

性、d) 抗原結合性蛋白の測定（抗原をミミズに免疫）、e) Natural killing activity、を指標に検討することが可能である。これらの基本的免疫機能の測定は、技術的に他の生物で行ってきた方法を応用でき、評価基準を確立することが可能である。1) -5) の機能の評価を行う手法として、免疫組織化学、免疫化学（ウエスタンブロット、ザイモグラフ、ELISA による定量）、蛍光免疫染色（顕微鏡およびフローサイトメトリー解析）などがある。

さらに、環境有害物質の免疫機能へ与える影響を分子レベルで検討することも可能である。汚染物質のレセプターと考えられる arylhydrocarbon receptor(AhR), estrogen receptor (ER) heat shock protein(HSP,60,70,90), cytochrome oxidase subunit, cathepsin などレセプターの標的遺伝子について、分子生物学的手法と蛋白解析を合わせて行い、総合的に評価する。ミミズ免疫能を担う分子として Thy-1、(2-microglobuline, pore forming protein、ケモカインなどの発現も検討することが可能である。

ミミズにおける環境汚染有害物質の評価は現在行われている行われている短期毒性試験の他、世界的に統一された評価方法は未だ確立されていない。これらの研究の結果得られる知見は、環境汚染有害物質の評価の確立に寄与するにとどまらず、生物における免疫系の進化を明らかにするなど派生する利点は大きい。ともすると地球環境の保全を計るという問題は、人類の生存を前提条件として述べられるが、この地球上の動物王国の中では、ヒト占める割合は数的に微々たるもので、我々はこの地球環境を守る義務があると考え、その戦略を確立する上で、この成果が生かされると思われる。

(9) 結論

多くの野生生物が生物学的に影響を持つ可能性のある濃度の PCB やダイオキシンなどの有機塩素系化合物、有機スズなどの重金属、アルキルフェノールなどの可塑剤、農薬とい

った有害化学物質に曝されていると考えられる。マウスを用いたダイオキシンの実験に見られるように環境中に現実にあるような濃度においても有害化学物質による免疫機能の攪乱が起きる可能性があると考えられる。今回の調査により、実験室レベルにおいても生態系においても、有害化学物質が環境生物の免疫機能におよぼす影響に関わる知見がきわめて少ないことが明らかになった。特に、哺乳類以外の生物において未知の部分が多く実験手法の開発を含め今後の研究の進展が望まれるが、現存の手法を用いることでも多くの知見が得られることが明らかになってきた。一方、種々の野生生物における免疫機能の異常が生態系におよぼす影響については多くの因子が含まれていることから複雑な因果関係で影響にいたることが推察される。この点についても地道な基礎研究による解析が必要になると考えられる。この観点からも解析の基盤となる環境有害化学物質による免疫機能への影響の研究を推進する必要がある。国際的にも米国、EU 諸国は連携を謀りながらこれらの点についての検討を推進している。有害化学物質の生態系におよぼす影響の研究は我が国のみならず人類全体の問題であることから、我が国においても早急に正式なプロジェクト研究として立ち上げ、基礎データを得つつこれらの諸国との連携を強化する必要がある。

(10) 研究発表

なし

(11) 英文アブストラクト

Living things lead their lives with excluding invasion of microorganisms by developing their immune functions. Decline of the immune functions allows invasion of latently invasive microorganisms. There is a possibility that this invasion causes fatal effect on creatures. The cause of mass death of marine mammals in polluted waters such as the Baltic Sea is presumed to be infectious disease by suppression of immune system due to hazardous chemicals. It

is not too much to say that most studies on the effects of chemicals on immune functions have been done with using experimental animals such as mice and rats not with other diverse species. Differences are expected in the effects of chemicals on immune functions of different species because of their diversity of immune functions. Therefore, in order to elucidate the effects of hazardous chemicals in the environment on various animals, we surveyed using literatures 1) immune functions of various

representative animals, 2) effects of hazardous chemicals on the immune functions of various animals, and considered 3) future studies. Regarding 1) and 2), we surveyed vertebrates such as mammals, birds, amphibians and fish, and invertebrates such as mollusk, arthropod and annelid. Based on these surveys, we considered direction of future studies and made clear that it is necessary to push forward with a project to elucidate the effects of hazardous chemicals on immune functions of environmental animals.

