

クロルプロフェム(CIPC)がICRマウスとBALB/cマウスの免疫系に及ぼす影響

山口敦美, 藤谷知子, 大橋則雄, 中江大, 小縣昭夫

クロロプロファム(CIPC)がICRマウスとBALB/cマウスの免疫系に及ぼす影響

山口敦美*, 藤谷知子*, 大橋則雄*, 中江大**, 小縣昭夫**

クロロプロファム(CIPC)の免疫系への影響をICR及びBALB/cの2系統のマウスで検討した。1,000 mg/kg CIPC投与で、ICRマウスの臓器重量は、胸腺が減少し、脾臓及び肝臓が増加したが、腎臓及び副腎は変化がなかった。胸腺の細胞のうちCD3⁺CD4⁺CD8⁺細胞が有意に減少した。BALB/cでは有意な変化はなかった。免疫系を抑制するコルチコステロンの変化に差はなく、CIPCは免疫系に直接作用する可能性が考えられた。2系統のマウスの血中リンパ球のサブタイプには差があり、免疫反応への影響が考えられた

キーワード: 農薬, クロロプロファム, ICRマウス, BALB/cマウス, リンパ球, コルチコステロン

はじめに

クロロプロファム (CIPC: isopropyl N-(3-chlorophenyl) carbamate)は日本では除草剤として使用されている農薬で、植物の根から吸収され細胞分裂を抑制することで作用する¹⁻³⁾。日本では農薬として以外の使用は許可されていないが、外国では、ジャガイモの発芽防止に使用されており、日本に輸入されるジャガイモ加工製品から頻りに検出される⁴⁾。除草剤としての残留基準値は0.05 ppmであるが、ジャガイモの残留基準値は50 ppmである。一日許容摂取量は0.1 mg/kg体重である。カナダでの調査では、果物、野菜、魚や加工品などの多種にわたる食品から検出されており、基準値以下であるが、量としては摂取されるのが多い農薬である⁵⁾。

これまでに、我々はマウスとラットで亜慢性毒性試験を行ってきており、メトヘモグロビン血症、肝臓と脾臓重量の増加、胸腺重量の減少などを観察してきた⁶⁸⁾。脾臓や胸腺などの免疫を担う臓器の異常が観察されていること、つまりメトヘモグロビン血症に由来する脾臓での赤血球の増加が脾臓中のリンパ球を減少させている可能性や、胸腺重量の減少が胸腺細胞中の特定のリンパ球の減少をともなっている可能性を考えた。このような化学物質が免疫毒性を持つかどうかを調べるために、リンパ球の変化を分析する系を確立した。確立した系を用いてCIPCが免疫毒性を持つかどうかを、ICRマウス及び、免疫系の研究に用いることが多いBALB/cマウスの2系統のマウスについて比較検討した。

実験方法

1. 材料

CIPC及びコルチコステロンはシグマ、コーンオイルは和光純薬工業から購入した。リンパ球の細胞表面抗原を検出する抗体は、PE標識anti-CD3 (clone:145-2C11), FITC標識anti-CD45R/B220 (clone:RA3-6B2), PE標識anti-CD8 (clone 53-6.7)及びFITC標識anti-CD4 (clone:GK1.5)は、ベックマン・コールターから購入した。PE-Cy5.5標識anti-CD3 (clone: 145-2C11)及びPE-Cy5.5標識anti-CD45 (clone:30-F11)はペイバイオサイエ

ンスから購入した。

2. 動物

(1)動物 日本チャールスリバー(株)から、CrIj:CD1(ICR)及びBALB/cAnNCr1CrIj(BALB/c)系統の7週齢雌マウスを購入し、24-26°C, 相対湿度50-60%, 照明12時間の動物室でチップを敷いたプラスチック製ケージで1匹ずつ、1週間予備飼育した。コルチコステロンの分析には8-15週齢の雌のマウスを使用した。予備飼育および実験中、マウスは飼料と水を自由に摂取した。

