

る必要がある。環境有害化学物質は、大気中、水中、土壌中などに、さまざまなかたちで存在するが、水中に含まれる汚染物質について、自然界で魚が暴露する可能性の高いものを具体的に選別し、それらを実験的に曝露したときにあらわれる、免疫系の変化を形態的および機能的側面から検討することが可能である。さらに、汚染物質の取り込まれる経路（食物から、皮膚から、鰓から、）や、魚体内での処理過程（蓄積部位、排除経路など）を探ることにより、栽培漁業の改善あるいは食品としての魚の安全性という分野への寄与も期待される。有害環境有害化学物質が免疫機能にどのような影響を与えているかについて、液性（サイトカイン、補体系、抗体産生）および細胞性免疫機能（食細胞の貪食能）や外界とのバリアー機能を持つ体表（皮膚）、粘液による防御などを指標に検討することが必要である。具体的には、魚に環境有害化学物質を飼育水に混入、あるいは餌から経口的に投与して、マクロな視覚による健康状態の診断による評価（呼吸数、鰓、皮膚、鱗など）、病理組織学的評価、免疫関連器官の光学・電子顕微鏡的診断、血液学的・免疫学的評価、感染実験魚病実験でつかわれる病原体に感染させたときの感染抵抗性に及ぼす影響、末梢血あるいは腹腔のマクロファージ好中球などの食細胞の貪食能、移植片拒絶反応への影響などの指標による評価が可能である。魚類は系統進化の上で脊椎動物の基にあり、免疫系も哺乳類にみられる機能をほぼ備えている一方、無脊椎動物とをつなぐ位置にある。魚類を対象材料とすることは、環境有害化学物質が動物の免疫システムに及ぼす影響を広い視野から展望できることが期待できる。また、水棲生物であるので、環境水の汚染が生物の生体防御システムに及ぼす影響を判定する基礎を得られると考えられる。魚類は、河川、湖沼などの陸水から海洋の沿岸域から遠洋にわたり、広く分布し、その種類も多様である。その中には、コイのように寿命の長い種もあればアユやハゼ、メダカのように短寿命の種もある。環境有害化学物質はそれぞれの種の

卵発生期から老年期にわたり影響を及ぼすと考えられるので、多様性のある魚種の存在は、実験・調査の材料として大きな利点となる。

金属、芳香族炭素化合物などの環境有害化学物質は、これまでの毒性物質の安全基準からかけ離れたきわめて微量で、内分泌機能を攪乱させることが確認されている。自己以外の物質を異物として排除する免疫システムは、生体内で複雑な分子生理的メカニズムで制御されている。そこにさまざまな環境有害化学物質が侵入すると、それらの化学的情報伝達が誤作動して、システムが攪乱、破壊され、生存の危機に陥ることは十分考えられる。

我々人類は、さまざまな魚類を食用として用いているので、環境物質による魚類の汚染は、食品衛生上の問題や我々の健康管理の問題とも直接関係が深い。有害環境有害化学物質の免疫学的評価法が魚類を用いて確立され、汚染物質の魚体内での代謝経路の詳細が明らかになれば、その成果は、魚病研究や水産養殖の分野さらには食品管理の面においても、大きく貢献できると思われる。

ナメクジ

陸棲軟体動物ナメクジの主たる免疫担当細胞はマクロファージであることが明らかにされてきた。マクロファージはどの種の動物にも存在し、生体防御に深く関わる細胞であり動物の生死に直接結びつくことから、環境有害化学物質のこの細胞に対する影響を調べることは、重要な意味をもつ。環境有害化学物質が無脊椎動物のマクロファージに与える影響についての詳細はほとんど明らかになっていないのが現状である。そこで、調査研究と実験的研究のいずれもが必要となると考えられる。

調査研究としては、汚染度の異なると思われる地域においてナメクジを採集し臓器、器官内の汚染物質の蓄積量はどれほどかについて、a)消化管、腎、中腸腺、生殖腺、結合組織、皮膚等に分けて汚染物質の含有量を分析する、b)ゴミ焼却炉近辺、農薬散布地、山林等の採集地における汚染度の差はあるか、c)