小林隆弘	国立環境研究所
菊池慎一	千葉大学海洋バイオシステムセンター
小宮山一雄	日本大学歯学部
高橋慎司	国立環境研究所
平野靖史郎	国立環境研究所
古田恵美子	獨協医科大学
吉田貴彦	旭川医科大学
和合治久	埼玉医科大学短期大学
遠藤直紀	筑波大学医科学
瀬尾直美	東京医科大学
高木 尚	東北大学
中村弘明	東京歯科大学
山口恵一郎	獨協医科大学

Fig.1 環境生物の免疫影響に関する研究



Fig.2 アザラシの大量死

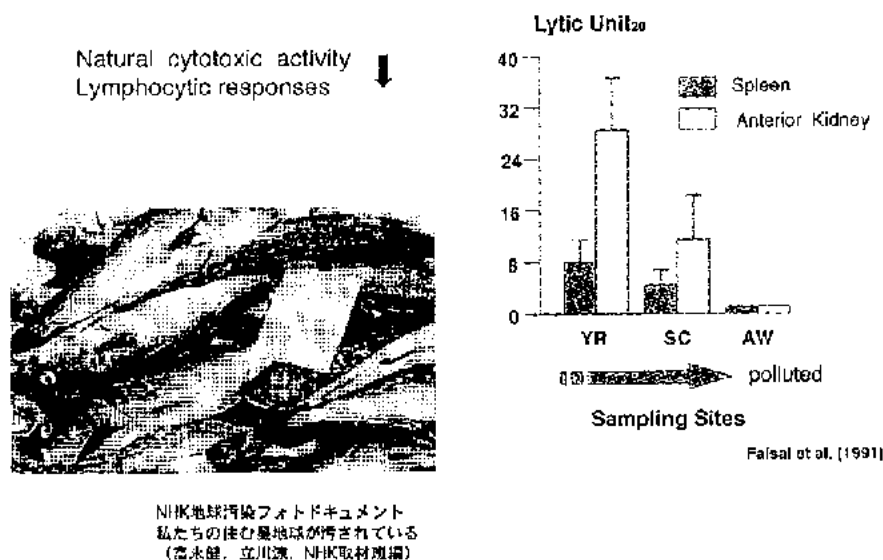


Fig.3 汚染された水域の魚類の免疫機能の低下

環境汚染有害化学物質が各種生物の免疫機能に及ぼす影響の解明研究
のための文献調査

1. 指標生物を中心とした生物の免疫機能についての文献調査
2. 有害化学物質が各種生物の免疫機能に及ぼす影響についての文献調査
3. 今後の研究の方向性

Fig.4 目的

脊椎動物

哺乳類（マウス，ラット）

鳥類

両生類 (カエル)

魚類

無脊椎動物

軟体動物 (ナメクジ, 貝)

節足動物（昆虫）

環形動物 (ミミズ)

