

の数、密度などについては、個体数が少なく確定的なことはいえないが、両者の間に大きな違いは認められなかった。泌尿器系組織については、100 mg/kg BW 投与群の尿細管に若干の変性像と新たな細胞新生はみられた(図9、10)。脾臓の細網組織内には、100 mg/kg BW 投与群においてペルオキシダーゼ反応陽性の顆粒を豊富に持つ細網様細胞が多く出現する個体がみられたが、これについても、今後実験個体数を増やして検討する必要があると考えている。

・Indian ink の取り込み 実験群と対照群の Indian ink の取り込みを比較すると、実験群において若干の取り込みの低下がみられた。脾臓において、実験群・対照群ともにエリブノイド(英動脈)周囲に Indian ink の取り込みがみられたが、その取り込みは、実験群においてより明瞭であった(図11、12)。腎臓の取り込みには、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。

4) アコヤガイの免疫機能におよぼす影響
曝露飼育期間中に各群において目立った変化はなかった。曝露終了日に、低濃度 BaP 曝露群の1貝の状態が悪く検索から除外した。鰓構造の破壊と反応性(刺激を加えることにより反射的な閉殻)の低下が軽度に見られた。

・血リンパ球遊走能 血リンパ球の遊走能の比較では、対照群に比して BaP 曝露群で小さい値となる傾向があったが、個体差が大きく有意差は認められなかった。

・総血リンパ球数の測定 総血リンパ球数には 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(図13)。

・NBT還元能測定 いずれの細胞においても BaP 曝露による差はなかった(図14)。

・血リンパ球分画の測定 血リンパ球分画は、無顆粒球と顆粒球の比率がほぼ2:1であり、従来の諸報告と同じであったが、個体差が大きかった。また、BaP 曝露の影響は認められなかった(図15)。

・食作用の観察 リチウムカルミンの食食能は高濃度 BaP 曝露群で低値を示したが、個体差が見られた(図16)。

・遊走能の測定 血リンパ球の遊走能は各群間に有意差は認められなかった(図17)。

・凝集素価の測定 凝集素価には各群間に差はなかった。

今回の BaP 曝露の最も大きな影響は、血リンパ球の食食能であった。血リンパ球の食食作用は生体外から侵入する異物に対して即対応できる生体防御機構の一つであり、免疫学的な進化の遅れた生物の生体防御にとっては重要な機能を担っている。さらに体内に取り込んだ栄養素の利用の課程でも細胞の食作用が関与するのでさらに有用な機能である。この他の指標には BaP 曝露の影響は認められなかった。使用した貝の個体差の大きさも影響が検出できなかった要因と考えられるが、低濃度、高濃度ともに対照群との間に差がある傾向もなかったため、今回採用した BaP 曝露条件ではアコヤガイに対して血リンパ球食食能の低下といった弱い免疫学的異常をのみ与えたものと結論できよう。

5) ナメクジの免疫機能におよぼす影響

・粘液の性質 正常状態におけるナメクジの粘液は薄褐色を呈する透明なしょう液性である。10³ppm までの BaP の曝露では粘液の性状に変化が起きないが、5×10³ppm 以上では白色の粘液性になることが観察された。しかしながら、粘液の分泌量は BaP 濃度によって異なることはなかった。

・マクロファージ食食能 *In vitro*においてマクロファージの食食能を調べたところ、正常なナメクジ血球マクロファージの食食能に比して、10²ppm 以上では明らかな低下がみられた。10⁴ppm では正常時の 1/7 までに低下することが分かった。マクロファージの周囲に SRBC が多数あるのにもかかわらず、食食数が少ないことによるものであった(図18)。

6) ミミズの免疫機能におよぼす影響

・食食能に及ぼす影響 BaP への暴露が、血球細胞の蛍光ビーズ食食能にあたえる影響を測定した結果、暴露後同様に経時的に低下した。5 日目の血球細胞を測定すると、汚染土壌中の濃度が $1\text{ ng}/20\text{ g}$ から濃度依存的に抑制された。食食能は $100\mu\text{g}/20\text{ g}$ で、約 70% の低下した (図 19)。しかし $100\text{ pg}/20\text{ g}$ 以下では影響を与えなかった。

血球細胞の H2O2 活性は、暴露後同様に経時的に低下した。5 日目の血球細胞を測定すると、 $100\text{ pg}/20\text{ g}$ ですでに、活性の低下が見られ、 $100\text{ ng}/20\text{ g}$ では、対照群に比べ半減した。

DMBA の暴露は、上記の免疫能の低下には、より高濃度が必要であった。

・代謝酵素への影響 *E. foerlida* を BaP および DMBA 汚染人工土壌中で、1 日から 5 日まで暴露させ、血球細胞の酵素活性と食食能を FACS で、および P450、HSP60、70、90 の発現動態を免疫組織学的に検討した。

P450 (CYP1A1, 2E1) 発現は、皮膚上皮細胞 (図 20)、血球細胞で著明に増加した。HSP60、70、90 の発現も、経時的に増加を示した。また、CYP1A1 は遺伝子発現レベルでも発現増加を確認した。

7) カイコの免疫機能におよぼす影響

・総血球数及び血球比に及ぼす影響 終齢 1 日目から 6 日間、BaP を塗布した結果、総血球数が著しく減少した (図 21)。また血球比を調べて見ると、BaP 塗布群では顆粒細胞の占める割合が減少し、プラズマ細胞の割合が増加した (図 22)。

一方、1 回の BaP 暴露を終齢 4 日目の正常幼虫に行い、総血球数及び血球比を観察した結果、BaP 塗布後 2 時間目で総血球数が増加するのが観察された。しかし、その後は対照群よりも低下した (図 23)。一方、塗布後 60 分目に顆粒細胞とプラズマ細胞の占める割合は、BaP 塗布によって顆粒細胞比が減少し、プラズマ細胞比が増加するのが観察された (図 24)。

・生体外での BaP 処理が顆粒細胞及びプラズマ

細胞の形態に及ぼす影響 終齢 4 日目の正常カイコ幼虫から得た血球に生体外で BaP を添加し 60 分間処理して形態への影響を観察した。BaP 添加群の顆粒細胞の形態と伸展は対照群の顆粒細胞と比較して糸状突起の伸展も抑えられる傾向が見られた。しかし、プラズマ細胞の形態と伸展は BaP 添加群でも対照群と同じであった。

・顆粒細胞による食食活性に及ぼす影響 終齢 1 日目から 6 日間、BaP の塗布は、顆粒細胞によるヒツジ赤血球の食食率を低下させた (図 25)。

・メラニン色素形成に及ぼす影響 終齢 1 日目から 6 日間、BaP 塗布が体液メラニン色素形成に及ぼす影響をドーバ反応により観察した結果、BaP 塗布はメラニン色素形成にほとんど影響はを与えなかった。

・抗菌活性に及ぼす影響 終齢 1 日目から 6 日間の BaP 塗布が、幼虫が前蛹 2 日目になったときの体液の示す抗菌活性に及ぼす影響を検討した結果、BaP 塗布は体液の抗菌活性を低下させ、生菌数が対照群よりも多く観察された (図 26)。

終齢 1 日目から 6 日間の BaP 塗布が、幼虫が前蛹 2 日目になったときの体液の示すレクチン活性に及ぼす影響を検討した結果、BaP 塗布は体液のレクチン活性を低下させることが観察された (図 27)。

D. 考察

マウス BaP は煙草やディーゼルエンジンの排ガスに含まれる発ガン性を有する PAH である。この PAH に属す物質は Ah-receptor を介して胸腺細胞の委縮を引き起こし、その結果 B 細胞や T 細胞の免疫反応を抑制するという報告がある。また、胎仔の胸腺や肝臓に対して PAH がその細胞数に影響を与えるというデータも報告されている。そこで、BaP が胸腺細胞の CD25 を発現する CD4 T 細胞のサブセットに何らかの影響を与える可能性について検討した。10mg/kg・day を 1 週間投与した系において胸

腺細胞の分化段階については CD4+CD8⁻、CD4⁻CD8⁺のサブセットの割合の有意な増加が見られた。CD4⁻CD8⁻、CD4+CD8⁺のサブセットに有意な変化が見られなかった。本実験に用いた投与量の BaP では CD4 T 細胞のサブセットの分化、成熟におよぼす影響は小さいものと考えられた。BaP が Ah-receptor を介し分化成熟段階に影響を及ぼすかについては胸腺細胞の総数と胸腺重量にあまり変化が見られなかったことも考慮すると今回の結果からでは不明であり、今後の検討課題である。一方、100mg/kg・day 投与したところ、体重が大きく減少した。また、脾臓重量が大きく減少した。また、胸腺の cellularity が対照群に比べ大きく増加したが、これは胸腺重量の BaP を投与した群での減少の割合が、胸腺細胞数の総計における BaP の減少の割合よりも大きかったからと考えられた。高濃度の BaP を投与した系において CD4、CD8 T 細胞の発現はほとんど変化が見られなかった。しかし、CD4+CD25⁺ T 細胞については低濃度の投与時は CD4 high の領域で減少が見られたのに対し、高濃度では low の領域で大きく減少が見られた。抑制性 T 細胞のサブセットは CD4+CD8⁻CD25⁺であるとの報告があり、今後さらに検討を加える余地がある。また、本研究 BaP 投与の系で組織の変化についての評価は進行中である。自己免疫疾患の発症への関与については今後の検討する課題である。また、BaP が親の体内で分解、排出されてしまい、新生仔マウスに取り込まれたものが少ないの可能性もある。従って、新生仔に直接投与し影響を評価することについても検討する必要がある。

ウズラ 鳥類の免疫機能に及ぼす有害化学物質の影響については、特に有機塩素化合物が問題であると報告されている。今回の BaP は、発ガン性のある有機塩素化合物として古くから注目されており、また最近では内分泌攪乱化学物質として問題視されている。しかしながら、これまでの報告例は野鳥の調査が主体であり、免疫毒性の文献の占める割合が少ないため、BaP が

鳥類の免疫機能に及ぼす影響を実験的に検証する必要が生じていた。NIES-L₂ 系ウズラでの BaP 投与後の免疫細胞の変化では、T-細胞とマクロファージには制御的に働き、一方、B-細胞には促進的に作用することが示唆された。しかしながら、抗体産生能 (SRBC-HA 力価) 及び感染抵抗性 (RSV 肉腫形成) には、BaP の 10・30・100mg/kg 投与では影響が明らかではなかった。

このように、近交系ウズラを用いた免疫機能への BaP の投与は、細胞レベルで攪乱されるものの、最終的な感染抵抗力を低下させるまでに至らなかったと考えられる。

金魚 金魚は哺乳動物と比較して、BaP に対して強い抵抗性を示し、高濃度の腹腔内注射を行っても、目立った病的(病理的)変化を起こさなかった。これには今回の投与方法 (corn oil に溶かして腹腔内に注射するという方法)、投与量、アッセイ系 (組織学的観察) の妥当性をすこし検討する必要があるだろう。Walczak ら (J.Fish.Biol.,supplA 251-253, 1987)は、ニジマスに BaP を腹腔内注射し、12 ヶ月後に血球採取を行い、単球の食作用の低下を報告している。このように食作用の増減の判定は、単離した細胞でのアッセイ系が有用で、今回用いた組織切片法は量的観察には不向きである。今後、血清学的検査を含めて、単離した血球を用いたアッセイが必要と考えている。

ナメクジ 陸棲軟体動物ナメクジを用い、環境汚染物質の一つである BaP に短期間曝露した時の生体防御系の変化について検索し、ナメクジ類が、環境汚染の指標動物として、最適ではないかとの結論を得た。ナメクジの体表は、単層円柱上皮細胞及びその所々に存在する多数の粘液細胞で覆われている。円柱細胞は体表側に微絨毛を突出させ、その基部には多数の pinocytic vesicle が観察され、あたかもヒト消化管上皮様を呈している。また体表に分泌される粘液は、二種類の粘液細胞(round mucous cell, tubular mucous cell)から放出され、その放