(2)投与方法 CIPCをコーンオイルで溶解し、1,000 mg/kg/10 ml, 1,250 mg/Kg/10 ml (BALB/cマウスのみ)で3日間強制経口投与した。対照はコーンオイルのみ投与した。4日目に解剖し肝臓、腎臓、脾臓、胸腺及び副腎の重量を測定した。血液は心臓から採血した。抗凝固剤としてEDTAを使用した。

3. 血液学的検査

白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン濃度, ヘマトクリット, 及び平均血球容積を多項目自動血球計数装置 (Sysmex社, KX21-NV) で測定した。

4. 脾臓・胸腺細胞の分離

脾臓及び胸腺を摘出した後、それぞれを4mlの0.5% BSAを含むPBS中で磨りの付いたスライドガラスの磨りの部分で潰した後、径57 µmのナイロンメッシュでろ過した。1,200 rpm, 5 minで遠心した。さらに4 mlの0.5% BSAを含むPBSを加えて再浮遊させ、1,200 rpm, 5 minで洗浄した。沈渣に4 mlの溶血液(0.173 M Tris-HCl (pH 7.65):0.83% NH₄Cl=1:9)を加えて、室温10 minで赤血球を溶血させた。4 mlの0.5% BSAを含むPBSで1,200 rpm, 5 minで2回洗浄して、細胞数を5 x 10⁶/mlに調整した。

5. 蛍光染色

脾臓及び胸腺由来の5 x 10⁶/mlの細胞浮遊液を96 wellのプレートに0.1 mlずつ分注した。脾臓の細胞はPE標識anti-CD3及びFITC標識anti-CD45R/B220抗体を加え、胸腺の細胞はPE-Cy5.5標識anti-CD3, PE標識anti-CD8及びFITC標識

* 東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター環境保健部 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

anti-CD4を加え室温で30分間インキュベーションした後、250 μ lの0.5% BSAを含むPBSで1,200 rpm, 5 minで2回洗浄し450 μ lの0.5% BSAを含むPBSに再浮遊し、径57 μ mのナイロンメッシュでろ過した。血液中のリンパ球は、血液0.1 mlに、PE-Cy5.5標識anti-CD3, PE標識anti-CD8及びFITC標識anti-CD4またはPE-Cy5.5標識anti-CD45, PE標識anti-CD8及びFITC標識anti-CD4を加え30分間インキュベーションした後、4 mlの溶血液(Tris 1 g, NH_4Cl 2.8 g /500 ml)を加えて氷中で5分間インキュベーションした後、同量のPBSで希釈し、1,200 rpm, 5 minで遠心した。さらに4 mlの0.5% BSAを含むPBSで1,200 rpm, 5 minで2回洗浄し、450 μ lの0.5% BSAを含むPBSに再浮遊した。蛍光染色した細胞はフローサイトメリー(Cell Lab Quanta SC・ベックマン・コールター社製)で測定した。血液リンパ球はフローサイトメリーでPE-Cy5.5標識CD45抗体で染色した白血球画分を抽出し、さらに側方散乱の程度で白血球画分からリンパ球画分を決定した。

6. コルチコステロンの定量

コルチコステロンの定量は硫酸蛍光法で行った⁹⁾。0.5 mlの血漿に3.5 mlのジクロロメタンを加え15秒間攪拌し 3,000 rpm, 10 min遠心分離した。下層を取り、0.2 N NaOH, 10% Na_2SO_4 (1 ml)を重層して、15秒間攪拌し 2,500 rpm, 5 min遠心後、下層に1.0 mlの反応液(H_2SO_4 , EtOH= 7:3)を加えて15秒間攪拌し 2,500 rpm, 5 min遠心した。下層を分離して2時間後にEx /Em = 470 / 520 nmで蛍光強度を測定した。

