

においてより明瞭であり BaP による食細胞の貪食能の低下が示唆された。腎臓への取り込みは、実験群・対照群ともに顕著でなく、大きな差異はみられなかった。(菊池慎一、中村弘明、菅谷芳雄)
アコヤガイ: アコヤガイに 5、50ppm の BaP を 14 日間曝露を行った。血リンパ球遊走能、総血リンパ球数、NBT 還元能、血リンパ球分画、凝集素価には BaP 曝露の影響は見出されなかった。各群とも個体差が極めて大きかった。リチウムカルミンの血リンパ球貪食能は高濃度 BaP 曝露群で低値を示した (吉田貴彦)。

ナメクジ: 陸棲軟体動物のフツウナメクジ(*Incilaria bilineata*)を BaP を濃度、 10^1 , 10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 ppm を染み込ませたペーパータオル上で飼育した。BaP の短期間曝露により、 5×10^3 ppm 以上の濃度で体表粘液の粘性が増し、体液から取り出したマクロファージの貪食能が低下を示した。これらの結果は陸棲軟体動物が環境指標動物として適していることを示唆する。(古田恵美子、瀬尾直美、山口 恵一郎、間中 研一)

ミミズ: ミミズ免疫機能を (1) coelomocyte 異物貪食能、H2O2 活性、NK 活性、溶血活性など生体防御機能に対する障害を検索する。(2) 環境汚染物質の細胞表面レセプター (AhR およびエストロゲンレセプター)、代謝酵素 (cytochrome P450)、核内移行の cofactor (HSP60, 90, 70) の発現に与える影響を分子病理学的に検討した。BaP のミミズ皮膚への暴露後、P450 (CYP2E1 および CYP3A4) は、皮膚で著しく増加した。HSP60, 90, 70 においてもその発現し増加した。P450 の発現は、RT-PCR により、CYP1A1 のサブファミリーを確認した。エストロゲンレセプターは皮膚には分布がなく、AhR レセプターは、確認できなかった。BaP の蛍光ビーズ貪食能に与える影響は、 $1\text{ng}/20\text{g}$ から濃度依存的に減少した。H2O2 活性も、濃度依存的に低下した。(小宮山一雄、Edwin Cooper、岡上真裕)

カイコ: 5 齢のカイコに 6 日間背側皮膚に 0.1% BaP を塗布し、6 日目に総血球数、顆粒細胞数、プラズマ細胞数、ヒツジ赤血球への貪食率、メラニン色素形成、抗菌活性とレクチン活性への影響を検討した。総血球数、全血球に占める顆粒細胞比、ヒツジ赤血球への顆粒細胞による貪食率、大腸菌に対する抗菌活性が減少すること、全血球に占めるプラズマ細胞比が増加すること、メラニン色素形成には影響がないこと、さらに 5 齢 4 日目の免疫細胞の形態と伸展に及ぼす BaP の影響を生体外で調べた結果、BaP 存在下では顆粒細胞の伸展が抑制されるが、プラズマ細胞の伸展は影響されないこともわかった。以上の結果より、BaP は昆虫の免疫機能を抑制することが示唆された。(和合治久)

これらの結果から BaP により貪食能などの免疫機能の低下が起きることや、動物種や各免疫担当細胞により感受性の差の違いがあることが明らかになった。

研究協力者

Edwin Cooper (南カリフォルニア大学医学部)	遠藤 直紀 (筑波大学医科学)
岡上 真裕 (日本大学歯学部)	小山 卓美 (家畜衛生試験場)
清水 佐良子 (東京大学生命科学研究科)	菅谷 芳雄 (国立環境研究所地域環境研究グループ)
瀬尾 直美 (東京医科大学生物学)	間中 研一 (獨協医科大学医学総合研究所)
三浦 克洋 (家畜衛生試験場)	山口 恵一郎 (獨協医科大学医学総合研究所)
中村 弘明 (東京歯科大学生物学)	