Fig.5 環境生物の免疫機能

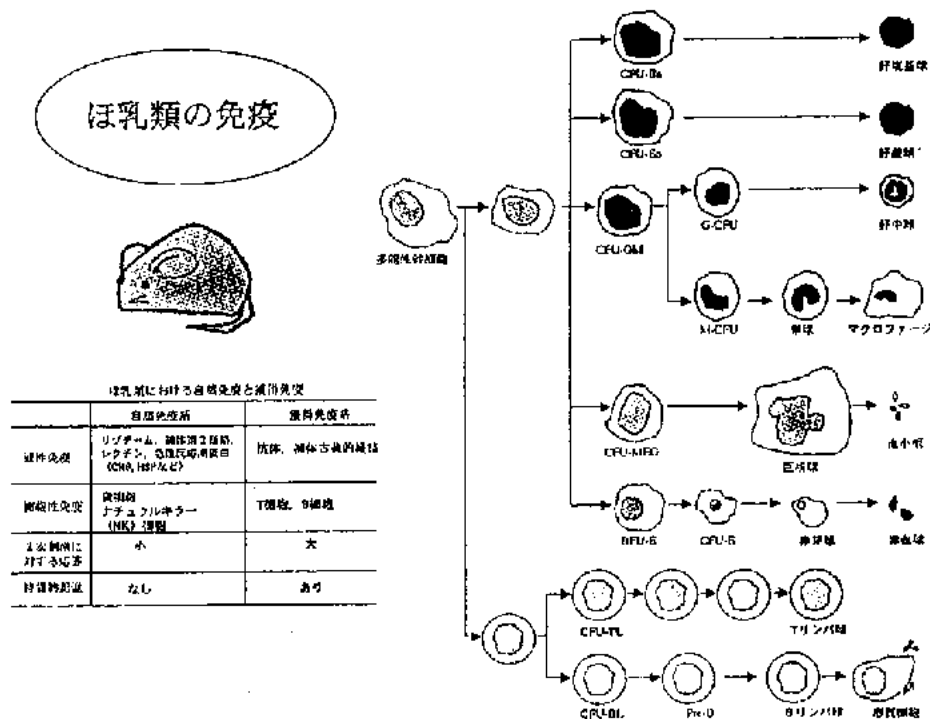


Fig.6 ほ乳類の免疫

・液性防御因子

非特異的因子

リゾチーム
トランスフェリン
C反応性タンパク質
補体 など

特異的因子

抗体 (IgM)

・細胞性防御因子

非特異的因子

顆粒白血球
マクロファージ

特異的因子

Bリンパ球
Tリンパ球

・免疫器官

脾臓、腎臓、胸腺

Fig.7 硬骨魚類の免疫系

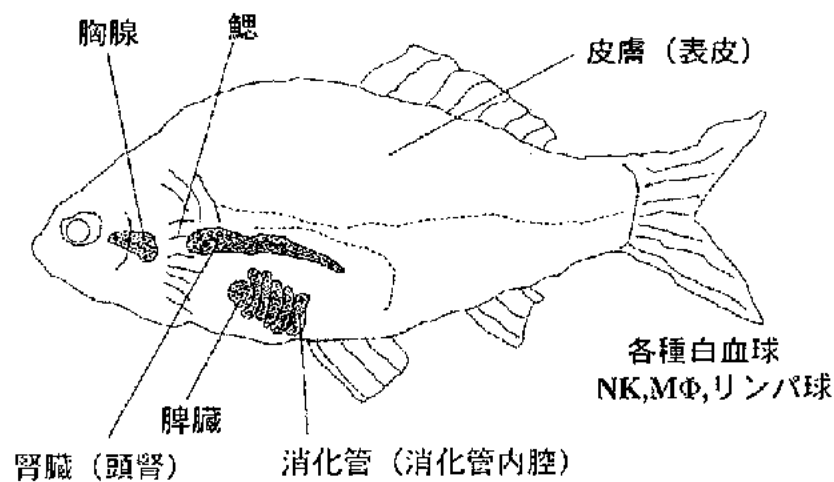


Fig.8 魚類の免疫機能

・液性防御因子

非特異的因子

リゾチーム
トランスフェリン
C反応性タンパク質
補体 など

特異的因子

抗体 (IgM, IgY)

・細胞性防御因子

非特異的因子

顆粒白血球
マクロファージ

特異的因子

Bリンパ球
Tリンパ球

・免疫器官

脾臓、腎臓、胸腺、
骨髓 / リンパ節 (カエル)