出機構は体表面に感覚毛を持つ感覚細胞によってコントロールされている。このことは、ナメクジにとって不快な、又は有害な物質が存在する時には、粘液分泌が変化することが予想される。さらに、上皮細胞の構造の上から、容易に環境物質が取り込まれることも考えられる。体内についてみると、ヘモシアニンを血色素にもつ血液(体液)中に、血球(マクロファージ)が存在し、異物の認識・食食を行っている。

我々は、BaP 濃度を5段階に分け、短期間曝露におけるナメクジ生体を組織学的に観察した。 5×10^3 ppm 以上の濃度では、体表粘液の分泌が変化し、通常時に見られないきわめて粘性の高い白濁した粘液を分泌することが分かった。また、マクロファージの食食能をヒツジ赤血球を注入することで観察計量したところ、血球数は増加するものの、 5×10^3 ppm 以上の濃度では、明らかに食食能が減少することが分かった。この結果はBaP 単独汚染の場合ですら、ナメクジの生体防御系に明らかなダメージを与えること、またさらに、粘液の分泌が変化することから、この動物を観察することによって、肉眼的に汚染土壌を見分け得るものと考ええる。

無脊椎動物でも、近年 C-反応性蛋白質(C-reactive protein, CRP)の存在が報告されている。しかし、それらの報告によると、急性期蛋白質ではなく、常時高レベルでみられると述べられている。このことは無脊椎動物の住環境から推測してみると、理解し得るレベルであると考ええるが、無菌的状态ではどうかの報告はみられない。我々は今後、生体防御系の攪乱によって引き起こされるであろう日和見感染の機序についてさらなる実験を継続すべきであると考ええる。

アコヤガイ BaP 曝露の最も大きな影響は、血リンパ球の食食能であった。血リンパ球の食食作用は生体外から侵入する異物に対して即対応できる生体防御機構の一つであり、免疫学的な進化の遅れた生物の生体防御にとっては重要な機能を担っている。さらに体内に取り込んだ栄

養素の利用の課程でも細胞の食作用が関与するのでさらに有用な機能である。この他の指標にはBaP 曝露の影響は認められなかった。使用した貝の個体差の大きさも影響が検出できなかった要因と考えられるが、低濃度、高濃度ともに対照群との間に差がある傾向もなかったため、今回採用したBaP 曝露条件ではアコヤガイに対して血リンパ球食食能の低下といった弱い免疫学的異常をのみ与えたものと結論できよう。今回のBaP 曝露条件は、5および50ppb ($\mu\text{g/L}$)の低濃度であり、かつ2週間という短期間であった。にもかかわらず、1項目ではあるものの僅か2週間のBaP 曝露によって免疫機構の一部が障害されることは問題であるとも言える。アコヤガイに関して全国各地で環境汚染物質が原因と考えられる日和見感染症の発症が、その原因の一つであると考えられている大量斃死が起こっている。日和見感染症は免疫機能が低下した結果として、あらゆる微生物に対しての抵抗力が失われて発症するものである。これら大量斃死の事実は、アコヤガイなどの野生生物が環境汚染物質の影響によって免疫機構が障害されていることを示すものである。

ミミズ 土壌中にしみ込んだ化学汚染物質のBaP やDMBA は、ミミズの皮膚を介して、取り込まれ、ミミズの免疫能の低下をきたすことが明らかとなった。

食色や H2O2 産生能といった基礎的な生体防御機能への影響は、ミミズの致死量以下でもおこることが確認され、その生存に重大な障害をもたらすことが明らかになった。このことは、ミミズの体内にこれらの物質が蓄積する可能性を示しており、長期投与の影響とともに検索が必要であると考ええる。本研究の結果、FACS を用いた簡便な検査法により、食色や H2O2 産生能の変化をモニターすることで生物学的測定が可能となることが示唆された。

