

胸腺における微量元素と T 細胞の動態

荒川 泰昭¹⁾・室賀 清美¹⁾・小石 秀夫²⁾・森田 亮³⁾
岩崎 徹³⁾・中島 晴信⁴⁾・堀 伸二郎⁴⁾
(静岡県立大学*, ¹⁾公衆衛生学教室, ²⁾特殊栄養学教室, ³⁾動物実験センター
⁴⁾大阪府立公衆衛生研究所**)

Movement of Trace Elements and T Cell in the Thymus

Yasuaki ARAKAWA¹⁾, Kiyomi MUROGA¹⁾, Hideo KOISHI²⁾, Akira MORITA³⁾,
Toru IWASAKI³⁾, Harunobu NAKASHIMA⁴⁾, Shinjiro HORI⁴⁾

¹⁾Department of Hygiene & Preventive Medicine, ²⁾Department of Human Nutrition, Faculty of Food and Nutritional Sciences, ³⁾Animal Experimental Center, The University of Shizuoka, and ⁴⁾Osaka Prefectural Institute of Public Health

Movement of thymocytes and peripheral T cells of manganese deficiency, zinc deficiency and organotin-induced thymus atrophy in SPF Wistar-derived rat was analyzed on a Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) with monoclonal antibodies to rat cell surface determinants. In manganese deficient thymocytes, there was no significant difference in cell subpopulations. However, significant increases in percentage of CD4 antigen cells (Rat T helper cell and macrophages) and CD8 antigen cells (Rat T suppressor/cytotoxic cells), and a significant decrease in percentage of unlabelled cells were seen in peripheral T cells of manganese deficiency rats. Significant increases in percentage of CD4 antigen cells, CD8 antigen cells and unlabelled cells and a decrease in percentage of undifferentiated cells were seen in zinc deficient thymocytes. On the other hand, an extreme decrease in CD4 and CD8 antigen cells, undifferentiated cells, and an extreme increase in unlabelled cells were seen in peripheral T cells of zinc deficiency rats. The ratio of CD4/CD8 decreased from 2.23 to 0.62. This result suggests the changes of not only number but also quality (or structure) of the cells. In organotin-induced thymus atrophy, there were increases in percentage of CD4 and CD8 antigen cells and unlabelled cells, and a decrease in percentage of undifferentiated cells in the thymocytes. However, a significant decrease in CD4 antigen cells and a significant increase in unlabelled cells were seen in peripheral T cells. The ratio of CD4/CD8 decreased from 4.69 to 3.66.

*所在地：静岡市谷田395 (〒422)

**所在地：大阪市東成区中道1-3-69 (〒537)

微量元素の欠乏（とくに亜鉛欠乏）や有機錫による中毒によって胸腺萎縮が誘発され、最終的には免疫機能が低下する。しかし、このような欠乏あるいは中毒による栄養障害が何故、免疫中枢臓器である胸腺を萎縮させるのか、また免疫機能を低下させるのかなど、そのメカニズムについては全く解明されていない。おそらく、そのターゲットは量的には胸腺細胞（T細胞）の消失、質的には胸腺細胞の分化・成熟の程度にあるように思われる。

従って、本研究では微量元素の欠乏が免疫機能の低下にどのように結びついているのかを明らかにするために、胸腺を中心に欠乏あるいは中毒という全く相反する方向から揺さぶりをかけながら、胸腺におけるT細胞の分化・成熟の程度、さらにはT細胞膜表面抗原の変化などを検索した。すなわち、各種モノクローナル抗体を用いてマンガン欠乏、亜鉛欠乏ならびに有機錫誘導胸腺萎縮時のT細胞について、その細胞動態を細胞自動解析分離装置（Fluorescence Activated Cell Sorter）を用いて解析した。

実 験 方 法

1. 動物実験

1)マンガン欠乏状態の胸腺の作製：動物はWistar系のSPFラットを使用し、マンガン欠乏飼料は改変AIN配合精製飼料（Mn含量0.03mg%）を使用した。なお、コントロール群飼料のMn含量は5.4mg%である。飲料水は自作の超純水を使用した。マンガン欠乏状態の胸腺は、SPF動物実験施設において2世代にわたって飼育したラットのうち、2代目の10週齢ラットから採取した。

