

有機スズ招来の胸腺萎縮にみる耐性と細胞死抑制因子の発現

鈴木浩史¹⁾, 大谷寧子¹⁾, 荒川泰昭¹⁾
武内孝之²⁾, 中野幸廣²⁾, 中島晴信³⁾
(¹⁾ 静岡県立大・食品栄養科学・公衆衛生・生体衛生所*
²⁾ 京都大・原子炉研究所**, ³⁾ 大阪府立公衆衛生研所***)

Manifestation of tolerance and cell death suppressive factors in the organotin-induced thymus atrophy

Hirofumi SUZUKI¹⁾, Yasuko OHTANI¹⁾, Yasuaki ARAKAWA¹⁾
Takayuki TAKEUCHI²⁾, Yukihiro NAKANO²⁾, Harunobu NAKASHIMA³⁾

¹⁾ *Department of Hygiene & Preventive Medicine, Faculty of Health Science,*

The University of Shizuoka,

²⁾ *Research Reactor Institute, Kyoto University,*

³⁾ *Osaka Prefectural Institute of Public Health*

Dialkyltin compounds such as dibutyltin and dioctyltin induced a severe thymus atrophy and a concurrent cellular immunodeficiency. This atrophy, however, was recovered by a long-term exposure (5-8 weeks), that was, a tolerance was manifested.

In this study, the mechanism for the tolerance manifestation of organotin-induced thymus atrophy was analyzed through investigating three factors that are assumed as a main cause of the tolerance manifestation, 1) inducing the degradation enzyme, 2) inducing the generation of dibutyltin-binding substances, and 3) inducing the generation of cell death suppressive substrates.

The result was that the induction of degradation enzyme working in the dealkylation of organotins was not found, because most of dibutyltin remained as it was in the thymus.

The induction of the generation of dibutyltin-binding substances or the generation of cell death sup-

* 所在地：静岡市谷田52-1 (〒422-8526)

** 所在地：大阪府泉南郡熊取町野田 (〒590-04)

*** 所在地：大阪市東成区中道1-3-69 (〒244)

pressive substances were found by analyzing the cell death suppressive activity in the thymus extracts of a tolerance finished stage (after 8 weeks). The active substance was found in the metallothionein family fraction of aqueous fraction. The substance, further, was separated by using MonoQ column and three active proteins purified on the SDS-PAGE.

Of three active proteins that are responsible for the tolerance, one was "rat serum albumin", and the others were 120kDa and 90kDa proteins that have not been identified as yet.

有機スズ化合物の生物活性は主として免疫毒性や神経毒性について検討されてきたが、最近では内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）の範疇にも区分され、内分泌毒性についても興味が注がれるようになってきた。その中で、現在なおプラスチック製の食器や食品用包装紙などの合成に安定剤として頻用されているジブチルスズやジオクチルスズなどのジアルキルスズは短期暴露では選択的に著しい胸腺萎縮を誘発し、細胞性免疫不全を誘発する^{1) - 6)}。しかし、この萎縮は長期連続暴露において回復してくる。すなわち、耐性が発現してくる^{1), 2), 6)}。そこで、本研究ではこの耐性発現の機序を解明するため、耐性発現の要因として考えられる三つの因子、1) 分解酵素の誘導、すなわち有機スズの代謝に伴う無毒化に由来するものか、2) スズ結合物質の誘導に伴う無毒化に由来するものか、3) 細胞死抑制因子の発現など他の要因に由来するものか、について検索した。

実 験 方 法

1. 動物実験

Wistar系幼若ラット（雄性、3週齢、40g前後）にジブチルスズジクロリド（ Bu_2SnCl_2 ）もしくはトリブチルスズクロリド（ Bu_3SnCl ）100ppmを含むNMF固形飼料を連続自由摂取させた。別にそれぞれの対照群をとり、実験開始後、0、2、5、8週目に胸腺を摘出し、体重当たりの相対臓器重量を測定した。

