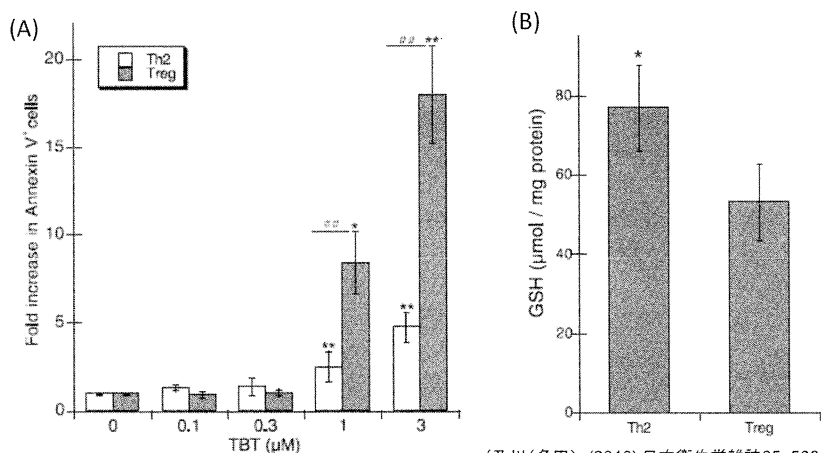


図4 (A) TBT曝露によるTh1,Th2クローン細胞におけるアポトーシス誘導細胞の割合. (B) Th1 および Th2 クローン細胞における細胞内GSH量
Data represent the means \pm S.E. of five Th1 and eight Th2 clones. * $p < 0.001$; significant differences between Th1 and Th2 cells were assessed by Student's *t*-test with Welch corrections.

4. Th1/Th2 と制御性 T 細胞

以上に述べたように、近年のアレルギー疾患の急増が衛生仮説により説明されるとすると、Th1 細胞によって惹起される自己免疫疾患はアレルギー疾患の増加に反比例して減少しているはずである。しかし実際には、Th1 細胞の活性化によって惹起されると考えられている I 型糖尿病や炎症性腸疾患の患者数は、喘息患者の増加とともに増えている。最近になって、生体内には Th1 や Th2 などの Th 細胞の活性化を能動的に負に制御する $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 制御性 T 細胞 (Treg) が備わっており、Treg の質的・量的機能抑制が自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症・増悪に関与することが明らかになりつつある¹²⁾。しかし、免疫応答を負に制御する Treg に対する TBT の低濃度曝露の影響に関しては不明のままである。そこで我々は、Th1, Th2 クローンに加え Treg クローンを樹立し、これらを用いて TBT による Treg と Th2 のアポトーシス感受性の異同に関する検討を行った。Treg クローンは、BDF1 マウスの脾細胞から精製した $CD4^+CD25^+$ 細胞を同系骨髄由来樹状細胞を用いて Syngeneic mixed lymphocyte reaction (MLR) を行い、限界希釈法にて 10 クローンを樹立した。制御性 T 細胞機能と細胞内 Foxp3 発現を解析し、Treg クローンであることを確認した。3 で行った方法と同様に、TBT による Th2、Treg クローンにおけるアポトーシス誘導を解析した結果、アポトーシス誘導細胞は Treg クローンの方が Th2 クローンより高い割合で認められた (図 5 A)。さらに Th2, Treg クローンにおける GSH 量を比較したところ、細胞内 GSH 量は、Th2 では Treg より有意に高かった (図 5 B)。したがって、Th2 と Treg の TBT に対するアポトーシス感受性の違いも、細胞内の GSH が重要な役割を果たしていることが示唆された¹³⁾。



(及川(多田), (2010) 日本衛生学雑誌 65: 530-535)

図5 (A) TBT曝露によるTh2,Tregクローン細胞におけるアポトーシス誘導細胞の割合. (B) Th2,Treg クローン細胞における細胞内GSH量

Data represent the means \pm S.E. of eight Th2 and ten Treg clones. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; Significant differences from untreated cells were determined using a Kruskal-Wallis test, followed by a Scheffé test. ##, $p < 0.01$; significant differences between Th2 and Treg clones were determined using a Mann-Whitney test.