結果

1. 体重・臓器重量の変化

3日間の投与後ICRマウス及びBALB/cマウス共に、対照と比べて、有意な体重の変化はなかった。臓器の重量と体重100 mgあたりの相対臓器重量の変化をみると、表1のようにICRマウスでは胸腺は有意に低下したが、脾臓及び肝臓は有意に増加した。一方BALB/cマウスではどれも有意な変化はなかった。

2. 血液学的変化

白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン濃度, ヘマトクリット及び平均血球容積は、ICRマウス及びBALB/cマウス共に、対照に比べて差はなかった(表2)。

3. 胸腺細胞

表3に示すように、胸腺細胞数は、ICRマウスでは対照 5.98×10^7 に対しCIPC投与(以下CIPC)では 3.50×10^7 であり有意に低下したが、BALB/cマウスでは、対照 5.14×10^7 に対しCIPC 5.43×10^7 で差はなかった。ICRマウスの胸腺の細胞の中でも、 $\text{CD}3^-$ 細胞数が対照 3.71×10^7 に対しCIPCは 1.95×10^7 であり有意に低下した。 $\text{CD}3^+$ 細胞数は対照 2.26×10^7 に対しCIPCで 1.56×10^7 と有意差はなかったが減少傾向を示した。胸腺の細胞を $\text{CD}3^-$ と $\text{CD}3^+$ に分け、さらに、 $\text{CD}4$ と $\text{CD}8$ 抗原の有無を測定した(図1)。ICRマウスでは、 $\text{CD}3^+$ 細胞のうち $\text{CD}4^+\text{CD}8^+$ の細胞数が、対照 3.62×10^7 に対しCIPCは 1.90×10^7 と有意に減少した。

$\text{CD}3^+$ 細胞でも $\text{CD}4^+\text{CD}8^+$ の細胞数が対照 1.95×10^7 に対しCIPCは 1.40×10^7 と、 $\text{CD}4^+$ の細胞数が対照 0.21×10^7 に対しCIPCは 0.11×10^7 と、 $\text{CD}8^+$ の細胞数が対照 0.09×10^7 に対しCIPCは 0.04×10^7 に減少する傾向が観察された。BALB/cマウスでは、 $\text{CD}3^+$ 細胞の $\text{CD}4^+\text{CD}8^+$ 細胞数は対照 2.02×10^7 とCIPC 2.39×10^7 で変化はなかった。 $\text{CD}3^+$ 細胞も分布に差はなかった。

4. 脾臓細胞

脾臓細胞数は、ICRマウスでは、対照の 6.60×10^7 に対しCIPCでは 8.80×10^7 で増加傾向であったが、BALB/cマウスでは対照の 7.80×10^7 に対しCIPCでは 7.48×10^7 と変化がなかった(表3)。ICRマウスの脾臓のT細胞は対照 1.89×10^7 に対しCIPCでは 2.36×10^7 , B細胞は対照 3.9×10^7 に対しCIPCでは 5.07×10^7 で脾臓の細胞の増加に比例して増加傾向を示した。BALB/cマウスではT細胞とB細胞ともに対照及びCIPCで割合及び数に変化はなかった(図2)。

5. 血液リンパ球

リンパ球の数と、その中のT細胞及びB細胞の数と割合は、ICRマウスとBALB/cマウスともに変化はなかった(表4, 図3)。また、血液細胞中の $\text{CD}3^+$ 画分の $\text{CD}4^+$, $\text{CD}4^+\text{CD}8^+$, $\text{CD}8^+$ の割合と数はICRマウスとBALB/cマウスともに変化はなかった(図4)。ICRマウスではBALB/cマウスに比べて $\text{CD}3^+ \text{CD}4^+\text{CD}8^+$ が多く、BALB/cマウスでは $\text{CD}3^+\text{CD}4^+$ が多く2系統間に差があった。

