

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 広川勝彦 東京医科歯科大学大学院医学系研究科感染免疫病理 教授

研究要旨

免疫系は感染に対する生体防御機構として働くと共に内部環境のホメオスターシスを維持する上で重要な役割を果たしている。その免疫系の機能に内分泌攪乱化学物質がどのような影響を与えるかを知ることは、ヒトの健康の維持上必須なことである。そこで、内分泌攪乱化学物質の免疫系に及ぼす影響として、末梢リンパ組織内のT細胞、B細胞、NK細胞などの数、T細胞亜集団の比率、T細胞の増殖能、抗体産生能などの変化を検討した。特に今回の実験では、その予備的な検討して、エストロゲン作用を示す合成女性ホルモンの一つであるジエチルスチルベストロール（Diethylstilbestrol:DES）を内分泌かく乱物質として用い、マウスをモデルとしてその免疫系への影響を詳細に検討した。

A. 研究目的

免疫系は感染に対する生体防御機構として働くと共に内部環境のホメオスターシスを維持する上で重要な役割を果たしている。このホメオスターシスの維持においては、免疫系と神経系・内分泌系との相互作用が重要な役割を果たしている。内分泌系と免疫系との関係は内分泌系から免疫系に及ぼす影響とその逆の免疫系から内分泌系への影響の相互作用の上に成り立っている。ステロイドの免疫系細胞への影響で知られる如く、前者の（内分泌系→免疫系）の関係は古くから知られているが、後者の（免疫系→内分泌系）の関係はリンパ球がいろいろなペプチドホルモンを産生するという事実から、比較的最近になって分かって来たことである。

内分泌系が免疫系と相互作用するには3つのルートがある。第一はグルココルチコイドによる免疫系に対する抑制作用である。これにはグルココルチコイドのリンパ球に対する融解などの直接作用とメディエーターを介した間接作用がある。第二は性ホルモンによる免疫系への抑制作用である。免疫系の主役であるT細胞の分化に必須の胸腺は、思春期になって性ホルモンの分泌が盛んになると萎縮が促進される。実験的に見ても、エストロゲンやテストステロンはリンパ球の諸機能に対して抑制的に作用する。従って、実験的に精巣や卵巣を取ると免疫系の機能は全般的に亢進する。第三は視床下部？下垂体軸である。上述のグルココルチコイドや性ホルモンがこのコントロール下にあることはい

うまでもない。それに加えて下垂体ホルモンも免疫系と深く関係する。中でも成長ホルモン(GH)は胸腺の成長とT細胞分化に必須のホルモンである。従って、GHが低下する様な場合には免疫系の正常は発達が見られなくなる。さらに興味あることはリンパ球がGHを始めとしたいろいろな下垂体ホルモンを産生することである。

このような免疫系と内分泌系との密接な相互作用の上に、生体のホメオスタシスの維持が成り立っている。その生体内に、どんなものであれ内分泌かく乱物質が入れば重大な影響をもたらすことは想像に難くない。

本実験ではエストロゲン作用を示す合成女性ホルモンの一つであるジエチルスチルベストロール(Diethylstilbestrol:DES)を内分泌かく乱物質として用い、マウスをモデルとしてその免疫系への影響を詳細に検討した。DESの生体への影響はその催奇性効果などの報告に見られるように、胎児期から成長期における影響を見たものが多い。ここでは先ず若齢マウスへの影響を見ると共に、老化マウスへの影響を検索する計画とした。免疫系は幼?若齢期をピークとして、思春期を過ぎると加齢と共に確実に機能低下し、老齢期にはピーク時の1/10以下に低下する機能もある。このように、老齢期に免疫機能が著しく低下することが老齢期におけるいろいろな疾病の発生の重大な背景となっている。この老化に伴う免疫機能の低下に内分泌かく乱剤がどの様な影響を及ぼすかを見ることは極めて重要と思われる。

B. 研究方法

動物: C57BL/6 マウス (♂/♀) 3ヶ月齢。

内分泌かく乱剤: Diethylstilbestrol (DES)。

投与量: 高用量、15mg/Kg。低用量、3mg/Kg。

投与方法: 腹腔内(ip)

投与回数: 実験1; 1回。実験2; 1回 x 5日(5回)。

検索日: 実験1では投与後2及び3日後、実験2では最終投与後2日目に屠殺し検索。

実験群

- A) Male Corn oil 0.2ml 5 x 5 mice
- B) Male DES 3mg/g (体重) 5 x 5 mice
- C) Male DES 15mg/g (体重) 5 x 5 mice
- D) Female Corn oil 0.2ml 5 x 5 mice
- E) Female DES 3mg/g (体重) 5 x 5 mice
- F) Female DES 15mg/g (体重) 5 x 5 mice

検索項目

- A) 体重と臓器重量(胸腺、脾臓、肝、腎、精巣、卵巣、副腎)
- B) フローサイトメトリー
胸腺(CD4/CD8)、脾臓(Thy-1/B220, CD4/CD8, ナイフ/メモリー, NK/CD3)
- C) リンパ球の増殖能
T細胞増殖能(anti-CD3MoAb, Con A), B細胞増殖能(LPS)
- D) 抗SRBC抗体産生能(PFC法)
- E) NK細胞活性

C. 研究結果

本年度は若齢マウスを用い、1回目は予備実験を行い、その結果を参考として2回目の本実験を行った。

DES 投与 1 回の予備実験では雄マウスを用いたが、低用量 (3mg/kg) と高用量 (15mg/kg) のどちらの場合も、胸腺、脾臓の軽度の重量増加と T 細胞、B 細胞の軽度の増加が認められた。

