

有機錫による胸腺萎縮とその耐性発現の機序解析

村田 純子¹⁾, 荒川 泰昭¹⁾, 中島 晴信²⁾, 大森 佐与子³⁾

武内 孝之⁴⁾, 中野 幸廣⁴⁾, 和田 攻⁵⁾

¹⁾静岡県立大学・公衆衛生学教室, ²⁾大阪府立公衆衛生研究所

³⁾大妻女子大学, ⁴⁾京都大学・原子炉実験所, ⁵⁾埼玉医科大学

Analysis of the Mechanism for Organotin- Induced Thymus Atrophy and Its Tolerance Manifestation

Junko Murata¹⁾ Yasuaki Arakawa¹⁾, Harunobu Nakashima²⁾, Sayoko Ohmori³⁾,

Takayuki Takeuchi⁴⁾, Yukihiro Nakano⁴⁾, Osamu Wada⁵⁾

¹⁾Department of Hygiene & Preventive Medicine, Faculty of Health Science, The University of Shizuoka,

²⁾Osaka Prefectural Institute of Public Health, ³⁾Ohzuma Women University,

⁴⁾Research Reactor Institute, Kyoto University, ⁵⁾Saitama Medical College

Dialkyltin compounds such as dibutyltin and dioctyltin induce a severe thymus atrophy and a concurrent cellular immunodeficiency. However, this atrophy is recovered by a long-term exposure (5 ~ 8 weeks), that is, a tolerance for the dibutyltin-induced thymus atrophy has become apparent.

This tolerance is not due to inducing the generation of degradation enzyme working in the dealkylation of organotins. Rather it appears to be caused by inducing the generation of a dibutyltin-binding substance or an unknown substance which is capable of preventing the dibutyltin-induced suppressive effects, specifically, antiproliferation and death of the thymocytes.

は じ め に

有機錫の中でも特にジブチル錫やジオクチル錫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¹⁻⁵⁾が、この萎縮は長期間連続暴露を続けると逆に回復する。すなわち、耐性が発現してくる^{4,6)}。そこで、この耐性発現が、1) 分解酵素の誘導、すなわち有機錫の代謝に伴う無毒化に由来するものか、2) 錫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、について検討した。

実験方法

1. 動物実験

Wistar 系幼若ラット（雄性，3 週齢）を用い，有機錫投与群には 100ppm ジブチル錫含有 NMF 固形飼料を，コントロール群には無添加の NMF 固形飼料を与え，0，2，5 および 8 週間飼育した後，両群のラットから胸腺を採取した。また，萎縮時および耐性時の胸腺は同様の条件で 2 および 8 週間飼育したラットより採取した。

2. 胸腺中有機錫の分析

有機錫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. 胸腺分画と各画分中の錫および亜鉛の分析

胸腺を水溶性から脂溶性にいたる 6 画分（A，B，C，D，E，F）に分画し⁶⁾，各画分中の錫量は原子吸光法により，亜鉛量は 5-Br-PAPS 法により測定した。

4. 胸腺細胞および結合組織の抽出画分中の錫分析

萎縮時および耐性時の胸腺を胸腺細胞と結合組織に分離し，それぞれを 3. と同様の方法で 6 画分に分画し，画分（D）および（F）の錫量を原子吸光法により測定した。

5. 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

細胞死誘発の系すなわち胸腺細胞浮遊液（ $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml）に 5×10^{-6} M ジブチル錫添加の系に耐性時胸腺の画分（A）～（F）をそれぞれ添加し，37℃，5 % CO₂ in air にて 6，12 および 24 時間培養した。培養後，エリスロシンで染色しそれぞれの細胞生存率を測定した。

結果ならびに考察

1. 有機錫分解酵素誘導の検索

有機錫分解酵素の誘導を検索するため，胸腺内に存在するジブチル錫ならびにその代謝産物の動態を観察した。その結果，耐性発現時においても大部分のジブチル錫は，代謝（脱アルキル化）されずに本体のままで依然萎縮（あるいは細胞死）を誘発するに値する量として胸腺内に残存していた^{4,6)}。

2. 錫結合物質誘導の検索

錫結合物質の誘導を検索するため，胸腺を水溶性から脂溶性にいたる 6 つの画分（A，B，C，D，E，F）に分画し，各画分中の錫の動態を観察した。その結果，Fig. 1 に示すように，萎縮時の胸腺では水溶性の画分（D）に大量の錫が存在したが，耐性時には画分（F）に移行していた。画分（F）は水およびクロロホルム-メタノール（2：1）に不溶な画分であることから，錫が胸腺細胞から結合組織へ運搬される可能性が考えられた。

そこで，胸腺を胸腺細胞と結合組織に分離し，それぞれの D 画分中ならびに F 画分中の錫の動態を観察した。その結果，Fig. 2 に示すように，先の結果と同様に錫は画分（D）から（F）へと移行したが，画分（F）にくる錫は結合組織ではなく胸腺細胞においてみられた。