Fig.9 両生類免疫系

特徴： 非特異的免疫（免疫学的記憶は存在しない）

液性免疫

機能： 異物の凝集、殺菌・失活化

レクチン（凝集素）、抗菌物質（リゾチームなど）が担う

細胞性免疫

機能： 異物への遊走、接着、貪食、殺菌（消化）、など

循環血中の無顆粒球、顆粒球が主役となる

（一部、組織定着細胞も一定の役割を担う）

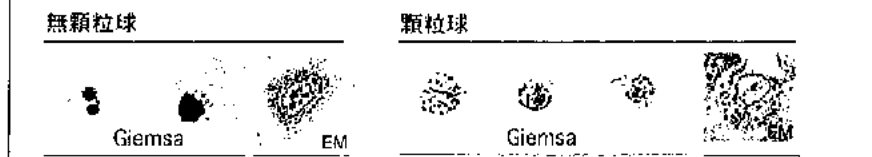


Fig.10 貝類の免疫機構

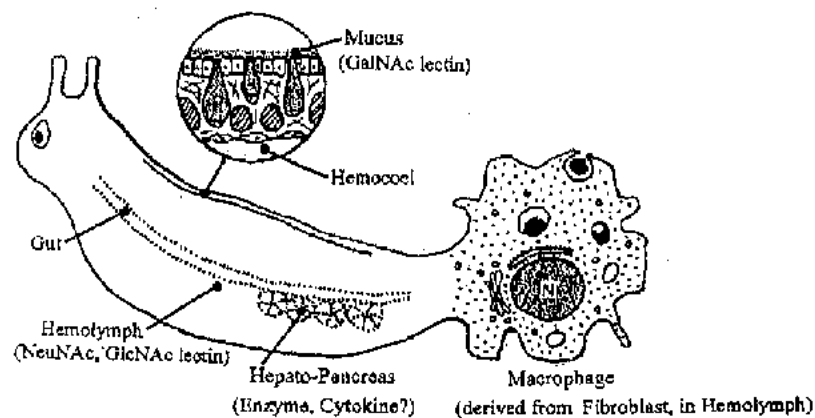


Fig.11 DO YOU HAVE MACROPHAGES?