A. 研究目的

多環式芳香族化合物(PAH)の一つであり、有害環境汚染物質であるベンゾ[a]ピレン(BaP)は大気、水、底質、土壌のいずれにも含まれており発ガンを含めた生体影響が問題となっている。BaPが免疫機能に及ぼす影響については、主にマウスやラットを使用した実験において感染抵抗性、抗体産生、ナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性、マクロファージのTNF α やIL-1の産生を低下させることなどが報告されている。また、海域において二枚貝であるアコヤガイやカキなどの大量死があり、大量死では原虫、細菌、ウイルス、などの微生物の感染が確認されているが、このような多くの微生物に対する易感染性が起こる場合、高等動物では日和見感染と言いつい生体の防御能の低下が基礎にある場合が多い。これらのことは、環境中のBaPなどにより生物は免疫機能を攪乱される可能性があることを示している。しかしながら、BaPマウスやラット以外の生物の免疫機能におよぼす影響についてはほとんど検討されていないのが現状である。そこで、BaPが、マウス、ウズラ、金魚、アコヤガイ、ナメクジ、ミミズ、カイコの免疫機能に影響を及ぼす可能性があるかについて以下を指標として検討した。

マウス 新生仔における胸腺細胞への影響

ウズラ 免疫細胞(マクロファージ、TおよびB細胞)の活性、感染抵抗性への影響

金魚 腹腔内投与が腎臓、脾臓など免疫関連器官の組織および体腔に注入されたカーボン粒の、腎臓、脾臓への取込みへの影響

アコヤガイ 血リンパ球遊走能、総血リンパ球数、NBT還元能、血リンパ球分画、食作用、凝集素価への影響を検討した。

ナメクジ 短期間曝露による体表粘液の粘性、体液中マクロファージの貪食能への影響を検討した。

ミミズ coelomocyte異物貪食能、H2O2活性、NK活性、溶血活性など生体防御機能に対する障害を検索すること、および環境汚染物質の細

胞表面レセプター(AhRおよびエストロゲンレセプター)、代謝酵素(cytochromeP450)、核内移行のcofactor(HSP60, 90, 70)の発現に与える影響の分子病理学的検討。

カイコ 経皮投与が血球のカイネティクス、食作用、メラニン色素形成、抗菌活性並びにレクチン活性への影響を及ぼすかの解析。

B. 研究方法

1) マウスの免疫機能におよぼす影響

・動物および投与方法 9週齢の雌雄BALB/cを交配させて新生仔を得た。出生した日を1日目とし、7日目まで雌親に対して1日1回10または100mg/kg・dayのBaPをi.p.投与し母乳を介して薬物を仔に作用させた。対照群はOlive oilのみを投与し、7日目の新生仔の胸腺細胞を表面抗原解析に用いた。

・細胞表面抗原の解析 表面抗原の解析にはFACSscaliburを使用した。1 $\times$ 10⁶cells/mLの胸腺細胞懸濁液にCD4標識、CD8標識及びCD25標識の細胞表面抗原標識用マウス抗体を使用した。

2) 鳥類の免疫機能におよぼす影響

・動物 選抜54世代の♂・♀計62羽二ホンウズラの近交系(NIES-L₂系)を用いた。

・BaP投与 : 100mg/ml/kg, 30mg/ml/kg, 10mg/ml/kg および 0mg/ml/kg (対照群)のBaPを投与し免疫細胞の活性および感染抵抗性を検討した。

・BaPによるT, B細胞活性への影響 2回目のBaP投与から5日目に採血をおこなった。Percollを用いた密度勾配遠心にて、末梢血からリンパ球を分離し、RPMI培地(10% FCS添加)に懸濁した。無刺激あるいはConA(最終濃度1 μ g/ml, 10 μ g/ml)またはLPS(最終濃度5 μ g/ml, 10 μ g/ml)刺激したリンパ球を、5% CO₂インキュベーターにて39℃、2日間培養後細胞増殖をCell Proliferation ELISA, BrdU(colorimetric) kitを使用し測定した。

・BaPによる抗体産生能への影響 2回目の

BaP 投与から 5 日目に 40% SRBC 100ul/羽を 3 日間隔で、2 回続けて静脈内投与して免疫をおこなった。2 回目の免疫から 5 日目に採血をおこない、得られた血液を遠心し、血漿を分離し補体の非動化処理 (56℃, 30 分インキュベーション) をおこなった。96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに希釈液 (0.05% BSA/PBS) を添加後、各血漿を連続的に段階希釈をおこなった。そこへ、2% SRBC を各ウェルに添加し振とう混和後、プレートを加湿チャンバー内にて 37℃、90 分インキュベーションをおこない、赤血球凝集力価より抗体価の測定をおこなった (抗体価は $\log_2$ で表す)