2)亜鉛欠乏状態の胸腺の作製：動物はWistar系のSPFラットを使用し、亜鉛欠乏飼料は亜鉛欠乏試験飼料（オリエンタル酵母KK、Zn含量0.095mg%）を使用した。なお、コントロール群飼料のZn含量は3.0mg%である。飲料水は自作の超純水を使用した。亜鉛欠乏状態の胸腺は、SPF動物実験施設において、乳離れしたばかりの幼若ラット（3週齢、雄性、40g前後）からスタートし、4～9週間飼育したラットから採取した。

3)有機錫による萎縮胸腺の作製：Wistar系幼若ラット（雄性、3週齢、40g前後）にジブチル錫を100ppm含むNMF固形飼料を実験開始より10日間自由摂取させた。

2. 細胞表面抗原の解析

各グループのラットから胸腺細胞ならびに末梢血リンパ球を採取し、 5×10^6 cell/100 μ lの細胞浮遊液を作製し、CD4（Rat T helper cells and macrophages）、CD8（Rat T suppressor/cytotoxic cells）およびThy1.1（総T cells）に対する蛍光標識モノクローナル抗体とそれぞれインキュベートして、ダブル染色し、これを細胞自動解析分離装置（FACS can）にかけ、細胞動態を解析した。

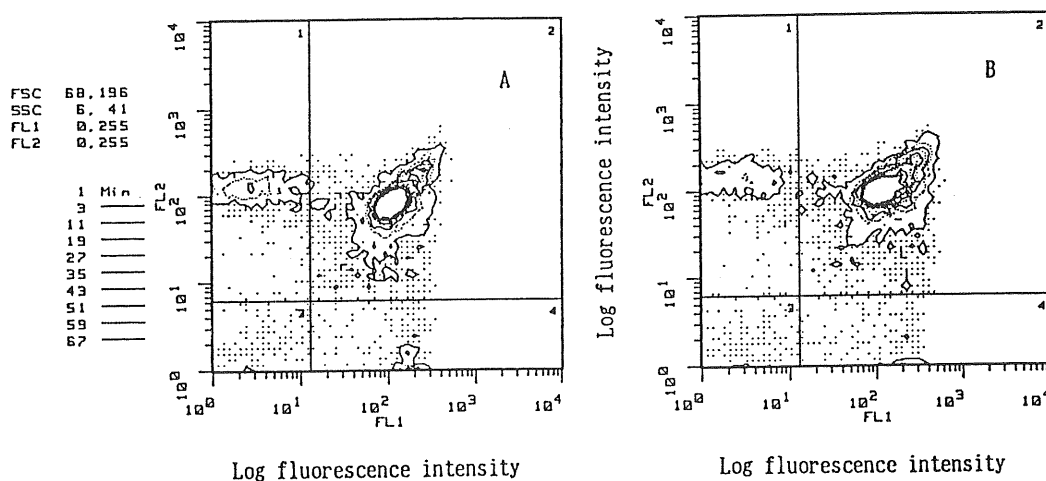
結 果 と 考 察

マンガン欠乏においては、グルコースの細胞膜透過性の低下などグルコースの利用障害や結合組織の異常とくにムコ多糖体の合成障害などがみられる。Table 1に胸腺中のマンガンの動態を示す。マンガン欠乏飼料で飼育した2世代目のラットにおける胸腺中のMn量は10週目では対照群の1/5に低下しており、明らかにMn欠乏状態の胸腺ができている。このときの胸腺細胞ならびに末梢血リンパ球の動態を

Table 1. Determination of manganese in the thymus

	The second generation rat (ages)			
	40days		70days	
	Total Mn content (ng)	Mn concentration (ng/g tissue)	Total Mn content (ng)	Mn concentration (ng/g tissue)
control	52.23±0.58	141.53±11.48	50.12±6.86	116.4±6.15
Mn-deficiency	41.10±4.46	115.10± 6.64	13.14±1.81	39.9±7.38

The thymus were prepared from the second generation rat (SPF Wistar-derived, male, 6-10 weeks ages) being fed with Mn-deficient diet over two generations. Prior to application to AAS, samples were decomposed by high frequency heating (S. H. F. 2450MHz). The determination of Mn was performed by using flameless atomic absorption spectrophotometer (AAS). Each value represents the mean ± SE of five determinations.