これらの結果より，ジブチル錫暴露によって画分（D）に現れる錫結合物質が誘導されるが，ここに貯留されていた錫は連続暴露に伴い次第に膜や腱などの不溶性の繊維性組織に運ばれていくものと考え

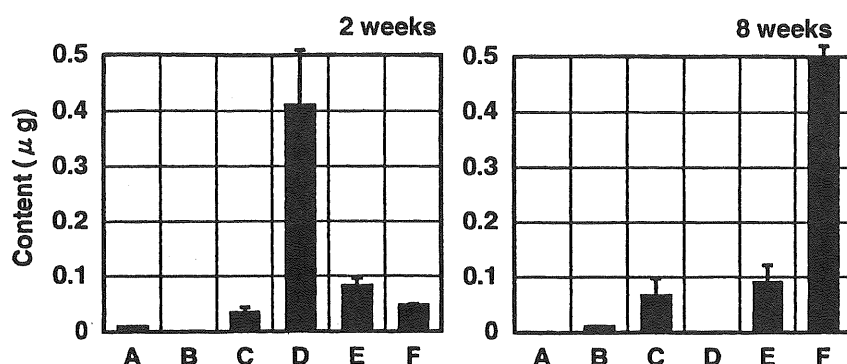


Fig. 1 The distribution of organotins in various thymus extracts of rats fed 100 ppm dibutyltin for 2 or 8 weeks. Vertical bars denote the SE of the mean for five determinations. Thymus extracts; supernatant fraction (A) and precipitates (B) after centrifugation (33,000 rpm, 1hr) of the aqueous extraction layer, organic solvent layer (C) and precipitates (D) after centrifugation (3,300 rpm, 30min) of the water-soluble fraction shaken with chloroform-methanol (2 : 1), organic solvent layer (E) and precipitates (F) after centrifugation (3,300 rpm, 30min) of the water-insoluble fraction homogenized with chloroform-methanol (2 : 1).

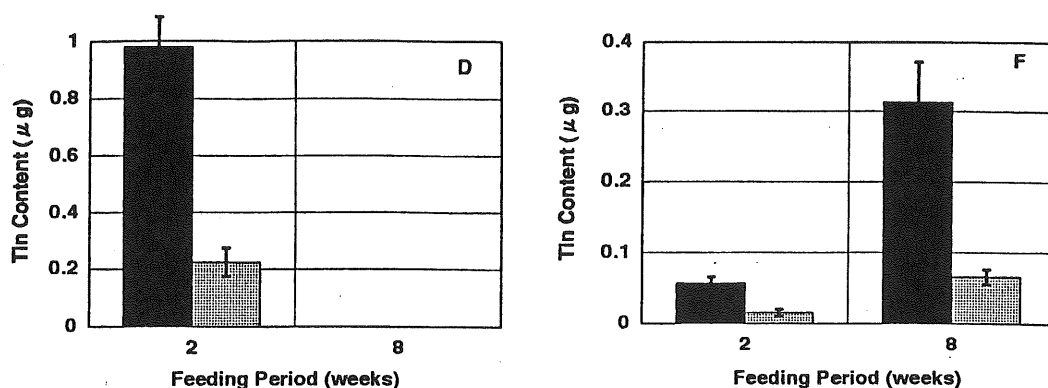


Fig. 2 The location of tin-binding extracts (D) and (F) in the thymus of rats fed 100 ppm dibutyltin dichloride for 2 or 8 weeks. The thymus was divided into two parts of thymocytes (■) and connective tissues (▨).

Vertical bars denote the SE of the mean for five determinations.

られた。

3. 細胞死抑制因子誘導の検索

細胞死抑制因子の誘導を検索するため、耐性発現時の各種胸腺抽出画分を用い、ジブチル錫誘導の細胞死 (= 萎縮の原因) に対する抑制効果を観察した。その結果、Fig. 3 に示すように 6 時間培養においては画分 (A), (D), (F) で有意の抑制効果がみられ、画分 (F) は 24 時間培養でもその効果を持続し

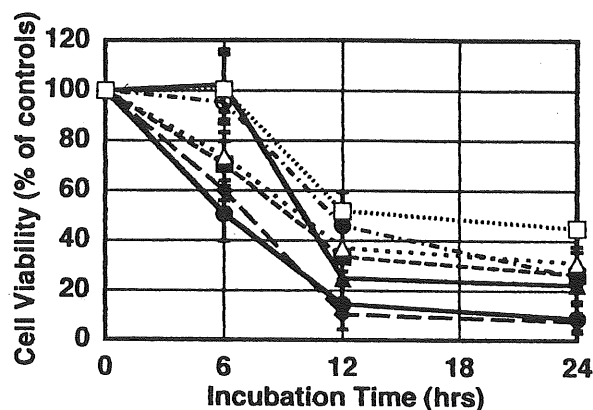


Fig. 3 Suppression of cell death by various thymus extracts of rats fed 100 ppm dibutyltin dichloride for 8 weeks. Thymocytes ($1 \sim 5 \times 10^{-6}$ cells/ml) were incubated with the same quantity of each thymus extract: A (▲), B (■), C (◆), D (○), E (△), F (□), in the presence (●) of 5×10^{-6} M dibutyltin dichloride at 37°C for 6, 12 and 24 hrs. Vertical bars denote the SE of the mean for five determinations.

