原 著

トリフェニル錫の好中球機能—とくにスーパーオキシド (O_2^-) 生成および脱顆粒に及ぼす影響松井 寿夫*, 和田 攻*, 牛島 義雄**
阿久沢 孝文*, 岩井 秀明*EFFECT OF TRIPHENYLTIN CHLORIDE ON SUPEROXIDE (O_2^-) PRODUCTION IN HUMAN NEUTROPHILSHisao MATSUI,* Osamu WADA,* Yoshio USHIJIMA,**
Takafumi AKUZAWA* and Hideaki IWAI*

Brief treatment (3 min at 37°C) of human neutrophils with triphenyltin chloride (TPTCl) resulted in a dose-dependent inhibition of superoxide (O_2^-) production stimulated by concanavalin A + cytochalasin D. It was considered from the following findings that the inhibition may be caused by some functional disorders of neutrophils: 1) O_2^- generated by xanthine oxidase-acetaldehyde system was not inhibited by TPTCl. 2) There was no change in cell viability after treatment with TPTCl. When the other phenyltin compounds were examined, the relative potencies of inhibitory effect were shown to be in the order of TPTCl > diphenyltin dichloride > phenyltin trichloride > tetraphenyltin on a molar basis. Lysosomal enzyme release caused by neutrophils stimulated by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) was also inhibited by TPTCl. These results suggest that TPTCl inhibits the common pathway(s) of the two stimulus responses.

I. 緒 言

トリフェニル錫化合物は、微生物や軟体動物に対する致死効果があるため、農業用殺菌剤や防汚塗料（船底塗料）などとして広く用いられている¹⁾。労働者への曝露は、製造工程や農薬散布に際してみられ、職業性中毒では、皮膚・眼結膜・粘膜の刺激症状や消化器症状の他に、高血糖、糖尿など糖代謝障害がみられている²⁾。

トリフェニル錫の血液に対する毒性として、ウサギの赤血球に対する溶血作用³⁾、モルモットに対するリンパ球の減少および免疫抑制⁴⁾がみられている。最近、われわれは、ウサギの血小板凝集も抑制されることを *in vitro*

の実験で明らかにした⁵⁾。以上のようにトリフェニル錫化合物は種々の血液細胞に毒性を示す。しかしながら、現在まで好中球に対する作用については報告がみられない。そこで、今回は殺菌機構に重要な役割を演じる好中球のスーパーオキシド (O_2^-) 生成能に及ぼす塩化トリフェニル錫の影響について *in vitro* での検討を行い、スーパーオキシド生成阻害を起こすことを明らかにしたので報告する。

II. 実験方法

1. 好中球

好中球はヒトの末梢血より Ushijima and Nakano の方法⁶⁾にしたがって得た。末梢血 (200 ml) を血液保存液 C 液 (100 ml 中にクエン酸ナトリウム 2.63 g, クエン酸 0.327 g, リン酸ナトリウム 0.251 g, ブドウ糖 2.32 g を含有) 28 ml を含む輸血用バッグに採血し、よく混合した後、DAMON/IEC Division の遠心機 DPR-6000 で遠心 (2,000 rpm, 3 分, 4°C) した。上層の血漿を除去した後、下層の血球部分をメスシリンダーに移

* 群馬大学医学部衛生学教室

** 群馬大学附属病院中央検査部
昭和58年9月14日受付

* Department of Hygiene, Gunma University School of Medicine

** Clinical Laboratory, Gunma University School of Medicine

Received for publication, September 14, 1983

し、等量の3%デキストラン(分子量177,000, 3g/100 ml 生食水)を加え、よく混合した後室温で30~45分静置した。上層を回収し、遠心(150g, 10分)後の沈渣を30mlの低張液(10mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン, 10mM KCl, 1mM MgCl₂)に浮遊し、混在する赤血球を溶血させ、20秒後10mlの4倍濃度ダルベッコリン酸緩衝液を加えて等張に戻した。白血球を2回洗浄後、ハンクス液に浮遊し、使用時まで氷冷した。

2. 試薬

塩化トリフェニル錫(TPTCl)(東京化成)、二塩化ジフェニル錫、三塩化フェニル錫(以上Alfa Products)、テトラフェニル錫(和光純薬)は、エタノール(テトラフェニル錫はピリジン)に溶解し、 10^{-2} M から 10^{-5} M 溶液を作成した。使用直前にハンクス液で100倍希釈して用いた。コンカナバリンA(Con A)(Sigma)はダルベッコリン酸緩衝液に溶解し、サイトカラシンD(Cyt D)およびサイトカラシンB(Cyt B)(いずれもSigma)は、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して -20°C で保存した。

