

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

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 広川勝昱 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

合成エストロジェンのジエチルスチルベストロール（DES）を用いて、マウスの免疫系に与える影響を検討した。急性投与実験では胸腺萎縮、脾臓T細胞の減少と増殖能の低下が見られ、その変化は♂に比べて♀にやや顕著であった。また、若老間の比較では老齢マウスにおける影響の方が大きかった。一方、餌に微量のDESを混ぜる慢性投与実験では、胸腺の萎縮は急性投与実験と同様に見られた。DESの大量急性投与の場合のみならず、長期間のDES微量経口投与の場合でも免疫系に明らかな影響が見られることが分かった。また、その影響は性、月齢により異なることも明らかになった。

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。ホメオスターシスの維持においては、免疫系は神経系と内分泌系との緊密な総合作用をしながらその役割を果たしている。免疫系の主要構成細胞であるリンパ球は抗体やサイトカインを作るだけでなく、エンドルフィンなどの神経伝達物質や各種下垂体ホルモンを産生し、それらに対する受容体も持っている。リンパ球はステロイドは作らないが、副腎皮質ホルモンや性ホルモンに対する受容体を持ち、ステロイドの影響を受けることができるようになっている。従って、内分泌かく乱化学物質が免疫系に影響を及ぼすことは必至である。

本実験ではエストロジェン作用をもつ合成ホルモンであるジエチルスチルベストロール（DES）を用い、マウスを用いてその免疫系への影響を検討した。DESの生体への影響はその催奇性効果などの報告にあるように、胎児期から成長期にかけて見た報告は多い。そこでここでは、対象を老年期に絞り、低下しつつある免疫系にDESがどのような影響を及ぼすかを検討した。

B. 研究方法

動物：C57BL/6マウス（♂/♀）3ヶ月齢、

18ヶ月齢の4群を用いた。

内分泌かく乱剤：Diethylstilbesterol (DES)。投与方法：急性投与実験；高用量(15mg/ Kg)、低用量(3mg/ Kg)を腹腔内投与で1回x5日。慢性投与実験ではDES微濃度(0.44 μg/ Kg)と少濃度(4 μg/ Kg)添加粉末飼料を3ヶ月間給餌。

検索日：最終投与後2日目に屠殺し、各臓器を採取し検索した。

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7/ メリ-, 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

1) DES腹腔内投与による急性影響：性別と月齢別比較（表-1）。

初年度には若齢マウスのオスとメスをを用いて、低用量(3mg/kg)と高用量(15mg/kg)のDESを5日間連続腹腔内投与し、その影響を見た。その結果低容量で十分な影響が見ら

れることが分かったので、本年度は低容量を老齢マウスに投与した場合の影響を検索し、性別と年齢別で比較検討した。

a) 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若齢の雌雄ともに認められたが、老齢では変化がなかった。副腎の重量もDES投与後軽度増加する傾向が若齢の雌雄ともに認められたが、老齢では雌では増加するが、雄では減少した。若齢雄の精巣の重さには大きな変化はなかったが、雌の卵巣の増加は有為な増加を示した。しかし、老齢になると雄の精巣は萎縮し、雌の卵巣は増加傾向を示した。腎臓の重量は若齢では増加傾向を示したが、老齢では変化が見られなかった。肝臓の重量は若齢では雌雄ともに増加したが、老齢になると雌では増加するが、雄では減少した。若齢雌において子宮の腫大が認められたが、老齢ではむしろ減少傾向が見られた。

b) 胸腺と脾臓

DES投与により胸腺の著しい萎縮が性、月齢に拘わらず認められた。フローサイトメトリでみると、その胸腺萎縮はCD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ (DP) 細胞の減少として認められた。

脾臓の重量は胸腺とは逆に増加傾向を示し、それは若齢の雌雄と老齢の雄に明瞭であったが、老齢の雌では認められなかった。

c) 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細胞は性・月齢に関わらず減少することが分かった。T細胞の亜集団であるCD4⁺T細胞やCD8⁺T細胞についても同様の減少が見られた。しかし、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。この傾向は老齢雄では見られたが、雌では見られなかった。B細胞についても減少傾向が性、月齢に関わりなく見られた。

d) 脾臓T細胞の増殖能

脾T細胞のin vitroにおける増殖能は性、月齢に関わらず抑制された。脾B細胞のin

vitroにおける増殖能は若齢雄では増加したが、若齢雌と老齢の雌雄では抑制された。

e) 脾臓における免疫機能

羊赤血球(SRBC)に対する抗体産生能は若齢では性に関わらず抑制された。加齢により抗体産生能は10分1以下に低下するが、老齢雄マウスではDES投与により軽度増加を示した。