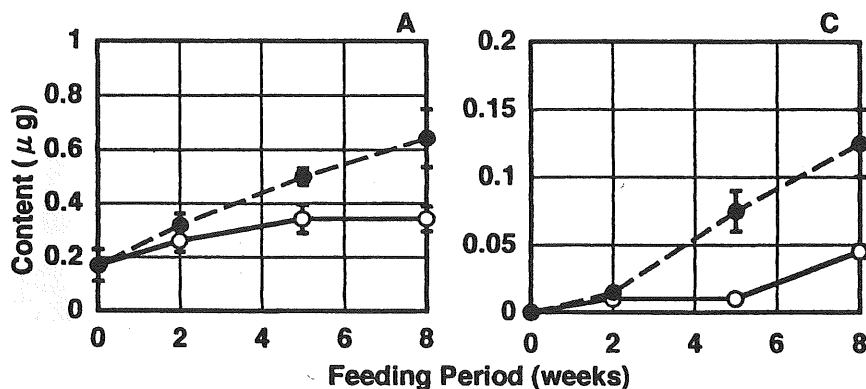


Fig. 4 Movement of zinc in various zinc-binding thymus extracts of rats fed 0 or 100 ppm dibutyltin dichloride throughout the experimental period. Vertical bars denote the SE of the mean for five determinations. (A) (C): thymus extracts. (○): control (0 ppm) group, (●): 100 ppm group.

ていた。画分 (F) は錫結合物質を含んでいるため、培養液中の有機錫と結合し、その直接細胞毒性作用を抑制していることが考えられる。一方、錫結合物質が存在しないと考えられる画分 (A) に、細胞死抑制効果が出ていることから、画分 (A) に細胞死抑制因子が誘導されていることが示唆される。

しかも、胸腺画分中の亜鉛の動態を観察してみると、Fig. 4 に示すようにジブチル錫暴露に伴い画分 (A) および微量であるが (C) で亜鉛結合物質の誘導が観察され、この誘導がジブチル錫の連続暴露に伴い増大していた。

とくに、画分 (A) はメタロチオネインファミリーを含む画分であることから、ジブチル錫暴露によってメタロチオネイン様物質が誘導され、その中に細胞死抑制因子が誘導されていると考えられた。そして、この細胞死抑制因子の発現が耐性発現の要因の一つであろうと思われた。

以上の結果を総合すると、有機錫暴露による胸腺萎縮の耐性発現は、分解酵素の誘導、すなわち有機錫の代謝に伴う無毒化によるものではなく、水およびクロロホルム-メタノールに不溶性の画分 (F) にくる錫結合物質の誘導と、それに伴う有機錫の局在化によるもの、あるいはメタロチオネインファミリー画分 (A) にある細胞死抑制因子の発現によるものであり、と考えられた。

参 考 文 献

- 1) Arakawa, Y. et al. : Chapter 9, Suppression of cell proliferation by certain organotin compounds. In Tin and Malignant Cell Growth, (Zuckerman, J. J., ed.), CRC Press, Florida, U.S.A., 83-106, 1988
- 2) Arakawa, Y. : Chapter 23, Antitumor activity of organotin compounds and inhibition of membrane signal transduction. in Chemistry and Technology of Silicon and Tin. (Kumar Das V. G., Gielen, M., ed.). Oxford University Press, Oxford, U. K., 319-333, 1992.
- 3) Arakawa, Y. et al. : Chapter 4, Biological properties of alkyltin compounds. in Metal Ions in Biological Systems, Volume 29, Biological Properties of Metal Alkyl Derivatives. (Sigel, H., ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A., 101-136, 1993.
- 4) Arakawa, Y. : Tin and Immunity, -Review-. Biomed. Res. Trace Elements Vol.6 No.2, 1-34, 1995.
- 5) Arakawa, Y. : Cellular and biochemical aspects of antitumor activity of organotin compounds. In Main Group Elements and Their Compounds. (Kumar Das, V. G. ed.) Narosa Publishing House, New Dehli, India, pp.422-445, 1996
- 6) Arakawa, Y. : Chapter 2. Recent studies on the mode of biological action of the di- and tri-alkyltin compounds. in Chemistry of Tin. (Smith, P. J., ed.), Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Glasgow, U. K. 1996.