

de Voogt P. and Govers H.A.: Sci. Total Environ., 182:93-103, 1996.

2.2.1.2. 貝類

(吉田貴彦)

貝類の免疫機構に対する環境有害物質の影響を研究した報告は多くはない。その研究報告には、複合汚染された現場海域における調査報告、汚染海域へ貝を移送しての曝露実験、汚染海域で採取された汚染物質の実験室での曝露実験なども含まれており、研究室において行われた特定の有害因子の免疫機構に対する影響を調べた研究はさらに少ない。貝類の免疫学的検索法が十分に確立された状況に無いため研究者によって用いられた免疫学的手法も異なる。また用いる貝の種も様々である (Fisher, 1988 ; Pipe ら, 1995c ; Livingstone ら, 1992)。以下に、環境有害化学物質による貝類の免疫機構への影響を報告した文献をまとめる。

a) 金属類

カドミウム曝露によってムラサキイガイに血リンパ球の増加が見られ (Coles ら, 1995)、また、カキへのカドミウム曝露によって血リンパ球の増加 (Cheng, 1988a ; Auffret, 1994)、さらに小無顆粒球の増加と大きな細胞の減少 (Auffret, 1994)、無顆粒球の減少 (Cheng, 1988a) が報告されている。低濃度カドミウム短期曝露でムラサキイガイに血リンパ球食能の増強の報告 (Cole ら, 1995) がある。他、カキやムラサキイガイ活性酸素量には影響しないとの報告 (Anderson ら, 1992 ; Coles ら, 1995) や、ムラサキイガイにおこる血リンパ球膜傷害性の報告 (Coles ら, 1995) などがある。ハマグリを用いた感染実験では、7日間の 0.4ppm のカドミウム (塩化カドミウム) 曝露後のビブリオ感染により循環血リンパ球数の増加と、好塩基性染色細胞の細胞比率の増大が見られている (Pipe ら, 1995 c)。

銅曝露によってカキに無顆粒球比率の低下 (Cheng, 1988a)、ムラサキイガイに塩基性に染色する血リンパ球の比率の上昇 (Coles ら, 1995) がおこる。高濃度銅曝露によって

血リンパ球の減少 (Suresh ら, 1990)、カキに活性酸素量の減少 (Anderson ら, 1994) がみられる。ハマグリに7日および7週間の 0.2ppm、0.5ppm の銅 (硫酸銅) 曝露後、通常病原性を示さないビブリオ (*Vibrio tubiashii*) 感染によって循環血リンパ球数に変化は無かったものの、好塩基性染色細胞の細胞比率の減少が見られた (Pipe ら, 1995c)、0.2ppm の銅 7 週間曝露によってビブリオ感染によって亢進する血リンパ球細胞内の活性酸素量が減少し供試貝の死亡率が高まった (Pipe ら, 1995c)。

カキへのトリブチル錫によって活性酸素量が高濃度では減少し、低濃度では増加した (Fisher ら, 1989 ; Fisher ら, 1990)。

低濃度短期の重金属類曝露により血リンパ球食能の増強がみられた (Cheng ら, 1984 ; Cheng, 1988b)。高度金属汚染海域でのムラサキイガイの調査により血リンパ球食能の減弱 (Pipe ら, 1995a) が観察されている。

b) 有機物質

ムラサキイガイへのフルオランセン (Fluoranthene) の曝露によって血リンパ球は増加するが血リンパ球分画に変化無く、血リンパ球からの活性酸素放出量は増加し (Coles ら, 1994)、フェノール曝露によって血リンパ球が増加すると (Renwants, 1990) 報告されている。

多環芳香族炭化水素汚染海域でのカキの調査により血リンパ球分画の変化や血リンパ球食能の減弱が観察され (Sami ら, 1992)、実験室でのカキへの多環芳香族炭化水素曝露によってコンカナヴァリン結合部位の減少 (Sami ら, 1993) や、細胞活性の低下 (Faisal ら, 1994) が報告されている。

ハマグリの血リンパ球に6塩化ベンゼン、5塩化ベンゼンを曝露するとフラボバクテリウム属の殺菌能力が低下する (Anderson, 1990)。

Elizabeth 川の南の支流で採取した汚染沈殿物質 (クレオソート汚染) を 56 日間、カキに対して曝露したところパーキンサス属原

虫への感染を助長した (Chu ら, 1994)。
有機汚染物質曝露によって血リンパ球に変化無し (Anderson, 1981)