1) NON-SELF RECOGNITION

2) PHAGOCYTOSIS

3) ENCAPSULATION

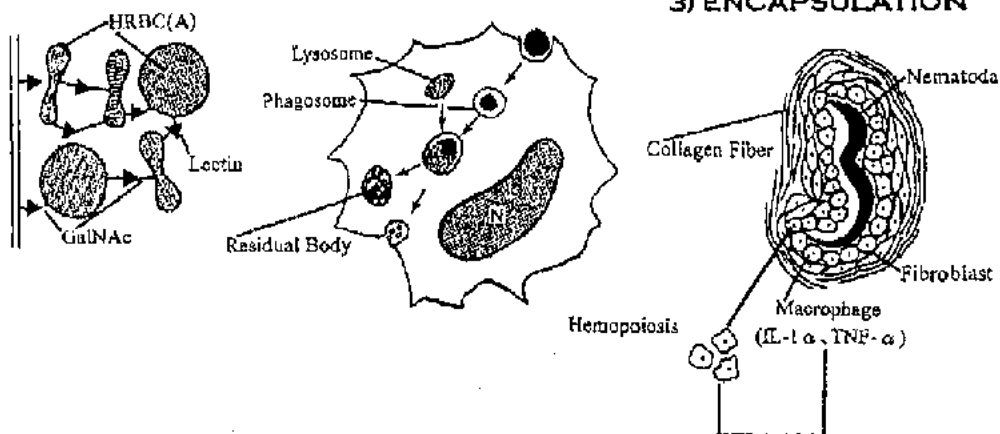


Fig.12 FUNCTIONS

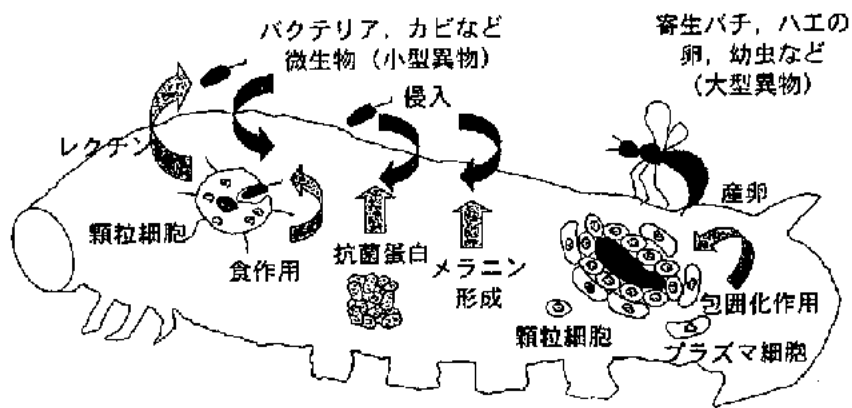


Fig.13 昆虫の免疫機能

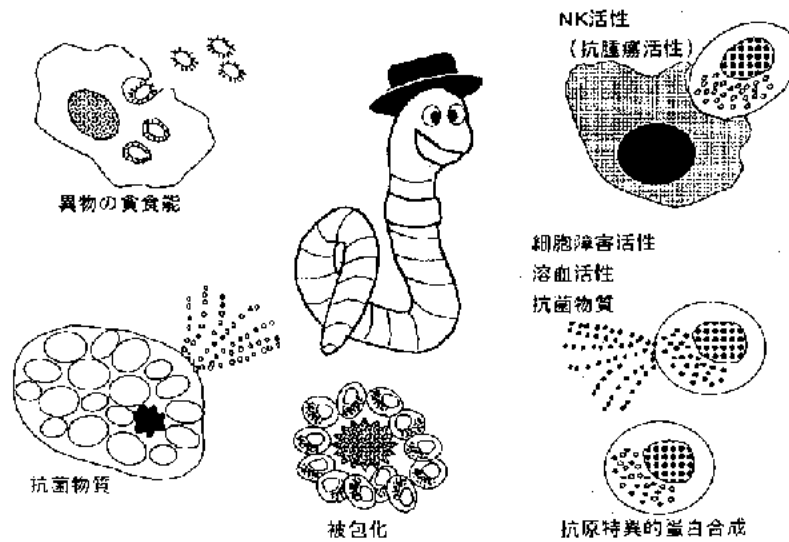


Fig.14 ミミズの免疫機能

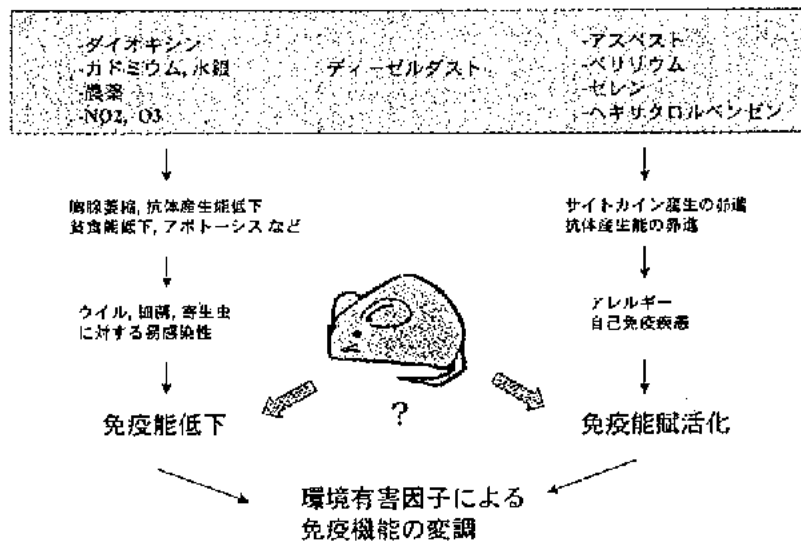


Fig.15 環境有害物質がほ乳類の免疫機構に及ぼす影響

重金属 水銀：リンパ球の減少（コイ） 銅：抗体産生の抑制（ニジマス） カドミウム&銅：循環抗体の減少 （ブラウントラウト）	芳香族炭化水素 PCB：影響無し（ニジマス） 食作用の減少（アメリカナマス） 血清抗体の減少（ナツヒラメ）
殺虫剤 DDT：抗体産生細胞および 循環抗体の減少（キンギョ） Edrin：食作用・抗体産生の減少 （ニジマス） 有機スズ：食作用の機能低下（Toadfish）	抗生物質 テトラサイクリン：抗体産生低下 （ニジマス） アフラトキシン：B細胞の記憶喪失 （ニジマス）

Fig.16 環境汚染物質の魚類免疫機能への影響

金属類

カドミウム、銅、有機スズ、複合金属汚染

一般に、短期・低濃度で応答亢進、長期・高濃度で抑制影響

有機物質

カトラレン、フェノール、多環芳香族炭化水素化合物、6塩化ベンゼン、5塩化ベンゼン、汚染沈殿物質（タレオソート汚染）、農薬（DDT、トキサフェン、パラチオン）、n-ニトロソジエチル アミン、ホルムアルデヒド