2. 胸腺中有機錫の分析

有機スズのプロピル化体をガスクロマトグラフィーにより測定した。

3. 耐性発現時の胸腺抽出画分における細胞死抑制因子の検索

耐性因子の検索は胸腺をホモジネート後、水溶性から脂溶性に至る6画分に分画し、それぞれの画分について、胸腺細胞を用いたin vitroでの有機スズ（ 10^{-6}M ）誘導細胞死に対する抑制効果を細胞内エステラーゼ活性を指標として調べた。すなわち、胸腺細胞浮遊液（ $1\sim 5 \times 10^6$ cells/ml）に $5 \times 10^{-6}\text{M}$ ジブチルスズを添加した系に耐性完成期（8週目）の胸腺画分（A）～（F）をそれぞれ添加し、 37°C 、5% CO_2 in airにて12時間培養後、細胞内エステラーゼ活性を指標にして、細胞の生存率を調べた。

4. 細胞死抑制因子の精製および同定

活性の強く出た水溶性画分については、細胞死抑制因子を同定するため、MonoQカラムで精製を行った。精製された蛋白質のうち細胞死抑制活性を持つものについて、N末端のアミノ酸配列の決定を行い、蛋白質の同定をした。すなわち、画分(A)をMonoQカラムで0~1M NaClで溶出し精製を行い、精製した蛋白質は、SDS-PAGEで泳動、PVDF膜に転写し、N末端のアミノ酸配列を決定し、蛋白質の同定をした。

結果と考察

ジブチルスズもしくはトリブチルスズの連続経口暴露では、いずれも暴露開始後1-2週目で著しい胸腺の萎縮が見られる (Fig. 1)。病理組織学的には、未熟細胞が多く、分裂増殖の激しい皮質領域のリンパ球の消失が顕著である (Fig. 2)。しかし、この胸腺の萎縮はジブチルスズの場合、5週目以降次第に回復し始め、8週目で完全に回復する。トリブチルスズの場合、このような回復は見られない (Fig. 3)。

ジブチルスズに見られるこの耐性発現の要因として、1) 分解酵素の誘導、2) 結合物質の誘導、3) 細胞死抑制因子の誘導などが考えられる。まず、有機スズ分解酵素の誘導を検索するため、胸腺内に存在

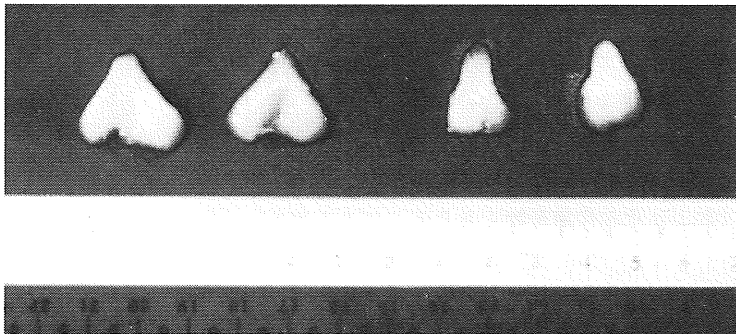


Fig. 1 Thymus atrophy in rats produced by feeding, from left to right, 0 or 100 ppm dibutyltin dichloride (Bu_2SnCl_2) for 2 weeks.

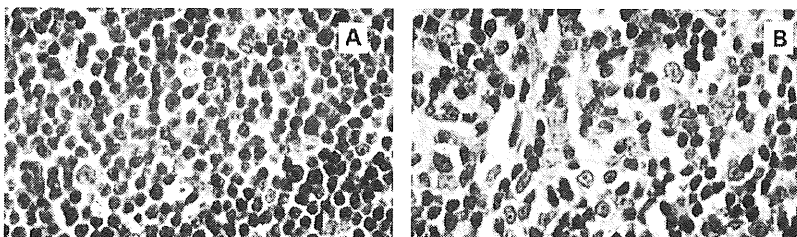


Fig. 2 Part of the thymic cortex from a control rat (A) and a rat (B) fed 100 ppm dibutyltin dichloride for 2 weeks. Note the complete lymphocyte depletion of the cortex (B). Hematoxylin and eosin; x 400.

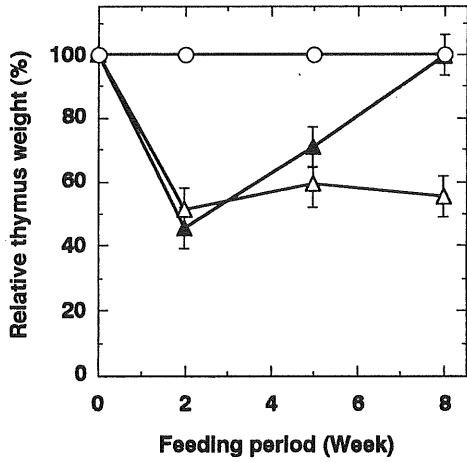


Fig. 3 Relative thymus weight (% of control) of rats fed 100 ppm of dibutyltin dichloride or tributyltin chloride throughout the experimental period. Vertical bars denote SE of the mean for ten determinations.