6. コルチコステロン

1,000 mg/kgのCIPCを1回投与後、0, 2, 6, 24時間後の血漿中のコルチコステロンの量を測定した(図5)。ICRマウスとBALB/cマウスともに対照に比べ2時間後には高値を示し、6時間では減少傾向であり、24時間では0時間のレベルに復帰した。データは示していないがCIPC, 1,000 mg/kgを3日間投与後24時間の血漿中のコルチコステロンの量も対照と差はなかった。

考察

フローサイトメーターを使用して胸腺細胞, 脾臓細胞と血中のリンパ球のサブタイプを分析する系を確立した。この系を用いてCIPC投与後のリンパ球の変化を測定した。これまでのマウスとラットでのCIPCを含む飼料で13週間飼育した亜急性毒性試験では、マウスはラットよりメトヘモグロビン値の上昇を生じたが、臓器重量の変化は、マウスはラットに比べ軽度であった^{6,7)}。ラットでは食餌中濃度3%で肝臓, 腎臓, 胸腺, 脾臓重量に変化が見られたが、マウスでは肝臓, 脾臓のみであり、マウスとラットに対する影響には差があった。今回のICRマウス及びBALB/cマウスへの1,000 mg/kg, 3日間の強制経口投与は、飼料での投与に換算すると、およそ0.5%に相当する。ICRマウスは脾臓の肥大が見られたことから(表1), 前回の結果同様にメトヘモグロビン血症を生じていることが推測された。BALB/cマウスではCIPCが1,000 mg/kg及びデータは示していないが1,250mg/kgの濃度でも影響はなく系統間に差があった。

表1 CIPCを投与したICRマウスとBALB/cマウスの臓器重量変化

		Thymus (mg)	Spleen (mg)	Adrenal (mg)	Liver (g)	Kidney (mg)
ICR	Corn Oil	188±11	381±21	33.0±1.4	5.136±0.21	1271±36.7
	CIPC	153±9.9*	474±24*	32.2±2.4	5.907±0.17*	1367±42.8
BALB/c	Corn Oil	211±21	534±23	33.8±0.1	5.455±0.17	1294±17.9
	CIPC	212±22	565±22	39.4±2.4	5.358±0.22	1249±30.5

臓器重量を体重100mgあたりの相対重量で示した. ICRマウス, n=12, BALB/cマウス, n=3-4, mean±SE, *p<0.05

表2 CIPCを投与したICRマウスとBALB/cマウスの血液学的変化

		白血球数 10 ² /μl	赤血球数 10 ⁴ /μl	濃度ヘモグロビン g/dL	ヘマトクリット値 %	平均血球容積 fL	血小板数 10 ⁴ /μl
ICR	Corn Oil	41±5.7	772±15.6	13.1±0.2	41.6±1.0	53.8±0.4	85.6±7.3
	CIPC	43±5.5	780±11.0	13.2±0.2	42.2±0.7	54.1±0.3	82.2±3.6
BALB/c	Corn Oil	73±15.1	890±14.4	14.1±0.3	45.7±0.8	51.3±0.3	92.3±6.9
	CIPC	78±4.7	900±10.5	14.2±0.2	46.3±0.5	51.5±0.3	91.6±7.9

ICRマウス, n=10-12, BALB/cマウス, n=3-4, mean±SE

表3 CIPC投与後のICRマウスとBALB/cマウスの
胸腺及び脾臓の細胞数

		Corn Oil	CIPC
ICR	Thymus	5.98 ± 0.70	3.50 ± 0.68 *
	CD3 ⁻	3.71 ± 0.48	1.95 ± 0.36 *
	CD3 ⁺	2.26 ± 0.42	1.56 ± 0.36
	Spleen	6.60 ± 0.47	8.80 ± 1.27
BALB/c	Thymus	5.14 ± 0.50	5.43 ± 0.55
	CD3 ⁻	2.25 ± 0.27	2.48 ± 0.27
	CD3 ⁺	2.87 ± 0.26	2.92 ± 0.30
	Spleen	7.80 ± 0.58	7.48 ± 0.76