農薬である、DDT、トキサフェン、パラチオンの慢性曝露はカキに真菌感染 (Lowe ら, 1971) を起こした。

n-ニトロソジエチルアミン曝露はカキにパーキンサス属原虫の持続感染を起こさせた (Winstead ら, 1988)。

分担者はアコヤ貝に 1 ppm および 10 ppm のフォルムアルデヒドを 4 週間、連続あるいは間歇曝露し、NBT 還元能を有する無顆粒球の減少、血リンパ球の遊走能の減弱などを観察している (吉田、未発表)。

3) 複合汚染

環境有害化学物質曝露によって活性酸素産生量が高濃度では抑制され、低濃度では亢進することをカキで確認した (Larson ら, 1989)。非汚染海域から汚染海域に移動したカキやムラサキイガイなどの貝類に血リンパ球分画の変化が見られた (Ruddell ら, 1975; Coles ら, 1995)

低濃度短期の汚染物質曝露により血リンパ球食能の増強がみられる (Anderson, 1981)。

参考文献

- Anderson, R.S. (1981). Effects of carcinogenic and non-carcinogenic environmental pollutants on immunological functions in marine invertebrates. In *Phylogenetic Approach to Cancer* (C.J. Dawe, J.C. Harshbarger, S. Kondo, T. Sagimura and S. Takayama, eds) pp.319-331. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press.
- Anderson, R.S. (1990). Effects of pollutant-exposure on hemocyte-mediated immune function. *J. Shellfish Res.* 8(2), 435-436.
- Anderson, R.S., Oliver, L.M., and Jacobs, D. (1992). Immunotoxicity of cadmium for the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*, Gmelin, 1791): effects on haemocyte chemiluminescence. *J. Shellfish Res.* 11, 31-35.
- Anderson, R.S., Mora, L.M., and Thomson, S.A. (1994). Modulation of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocyte immune function by copper, as measured by luminol-enhanced chemiluminescence. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 108C, 215-220.
- Auffret, M and Oubella, R. (1994). Cytometric parameters of bivalve mollusks: effects of environmental factors. In *Modulators of Fish Immune Responses*, Vol. 1 (J.S.Stolen and T.C.Fletcher, eds) pp.23-32. Fair Haven:SOS Publications.
- Cheng, T.C. (1988a). In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: total and differential haemocyte counts. *J. Invertebrate Pathology.* 51, 207-214.
- Cheng, T.C. (1988b). In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: phagocytic and endocytotic indices. *J. Invertebrate Pathology.* 51, 215-220.
- Cheng, T.C., and Sullivan, J.T. (1984). Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environ. Res.* 14, 305-315.
- Chu, F.-L., and Hale, R.C. (1994). Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Environ. Res.* 38, 243-256.
- Coles, J.A., Farley, S.R., and Pipe, R.K. (1994). Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology.* 30, 367-379.
- Coles, J.A., Farley, S.R., and Pipe, R.K. (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Disease of Aquatic Organisms.* 22, 59-65.
- Faisal, M. and Demmerle-Sami, S. (1994). Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate the macromolecular synthesis in hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). In *Modulators of Fish Immune Responses*, Vol. 1 (J.S.Stolen and T.C.Fletcher, eds) pp.235-246.

Fair Haven:SOS Publications.

Fisher, W.S. (1988). Environmental influence on host response: Environmental influence on bivalve hemocyte function. American Fisheries Society Special Publication. 18. 225-237.

Fisher, W.S. Chu, F.-L.E., and Wishkovsky, A. (1989). Immunosuppression of oysters by tributyltin. J. Shellfish Research. 8. 437.

Fisher, S.W., Wishkovsky, A., and Chu, F.-L.E. (1990). Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. Archives of Environ. Contamination and Toxicology. 19, 354-360.

Larson, K.G., Roberson, B.S., and Hetrick, F.M. (1989). Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. Disease of Aquatic Organisms. 6. 131-136.

Livingstone, D.R., and Pipe, R.K. (1992). Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. In Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 25; The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture (E. Gosling, ed.) pp. 425-456. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

Lowe, J.I., Wilson, P.D., Rick, A.J., and Wilson, A.J. (1971). Chronic exposure of oysters to DDT, Toxaphene and parathion. Proceedings of the National Shellfisheries Association. 61, 71-79.

Pipe, R.K. Coles, J.A., Tomas, M.E., Fossato, V.U., and Pulsford, A.L. (1995a). Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. Aquatic Toxicology. 32, 59-73.

Renwanz, L. (1990). Internal defence system of *Mytilus edulis*. In Studies in Neuroscience, Neurobiology of *Mytilus edulis* (G.B. Stefano, ed.) pp. 256-275. Manchester: Manchester University Press.