・BaP によるマクロファージ貪食能への影響
2 回目の BaP 投与から 5 日目に 3% チオグリコレート培地を腹腔内投与し、それから 4 日目に誘導された腹腔マクロファージを回収した。採取した腹腔液の洗浄・遠心を繰り返し得られた細胞の数を血球計算盤にて算定した。細胞を RPMI 培地 (10% FCS 添加) に懸濁し、カバーガラスを敷いたプラスチックシャーレにマクロファージ数 4×10^5 cells/シャーレずつ添加し、5% CO_2 インキュベーターにて 39℃、2 時間培養した。インキュベート後、PBS でシャーレを洗浄し非付着細胞を除去し、新たに RPMI 培地を加えて一晩培養した。2 日目に、再度シャーレを PBS で洗浄後、蛍光ラテックスビーズ (10um) を浮遊させた RPMI 培地 (1×10^6 ビーズ/シャーレ) を添加し、5% CO_2 インキュベーターにて 39℃、3 時間培養した。シャーレを洗浄後、顕微鏡下でカバーガラスに付着した細胞をランダムに 200 個数え貪食したマクロファージの割合 (貪食率)、程度 (貪食度) を算定した。

・BaP 投与後のラウス肉腫 (RSV) 抵抗力の比較 (BaP 投与群 (20mg/ml/kg のみ) 各群、全てゾンデにて食道内投与を 3 日間隔で続けて 2 回おこなった。2 回目の BaP 投与から 8 日目に RSV または PBS を左右の翼下皮内 (wing web) に接種し、肉腫の肥大化と退化を測定した。最終的には、死亡率の有意性を検定する。RSV は、

PBS で 30,000FFU (focus forming units)/ml となるように調整し、各左右に 100ul (3,000FFU 相当) を接種した。

3) 金魚の免疫機能におよぼす影響

金魚 (当歳魚 Body Weight, BW 10-14g) の腹腔内に corn oil に溶かした BaP 100 mg/kg, 30 mg/kg, 0mg/kg を各群 3 匹に注射した。

実験 1 では 7 日後に、実験 2 では 7 日後にさらに生理食塩水 100 倍希釈 Indian ink (0.04ml/gBW) を腹腔内注射し、その 3 日後 (BaP 注射から 10 日後) に、金魚を解剖し、リンパ器官 (脾臓、腎臓、肝臓、胸腺など) を摘出、4% パラフォルムアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH7.2) で 7-8 時間固定、洗浄、水溶性樹脂 (JB-4) で包埋、組織切片 (2-3 μm 厚) 作製、スライドガラスに伸展貼付、ベルオキシダーゼ染色; ジアミノベンチジン (DAB) 反応液に浸漬、ヘマトキシリン核染色、封入、光顕で観察した。

4) アコヤガイの免疫機能におよぼす影響

・アコヤガイ 長崎県壱岐郡の日本産真珠母貝 (3 年輪) のアコヤガイを用いた。7 日間の馴化飼育を行い、輸送によるダメージを受けた個体を排除した。対照群 1 1、低濃度曝露群 1 1、高濃度曝露群 1 2 貝で実験を開始した。

・飼育海水 飼育海水は、人工海水「マリンアートハイ」を用時に適量のチオ硫酸ナトリウムにて塩素を中和した水道水にて作成し用いた。水温は馴化期間および有害物質曝露期間をとおして 20~21℃で行った。

・飼育および BaP 曝露 飼育は 20 リットル、ステンレス製水槽中にて無給餌で行った。BaP を DMSO に溶解し海水中に溶解し曝露を行った。DMSO 最終濃度は 0.01% であり、対照群にも同濃度の DMSO のみを溶解した。BaP 曝露濃度は低濃度群 5 ppm、高濃度群 50 ppm とし、14 日間曝露を行った。飼育海水は 2 日おきに交換した。