ICRマウス, n=10, BALB/cマウス, n=7-9, mean±SE, *p<0.05

表4 CIPC投与後のICRマウスとBALB/cマウスの
血液中のリンパ球数

	Corn Oil	CIPC
	Cell Number x10 ⁷ /ml	
ICR	0.30 ± 0.07	0.31 ± 0.05
BALB/c	0.35 ± 0.04	0.38 ± 0.03

ICRマウス, n=10, BALB/cマウス, n=7-9,
mean±SE

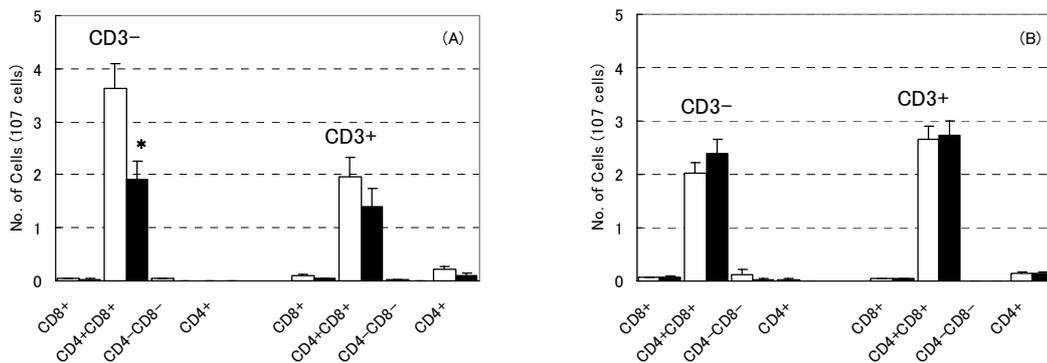


図1 CIPCを投与したICRマウスとBALB/cマウスの胸腺細胞のサブタイプの変化
 胸腺細胞を、PE標識anti-CD8, FITC標識anti-CD4とPE-Cy5.5標識anti-CD3で染色してフローサイトメーターで分離した. (A) ICRマウス, n=10 (B) BALB/cマウス, n=7-9, mean+SE, *p<0.05, □:Corn Oil, ■:CIPC

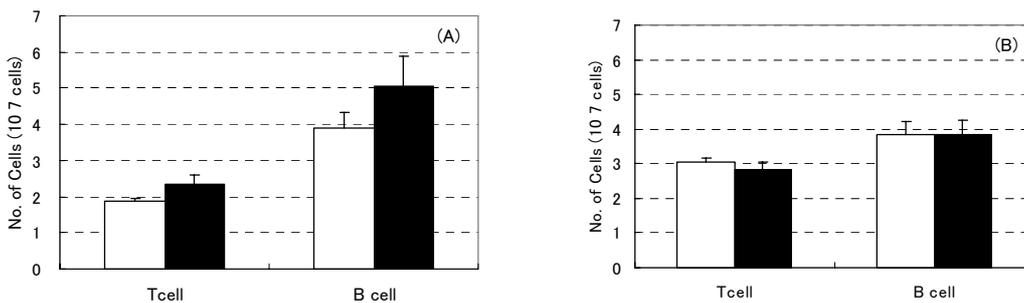


図2 CIPC投与後のICRマウスとBALB/cマウスの脾臓細胞におけるT細胞数とB細胞数
 脾臓細胞をFITC標識anti-CD45R/B220とPE標識anti-CD3で染色してフローサイトメーターで分離した.
 (A) ICRマウス, n=10 (B) BALB/cマウス, n=7-9, mean+SE, □:Corn Oil, ■:CIPC