Ruddell, C.L., and Rains, D.W. (1975). The relationship between zinc, copper and the basophils of two crassostreid oysters, *C. gigas*

and *C. virginica*. Comparative Biochemistry and Physiology. 51A, 585-591.

Sami, S., Faisal, M., and Huggett, R.J. (1992). Alterations in cytometric characteristics of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated environment. Marine Biology. 113, 247-252.

Sami, S., Faisal, M., and Huggett, R.J. (1993). Effects of laboratory exposure to sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons on the hemocytes of the American oyster *Crassostrea virginica*. Marine Environmental Research. 35, 131-135.

Suresh, K., and Mohandas, A. (1990). Hemolymph acid phosphatase activity pattern in copper-stressed bivalves. J. Invertebrate Pathology. 55, 118-125.

Winstead, J.T., and Couch, J.A. (1988). Enhancement of protozoan pathogen *Perkinsus marinus* infections in American oysters *Crassostrea virginica* exposed to the chemical carcinogen *n*-nitrosodiethylamine (DNA). Disease of Aquatic Organisms. 5, 205-213.

2.2.2 昆虫類

(和合治久)

殺虫剤の影響について

昆虫の体液が種々の化学物質の解毒において重要な役割を果たしていることは以前から指摘されていた。実際に、Joseph はゴミムシ *シダマシ* の 1 種に 5%DDT を湿らせた濾紙上を 2 分間歩かせると、3 日後の血液中の蛋白性窒素は変化しないのに、非蛋白性窒素は 50% 増加することを観察している (Joseph, 1958)。また、Jones は DDT に対する防御反応には血球は役割を果たしてはいないことを報告した (Jones, 1957)。しかし、Patton はパラチオンをコオロギに処理すると、血球数が減少することを観察した (Patton, 1961)。さらに、Rakitin は昆虫の血球がかなりの割合で投与された放射性の殺虫剤を吸収することも見出している (Rakitin, 1974)。

一方、Saxena らはワモンゴキブリにマラ

チオンを処理し、その後の血球の細胞病理学的変化と数を研究した結果、マラチオン処理後の全血球数は雌雄において減少すること、顆粒細胞が縮小化すること、プラズマ細胞の細胞質空胞が増加すること、そして原白血球の有糸分裂が増加すること、などを明らかにしている(Saxena ら、1985)。Gupta らもクロルダン処理後のワモンゴキブリにおいて血球の減少を観察しており (Gupta ら、1968)、これらの結果から、血球が何らかのメラチオンの解毒に関与していることが示唆されている。血球の形態変化については、Yeager らも塩化第2水銀を処理した蛾の1種において血球の球状化と血球凝集並びに細胞分裂の増加を観察しており(Yeager ら、1942)、こうした反応は有毒物質に対する血球応答と考えられる。

さらに、Shukla と Bahadur は別の殺虫剤であるディコルボスの昆虫血球に及ぼす影響を知るため、特にバッタの1種の雌雄成虫を用いて、ディコルボスを0.001%でオスに、0.004%でメスに処理し、処理後1日目から7日目まで血球の変化を観察した(Shukla と Bahadur、1989)。その結果、原白血球は処理1日目で小型化した、3日目ではサイズは大きくなり、5日目からほとんど正常な形態にもどること、プラズマ細胞はサイズと細胞質が増加し、外見上3極性になること、顆粒細胞はサイズが小さくなり、細胞質と核内には多くの顆粒が出現するが、メスの顆粒細胞は特に空胞が多く見られること、コアギュロサイトは核が偏心的になり形態が異常になること、小球細胞はほとんど影響を受けないこと、エノシトイドには細胞質にわずかな小滴が現れること、アディポヘモサイトは脂肪粒が消えること、などが明らかになった。

一方、Azambuja と Gracia は、サシガメの1種 *Rhodnius prolixus* を用いて、アザディラクチン *azadirachtin* (tetranortriterpenoid のこと、昆虫や線虫の摂食阻害剤とか成長阻害剤)の免疫能及びトリパノゾーマ感染に対する影響を研究した。その結果、この物質の投与でサシガメ血球数の減少が引き起こされる

こと、またクロアカ菌 (*Enterobacter cloacae*) 接種で生じるノジュール形成も減少すること、この細菌接種で誘導される抗菌蛋白質が減少すること、などが明らかになっている (Azambuja と Gracia、1992)。加えて、彼らはこの物質を餌に混ぜて与えることで、感染させたトリパノゾーマの発育が阻害されることも見出している。