**Fig. 1.** FACS Analysis of FITC-MRC OX-8 and/or PE-W3/25 labelled rat thymocytes

A: control B: manganese deficiency

1. T helper cells (W3/25) 2. undifferentiated cells
3. unlabelled cells 4. T suppressor cells (OX-8)

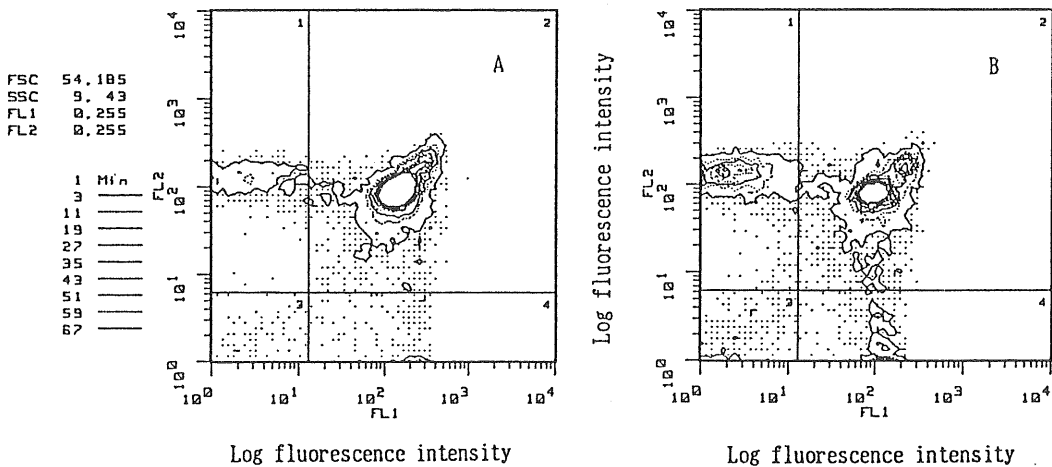
Fig. 1 および Table 2 に示す。胸腺細胞においてはほとんど有意差はみられなかったが、末梢血リンパ球において著しい有意差がみられた。すなわち、CD 4 および CD 8 抗原をもつ細胞の割合が増大し、逆に染色不可細胞（末血の場合、大部分が B cell）の割合が減少した。また、CD4/CD8の比をみると胸腺細胞ではやゝ減少傾向を示したが、末梢血リンパ球では逆に増大し、抗体産生能における質の変化も示唆された。

亜鉛欠乏は免疫不全を誘発し、この不全の特徴は胸腺やリンパ節など胸腺依存性部位の萎縮とそれに

Table 2. Cell surface marker analysis of thymocytes and peripheral T cells of manganese deficiency rat

Lymphocyte subpopulation	Relative count (%) ^a			
	Thymocytes		Peripheral T cells	
	Control	Mn-deficiency	Control	Mn-deficiency
T helper cells (W 3/25)	11.79±1.89	9.65±1.32	37.20±2.38	52.60±2.44
undifferentiated cells	82.60±2.28	85.20±1.56	1.31±0.39	1.40±0.66
unlabelled cells	1.73±0.17	1.69±0.18	42.02±4.33	21.85±6.03
T suppressor cells (OX-8)	3.88±0.51	3.40±0.34	19.48±2.18	24.15±4.35
Thy 1,1 (MRC OX-7)	99.88±0.07	99.74±0.19	40.86±1.79	35.98±5.52
CD4/CD8	3.04	2.84	1.91	2.18

a The values are the mean $\pm$ SE of 5 animals per group. Using the second generation rat (SPF Wistar-derived, male, 10 weeks ages) being fed with Mn-deficient diet (Modified AIN-B) over two generations, cell suspensions were made of the thymus and peripheral blood cells, and lymphocyte subpopulations analyzed on a fluorescence activated cell sorter (FACS) with monoclonal antibodies to rat cell surface determinants. The clones of antibodies used are indicated between parentheses.