3. スーパーオキシドの測定

Nakagawara らの方法⁷⁾に準じて行った。全量1ml中に、好中球 1×10^6 個、0.1mMのferricytochrome c (Sigma)、種々の濃度のフェニル錫化合物を含む反応液を、 37°C 、3分間インキュベートした後、Con A(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)とCyt D(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加した。これらの刺激で生成遊離されるスーパーオキシドは、cytochrome cの還元による550nmにおける吸収増加によって測定した。550nmにおける還元cytochrome c(還元型一酸化型)の分子吸光係数は 21.1×10^3 として計算した⁸⁾。

4. Xanthine oxidase によるスーパーオキシドの測定

反応系は、白血球の代りに0.013単位のxanthine oxidase (Boehringer Mannheim GmbH)と10mM acetaldehyde (E. Merck)を用いた以外はスーパーオキシド測定と同様に行った。反応はxanthine oxidaseの添加により開始した。

5. ライソゾーム酵素の放出反応

Showell らの方法⁹⁾に準じて行った。全量1ml中に好中球 5×10^6 個、5 μg のCyt B、種々の濃度のTPTClを含む反応液を、 37°C 、5分間振盪した後、10 μl の 10^{-5} M *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)を添加して、さらに5分間振盪した。振盪後直ちに氷冷し、遠心(250g, 10分, 4°C)して上清をとり、 β -glucuronidaseの酵素液とした。 β -glucuroni-

Fig.1. The inhibitory effect of TPTCl on superoxide production by human neutrophils. Superoxide production by neutrophils was induced by Con A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and Cyt D (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cell suspensions were preincubated with TPTCl for 3 min at 37°C before stimulators were added.

dase 活性の測定は *p*-nitrophenylglucuronide を基質として、生成する *p*-nitrophenol を発色させ比色定量した¹⁰⁾。また対照白血球浮遊液を0.2% Triton X-100で処理した液の酵素活性を測定し、総 β -glucuronidase 活性とした。

6. 好中球の viability の測定

細胞質に局在する乳酸脱水素酵素 (LDH) の細胞外遊離によって好中球の viability を測定した。LDH の測定はピルビン酸を基質とする UV 法¹¹⁾によって行った。

III. 実験結果

1. 好中球のスーパーオキシド生成に及ぼす塩化トリフェニル錫 (TPTCl) の影響

好中球を種々の濃度の TPTCl と3分間インキュベートした後のスーパーオキシド生成を検討した結果を Fig.1 に示す。1 μM の TPTCl で完全にスーパーオキシド生成が阻止され、0.25 μM および 0.5 μM TPTCl では阻害は部分的であり、量-反応的な阻害を示した。

Fig. 2. The effect of TPTCl on superoxide production by the xanthine oxidase-acetaldehyde system. Xanthine oxidase (XOD) was added to the reaction mixture containing 10 mM acetaldehyde and 0.1 mM ferricytochrome *c* with or without TPTCl in Hanks' balanced salt solution.

2. Xanthine oxidase-acetaldehyde 系によって生成されたスーパーオキシドに対する TPTCl の影響

xanthine oxidase-acetaldehyde 系によってスーパーオキシドを産生させて、このスーパーオキシドによる cytochrome *c* の還元が TPTCl によって阻害されるかを検討した。その結果は Fig. 2 に示すように、全く影響がみられず、TPTCl はスーパーオキシドの scavenger ではないことが明らかになった。

3. 好中球の viability に及ぼす TPTCl の影響

LDH の細胞外遊出は、10 μ M の TPTCl と 10 分間インキュベートしたときで 5% 以下であり、この程度の濃度の TPTCl では好中球の細胞破壊ないし致死効果は認められなかった。

4. 好中球のスーパーオキシド生成に及ぼす各種フェニル錫化合物の影響

TPTCl 以外のフェニル錫化合物についてもスーパーオキシド生成阻害作用を検討し、構造活性を比較した。Fig. 3 に示すように TPTCl が最も阻害作用が強く 1 μ M の濃度で 100% 阻害するのに対し、ジフェニル錫では 1 μ M で約 30% の阻害であり、10 μ M でも 80% 阻害にとどまっている。モノフェニル錫およびテトラフェニル錫ではさらに阻害作用は弱かった。なお、阻害度はスーパーオキシド生成速度から計算した。

Fig. 3. The inhibitory effect of various phenyltin compounds on the superoxide production by human neutrophils stimulated by Con A (100 μ g/ml) and Cyt D (20 μ g/ml). Cell suspensions were preincubated with phenyltin compounds for 3 min at 37°C before stimulators were added. ●, tetraphenyltin; ○, TPTCl; ▲, diphenyltin dichloride; □, phenyltin trichloride.