除草剤の影響について

Jones らは、除草剤の2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸 (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) がオオモンシロチョウの体液中の抗菌蛋白質の活性並びにリゾチーム活性に及ぼす影響について調べた。この除草剤を20ppmの濃度で餌に混ぜて、オオモンシロチョウの幼虫に与え、体液中のセレウス菌 (*Bacillus cereus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、ルテウス菌 (*Micrococcus luteus*) に対する抗菌活性とリゾチーム活性の影響を調べてみると、対照群に比べて、除草剤処理の幼虫では特に大腸菌とルテウス菌に対する抗菌活性が低下し、リゾチーム活性も同様に減少することが判明した (Jones ら、1989)。

その他の物質の影響について (昆虫類以外)

昆虫類以外の無脊椎動物免疫系に環境の汚染物質が及ぼす影響を与えるか、については詳細な研究報告は未だにほとんどない。しかし、Cheng と Sullivan は水銀とかコバルトが二枚貝のカキ *Crassostrea virginica* の食作用に与える影響について研究し、特に水銀は食細胞のラテックス粒子の取り込みを阻害することを見出している (Cheng と Sullivan、1984)。さらに、Anderson らは汚染物質のヘキサクロロベンゼンとペンタクロロフェノールがハマグリ (1種 *Mercenaria mercenaria*) の細菌除去力を低下させることを報告した (Anderson ら、1981)。一方、殺虫剤であるディチオカーバメイト *dithiocarbamate* がクサエビの1種 *Palaemonetes pugio* のエラの状態に与える影響を調べた Doughtie と Rao は、殺虫剤で傷ついたエラの部位に血球が集合し、

その結果血球の崩壊によってメラニン色素形成が誘導されることを明らかにした (Doughtie と Rao, 1983)。

2.2.3. 環形動物 (小宮山一雄)

ミミズの生態は土壌と深く関わっており、古くから土の性質を知るための指標として利用されてきた。また20年以上前から農業の環境毒性リスクの指標に取り入れられている。1984年に Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline #207により、ミミズの急性毒性試験の様式が示されたことから、環境アセスメントの指標動物としての重要性が認識されている。OECD Guideline は今日、慢性毒性試験の様式も規定され利用されている。しかし、これらの数値はいずれもミミズの生死を判定材料としているもので、長期慢性毒性や、ミミズの生理機能や生態防御機能に与える影響については、報告は少なく今まさに研究が始まったばかりである。Polycarbonate biphenyl (PCB) の免疫毒性について Ville (1995) らはミミズ (*L. terrestris*) の coelomocyte のロゼット形成を傷害する PCB 濃度は、5 g/cm² であるが、実際の組織内濃度は 76 g/g dry mass が障害の濃度であると報告している。彼らの実験では最も強く影響が出るのは5日目であり、この時に coelomocytes の PCB レベルが最も高くなる。ロゼット形成は coelomocytes が異物抗原や細菌に接触して、凝集素を分泌する能力を測定ものと考えられる。この凝集素はまた食食の為のオプソニンとして働いている。実験の結果、PCB の投与はリゾチーム活性、抗菌活性、溶血活性、蛋白分解酵素活性を上昇させる一方食食能および創傷治癒力を低下させた。また重金属 (塩化水銀、メチル水銀、塩化カドミウム、塩化亜鉛、塩化鉛、アセチル鉛) などを、in vitro で作用させ、coelomocytes の生細胞率および食食能を測定したところ Hg、Cd、Zn は高毒性を示し、生細胞率および食食能を著しく低下させたが、これらと比べ、Pb では影響が少なかった (Fugere et al.1996)。重金属類に汚染された土

壌や産業破棄物の無毒化にミミズに応用しようとする試みがあるが、ミミズの生体内ではどこに蓄積するのであろうか？電顕観察により亜鉛、鉄、鉛が chloragosome 内に認められたことから、これらの金属は chloragosome 内に蓄積されるミミズの腸管には重金属のカドミウムとする結合するタンパク質が認められる (Ramseir et al., 1990)。鉛、亜鉛は隣と結合して、chloragosome 内に蓄積されることによって、毒性が低下する (Morgan, 1989)。他毒性試験に関する報告が 30 報ある。

参考文献

- Fugere, N., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Coderre, D., Fournier, M. (1996) Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology* .109, 157-66.
- Morgan-JE; Morgan-AJ (1989) The effect of lead incorporation on the elemental composition of earthworm (Annelida, Oligochaeta) chloragosome granules. *Histochemistry*. 1989; 92 (3): 237-41
- Ramseier, S., Deshusses, J., Haerdi, W., (1990) Cadmium speciation studies in the intestine of *Lumbricus terrestris* by electrophoresis of metal proteins complexes. *Mol-Cell-Biochem*. 97(2): 137-44
- Ville, P., Roch, P., Cooper, E.L., Masson, P., Narbonne, J.F. (1995) PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *J Invertebr Pathol*. 65-3, 217-24.