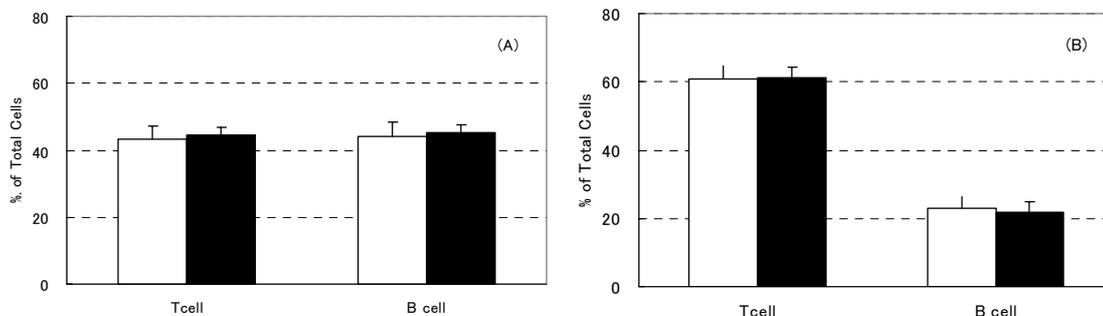


図3 CIPC投与後のICRマウスとBALB/cマウスの血液リンパ球中のT細胞とB細胞の割合
 血液をPE-Cy5.5標識anti-CD45, FITC標識anti-CD45R/B220とPE標識anti-CD3で染色してフローサイトメーターで分離した. (A) ICRマウス, n=10 (B) BALB/cマウス, n=7-9, mean+SE, □:Corn Oil, ■:CIPC

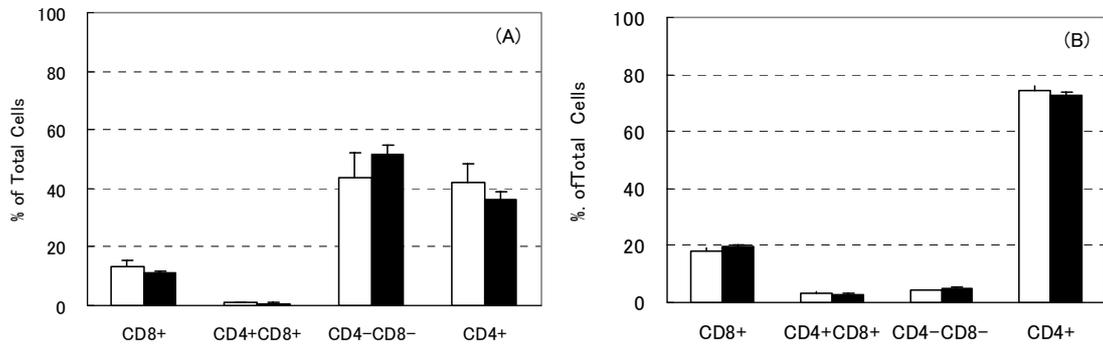


図4 CIPCを投与したICRマウスとBALB/cマウスの血液中のCD3+細胞のサブタイプの変化
 血液細胞をPE標識anti-CD8, FITC標識anti-CD4とPE-Cy5.5標識anti-CD3で染色し, 溶血後フローサイトメーターで分離した. (A) ICRマウス, n=10 (B) BALB/cマウス, n=7-9, mean+SE, □:Corn Oil, ■:CIPC