一般に免疫抑制、感染抵抗性の減弱

複合汚染物質

一般に、短期・低濃度で応答亢進、長期・高濃度で抑制影響

Fig.17 貝類で報告されている免疫影響

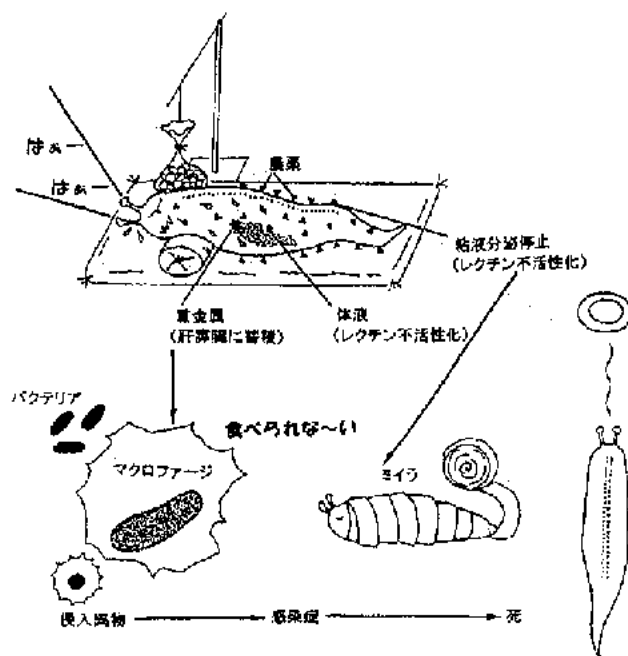


Fig.18 複合汚染物質

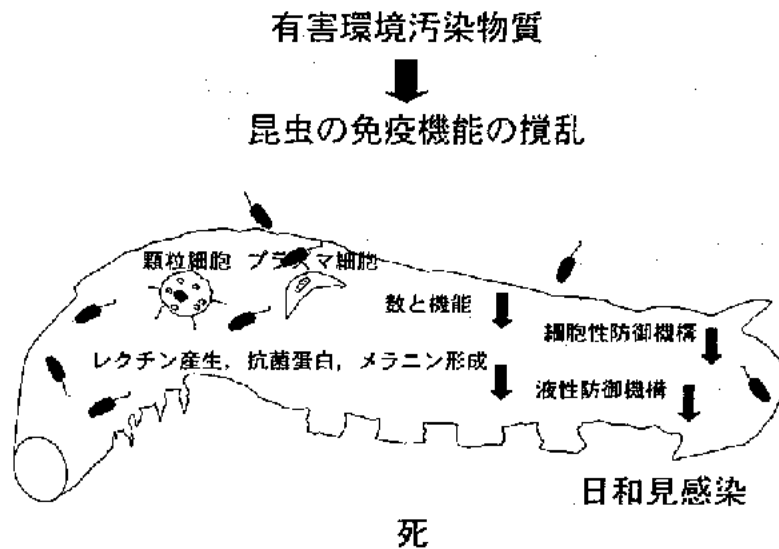


Fig.19 有害環境汚染物質

実験的研究：

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。

- a) 細胞性免疫：マクロファージや好中球、あるいはNK細胞を用いて、貪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。
- b) 液性免疫：補体やCRP、HSP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

調査研究：

- a) 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。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
- b) 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。

Fig.20 哺乳類

- a) 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
- b) 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の検討
- c) 汚染が顕著な水域の鳥類の免疫機能の調査

Fig.21 鳥類

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。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た。

- a) 環境有害化学物質を飼育水に加え曝露し、水生種あるいは幼生について影響の検討
- b) 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
- c) 自然界に自生するカエルについて、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）検討を行い、汚染との比較を行う。

Fig.22 両生類

有害環境有害化学物質が

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。

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、

- a) 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）、
- b) 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）
- c) 血液学的・免疫学的評価、
- d) 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、
- e) 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、
- f) 移植片拒絶反応への影響などの指標による評価も必要である

Fig.23 魚類

貝類の免疫機能について調査と実験的研究のいずれもが必要となる。

- a) 汚染度の異なると思われる地域において貝類を採集し汚染の度合いと免疫機能との関係を貝類体液中の貪食細胞の数や貪食能などを指標に非特異的免疫への影響を検討
- b) 汚染海域現場あるいは研究室での実験的な曝露と飼育を行い免疫機能への影響を検討する。
- c) 貝類への化学物質の曝露（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）し免疫機能への影響を検討する。

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開殻筋を持つ二枚貝が適切である。開殻筋の殻からの切離後の採血では血リンパ液の開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。止むを得ない場合には開殻筋の切離、開殻後に心臓からの採血を行う。真の心腔の外側に囲心腔があ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。

Fig.24 貝類

ナメクジの免疫機能について調査と実験的研究のいずれもが必要となる。

調査研究

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

- a) 汚染の度合いと免疫機能との関係をナメクジ体液中のマクロファージの数や貪食能などを指標に検討比較する。

実験的研究

- a) 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、
 - b) 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、量-反応関係を検討すること、
 - 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明らかにすること、
- などが重要な点であり新奇性も高い

Fig.25 ナメクジ

昆虫の生体防御機能に着目し、環境有害化学物質が異物排除を基盤とする免疫機能にいかなる影響を与えるかを、殺虫剤、除草剤、重金属などを用いて研究することは、空气中、水中、あるいは土壌中の環境有害化学物質の免疫学的影響評価が可能になり、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。

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囲化作用
- 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（電子顕微鏡を用いた検討）
- 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
- 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 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。

Fig.26 カイコ

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。

- a) 異物貪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) 赤血球凝集活性
- d) 抗原結合性蛋白の測定
- e) Natural killing activity,

を指標に検討することが可能。

1) - 5) の機能を評価を行う手法として、免疫組織化学、免疫化学（ウエスタンブロット、ザイモグラフ、ELISAによる定量）、蛍光免疫染色（顕微鏡およびフローサイトメトリー解析）などがある。

環境有害物質の免疫機能へ与える影響を分子レベルで検討することも可能である。汚染物質のレセプターと考えられるarylhydrocarbon receptor(AhR), estrogen receptor(ER) heat shock protein(HSP,60,70,90), cytochrome oxidase subunit, cathepsinなどレセプターの標的遺伝子について、分子生物学的手法と蛋白解析を合わせて行い、総合的に評価する。

Fig.27 ミミズ