蓄積量に季節的な変動があるか、d)解剖組織学的に蓄積部位に変化が見られるか、の観点からどのような環境有害化学物質を指標にするかを含め検討していくことが重要と考えられる。汚染の度合いと免疫機能との関係を a) ナメクジ体液中のマクロファージの数を計測し、採集地による差を調べることで、b) ヒツジ赤血球、イーストをナメクジ体腔内に注射して、一定時間後マクロファージを取り出して貪食能を調べることで、c) その貪食能に季節的な変動はあるか、d) 汚染物質の種類によりその貪食能に差があるか、などを指標に検討していくことにより影響を評価することが可能になる。

実験的研究としては、a) 環境有害化学物質(溶媒の検討)を混入した飼育土でナメクジを飼育し、どの濃度から影響が現れるかを検索すること、b) ナメクジに有害物質を経口接種および経皮接種を行い、細胞性防御(マクロファージ活性)への影響を明らかにすること、c) 同接種法を用いて生体内のどの臓器、器官から蓄積されて行くかを明らかにすること、d) 発生過程での曝露の影響など感受性の違いをあきらかにすること、などの検討が重要な点であり新奇性も高い。ナメクジの生体影響を検討する際に哺乳動物と大きく異なることから a) polyaromatic hydrocarbon (PAH) receptor があるか、b) CRP の存在、その変化はどうか(無脊椎動物では acute phase な protein ではなく、常時高濃度で存在するといわれているが、果たしてそうか)、など考慮しておく必要がある。これらの研究を通して、これまで空白だった陸棲軟体動物の免疫機能に対する環境有害化学物質の影響と汚染物質の侵入経路が明白になる。また、最も汚染が高いとされる地上に棲み這い回る陸棲軟体動物は、環境汚染度を知る上で重要な生物マーカーとして挙げることができるようになるのみならず、有害な環境有害化学物質の免疫学的評価法が確立され、地球環境保全のための情報の提供が可能となる。

貝類

貝類は地球上全ての汚染物質の終着のある水域に生息する。特に海棲貝類は全世界で使用されて環境に附加された汚染物質に遭遇する可能性を持つ。また、高等哺乳類と異なり、貝類では免疫機構が原始的な発達段階にあり、特異的な免疫機構が存在しない単純な機構から成り立っている。すなわち、外来異物の生体内への侵入直後に働く非特異的液性免疫と既存の免疫担当細胞群による食作用を中心とする非特異的免疫応答である。これらは高等哺乳類においても外来異物の排除における早期段階で機能する免疫機構と相同のものであるため、貝類での免疫学的研究によって高等動物での免疫学的研究にも有用な情報が得られる。これまで行われてきた研究等から、試験対象物質、試験物質の曝露方法、試験供試貝、飼育条件、曝露期間などの概略をまとめた。

A. 試験対象物質

貝類は魚類と同様に水棲生物であり水質の影響を多く受けると考えられる。また大気圏から降り注ぐ降雨は大気中に存在する物質を溶解して含んで水圏に入る。また地圏から水圏に流入する表層あるいは地下水脈もまた地圏に存在する化学物質を運び込む。すなわち水圏には大気圏および地圏に存在する全ての化学物質が付加されることとなる。従って、貝類に対する環境汚染物質の影響を評価するにあたっては、水圏のみならず大気圏、地圏における全ての汚染物質が対象となり得る。

B. 試験物質の曝露方法

貝類の免疫学的な検索など毒性学的な研究手法としては、汚染海域現場での飼育という曝露法と、研究室での実験的な曝露方法が行われている。前者では複合汚染である場合が多く、この場合は得られた結果を単一の結果に帰結できない、一方、曝露物質の調整などが不要で自然な形で曝露が行える。しかし、他生物の共存など個体差を生じさせる因子が極めて多くなる。研究室での実験的曝露について以下にまとめる。