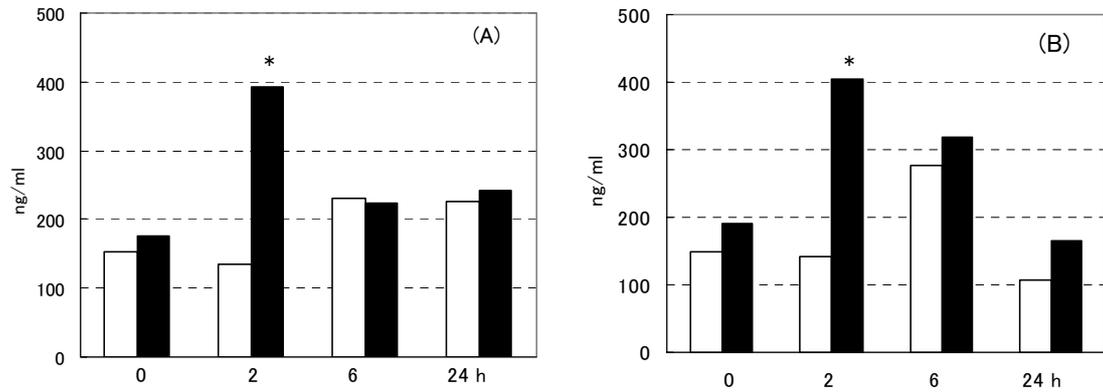


図5 CIPC投与後のICRマウスとBALB/cマウスの血中コルチコステロンの変化
 CIPC投与後0,2,6,24時間後に採血して血漿中のコルチコステロン量を測定した.
 (A) ICRマウス, n=3-4 (B) BALB/cマウス, n=3-4, mean+SE, *p<0.01, □:Corn Oil, ■:CIPC

CIPC投与ICRマウスでは胸腺細胞の減少が観察された。胸腺細胞では、CD3が発現する前にCD4とCD8両方が発現し、その後CD3が発現し、次にCD4またはCD8の一方のみを発現するように分化する。つまり、 $CD3^+CD4^+CD8^+ \rightarrow CD3^+CD4^+CD8^-$ または $CD3^+CD4^-CD8^+$ に分化が進行する。CIPC投与ICRマウスの胸腺細胞のサブタイプを分析した結果、CD3⁺でCD4⁺CD8⁺の両方を発現している細胞が対照の52.5%に減少した(p<0.05)(図1)。CD3⁺発現細胞ではCD8⁺は対照 0.09×10^7 に対しCIPCは 0.04×10^7 で44.4%に減少、CD4⁺CD8⁺は対照 1.95×10^7 に対しCIPCは 1.40×10^7 で71.8%に減少、CD4⁺は対照 0.21×10^7 に対しCIPCでは 0.11×10^7 で52.4%にそれぞれ減少した。CIPCはどのサブタイプも減少させたが、CD3⁺でCD4⁺CD8⁺が有意に減少したことから、CIPCは未分化の細胞により強くはたらくことが示唆された。

マウスの免疫系が抑制を受ける場合には、ダイオキシンのように化学物質が免疫系へ直接作用する場合^{10,11})と、エタノールやモルヒネ等の化学物質投与のストレス^{12,13})から生じる副腎皮質ホルモンのコルチコステロンの作用を介する場合がある。コルチコステロンの上昇は、胸腺の萎縮を生じ、コルチコステロンに感受性の高いCD4⁺CD8⁺細胞を特異的に減少させる¹²)。CIPCを投与後0, 2, 6, 24時間後のコルチコステロン濃度を測定した結果、ICRマウス及びBALB/cマウスともに投与2時間後に対照の2.5倍程度に上昇した(図5)。上昇したコルチコステロン濃度は6時間後では下がり、24時間後には元のレベルに低下した。コルチコステロン濃度の変化はICRマウスとBALB/cマウス共に上昇が2倍程度であり数時間後には低下すること、さらに副腎重量の増加がみられないことから(表1)、CIPC投与によるICRマウスでの胸腺細胞の減少は、コルチコステロンが関与している可能性は低いと考えられた。しかし、ICRマウス及びBALB/cマウスはコルチコステロンの感受性に差があることも考えられるので、コルチコステロンの間接的な作用の可能性は完全には否定できない。

CIPC投与の有無にかかわらずICRマウス及びBALB/cマウスの血液リンパ球のサブタイプに差が見られた(図3, 4)。血液中のリンパ球のうち免疫系に抑制的にはたらくことが報告されている^{14,15})CD3⁺CD4⁺CD8⁺細胞はBALB/cマウスにはほとんど観察されないが、ICRマウスではCD3⁺中の40%以上観察された。ICRマウスの胸腺中のCD3⁺CD4⁺CD8⁺は0.7%(対照)と0.6%