**Fig. 2.** FACS Analysis of FITC-MRC OX-8 and/or PE-W3/25 labelled rat thymocytes

A. control B: zinc deficiency

1. T helper cells (W3/25) 2. undifferentiated cells
 3. unlabelled cells 4. T. suppressor cells (OX-8)

Table 3. Determination of zinc in the thymus

	Total Zn content		Zn concentration ($\mu\text{g/g}$ tissue)
control	12.27 $\pm$ 1.88	(μg)	26.47 $\pm$ 2.97
Zn-deficiency	512.31 $\pm$ 58.99	(ng)	17.96 $\pm$ 2.36

The thymus were prepared SPF Wistar-derived male rats (9 weeks ages) fed with Zn-deficient diet for 6 weeks. Prior to application to AAS, samples were decomposed by high frequency heating (S.H.F.2450MHz). The determination of Zn was performed by using flame and flameless atomic absorption spectrophotometer (AAS). Each value represents the mean $\pm$ SE of five determinations.

関連した細胞性免疫の不全である。胸腺中の亜鉛の動態を Table 3 に示す。亜鉛欠乏飼料で 6 週間飼育した 9 週齢のラットにおける胸腺中の Zn 量は対照群の 1/24 に低下しており、明らかに Zn 欠乏状態の胸腺ができている。このときの胸腺細胞ならびに末梢血リンパ球の動態を Fig. 2 および Table 4 に示す。胸腺細胞においては CD 4 抗原をもつ細胞の割合の著しい増大と CD 8 抗原をもつ細胞および染色不可細胞の若干の増大、そして未分化細胞の割合の減少がみられ、CD4/CD8 の比も若干の増大がみられた。これに反し、末梢血リンパ球では CD 4 ならびに CD 8 抗原をもつ細胞および未分化細胞の極端な減少、そして染色不可細胞の極端な増大がみられ、CD4/CD8 の比も 2.32 から 0.62 へと極端に減少し、抗体産生能の低下が示唆された。このような亜鉛欠乏状態では著しい胸腺の萎縮が誘発されており、とくに胸腺内では未熟細胞の消失が著しい。これは皮質領域の増殖の激しい未熟細胞の方が成熟細胞に比べ、より損傷を受けやすいためであり、従って、胸腺細胞においては相対的に未分化細胞の割合が低くなり、かつ CD 4 や CD 8 抗原などをもつ成熟細胞の割合が高くなっているものと思われる。そして、末梢血リンパ球では逆に、胸腺萎縮により胸腺から末梢血への成熟細胞の供給が量的に激減したため、CD 4 および CD 8 抗原細胞の減少、染色不可細胞の増大が相対的に観察されるものと思われる。

一方、各種有機錫化合物の中で、ジブチル錫、ジオクチル錫、トリブチル錫などは亜鉛と同様に、細胞性免疫の中核臓器である胸腺を著しく萎縮させる¹⁻⁶⁾。この選択的な胸腺の萎縮はラットにおけるジブチル錫 (100ppm 含有, NMF 固形飼料) 経口投与の場合、約 1 週間で観察され、体重当たりの相対的臓器重量は対照群の 40% にまで低下する (カゼイン飼料の場合はジブチル錫 5 ppm 含有で同程度に低下する)。しかし、正常食に戻すとこの萎縮は速やかに回復する。すなわち、この萎縮現象は量-依存性であり、かつ可逆性である。胸腺中の有機錫の濃度と萎縮の程度との関係を Fig. 3 に示す。胸腺萎縮の程度は胸腺中のジブチル錫濃度と相関しており、ジブチル錫濃度の低下とともにその萎縮も回復した。胸腺萎縮時の胸腺細胞ならびに末梢血リンパ球の動態を Fig. 4 および Table 5 に示す。胸腺細胞においては CD 4 および CD 8 抗原をもつ細胞および染色不可細胞の割合が若干増大し、未分化細胞の割合が減少した。CD4/CD8 の比では若干の増大がみられた。これに反し、末梢血リンパ球では相対的に CD 4 抗原細胞の著しい減少と染色不可細胞の著しい増大がみられた。CD4/CD8 の比は 4.69 から 3.66 へと

Table 4. Cell surface marker analysis of thymocytes and peripheral T cells of zinc deficiency rat