・貝の採血と処置 曝露終了後、開口器にて開口し閉殻筋を露出させ、綿棒にて海水、体表面の粘液等を清拭し、27G 針を装着したツベル

クリンシリンジにて採血した。採血後、血球を均一化し各種の検索に用いた。採血後の貝は閉殻筋を殻より離断し、体表面の肉眼的観察を行った後、各群から3貝ずつホルマリン固定し病理標本として保存した。

・免疫学的検索事項

a) 血リンパ球遊走能の測定 30 分間、室温 (20℃) の培養中に、10%大腸菌培養濾液を遊走誘因物質として、ポアサイズ5マイクロメートルのニトロセルロース・フィルター中を移動した距離を測定して、当該アコヤ貝の30分当たりの血リンパ球遊走距離とし血リンパ球遊走能を評価する。計測にはヘマトキシリン染色した細胞核を顕微鏡にて400倍率で観察した。

b) 総血リンパ球数の測定 人工海水にて2倍に希釈後、チュルク液を等量混合し染色の上、100倍率にて血算板の大視野について顕微鏡で計測した。

c) NBT還元能の測定 人工海水にて2倍に希釈した血リンパ液をシランコート・スライドガラス上に塗布して、人工海水にて3倍希釈した0.1%NBT (nitroblue tetrazolium) -PBSを3倍量添加混合の上、遮光・湿潤したボックス内にて室温 (20度) で5時間培養した。培養後に顕微鏡下に青染した細胞を顕微鏡にて400倍率で観察しNBT還元能陽性細胞と判定し全体の細胞に対する比率を計測した。

d) 血球分画の測定 シランコート・スライドガラス上に人工海水にて2倍希釈した血リンパ液を塗布し2.5%ホルムアルデヒドで固定後、エタノールにて脱水、風乾した血リンパ球塗沫標本につきメイ・ギムザ染色を行い、顆粒球と無顆粒球を顕微鏡にて400倍率で観察し計測した。

e) 食作用の観察 人工海水にて2倍希釈した血リンパ液をシランコート・スライドガラス上に塗布し、人工海水にて4倍に希釈したりチウムカルミン液を3倍量添加混和のうえ、湿潤したボックス内にて室温 (20℃) で3時間培養した。培養後、2.5%ホルムアルデヒド海水液で細胞を固定後、エタノールにて脱水、風乾し、

リチウムカルミン粒子を貪食しピンク色を呈する細胞を顕微鏡にて400倍率で観察し、貪食能を有する細胞と判定し全細胞に占める比率を計測した。

f) 凝集素価の測定 2倍希釈血リンパ液から分離した希釈血清につき、96穴丸底マイクロプレートにて人工海水にて2段階希釈系列を作成し生理食塩水で調整した同容量の0.5%保存ヒツジ赤血球 (SRBC) を凝集対象血球として用い、SRBCが凝集し沈降リングが形成されない最大の血清希釈倍率をもって、その個体の凝集素価として計測した。

5) ナメクジの免疫機能におよぼす影響

・実験動物 福岡県八女市にて採集した、陸棲軟体動物フツウナメクジ (*Incilaria bilineata*) を使用した。実験開始時の体重は $1.0 \pm 0.2g$ であった。

・曝露剤 BaP濃度がそれぞれ $10^1, 10^2, 10^3, 5 \times 10^3, 10^4 ppm$ になるように、99.5%アセトンに溶かして、5段階の曝露剤を調製し、それぞれをペーパータオルに染み込ませた後、真空ポンプにてアセトンを吸引して乾燥させた。この方法により、一定濃度のBaPが乾燥したペーパータオルに均等に付着した。

・曝露方法 内径125 mm、深さ50 mmのすり合わせ蓋付シャーレの中をBaPが付着したペーパータオルを敷きつめた。各シャーレに3個体のナメクジを移し、さらに細切ペーパータオルで覆い、汲置き水道水を霧吹きでペーパータオルを湿らせて飼育を行った。BaP濃度が $10^1, 10^2, 10^3 ppm$ については、10日間、 $5 \times 10^3, 10^4 ppm$ については5日間を曝露期間とした。

・貪食能測定 一定期間飼育後、ナメクジを $100 \times 70 mm$ のファスナー付ポリ袋に入れ、 CO_2 を充満させて、7-10分間 CO_2 麻酔を行った。ナメクジから体液を採取し、カバーガラスに滴下後、BSSで2%にしたヒツジ赤血球を加えて0.05%になるようにした。1時間静置後、乾燥、メタノール固定、ギムザ染色を経て観察した。

5) ミミズ (*E. fetida*) の免疫機能におよぼす

影響

飼育容器内で人工土壤中に一定濃度のBaP、ジメチルベンゾアントラセン (DMBA) を混入し、5日間、暴露する。(BaP;100pg-100ng/20g) (DMBA;100ng-100mg/20g)

曝露したミミズから coelomocytes を分離 および組織を採取。

組織材料を免疫組織化学的手法により検索 (cytochromeP450, HSP60, 90, 70)

coelomocytes の免疫機能検索 (蛍光ビーズ食能およびH2O2 活性を FACS で測定、NK 活性を chromium release 法で測定)。

6) カイコの免疫機能におよぼす影響

・ベンゾピレン (BaP) の経皮投与法 人工飼料を用いて約22℃で育てたカイコ (*Bombyx mori*, J106 X DAIZO strain)の終齢幼虫 (5齢) 並びに前蛹2日目の個体 (抗菌活性とレクチン活性が誘導される発生段階) を使用した。BaP をアセトンに0.1%になるように溶解し、カイコ終齢幼虫の1日目から6日間にわたり1日1回、背側皮膚に絵筆を用いて塗布した。また1回のBaP 暴露実験では終齢4日目の幼虫を使用し同様にBaP を塗布した。なお、塗布対照群としてアセトンのみの経皮投与を同様に行った。

・総血球数及び血球比の測定 総血球数はカイコ幼虫の尾角を切除して得られる最初の体液を2滴採取し、タタイ式血球計算盤を用いて直接カウントした。また、血球比については、この血球計算盤で観察される顆粒細胞 (球状で細胞内顆粒があり糸状突起を有する血球) とプラズマ細胞 (採血後約2分間以内は紡錘形をしている血球) の占める割合を、全部で300個の血球を観察して調べた。

・食食活性の測定 0.5%のヒツジ赤血球浮遊液をリン酸緩衝食塩液 (PBS, pH7.2) で作製しこれを第1腹脚の符節より後部側の体腔内に注入した後、注入部位をワックスで封じた。60分後に尾角を切除して体液を10mM のフェニルチオウレアの入ったカイコ用生理的食塩水 (150mM NaCl, 5mM KCl) に採取して、プリリアントクレ

ジルブルー染色して、食食率を観察した。全部で300個の顆粒細胞をカウントして、ヒツジ赤血球を1個以上取り込んでいる顆粒細胞を食食陽性細胞とカウントした。

・メラニン形成の観察 終齢6日目のカイコ幼虫より尾角を切除して得られる体液を1.5ml 用マイクロチューブに採取して2000回転5分間遠心後、その5μlを0.5%ドーパを含む1.2%アガロースゲル (昆虫生理的食塩水で作製) のウエルに添加して黒色のメラニン色素の形成を室温で24時間放置後に観察した。

・抗菌活性の測定 セエリプロテアーゼ阻害剤結晶を用いて前蛹2日目のカイコより得られた体液20μlと普通ブイヨンを用いて1晩37℃で培養した大腸菌浮遊液20μlをマイクロチューブに入れて混合し、37℃で60分インキュベートした。その後、普通寒天培地を用いて混合希釈培養を37℃で24時間行い、生じた大腸菌コロニーをカウントした。

・レクチン活性の測定 前蛹2日目のカイコより得られた体液中のヒトO型赤血球に対するレクチン活性を凝集反応によって調べるため、0.5%ヒトO型赤血球浮遊液をPBSで作製し、U底型96穴マイクロプレートを用いて体液を2倍階段希釈した後、赤血球浮遊液を加えて凝集力価を室温2時間後に観察した。

・生体外での血球の形態観察 終齢4日目の正常カイコ幼虫の体液をフェニルチオウレア含有生理的食塩水に採取した後、乾燥を防止しながら、30分間氷冷下でスライドガラス上に血球を付着させた。上清を捨て2回昆虫生理的食塩水で洗浄し、BaP 液を添加して22℃で60分間インキュベートした。その後ギムザ染色して血球形態を光学顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1) マウスの免疫機能におよぼす影響 BaP を低用量で投与した新生児の体重、胸腺の体重比、胸腺細胞の胸腺重量比の変化については体