(8) 考察

いくつかの指標生物を中心とした生物の免疫機能および免疫機能におよぼす有害化学汚染物質が免疫機能におよぼす影響について文献的に調査した。生物の免疫機能は共通するものと各生物に特異的なものがあるため化学物質の影響の受け方も異なってくるものと考えられる。

実験動物

マウスやラットを用いた免疫機能への影響に関する実験は種々の環境生物を用いた影響研究の結果を踏まえ、条件がよくコントロールされたマウスやラットを用いた実験においても確認されるかどうか検討し、起こればその機序についても研究をすすめる視点での研究が重要と考えられる。細胞性免疫に関しては、マクロファージや好中球、あるいはNK細胞を用いて、貧食能や活性酸素あるいは活性窒素種の産生能、NKの細胞障害性について調べる。液性免疫においては、補体やCRPの定量値が環境汚染を反映するものなのか否かについて研究を行っていくことが必要である。また、他の脊椎動物に見られるリンパ球等が関わる獲得性免疫にお及ぼす影響においても種差を踏まえた上で検討し補完することが重要と考えられる。

海棲哺乳動物

汚染が顕著な海に棲息するイルカあるいはアザラシといった海棲哺乳動物の感染抵抗性に関わる免疫機能についてさらに検討することが必要と考えられる。特にカスピ海など汚染が深刻化している海域での調査が必要となると考えられる。また、捕獲、血液採取、野外でのNK活性、リンパ球の増殖能の測定など手法の開発も重要であることが明らかになってきた。しかし、日本近辺あるいは汚染がひどいとされる地域における海棲哺乳類の有害化学物質の体内の濃度と感染に関わる免疫機能との関連が明らかにされる。北海等でおきた大量死が日本近辺あるいは汚染がひどいとされる地域で起きる可能性について知見が得られれば予防措置をとることなどが可能となると考えられる。

鳥類

カモメなど汚染した魚を餌とする鳥類への影響も検討することが必要と考えられる。鳥類のなかでウズラは実験動物として、性成熟に達するまで約6週間と短いこと、体質が強健で繁殖も容易であること、鳥類特有の液性

免疫中枢器官(B.F.)があること、また、均一な性状の種卵(コピー卵)を大量に使用することが可能なことも、免疫毒性研究において有利な点である。重金属(Pb, Cd)、残留化合物(農業、多環式芳香族、有機塩素系化合物)の食餌投与や海面活性剤の飲水投与による免疫担当細胞(T・B細胞、Mφ、NK細胞)への傷害作用および病原体暴露による感染抵抗性と免疫担当細胞機能との関係を明らかにしていくことにより、カモメなどで報告のある免疫機能の低下の要因が実験的な研究においても明らかにされるものと考えられる。

両生類の免疫機能に関わる環境有害化学物質の影響についての報告は、ほとんどない状態であるが、水生生活をする幼生(オタマジャクシ)が水質汚染の影響を直接受けることが推察される。カエルが減少しているという報告があることから、その要因のなかに免疫機能の低下があるかどうか実験および調査研究が必要となるであろう。ツメガエルの近交系の確立により、免疫毒性研究への使用が可能になってきている。環境汚染につながると思われる環境有害化学物質を飼育水に加え曝露を行い、水生種あるいは幼生について影響の検討や陸生肺呼吸をするカエルについては経口あるいは経皮的に曝露を行い影響の検討をすることが可能である。また、自然界に自生するカエルについて、山間の渓流の清浄な地域と市街地域に自生しているカエルとの血液学的(血球種別血球数など)、血液生化学的、免疫生化学的(抗体価など)測定の比較を行うことも重要と考えられる。

魚類

硬骨魚類は、脊椎動物の中でも最も多くの種に分化し、海洋から河川・湖沼など地球を覆う水域に広く分布・繁栄している。その中で、人間の生活廃水などの影響を強く受ける可能性の高い、河川中流域から下流域・沿岸域に生息する魚類(コイ科、メダカ科、ハゼ科など)に注目して、各種汚染物質が魚類の免疫機能に及ぼす影響を与えるかを研究す