(CIPC投与群)と低く、CD3⁺細胞が作られる胸腺には僅かしか存在せず、血液中への由来が不明である。一方、BALB/cマウスの血液中のリンパ球はT細胞の割合が大きい、これらの差がICRマウスとBALB/cマウスの感受性の差に関係しているかは不明であるが、免疫への影響を検査する際には考慮する必要があると考えられた。

文献

- 1) Zilkah, S., M. E. Osband, R. Mccaffrey. *Cancer Res.*, **41**, 1879-1883, 1981.
- 2) Hoffman, J. C., K. C. Vaughn. *Protoplasma*, **179**, 61-65, 1994.
- 3) Hoffman, J. C., J. M. Mullins. *In Vitro Toxicology. A Journal of Molecular and Cellular Toxicology*, Vol. 9, No. 1, pages 61-65, 19 references, **9**, 61-65, 1996.
- 4) Nagayama, T., K. Kikugawa. *Jpn J Toxicol Environ Health*, **38**, 78-83, 1992.
- 5) Rawn, D. F., X. L. Cao, J. Doucet, et al.: *Food Addit. Contam.*, **21**, 232-250, 2004.
- 6) Fujitani, T., Y. Tada, A. T. Noguchi, et al.: *Toxicology*, **123**, 111-124, 1997.
- 7) Fujitani, T., Y. Tada, A. Fujii, et al.: *Food Chem Toxicol*, **38**, 617-625, 2000.
- 8) Fujitani, T., Y. Tada, A. T. Noguchi, et al.: *Food Chem Toxicol*, **39**, 253-259, 2001.
- 9) Zenkern N, B. D.: *J. Biol. Chem.*, **231**, 695-701., 1958.
- 10) Dooley, R. K., M. P. Holsapple. *Immunopharmacology*, **16**, 167-180, 1988.
- 11) Rowlands, J. C., J. A. Gustafsson. *Crit. Rev. Toxicol.*, **27**, 109-134, 1997.
- 12) Han, Y. C., T. L. Lin, S. B. Pruet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **123**, 16-25, 1993.
- 13) Sei, Y., K. Yoshimoto, T. McIntyre, et al.: *J. Immunol.*, **146**, 194-198, 1991.
- 14) Zhang, Z. X., L. Yang, K. J. Young, et al.: *Nat. Med.*, **6**, 782-789, 2000.
- 15) Marra, L. E., Z. X. Zhang, B. Joe, et al.: *J. Immunol.*, **172**, 1028-1035, 2004.

Effects of Chlorpropham on the Immune System of ICR and BALB/c Mice

Atsumi Yamaguchi, Tomoko Fujitani Norio Ohashi, Dai Nakae, Akio Ogata

We administered 1,000 mg/kg chlorpropham(CIPC) to ICR mice and found that their thymus weight was decreased, their spleen and liver weights were increased, and their body, kidney, and adrenal weights were unchanged. In accordance with the decrease in thymus weight, thymus cell number was decreased, particularly the number of CD3-/CD4+/CD8+ cells which were significantly decreased. However the number of lymphocytes in the spleen and blood did not change. We could not find any significant changes in BALB/c mice, and there was a different susceptibility between two strains. The amount of corticosterone in both ICR and BALB/c mice was increased 2 times that of the controls 2 hours after CIPC administration and was decreased to the 0-hour level 24 hours later. The quantity of corticosterone did not differ between the two strains, so CIPC is thought to affect the immune system of the ICR mouse directly, not through corticosterone. CIPC had no effect when administered at a dosage below 1,000 mg/kg, so CIPC likely has little effect on human body.

Keywords: pesticide, chlorpropham , ICR mice, BALB/c mice, lymphocyte, corticosterone

*Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan