

愛媛大学沿岸環境科学研究センター  
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」  
共同研究報告書（2023年度）  
研究内容（別紙）

研究課題

**Benzo[a]pyrene 暴露後における免疫応答の経時的変化と  
ウイルス感染への影響評価**

鹿児島大学 山崎雅俊

1. 研究目的

哺乳類において、環境化学物質が芳香族炭化水素受容体（AhR）を介して Th サブセットの分化・誘導に影響し、アレルギー性皮膚炎の増悪化や常在細菌や病原体に対する感受性に影響しているという報告がある（Furue *et al.*, 2019, Araújo *et al.*, 2021）。一方、魚類において環境汚染物質と AhR への結合性や化学物質の代謝などは研究されているが、AhR 活性化を介した Th バランスの不均衡に至るメカニズムや病原体感受性に与える影響などの研究は行われていない。

23年度 LaMer 共同研究では多環芳香族炭化水素の魚体への蓄積量と免疫攪乱の関連性、及びその免疫攪乱がウイルス感染に与える影響を調べる予定であったが、基礎的知見を充実させるため、C重油の水溶性画分液を用いた Th バランスの不均衡モデルの開発に計画を変更した。近年、我々はジャワメダカに対する C 重油水溶性画分液の 4 週間における連続曝露試験において、炎症性サイトカインの遺伝子発現低下と抗炎症性サイトカインの遺伝子発現上昇という逆相関関係を確認した。一方、どのくらいの期間、どのくらいの濃度でこの逆相関関係が観察されるのかは明らかではない。そこで本研究では、短期間曝露によって本応答が誘導される曝露濃度を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1. 試験魚

試験魚には、鹿児島大学水産学部環境保全学研究室で継代飼育している海産メダカであるジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) を用いた。試験には、孵化後 230-250 日の成魚 (魚体重:  $0.36 \pm 0.07$  g) を供試した。

### 2.2. ホルマリン不活化菌体の調整

病魚から分離された病原性株である *Vibrio anguillarum* NUF113 株を供試した。菌体を TSA 培地で継代した後、25 °C で 48 時間培養後に使用した。

培養した *V. anguillarum* NUF113 株を湿菌重量 1 mg/mL に PBS を用いて調製した。ホルマリンをホルムアルデヒド終濃度が 0.5 % になるよう菌浮遊液に加え 4 °C、24 時間静置した。その後、PBS で 22 °C、10,000 ×g、3 分間の条件で 3 回遠心洗浄し、PBS に 1 mg/ml となるように再懸濁した。菌の不活化を確認するため 100 μl を TSA 培地に塗布し、25 °C、24 時間培養し、コロニーが形成されないことを確認した。ホルマリン不活化菌体 (FKC) 懸濁液は使用まで 4 °C で保存した。なお、細菌培養及び FKC の調整等は愛媛大学沿岸環境科学研究センター内にある無菌培養室を利用した。

### 2.3. 暴露試験

海水 900 mL の水面上に C 重油を 100 mL 重層し、室温で 23 時間攪拌した。1 時間静置後、下層の海水部分を抜き取り、これを溶出液とした。海水で溶出液濃度が 20%、0.8%、0.032% となるように調製した。2.5 L の暴露水に 10 個体のジャワメダカを入れ、96 時間曝露した。

### 2.3. FKC による抗原刺激

C 重油の溶出液に曝露後、FKC による抗原刺激を行った。200 mL ビーカーに  $5 \times 10^8$  CFU/mL となるように FKC を調製した。そこに曝露したジャワメダカ 5 尾を入れ、室温で 1 時間浸漬した。飼育水に置換後、24 時間後に氷冷麻酔を行い、脱血し鰓をサンプリングした。ISOGEN (ニッポン・

ジーン) 内でホモジネートし、冷凍保存した。なお、菌体による抗原刺激は、愛媛大学沿岸環境科学研究センター共同設備である感染試験施設を利用した。

#### 2.4. 免疫関連遺伝子の発現解析

RNA はフェノール・クロロホルム抽出法で抽出し、High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) で cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、GoTaq® qPCR Master Mix (Promega)を用いて比較 Ct 法により鰓における TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、IL-10 および IL-22 遺伝子の発現解析を行った。

### 3. 研究成果

#### 3.1. C 重油溶出液の曝露試験結果

C 重油の溶出液に含まれる油分量を蛍光分光法 (クリセン標準) で測定したところ、 $698.8 \pm 72.2 \mu\text{g/L}$  であった。曝露試験の結果、試験期間中に全ての試験区で死亡は見られなかった。激しい炎症等、肉眼目視で確認できる状態変化は確認されなかった。

#### 3.2. 免疫関連遺伝子の発現解析

曝露 96 時間後の鰓における免疫関連遺伝子の発現解析の結果、Naïve や 0.03%曝露区と比較して、0.8%曝露区及び 20%曝露区で炎症性サイトカインである TNF $\alpha$ の有意な発現低下が観察された。また、Th1 や一部の Th17 が産生する IFN $\gamma$ の産生も曝露濃度依存的な発現減少の傾向が観察された。一方、Treg が産生する抗炎症性サイトカインである IL-10 や AhR により誘導される IL-22 の発現については、Naïve と比較し増減の変化は見られなかった。