貝類への化学物質の曝露は、対象物質を水

質に溶解あるいは固形成分の場合には浮遊させその中で貝を棲息飼育させて行う方法が一般的と考えられる。個体ごとへの注射投与などは閉殻筋（二枚貝で言う貝柱）などへの注射が可能ではあるものの適切でないと考える。なぜならば貝類は殻と身からなり、体重あたりの投与の場合、身重量あたりに計算して投与すべきと考えるが、生きたままで身重量のみを計測することは困難だからである。以下には、飼育水質に試験物質を添加しての曝露法について検討する。

水に溶解しやすく、かつ安定性の良い物質の場合は問題が少ないが、水に難溶性、疎水性、高揮発性、有機物質などとの反応性が高い物質の場合、曝露濃度の制御が困難となる。頻回の飼育水の交換と飼育水容量と化学物質添加量とから計算した推測濃度での曝露実験、あるいは曝露中の濃度測定を行いつつの実験となることは止むを得ないであろう。

C. 試験供試貝

二枚貝の研究では殆ど海産貝が用いられているようである。カキ(oyster, *Crassostrea*)、ムラサキイガイ(mussel, *Mytilus*)、ハマグリ(clam, *Mercenaria*)などが用いられている(Pipeら、1995c)。分担者は、アコヤ貝を用いた経験がある。

以下には海産貝について考える。実験に用いる貝は、哺乳動物 SPF(specific pathogen free)に相当する貝が望ましい。しかし、試験貝の供給を考えると幼生から稚貝までは漁協稚貝供給研究所などでの濾過海水を用いての飼育が行われている貝種もあるが、一般的な貝種や、成長貝の場合には、天然海にて飼育されている場合が殆どである。このような飼育環境にあつては、各種プランクトン（餌そのものもプランクトンであるが、ここでいうのは餌としないプランクトン）、貝殻表面のホヤ、カサネカンザシ、フジツボ、カイメン、海藻類など付着生物、さらにはオキアミや寄生虫、細菌・真菌類やウイルスなどが存在する。これらの共存する生物を排除するためには、受精の段階から実験に供するまでの成長貝の段階まで人工海水を用いての飼育が必要となるが、現実的にそのような条件で

飼育した貝の供給を求めることは困難である。それに替わるものとして、通常の天然海にて飼育された貝の提供を受けた後、人工海水中にて物理的に貝殻表面の付着生物を除去し、殻内部を人工海水にて洗浄し、かつ数日間ないし1週間程度を人工海水にて毎日殻表面の生物を除去する操作を繰り返しながら順化飼育を行うことによってある程度の外部生物を排除した貝が得られる。こうした貝を実験に供することが現実的かつ無難なところであろう。事実、濾過天然海水を用い他生物の存在を無視した実験系よりは、人工海水を用いかつ他生物を極力排除した実験系の方が、各種免疫能の指標において個体差が小さい結果が得られ、より感度の良い毒性学的な検索が可能となる結果を得ている。欧米では一般的に、野生の貝類を採取し、数日間ないし3ヶ月ほど濾過天然海水でタンクにて飼育して実験に供している。

免疫学的な検索を行うにあたって用いる検体である血リンパ液を採取するには、採血操作を容易とするために大きな閉殻筋を持つ二枚貝が適切であろう。閉殻筋の殻からの切離後の採血では血リンパ液の閉殻筋からの出血により得られる血液量の損失や体外海水などの混入を避けることが難しい。しかし、止むを得ない場合には閉殻筋の切離、開殻後に心臓からの採血を行うこととなる。真の心腔の外側に囲心腔が有る場合には心臓からの採血は注意を要する。すなわち囲心腔中の体液は血リンパと大きく異なり、血球成分が殆ど無いからである。

D. 飼育条件

飼育条件としては、哺乳動物 SPF(specific pathogen free)に相当する環境での飼育が望ましいと考えられる。自然海水を一般的海棲動物飼育用の濾過だけでは外部生物を完全に除去できない上に、自然海水は季節や天候によって成分組成の変動が考えられるので、成分が一定である人工海水などでの飼育が必須である。

飼育温度をコントロールすることは重要である。なぜならば季節変動に伴う温度変化によって血リンパ球数の変動があることが知ら

れている（船越、1977；Pipe ら、1995b）。船水によると、一般海域で飼育観察されたアコヤ貝の血リンパ球数は冬季に増加し夏季に減少する。温度幅 9℃から 28℃の範囲で 4 倍の開きがあり、血リンパ球分画の構成比もやや変動する。したがって、曝露実験中の温度変化は免疫学的な観察の際に大きな交絡因子となるので、特殊な目的をもつての実験以外は、一定の温度での飼育が望ましいと考える。一般に 20℃前後で行われた実験が多い。飼育容器は毒性試験を行う以上、有害物質の溶出が無いものを使うことが必須と考えられる。飼育が水中で行われる都合上、水圧、重量に耐えうる容器を準備しなければならない。溶出物質の少なさを考慮すると総ガラス製ないし総テフロン製が最も適切と考えられるが、高価であり、特に後者は高価である。また、前者は重い上に割れやすく扱いが難しい。水産関係の飼育には、ポリカーボネート製、FRP 樹脂製、アクリル樹脂製が一般的とのことである。また、ポリプロピレン製タンクを用いる研究者もある。いずれの材質にしろ製造過程で使用される原料、添加物などの溶出の可能性は完全には否定しえないであろう。

給餌を考慮する場合、貝類の場合には水質に浮遊させたプランクトンを与えねばならないが、これらプランクトンと当該化学物質の反応や相互作用も考慮せねばならないなど実験系の構築に際して懸案事項が少なくない。あこや貝などの真珠核珠入れ時の抑制に相当する無給餌状態での実験条件を採用するならば、餌と化学物質の相互作用を無視した実験ができるが、無給餌という別の条件が加わるることとなる。また、化学物質への曝露前に時間を区切って給餌する条件の下に実験をおこなった研究もある（Pipe ら、1995c）。

E. 曝露期間

無給餌での飼育を前提とした場合、分担者はあこや貝を用いての 1 ヶ月以上にわたる飼育経験があり、かつホルムアルデヒドの間歇曝露実験においても 4 週間の無給餌飼育の経験がある。他の研究者の採用している曝露期間は給餌の上で 7 日から 11 週間である。感

染実験では、曝露期間に加えて感染をさせる期間が加わるために一般的に長期の曝露期間となっている。

参考文献

- Pipe, R.K., Coles, J.A., and Farley, S.R. (1995). Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. In *Techniques in Fish Immunology-4. Immunology and Pathology of Pathology of Aquatic Invertebrates* (J.S. Stolen, T.C. Fletcher, S.A. Smith, J.T. Zelikoff, S.L. Kaattari, R.S. Anderson, K. Sørderhll and B.A. Weeks-Perkins, eds) pp. 93-100. Fair Haven: SOS Publications.
- Pipe, R.K., and Coles, J.A. (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve mussels, *Fish and Shellfish Immunology*, 5, 581-595.
- 船越将二. (1977). アコヤガイの血球数、血球組成および血球の大きさの季節変化。国立真珠研究所報告。21、2229-2308。

カイコ

無脊椎動物の中で約 80%以上占める昆虫の生体防御機能に着目し、環境有害化学物質がこの異物排除を基盤とする免疫機能に及ぼす影響を与えるかを、具体的な汚染物質（例えば、殺虫剤、除草剤、重金属など）を選別し、加えて昆虫の具体的な個々の生体防御因子の発現を指標に、研究することは、空气中並びに水中、あるいは土壌中の環境有害化学物質の免疫学的評価が可能になり、生物の免疫学的保護の技術の開発も将来模索できるようになると期待される。

昆虫は顆粒細胞とアメーバ状のプラズマ細胞による細胞性防御反応と、抗菌蛋白質やレクチン分子並びにフェノール酸化酵素前駆体活性化系などに依存した液性防御反応によって、侵入する異物の排除を行っている。この生体防御反応が正常に機能することが昆虫の健康維持と生存にとってきわめて重要である。昆虫は進化の流れの中で最も種分化を果たし、最も繁栄している生物であるため、人間の生

活空間に常に存在している。その観点で、人間活動によって生じる悪環境や自然界に放出される有害汚染物質には常にさらされる運命にあり、多くの影響を被っている。しかし、その影響についての具体的な実態は不明である。昆虫（特にカイコ）を用い、環境有害化学物質がの血球機能、特に顆粒細胞による食作用、抗菌蛋白質やレクチン、あるいはフェノール酸化酵素前駆体活性化系などの防御蛋白質の発現・誘導に及ぼす影響を生体内及び生体外のバイオアッセイによって解明することが重要である。具体的にはカイコを用いて有害物質の経口接種並びに経皮接種を行い、a)細胞性防御反応への影響を食作用と包圍化作用の観点で追求すること、b)細胞性防御反応に関与する顆粒細胞とプラズマ細胞の微細構造並びに細胞行動に及ぼす影響を電子顕微鏡で調べること、c)脱皮変態時に誘導されるレクチン分子並びに抗菌蛋白質誘導に及ぼす影響を追求すること、d)フェノール酸化酵素前駆体活性化系によるメラニン色素形成に及ぼす影響を調べること、また、*in vitro*において、e)上述の血球機能並びに防御分子の発現に及ぼす影響を調べること、などを検討することにより免疫機能への影響を観察することができる。

これまで、環境有害化学物質が昆虫類の生体防御機能にいかなる影響を与えるか、についてはほとんど知られていないのが現状である。カイコの免疫機能に着目し、人間活動が生み出す有害物質の影響を検討することにより、自然界の環境有害因子の昆虫の免疫攪乱の実態が明確になると考えられる。

ミミズ

ミミズは陸生動物としては、我々の身近に生息しており、生物生存環境の変化の補足に適している。ミミズは我々の生活と密接に結びついており、過去に畑の作物を荒らした害虫としてとらえられたものもあるが、畑にミミズがいますと、土壌改良効果があることが知られ、作物の育成に有益であることが知られている。またヘドロおよび生ゴミの処理にミミ

ズが有効であることが報告されている。さらにミミズはモグラや鳥など多くの野生生物のエサとなっているので、生物学的には誠に大きな役割をになっていると考えられる。日本の国上が、作物の生産を上げるために大量の農薬を土壌へ散布し続けている。陸生生物の住環境は著しく悪化しつつある。これらの環境を汚染する物質は降雨とともに川へは入り、河川およびさらに近海の生物の住環境に影響を与えている。当然、この結果のエンドポイントは、食物連鎖の頂点にあるヒトへとつながっている。我々の生活の利便性の追及から、自然界では存在しなかった様々な化学物質を生産し利用してきた。今、これらの物質が生物の生存を脅かしている現況であるが、これらの化学物質の生物の免疫機能へ与える影響を調べ、評価することは重要な意義があると考えられる。さらに、ミミズは環境汚染化学物質のモニター動物として使われてきたが、その判定基準は短期での大量被曝による生か死かであり、致死量以下での影響や長期毒性の影響について検討はほとんど行われてこなかった。ミミズの免疫機能については、極めて基本的な現象を観察してきた歴史があるが未だ充分に解明されてはいない。各免疫担当細胞の由来、分類および機能などを、分子レベルで明らかにすることが、必要であると考ええる。

ミミズは、実験動物としては比較的扱いやすく、大量飼育してもあまり、スペースをとらず、再現性のある実験を行うことが可能である。有害化学物質のミミズに与える影響について、基本的な液性免疫機能、および細胞性免疫能の測定を行うことが可能である。特にミミズの免疫担当細胞を分離する技術は確立されており利用できる。また実験対象となるミミズについては、純粋種に近いものを安定的に供給するシステムが確立されており、さらに汚染土壌から採取して検討することも比較的容易に出来る。そこで、環境有害化学物質がミミズの基本的な免疫能への影響を、a) 異物食能およびリゾチームを始めとする酵素活性、b) 溶血活性、c) 赤血球凝集活