(○) Control (0 ppm) group, (▲) dibutyltin group, (△) tributyltin group.

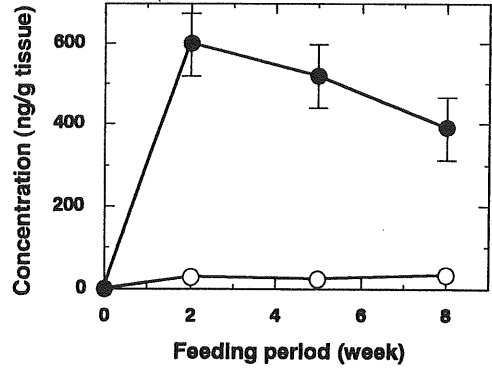


Fig. 4 Movements of dibutyltin and its metabolites in the thymus of rats fed 100 ppm dibutyltin dichloride throughout the experimental period. Vertical bars denote SE of the mean for ten determinations.

(●) Dibutyltin, (○) monobutyltin.

するジブチルスズおよびその代謝産物であるモノブチルスズを分析した (Fig. 4)。その結果、ジブチルスズ本体は投与開始より2週間後に最高値を示し、以降、次第に減少の傾向を示したが、耐性が完成する8週目においても大半は暴露されたジブチルスズ本体のままで、しかも胸腺萎縮を引き起こすのに十分な高濃度で存在していた。また、代謝産物のモノブチルスズはわずかに増加傾向を示したが、ジブチルスズ本体と比較して極めて少ない量 (胸腺中有機スズ量の3%以下) であった。従って、本耐性の発現は分解酵素の誘導すなわち有機スズ分解による無毒化に起因したものではないことが解かった。

そこで、他の二因について検討した結果、結合物質の誘導もさることながら、細胞死抑制因子が誘導されていることが解かった。まず、耐性完成期 (8週目) の各種胸腺抽出画分を用い、ジブチルスズ誘導の細胞死に対する抑制効果を観察した。胸腺を水溶性から脂溶性に至る6つの画分 (A, B, C, D, E, F) に分画し、各画分の細胞死抑制活性を調べた (Fig. 5)。その結果、6時間培養においては水溶性画分のメタロチオネインファミリー画分 (A) に有意の抑制効果がみられた。そこで、この画分 (A) に含まれる細胞死抑制因子を明らかにするために、画分 (A) を MonoQ カラムで精製したところ、数種の蛋白質が細胞死抑制に関与していることが解かった (Fig. 6A)。すなわち、精製画分のうち3つの画分がジブチルスズ誘導細胞死に対する抑制活性を持っていた (Fig. 6A, arrow head)。それぞれの画分を SDS-PAGE で分離し、銀染色したところ、分子量が、約 67kDa, 120kDa, 90kDa の蛋白質が活性画分に見い

だされた (Fig. 6B)。それぞれの蛋白質のN末端のアミノ酸配列を決定した結果、67kDaの蛋白質はラット血清アルブミンと同定されたが、他の2つの蛋白質は現在のところ未知の蛋白質であった。血清アルブミンの毒性軽減への関与の機序解析を含め、これらの蛋白質の同定と作用機序の解析が今後の課題である。