Lymphocyte subpopulation	Relative count (%) ^a			
	Thymocytes		Peripheral T cells	
	Control	Zn-deficiency	Control	Zn-deficiency
T helper cells (W3/25)	10.42±2.32	20.49±6.64	49.77±2.97	1.59±0.98
undifferentiated cells	84.79±3.06	71.09±7.53	3.36±0.05	0.06±0.04
unabelled cells	1.67±0.32	3.28±0.01	24.51±5.02	95.81±2.67
T suppressor cells (OX-8)	3.12±0.57	5.14±0.90	22.36±2.09	2.55±3.58
Thy1,1 (MRC OX-7)	99.83±0.05	99.70±0.10	38.30±5.30	4.30±2.00
CD4/CD8	3.34	3.99	2.23	0.62

^a The values are the mean±SE of 5 SPF Wistar-derived male rats per group. After 4-9 weeks of feeding with Zn-deficient diet (Oriental Yeast Co. Ltd.), cell suspensions were made of the thymus and peripheral blood cells, and lymphocyte subpopulations analyzed on a fluorescence activated cell sorter (FACS) with monoclonal antibodies to rat cell surface determinants. The clones of antibodies used are indicated between parentheses.

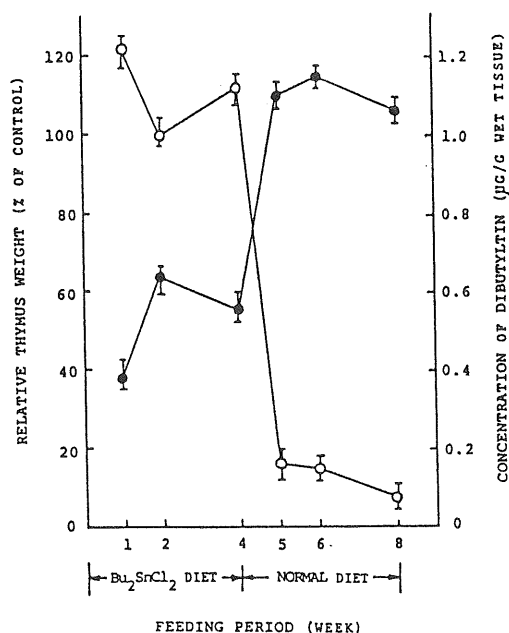


Fig. 3. Relationship between thymus atrophy and the concentration of dibutyltin in the thymus of rats fed 100ppm Bu_2SnCl_2 for 4 weeks and after that period a normal diet for 6 weeks. ○, Concentration of Bu_2SnCl_2 in rat thymus ($\mu\text{g/g}$ tissue); ●, relative thymus weights are given as percentages of control values.

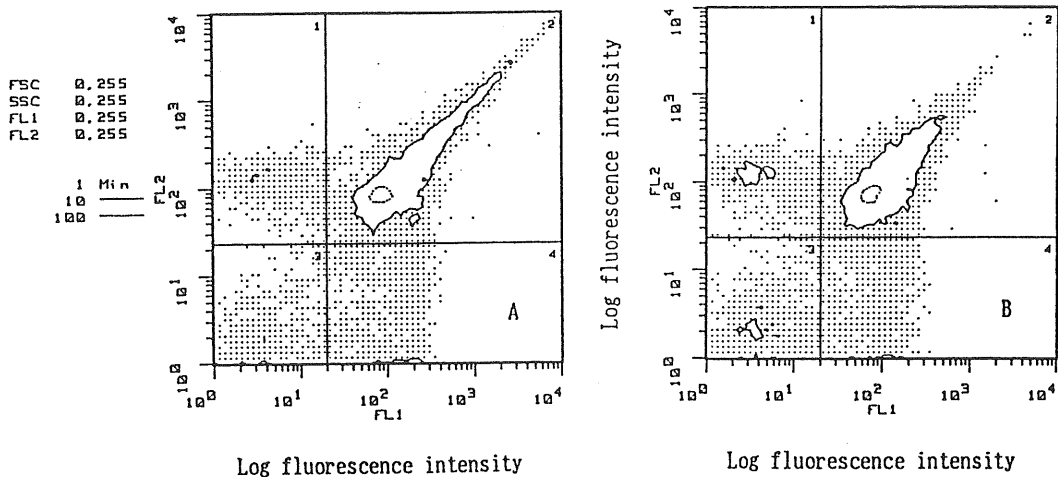


Fig. 4. FACS Analysis of FITC-MRC OX-8 and/or PE-W3/25 labelled rat thymocytes

A: control B: organotin-induced thymus atrophy

1. T. helper cells (W3/25) 2. undifferentiated cells
3. unlabelled cells 4. T suppressor cells (OX-8)

Table 5. Cell surface marker analysis of thymocytes and peripheral T cells of rat induced thymus atrophy by organotin compound

Lymphocyte subpopulation	Relative count(%) ^a			
	Thymocytes		Peripheral T cells	
	Control	Thymus atrophy	Control	Thymus atrophy
T helper cells (W3/25)	7.51±0.39	9.29±0.66	53.61±4.87	44.61±4.70
undifferentiated cells	73.94±2.68	65.67±2.68	0.92±0.33	0.88±0.16
unlabelled cells	7.64±1.71	12.61±1.99	33.83±5.16	42.33±4.36
T suppressor cells (OX-8)	10.91±1.61	12.43±0.96	11.44±0.75	12.18±1.07
Thy1.1 (MRC OX-7)	99.86±0.03	99.73±0.17	39.76±2.86	12.11±3.52
CD4/CD8	0.69	0.75	4.69	3.66

^a The values are the mean±SE of 5 Wistar-derived weanling rats (male, 40-45g) per group.

After 10 days of feeding with NMF solid diet containing 100ppm Bu₂SnCl₂ (Oriental Yeast Co. Ltd.), cell suspensions were made of the thymus and peripheral blood cells, and lymphocyte subpopulations analyzed on a fluorescence activated cell sorter (FACS) with monoclonal antibodies to rat cell surface determinants. The clones of antibodies used are indicated between parentheses.

減少し、ラットの場合、抗体産生能の低下も若干併発していることが示唆された。有機錫による胸腺萎縮はとくに皮質領域の未熟細胞の消失によるものであるが、これは Table 6 に示すように、未熟細胞の方が分化・成熟した細胞より有機錫に対して抵抗性が弱いためである。従って、胸腺内では相対的に細胞バランスが崩れ、CD 4 および CD 8 抗原をもつ細胞の割合が高くなり、未分化細胞の割合が低くなっているものと思われる。そして、この萎縮による胸腺細胞の絶対数の激減から、分化・成熟した細胞の

Table 6. (^3H)-thymidine incorporation in thymocyte cultures of cortisone-treated and-untreated rats under the addition of dibutyltin dichloride (Bu_2SnCl_2)

Cortisone	Uptake of ^3H -labeled thymidine (% of control)		
	Molarity of Bu_2SnCl_2		Control (no Bu_2SnCl_2)
	2.5×10^{-6}	5.0×10^{-6}	
treated	32.1	22.4	100
untreated	8.1	7.4	100

末梢血への供給が量的に低下し、末梢血リンパ球では相対的に CD 4 抗原をもつ細胞などの割合が低くなっているものと思われる。

以上の結果を総合すると、マンガン欠乏、亜鉛欠乏、有機錫誘導胸腺萎縮のいずれの場合も、細胞の量的変化もさることながら、CD4/CD8の比の変化にみられるように質的变化が十分に観察される。すなわち、T細胞の膜表面抗原の変化、言いかえれば、胸腺における分化・成熟の過程での影響が十分に窺われる。今後、他の抗原についても例数を増やし、そのメカニズムを検討してゆきたい。(なお、本研究の一部はソルト・サイエンス研究財団の研究助成金(助成番号9132)によるものである)

文 献

1. 荒川泰昭, 新川加奈子, 森本絢美, 小林俊秀, 小石秀夫 (1989) 微量栄養素研究 6 : 43
2. 荒川泰昭, 和田攻 (1986) 医学のあゆみ, 136(3) : 177
3. 荒川泰昭 (1991) 蛋白質・核酸・酵素36(3)臨時増刊号 “動物細胞におけるリン脂質代謝” : 462
4. ARAKAWA, Y. (1990) Sugiyama Chemical & Industrial Laboratory Annual Report : 151
5. ARAKAWA, Y. (1991) in “Chemistry and Technology of Silicon and Tin” ed. by M. Gielen, Oxford University Press, UK
6. ARAKAWA, Y. and O. WADA (1988) in “Tin and Malignant Cell Growth”, ed by J. J. ZUCKERMAN, CRC Press, Florida: Chapter 9 (pp. 83-106)