YAC-1細胞を用いた非特異的なNK活性は若齢では雌雄いずれの場合も増加傾向を示したが、老齢ではむしろ減少傾向を示した。

2) DES添加飼料摂取による慢性影響：性別と月齢別比較 (表-2)

今回の給餌法によるDESの3ヶ月間の総摂取量を概算すると低容量添加飼料では0.1μg/マウス、高用量添加飼料では1.0μg/マウスとなった。これは急性変化をみた腹腔内投与量の100分の1から1000分の1という微量であった。因みに妊婦の血清中のエストロゲン値は10ng前後である。

a) 体重と免疫系以外の臓器重量。

体重は若齢では変化がなかったが、老齢では性、摂取量に関わらず軽度増加した。副腎には性、月齢、用量に関わらず変化がなかった。精巣については月齢に関わらず減少、卵巣については月齢に関わらず、増加傾向が見られた。腎は若齢の雄と老齢の雌で用量に関わらず増加傾向、若齢の雌と老齢に雄では変化がなかった。肝は若齢では高用量では不変であったが、低容量で減少傾向が時られた。老齢では雌において増加傾向が見られた。

b) 脾臓と胸腺

胸腺は若齢雄と老齢雌で明らかな減少が見られ、他では不変であった。しかし、CD4⁺8⁺のダブルポジティブ細胞はいずれの群においても減少し、胸腺は萎縮傾向にあることが窺えた。

c) 脾臓における細胞亜集団

胸腺の萎縮傾向とは異なり、脾臓T細胞の増加傾向が若齢の雌雄と老齢の雌に見られた。老齢の雄ではむしろ減少傾向であった。B細胞は一部を除いて減少傾向を示した。CD4⁺T細胞の中のナイーブT細胞 (CD45^{high}CD44^{low}) は若齢では急性影響の場合と同

様に増加傾向を示したが、老齢雌では減少、雄では不変傾向であった。メモリーT細胞 (CD45^{low}CD44^{high}) は減少か不変傾向を示したが、老齢雌では増加傾向を示した。NK細胞は若齢では性、用量に関わらず減少傾向を示し、老齢雌では逆に増加傾向を示した。

d) 脾臓T細胞の増殖能

抗CD3抗体による増殖能では若齢で不変、老齢雄では減少傾向を示した。

e) 脾臓における免疫機能

羊赤血球(SRBC)に対する抗体産生能は若齢の雌雄と老齢雄で増加傾向を示した。

D. 考察

合成エストロゲンのDESの免疫系に及ぼす影響をマウスをモデルとして行った。腹腔内に5日間投与する急性実験では胸腺萎縮、脾臓T細胞の減少とその増殖能の低下という免疫系の抑制が認められ、その影響は雄より雌の方がやや顕著であった。腹腔内投与量より $10^2 \sim 10^3$ のオーダー少ない量を餌に混じて3ヶ月間与えた慢性実験でも、胸腺の萎縮は明瞭に認められたが、免疫機能の低下については検出できなかったが、老齢ではむしろ軽度ながら機能亢進が認められた。

ごく少量のDESを長期間与える慢性投与実験でも、胸腺を中心とした免疫系に影響を及ぼすことが分かった。しかし、その影響を老齢マウスで見ると、必ずしも抑制効果ばかりではなく、免疫系の一部の細胞集団や機能は逆に亢進することが分かった。

このようにDESの免疫系への影響がその投与量、性、年齢により変化することは、免疫系の細胞に発現するDESの受容体の量、種類およびその下流にあるシグナル伝達系の違いと想定される。今後は免疫系の細胞に発現するエストロゲン受容体について、その量、種類、および加齢変化について検討したい。

E. 結論

DESの大量投与の急性実験、および長期間の微量投与のいずれにおいても胸腺を中心とした免疫系への影響が認められた。その影響はDESの用量、マウスの性と月齢により異なる

ことが明らかになった。

F. 業績目録

1. 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.* 34:231-242,1999
2. Hirokawa K. Age-related change in signal transduction of T cells. *Exp. Gerontol.* 134:7-18,1999
3. Ishiyama N, Utsuyama M, Kitagawa M and Hirokawa K. Immunological enhancement with a low dose of cyclophosphamide in the aged mice. *Mech. Age. Dev.* 111:1-12,1999
4. Wu J, Zen Y-x and Hirokawa K. Signal pathway of mitogen-induced Ca²⁺ activated K⁺ current in young and aged T cell clones of C57BL/6 mice. *Cell. Signalling.* 11:391-398,1999
5. Wakabayashi A, Utsuyama M, Hosoda T, Sato K and Hirokawa K. Differential effect of oral administration of antigens on antibody response by host age: induction of tolerance in young mice but enhancement in old mice. *Mech. Age. Dev.* 109:191-201,1999.
6. Ohashi T, Hanabuchi S, Kato H, Koya Y, Takemura F, Hirokawa K, Yoshiki T, Tanaka Y, Fujii M and Kannagi M: Induction of adult T cell leukemia-like lymphoproliferative disease and its inhibition by adoptive immunotherapy in T cell deficient nude rats inoculated with syngeneic human T cell leukemia virus type-1-immortalized cells. *J. Virol.* 73:P-p, 1999
7. Taniguchi K, Kohsaka H, Inoue N, Terada Y, Ito H, Hirokawa K and Miyasaka N. Induction of p16INK4a senescence gene as a novel therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nature Medicine* 5:760-767,