Table 1. The inhibitory effect of TPTCl on FMLP-mediated neutrophil enzyme release.

Treatment ^{a)}	β -glucuronidase ^{b)} percent of total release ^{c)}
None	1.6
FMLP (10^{-7} M)	31.6
TPTCl (5 μ M) + FMLP (10^{-7} M)	1.4
(1 μ M) + FMLP (10^{-7} M)	16.4
(0.5 μ M) + FMLP (10^{-7} M)	29.0

a) Neutrophils were preincubated with TPTCl and 5 μ g/ml cytochalasin B for 5 min at 37°C, and exposed to FMLP for 5 min at 37°C.

b) The values represent the mean for two determinations.

c) Expressed as percent of total activity (100%) released by Triton X-100: 100% glucuronidase = 5.72 ± 0.11 (SD) *p*-nitrophenol nmol/hr/ 10^6 leukocytes.

5. ライソゾーム酵素の放出に及ぼす TPTCl の影響

FMLP の刺激によるライソゾーム酵素の放出が TPTCl によって阻害されるかを β -glucuronidase の放出について検討した。Table 1 に示すように β -glucuronidase 放出は TPTCl によって阻害され、その阻害にはスーパーオキシド生成阻害でみられたのと同様に

量-反応関係が認められた。

IV. 考 察

トリフェニル錫の好中球に及ぼす影響については、今まで報告がみられないが、今回の実験で TPTCl がヒト好中球のスーパーオキシド生成および FMLP による脱顆粒反応 (ライソゾーム酵素の放出) に対して阻害作用を示すことが明らかになった。xanthine oxidase-acetaldehyde 系で発生したスーパーオキシドによる cytochrome c の還元は TPTCl によって阻害されないことから、スーパーオキシド生成阻害の機作として、TPTCl が scavenger として働く可能性は否定される。また TPTCl 処理好中球に LDH の細胞外遊出がほとんどみられないことから細胞破壊などでスーパーオキシド生成が阻害されたものでもない。したがって、TPTCl による好中球のスーパーオキシド生成阻害はスーパーオキシド生成過程のいずれかが阻害作用をうけたものと考えられる。

好中球のスーパーオキシド生成は細胞膜に存在する NADPH oxidase の活性化によるとされている¹²⁾。しかし、この NADPH oxidase の活性化は、 Ca^{2+} 要求性¹³⁾であることや cAMP¹⁴⁾、蛋白分解酵素阻害剤¹⁵⁾、phospholipase 阻害剤¹⁶⁾、カルモデュリン阻害剤¹⁷⁾により抑制されること、などが知られているが、その活性誘導過程の本態については解明されていない部分が多い。

TPTCl の阻害作用がスーパーオキシド生成過程のいずれに関連するかは、今後検討する予定であるが、FMLP による脱顆粒反応も同時に阻害されていることから、好中球の両反応に共通する過程が阻害されているのではないかと考えられる。先に、トリフェニル錫による血小板凝集阻害が膜の刺激応答系に関与している可能性があることを明らかにしており⁵⁾、TPTCl が好中球に対しても同様な機序で働くことが考えられる。

好中球は貪食または膜刺激物質による刺激により、種の殺菌因子の産生、放出を行っている。それらの働きのなかでスーパーオキシドは殺菌機構の重要な因子と考えられている¹⁸⁾。したがって、今回みられた TPTCl によるスーパーオキシド生成阻害が *in vivo* でも起こるか検討する必要がある。さらに、ヒトのトリフェニル錫化合物曝露者についても感染抵抗性などに対する検討が必要である。