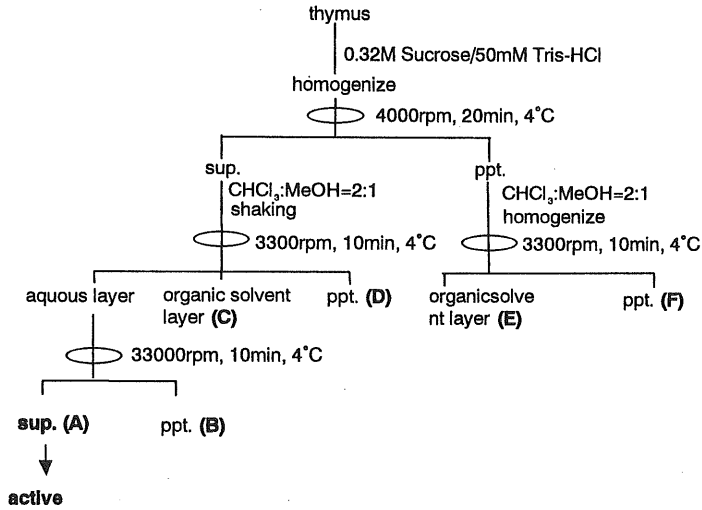


Fig. 5 Separation of cell death suppressive factors from the thymus extracts.

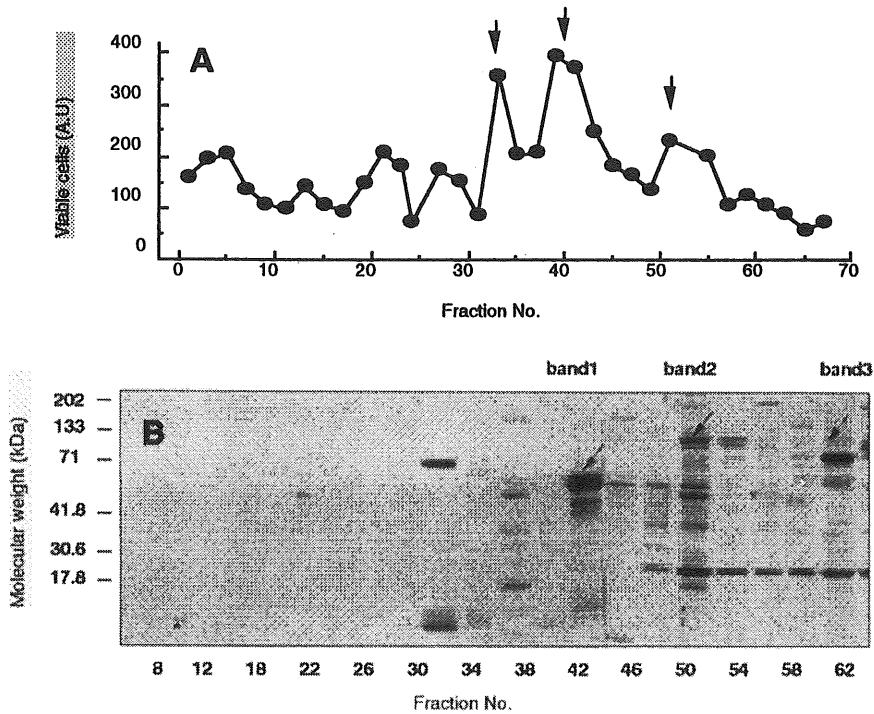


Fig. 6 Purification of cell death suppressive factors on MonoQ column (A) and on SDS-PAGE (B).

参 考 文 献

- 1) Arakawa Y: Chapter 10: Recent studies on the mode of biological action of the di- and tri-alkyltin compounds. Smith PJ (ed) : Chemistry of Tin. Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall, Glasgow, U.K., 1997, pp 388-422.
- 2) Arakawa Y, Wada O: Chapter 4: Biological properties of alkyltin compounds. Sigel H (ed) : Metal Ions in Biological Systems, Volume 29; Biological Properties of Metal Alkyl Derivatives. Marcel Dekker Inc., New York, 1993, pp 101-136.
- 3) Arakawa Y, Wada O: Chapter 9: Suppression of cell proliferation by certain organotin compounds. Zuckerman JJ (ed) : Tin and Malignant Cell Growth. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988, pp 83-106.
- 4) Arakawa Y: Chapter 23: Antitumor activity of organotin compounds and inhibition of membrane signal transduction. Kumar Das VG, Gielen M (ed) : Chemistry and Technology of Silicon and Tin. Oxford University Press, Oxford, 1992, pp 319-333.
- 5) Arakawa, Y: Cellular and biochemical aspects of antitumor activity of organotin compounds. Kumar Das VG (ed) : Main Group Elements and Their Compounds. Narosa Publishing House, New Dehli, India, 1996, pp 422-445.
- 6) Arakawa Y. Tin and Immunity -Review-. Biomed. Res. Trace Elements 6 (2) : 1-34, 1995.