1999

8. Wakikawa A, Utsuyama M,
Wakabayashi A, Kitagawa M and
Hirokawa K. Vitamin E enhances the
immune functions of young but not old
mice under restraint stress.
Exp.Gerontol. 34:853-862,1999

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

G. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

表一 1 : DES 腹腔内投与による急性影響 : 対象群との比較

| | 若 齢 | | 老 齢 | |
|---------|-----|---|-----|---|
| | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ |
| 体重 | ↑ | ↑ | ⇒ | ⇒ |
| 副腎 | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ |
| 性腺 | ⇒ | ↑ | ↓ | ↑ |
| 腎 | ↗ | ↑ | ⇒ | ⇒ |
| 肝 | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ |
| 胸腺 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| DN | ↑ | ↑ | | |
| DP | ↓ | ↓ | | |
| CD4SP | ↑ | ↑ | | |
| CD8SP | ↑ | ↑ | | |
| 脾臓 | ↑ | ↑ | ↑ | ⇒ |
| Thy1 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| CD4 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| CD8 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| B220 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Naive | ↑ | ↑ | ↑ | ↗ |
| Memory | ↓ | ↓ | ↓ | ⇒ |
| NK | ↗ | ↓ | ↓ | ↓ |
| NKT | ↓ | ↑ | ↓ | ↓ |
| T α β | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| 免疫機能 | | | | |
| PFC | ↓ | ↓ | ↑ | ↓ |
| ConA | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| PHA | ⇒ | ↓ | ↓ | ↓ |
| LPS | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ |
| NKLysis | ↑ | ↑ | ↓ | ↓ |

マウスは若齢、3ヶ月齢。老齢は18ヶ月齢を使用した。

↗ (微増) ↘ (微減) ⇒ (不変) ↑ (増) ↓ (減)

表一 2 微量 DES 添加飼料給餌による慢性実験

| | Young | | | | Old | | | |
|---------|-------|---|---|---|-----|---|---|---|
| | ♂ | | ♀ | | ♂ | | ♀ | |
| | 高 | 低 | 高 | 低 | 高 | 低 | 高 | 低 |
| 体重 | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ |
| 副腎 | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ⇔ |
| 性腺 | ↓ | ↘ | ↗ | ↗ | ↘ | ↘ | ↗ | ↗ |
| 腎 | ↗ | ↗ | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ↗ | ↗ |
| 肝 | ⇔ | ↓ | ⇔ | ↘ | ⇔ | ⇔ | ↗ | ↗ |
| 胸腺 | ↓ | ↓ | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ↓ | ↓ |
| DN | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ |
| DP | ↘ | ↘ | ↓ | ↓ | ↘ | ↘ | ↓ | ↓ |
| CD4SP | ↗ | ↗ | ↑ | ↑ | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ |
| CD8SP | ↗ | ↗ | ⇔ | ⇔ | ↗ | ↗ | ⇔ | ⇔ |
| 脾臓 | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↘ | ⇔ | ↑ | ↑ |
| Thy1 | ↑ | ⇔ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ⇔ | ↘ |
| B220 | ↓ | ↓ | ⇔ | ↓ | ↓ | ↓ | ↘ | ⇔ |
| Naive | ↑ | ↑ | ↑ | ↗ | ⇔ | ↗ | ↘ | ↘ |
| Memory | ↘ | ↘ | ⇔ | ↘ | ⇔ | ⇔ | ↗ | ↗ |
| NK | ↘ | ↘ | ↘ | ↘ | ⇔ | ⇔ | ↗ | ↗ |
| NKT | ↗ | ↗ | ⇔ | ↑ | ↗ | ⇔ | ⇔ | ⇔ |
| 免疫機能 | | | | | | | | |
| PFC | ↗ | ⇔ | ⇔ | ↗ | ↗ | ↗ | ⇔ | ⇔ |
| NKLysis | ↘ | ↘ | ↘ | ↗ | ↘ | ↘ | ↘ | ↘ |
| α CD3 | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ⇔ | ↘ | ↘ | ⇔ | ⇔ |

マウスは若齢、3ヶ月齢。老齢は18ヶ月齢を使用した。

↗ (微増) ↘ (微減) ⇔ (不変) ↑ (増) ↓ (減)