おわりに

以上のことから、TBTによるアレルギー増悪作用は、TBTがTh分化誘導系に作用し、さらに分化したTh細胞に対してTh1だけでなくTregに対しても優先的にアポトーシスを誘導することで、Th2優位性の誘導とその増強を介していることが示唆された。これまでに、酸化ストレスはTh2分化促進やTh2活性誘導を介してTh2優位性を誘導する事が明らかとなっている¹⁴⁾。本研究において、TBTはTh2分化促進に加え、酸化ストレス作用を介し、Th1だけでなくTregに対しても優先的にアポトーシスを誘導し、Th2優位性誘導によりアレルギー疾患増悪に関与することが示唆された(図6)。今後、Th1/Th2インバランス誘導によるアレルギー疾患増悪においてはTregの関与も考える必要がある。自然発生的に生じるTregは、アポトーシスに対し抵抗性を示すことが報告されていたが、近年、酸化ストレス作用を持つ抗がん剤cyclophosphamideによってTregに選択的に細胞死が引き起こされるとの報告もある¹⁵⁾。本研究において、TregクローンがTh2クローンに比較し細胞内GSHが低く、TBTによる酸化ストレスによるアポトーシス感受性が高いという結果と考え合わせると、Tregは酸化ストレスによるアポトーシスに対して感受性の高いT細胞亜集団である可能性が考えられる。

TBTは1980年代から先進諸国で使用規制がなされており、わが国でも1990年の法規制でほぼ使用されなくなった。しかし、未だ海底の泥中に蓄積されており、我々が普段食事として摂取する魚介類からも検出されている。また、TBT以外にも、最近、環境化学物質のポリ塩化ビフェニール(PCB)の母乳を通じた曝露とアレルギー疾患との関連についての疫学研究がなされ、血清中のPCB濃度とIgEの濃度が相関することが示されている¹⁶⁾。わが国では、科学技術の開発や化学物質の利用の増加に伴って人間の生活が豊かになった一方で、様々な化学物質が意図的・非意図的に環境に放出されている。近年のアレルギー疾患増悪にそれら化学物質の食品汚染が関与している可能性は高く、今後もさらなる対策を進めていかなければならない課題であると考えられる。

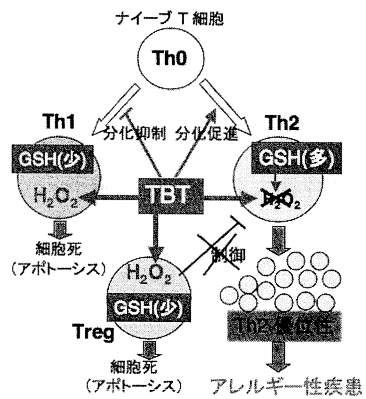


図6. TBTによるTh2優位性誘導機構

文献

1) Alzieu C (1991) Environmental problems caused by TBT in France: Assessment, regulations, prospects. *Mar Environ Res* 32: 7-17.

2) Champ MA (2000) A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci Total Environ* 258: 21-71.

- 3) Antizar-Ladislao B (2008) Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. a review. *Environ Int* 34: 292-308.
- 4) Strand J, Jacobsen JA (2005) Accumulation and trophic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. *Sci Total Environ* 350: 72-85.
- 5) 豊田 正武, 酒井 洋ら他 11 名 (2000) 日本人の食事経由のトリブチルスズ, ジブチルスズ, トリフェニルスズ及びジフェニルスズ化合物の摂取量. 日本食品衛生学雑誌, 41: 280-286.
- 6) Raffray M, Cohen GM (1993) Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy in vivo. *Arch Toxicol* 67: 231-236.
- 7) Stridh H, Fava E, Single B, Nicotera P, Orrenius S, Leist M (1999) Tributyltin-induced apoptosis requires glycolytic adenosine trisphosphate production. *Chem Res Toxicol* 12: 874-882.
- 8) WW Busse and RF Lemanske, Jr., (2001) Advances in Immunology: Asthma, *N Engl J Med*, 344: 350-362
- 9) D. P. Strachan (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 299: 1259-1260
- 10) Kato T, Uchikawa R, Yamada M, Arizono N, Oikawa S, Kawanishi S, Nishio A, Nakase H, Kuribayashi K (2004) Environmental pollutant tributyltin promotes Th2 polarization and exacerbates airway inflammation. *Eur J Immunol* 34: 1312-1321.
- 11) Tada-Oikawa S, Kato T, Kuribayashi K, Nishino K, Murata M, Kawanishi S (2008) Critical role of hydrogen peroxide in the differential susceptibility of Th1 and Th2 cells to tributyltin-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 75: 552-561.
- 12) Sakaguchi S (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101: 455-458.
- 13) 及川 (多田) 佐枝子, 村田真里子, 加藤琢磨 (2010) トリブチルスズによる制御性 T 細胞のアポトーシス誘導: アレルギー疾患増悪への関与、日本衛生学雑誌, 65: 530-535
- 14) Obata F, Hoshino A, Toyama A (2006) Hydrogen peroxide increases interleukin-12 p40/p70 molecular ratio and induces Th2-predominant responses in mice. *Scand J Immunol* 63: 125-30.
- 15) Brode S, Raine T, Zaccane P, Cooke A (2006) Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 177: 6603-6612.
- 16) Grandjean P, Poulsen LK, Heilmann C, Steuerwald U, Weihe P.(2010) Allergy and sensitization during childhood associated with prenatal and lactational exposure to marine pollutants. *Environ Health Perspect*:118:1429-1433.