V. 結 論

塩化トリフェニル錫によってヒト好中球のスーパーオキシド生成阻害および脱顆粒反応阻害が μM オーダー

の低濃度で認められた。塩化トリフェニル錫は他のフェニル錫化合物に比較して強い阻害作用を示し、その強さはトリフェニル錫>ジフェニル錫>モノフェニル錫>テトラフェニル錫の順であった。この阻害作用は血小板におけるのと同様な刺激応答系に対する作用である可能性があるが、さらに検討が必要である。ヒトのトリフェニル錫曝露者について産業衛生上検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) WHO: Environmental Health Criteria 15, Tin and Organotin Compounds: A Preliminary Review, 34-41, Geneva, 1980.
- 2) Zuckerman, J.J., Reisdorf, R.P., Ellis, H.V., III and Wilkinson, R.R.: Organotin in biology and the environment, In ACS Symposium Series, No. 82 Organometals and Organometalloids: Occurrence and Fate in the Environment (F.E. Brinckman and J.M. Bellama, Eds.), 410-411, American Chemical Society, Washington, D.C., 1978.
- 3) Byington, K.H., Yeh, R.Y. and Forte, L.R.: The hemolytic activity of some trialkyltin and triphenyltin compounds, Toxicol. Appl. Pharmacol., 27: 230-240, 1974.
- 4) Verschuuren, H.G., Kroes, R., Vink, H.H. and van Esch, G.J.: Short-term toxicity studies with triphenyltin compounds in rats and guinea pigs, Food Cosmet. Toxicol., 4: 35-45, 1966.
- 5) 真鍋重夫, 和田 攻, 松井寿夫, 小野 哲, 荒川泰昭, 岩井秀明: 家兎血小板の凝集, ATP 分泌およびマロンジアルデヒド産生に及ぼすトリフェニル錫の影響, 産業医学, 25: 15-22, 1983.
- 6) Ushijima, Y. and Nakano, M.: Kinetic aspects of luminescence in activated leukocyte systems, J. Appl. Biochem., 2: 138-151, 1980.
- 7) Nakagawara, A., Nabi, B.Z.F. and Minakami, S.: An improved procedure for the diagnosis of chronic granulomatous disease, using concanavalin A and cytochalasin E, Clin. Chim. Acta, 74: 173-176, 1977.
- 8) Van Gelder, B.F. and Slater, E.C.: The extinction coefficient of cytochrome c, Biochim. Biophys. Acta, 58: 593-595, 1962.
- 9) Showell, H.J., Freer, R.J., Zigmond, S.H., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Corcoran, B. and Becker, E.L.: The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils, J. Exp. Med., 143: 1154-1169, 1976.
- 10) Bergmeyer, H.U.: Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 2 (2nd ed.), 932, Academic Press, New York, 1974.
- 11) Bergmeyer, H.U.: Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 2 (2nd ed.), 574-579, Academic Press, New York, 1974.
- 12) Goldstein, I.M., Cerqueira, M., Lind, S. and Kaplan, H.B.: Evidence that the superoxide-

- generating system of human leukocytes is associated with the cell surface, *J. Clin. Invest.*, 59 : 249-254, 1977.
- 13) Cohen, H.J. and Chovaniec, M.E. : Superoxide production by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes—The effects of N-ethylmaleimide, divalent cations, and glycolytic and mitochondrial inhibitors on the activation of the superoxide generating system, *J. Clin. Invest.*, 61 : 1088-1096, 1978.
- 14) Nakagawara, A. and Minakami, S. : Generation of superoxide anions by leukocytes treated with cytochalasin E, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64 : 760-767, 1975.
- 15) Kitagawa, S., Takaku, F. and Sakamoto, S. : Evidence that proteases are involved in superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes, *J. Clin. Invest.*, 65 : 74-81, 1980.
- 16) Smolen, J.E. and Weissmann, G. : Effects of indomethacin, 5, 8, 11, 14-eicosatetraynoic acid, and *p*-bromophenacyl bromide on lysosomal enzyme release and superoxide anion generation by human polymorphonuclear leukocytes, *Biochem. Pharmacol.*, 29 : 533-538, 1980.
- 17) Takeshige, K. and Minakami, S. : Involvement of calmodulin in phagocytotic respiratory burst of leukocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99 : 484-490, 1981.
- 18) Babior, B.M. : Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes, *N. Engl. J. Med.*, 298 : 659-668, 721-725, 1978.

著者への通信先 : 松井寿夫, 〒371 前橋市昭和町 3-39-22 群馬大学医学部衛生学教室 *Reprint requests to* Department of Hygiene, Gunma University School of Medicine, 39-22, Showa-machi 3-chome, Maebashi, 371 Japan (H. Matsui)