本実験では若齢の雄と雌マウスを用い、低用量と高用量を 5 日間連続投与し、最終投与の 2 日後に屠殺し検索に用いた。この場合には胸腺の明瞭な萎縮とその逆に脾臓の肥大を認め、どちらもその程度は雌の方に顕著であった。脾臓で見ると T 細胞、B 細胞共に減少し、抗 S R B C 抗体産生能の低下が認められた。しかし、N K 細胞には明瞭な数の変化はなく、活性で見ると雄では寧ろ亢進する傾向が見られた。以下にこの本実験で得られたデータについて詳しく紹介する。

1) 体重と免疫系以外の臓器重量。

体重は DES 投与後軽度増加する傾向が雌雄共に認められ、低用量での増加は統計的にも有意であった。副腎の重量も DES 投与後軽度増加する傾向が雌雄共に認められ、雄ではその増加は統計的に有意差のある増加であった。雄の精巢の重さには大きな変化はなかったが、雌の卵巣の増加は統計的に有意な増加であった。しかし、投与量による差は認められなかった。腎臓の重量も軽度の増加傾向を示し、雌の低用量投与では有意な増加であった。肝臓の重量も DES 投与後、雌雄共に有意に増加した。雌ではその増加は投与量に依存した増加であった。

また、雌において子宮の腫大が DES 投与群全例に認められた。

2) 胸腺と脾臓

DES 投与により胸腺の著しい萎縮が認められた。萎縮の程度はやや用量依存的であり、また、

雌の方に顕著であった。フローサイトメトリーで胸腺リンパ球の亜集団の変化を見ると、CD4+CD8+ (DP) 細胞に 85・65%の減少が認められ、その程度は雌の高用量で最も著明であった。それに反して、CD4-CD8- (DN) 細胞、CD4+と CD8+ のシングルポジティブ細胞はいずれも比率において増加傾向を示した。

脾臓は胸腺とは逆に増加傾向を示し、その増加は雄では低用量で、雌では濃度依存的に有意な増加が認められた。

3) 脾臓における細胞亜集団

胸腺に萎縮が見られた如く、脾臓の T 細胞 (TCR $\alpha\beta$ 細胞) の減少が 66・81%の程度で DES 投与後に見られ、減少の程度は雌においてより顕著であったが、投与量による差は見られなかった。T 細胞の亜集団である CD4+T 細胞も雌雄ともに低用量で有意に減少し、減少の程度は雌においてより顕著であった。また、雌では高用量でも有意な低下が認められたが、投与量による差は見られなかった。CD4+T 細胞の中のナイーブ T 細胞 (CD45^{high}CD44^{low}) とメモリー T 細胞 (CD45^{low}CD44^{high}) の亜集団では DES 投与後の変化が異なり、ナイーブ T 細胞は増加傾向を示すのに対して、メモリー T 細胞は減少傾向を示した。

雄においては B 細胞の減少も見られたが、雌では有意な減少は見られなかった。

4) 脾臓 T 細胞の増殖能

脾細胞をコンカナバリン A で刺激し、in vitro における T 細胞の増殖能を検索した。雄では低用量で、雌では用量依存的に DES による T 細胞増殖の抑制が認められた。

5) 脾臓における免疫機能

DES 投与中に抗原として羊赤血球 (SRBC) で刺激し、それに対する抗体産生能を見た。

その結果、高用量の投与により抗 SRBC 抗体産生能が、雌雄に関わりなく 1/3 から 1/2 に減少した。

また、YAC-1 細胞を用いて、非特異的な NK 活性を調べた。NK 活性は抗体産生とは異なり雌雄いずれの場合も増加傾向を示したが、その増加は統計的に有意なものではなかった。

D. 考察

DESの投与は1回投与では免疫系をやや亢進させる作用がある。しかし、5日間連続投与すると免疫機能を抑制する作用が雌雄を問わず認められた。免疫系の中でも亜集団や機能によりDESに対する感受性は異なる。例えば、抗体産生能は抑制されるが、NK活性は寧ろ亢進する傾向が認められた。

今回は、若齢マウスを用いて、DES投与後の急性期の影響を見たが、さらに慢性期の影響および老化マウスにおける影響などを見る必要があると考えられた。

E. 結論

Diethylstilbesterol (DES) 用いて、低用量 (3 mg/kg) と高用量 (15 mg/kg) を雄マウスの腹腔内に投与し、胸腺、脾臓の重量およびT細胞、B細胞の数の変化を検討した。その結果、大きな変化をもたらすことはなかったが、胸腺、脾臓の軽度の重量増加とT細胞、B細胞の軽度の増加が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirokawa K. Age-related changes of signal transduction of T cells. *Exp. Gerontol.*, 34:7-18

2. Wakikawa A, Utsuyama M, Wakabayashi A, Kitagawa M and Hirokawa K. Age-related alteration of cytokine production profile by T cell subsets in mice: A flow cytometric study. *Exp. Gerontol.* in press.

3. Iizuka J, Katagiri Y, Tada N, Murakami M, Ikeda T, Sato M, Hirokawa K, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T and Ueda T. Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. *Lab. Invest.* 78:1523-1533, 1998.

4. Ishiyama N, Kitagawa M, Kina I and Hirokawa K. Expression of truncated form of VCAM-1 in thymocytes and its role during the process of apoptosis. *Pathobiol.* 66:274-283-1998

5. Hirokawa K: Immunity and Ageing. In: Principle and Practice of Geriatric Medicine. (Pathy M. S. J. ed.) John Wiley & Son UK 1998 pp. 35-47

6. Hirokawa K, Utsuyama M and Kobayashi S. Hypothalamic control of development and aging of the thymus. *Mech. Age. Dev.* 100 : 177-185, 1998