重、胸腺の体重比いずれもあまり変化は見られなかった。一方で胸腺細胞の胸腺重量比は有意な増加が見られた(図1)。投与量を増やすと体重に有意な減少が見られた。胸腺細胞の胸腺重量比について有意な増加が見られた(図2)。CD4CD8の発現は、10mg/kg BaP投与のマウスにおいて、CD4+CD8-及びCD4+CD8+ T細胞の割合に増加傾向が見られたが有意な差には至らなかった。CD4-CD8- T細胞及びCD4-CD8+ T細胞の割合は有意な減少が見られた。100mg/kgのBaPを投与群では有意な影響は見られなかった。

CD4CD25抗原のT細胞の発現については10mg/kg BaP投与したマウスではCD4+CD25+サブセットのCD4^{high}およびCD4^{low}の領域は減少傾向が見られた(図3)。100mg/kg BaP投与群ではCD4+CD25+サブセットのCD4^{low}の領域において有意な減少が見られた。highの領域には変化は見られなかった(図4)。

2) ウズラの免疫機能におよぼす影響

・BaPに対するT、B-細胞活性の変化 BaP(0, 10, 30, 100 mg/kg)投与後のCon AおよびLPSに対するウズラリンパ球のMitogen活性を検討した。Con Aに対するMitogen活性は、1ug/ml添加では対照群(無刺激)と同じとなり活性化されなかったが、10ug/ml添加では10および30 mg/kg投与群で有意な刺激効果(stimulation index = 1.5~2.5)が得られた($p < 0.05$) (図5)。この刺激効果(S.I.)を、BaP濃度別に比較すると10>30>100 mg/kgの順となり、量反的に抑制されることが示唆された。すなわち、BaP投与によりT-細胞活性は抑制されることが示唆された。

一方、LPSに対するS.I.は、BaP投与群が5および10 ug/ml添加区とも有意に上昇した(S.I. = 1.5~2.5, $p < 0.05$)。これを、BaP濃度別に比較すると10および100 mg/kg投与群での刺激効果は高いものの、30 mg/kg投与群では、逆に

S.I.が低下したため、量依存的な反応性は有意なものではなかった(図5)。以上のことから、BaPに対しては、T-細胞活性が低下し、B-細胞活性は上昇する傾向にあることが示唆された。

・BaPに対する抗体産生能への影響 図6はBaPのSRBCに対する抗体産生能への影響を示している。抗体産生能(SRBC-HA価, log₂)は、対照群:6.8±1.6(5羽)・10 mg/kg投与群:6.8±1.6(5羽)・30 mg/kg投与群:7.0±3.0(5羽)・100 mg/kg投与群:6.0±2.9(5羽)となり、何れも有意性は認められなかった。しかしながら、30および100 mg/kg投与群では各1羽にSRBC-HA力価が低い個体(共に2以下)が認められた。この現象は、抗体産生能に攪乱を起こしたという可能性も否定できないので、現在確認をおこなっている。

・マクロファージの食食能 図7はBaPがマクロファージの食食能に及ぼす影響について示している。ピーズの食食率は、BaP投与量に依存して低下し、有意な量反応曲線が得られた。以上より、マクロファージ活性は、BaP投与量に従って抑制されることが示唆された。

・ラウス肉腫(RSV)に対する抵抗力の比較 BaP 30 mg/kg投与下においては、ラウス肉腫の形成時期や肥大化の速度および退化の速度を指標として抵抗力を比較したところ、両群の間で有意な差は見られなかった(図8)。

3) 金魚の免疫機能におよぼす影響

・実験水槽内での金魚の行動観察 100 mg/kg BW, 30 mg/kg BWのBaPを注射された金魚は、対照群(0mg/kg BW)の金魚と比較して、特に変化が見られず、外見上はまったく健康で行動も活発であり、無処理の金魚と何ら変わりがないようであった。7日後にIndian inkを注射した個体においても、対照群あるいは無処理の金魚との違いは見られなかった。

・腎臓と脾臓のペルオキシダーゼ反応 実験群と対照群の腎造血組織内には、多くのペルオキシダーゼ反応陽性細胞が観察された。陽性細胞