カイコ 昆虫は体液内に存在する顆粒細胞とアメーバ状のプラズマ細胞が関与する細胞性防御反応、並びに抗菌蛋白質(セクロピン、アタシ

ン、ディフェンシン、高グリシン含有抗菌性蛋白質など)、異物細胞凝集性のレクチン、メラニン色素形成に係るフェノールオキシダーゼ系などに依存する液性防御反応によって、生体内に侵入する病原体などの異物細胞を排除することができる。この生体防御反応が正常に作動することが、昆虫の生存と健康維持にきわめて重要であると考えられる。昆虫はまた、人間の生活空間に常に存在しているため、人間活動によって放出される種々の化学物質の影響を直接に受ける存在でもある。したがって自然界に放出される有害汚染物質に常にさらされる運命にあるが、昆虫の生体防御機能にその物質がいかなる影響を及ぼしているかについては不明である。本研究では、有害物質であり発ガン性の強い BaP がカイコの皮膚から吸収された場合、どんな影響が免疫学的にもたらされるかを解明する一環として、人為的に BaP をカイコ幼虫の皮膚に塗布して、生体防御因子に及ぼす影響を調べた。

BaP の連続的な経皮投与により、1) 総血球数と顆粒細胞比が減少、2) 顆粒細胞による食食作用が低下、3) 抗菌活性とレクチン活性が低下することなどが判明した。また生体外での BaP 処理は顆粒細胞の形態にも影響することもわかった。1 回の BaP 暴露も総血球数や血球比に影響したので、環境有害物質である BaP は、昆虫の生体防御機能を抑制することが強く示唆される。したがって自動車の排気ガスやタバコのタールなどに含まれている BaP は免疫学的に昆虫の健康に悪影響を与える可能性があると思われる。

昆虫類では、殺虫剤であるパラチオンや馬拉チオンの処理で総血球数が減少することや顆粒細胞やプラズマ細胞の形態が変化し縮小化すること、さらに摂食阻害剤の処理でノジュール作用などの細胞性防御反応と抗菌蛋白質の産生が抑制されることが報告されているので、今回得られた BaP による同様の抑制作用がこれらの物質による抑制作用と同じ作用機序で生じてい

るかを今後追究することが必要と思われる。

E. 結論

今回用いた環境生物においては BaP の曝露によりマクロファージなど食食細胞の機能低下が観察された。免疫機能の低下が日和見感染などにつながっていく可能性が示唆された。今後より低い濃度での影響についての検討が必要とされる。動物種による感受性の違いや各免疫担当細胞機能や免疫に関わる物質群の活性に与える影響にも違いが観察された、その要因についてもさらに検討する必要がある。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1. Selgrade, M.J., Daniels, M.J., Dean, J.H., Correlation between chemical suppression of natural killer cell activity in mice and susceptibility to cytomegalovirus: rationale for applying murine cytomegalovirus as a host resistance model and for interpreting immunotoxicity testing in terms of risk disease. *J. toxicol. Environ. Health*, 37, 123-137 (1992).
2. Blanton, R.H., Lyte, M., Myers, M.J., Bick, P.H., Immunomodulation by polyaromatic hydrocarbons in mice and murine cells. *Cancer Res.* 46, 2735-2739 (1986).
3. Selgrade, M.J., Daniels, M.J., Bueleson, G.R., Lauer, L.D., Dean, J.H., Effects of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, benzo[a]pyrene and cyclosporin A on murine cytomegalovirus infection: studies of resistance mechanisms. *Int. J. immunopharmacol.* 10, 811-818 (1988).
4. Selgrade, M.J., Daniels, M.J., Dean, J.H., Correlation between chemical suppression of natural killer cell activity in

mice and susceptibility to cytomegalovirus: rationale for applying murine cytomegalovirus as a host resistance model and for interpreting immunotoxicity testing in terms of risk disease. *J. toxicol. Environ. Health*, 37, 123-137(1992).

5. Kong, L-Y, Luster, M.I., Dixon, D., O'Grady,

J., Rosenthal, G.J., Inhibition of lung immunity after intratracheal instillation of benzo[a]pyrene. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 150, 1123-1129(1994).