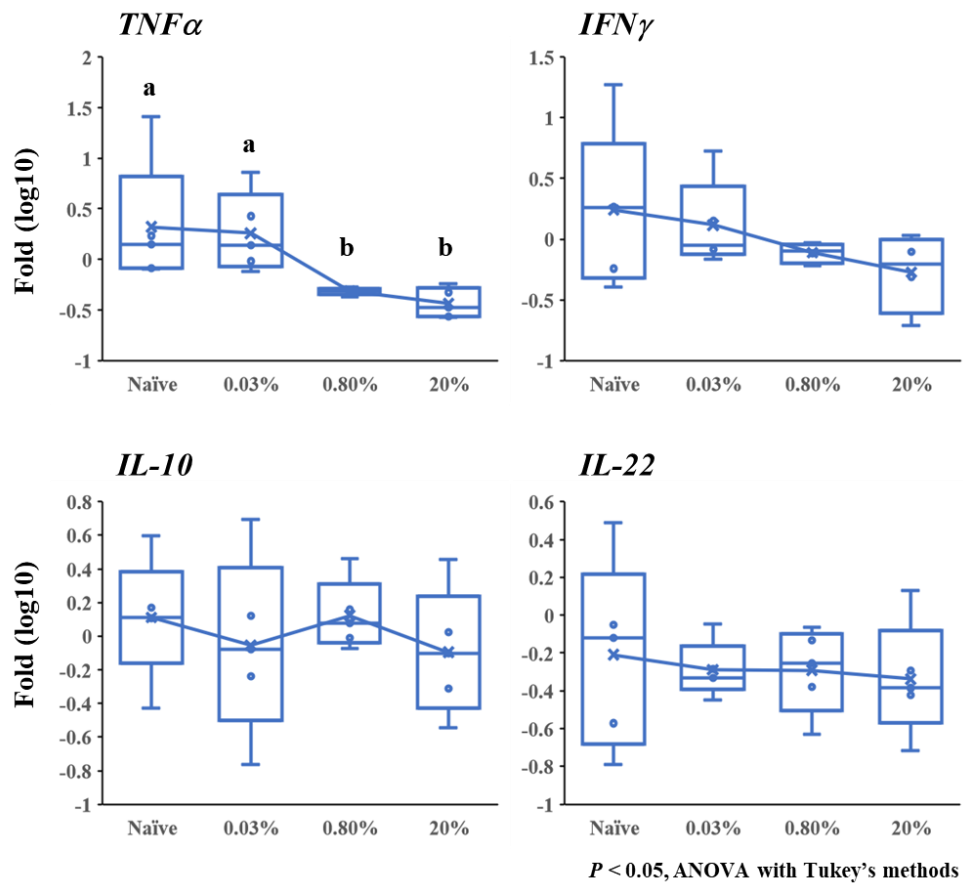


Fig.1. C 重油の水性画分暴露魚における  
抗原刺激後の免疫関連遺伝子の発現解析

### 3.3. Th17/Treg バランスの検証

免疫関連遺伝子の発現解析の結果、炎症性の免疫応答が濃度依存的に低下していた。一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 の発現については、変化は見られなかったが、IL-10 の発現の特徴として個体差が大きいことが観察された。そこで、個体ごとに  $TNF\alpha/IL-10$  或いは  $IL-10/TNF\alpha$  の値を算出し、炎症を誘導する Th17 と抑制する Treg のどちらが優位に誘導されているかを検証した。

検証の結果、0.08%及び20%曝露区では、Th17/Treg バランスが Naïve 区或いは0.03%曝露区と比較して Treg 誘導側に傾いており、特に0.8%では有意に抗炎症性サイトカインの誘導に傾いていた。これまでの研究において、C重油の水溶性画分の長期曝露によって、抗炎症性サイトカインの誘導が観察されていた（未発表）。本研究では0.8%の低濃度で96時間の短期間曝露によっても、炎症性サイトカインの抑制が観察されるとともに、各個体におけるサイトカインバランスについては Treg 側に大きく傾いていた。一方、22年度 LaMer 共同研究では、Benzo[a]pyrene (BaP)を用いた暴露試験において全身性の炎症が観察され、今回の試験とは異なる挙動を示していた。C重油の水溶性画分液には Phenanthrene や Pyrene など、4環以下の PAH 類が多く含まれており、BaP のような5環以上の PAH 類はほとんど含まれていなかった。この結果から、誘導される Th サブセットの違いは、PAH 類の環数や分子の形に依存していると考えられる。

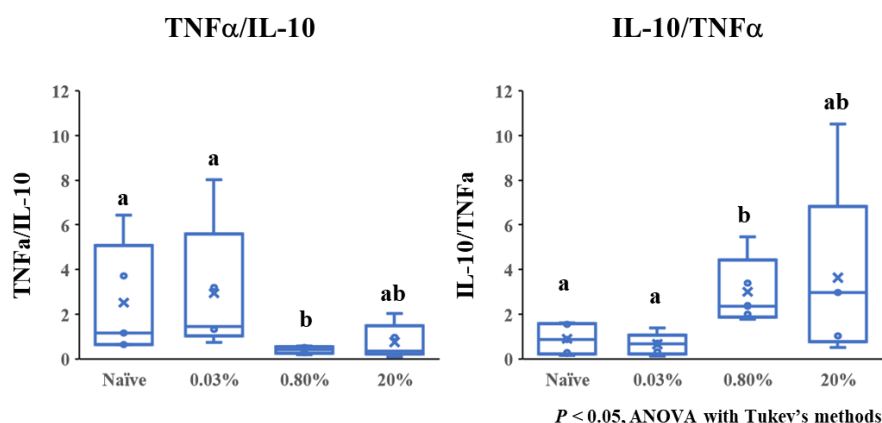


Fig.2. 炎症サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの発現比較による Th17/Treg バランスの解析

#### 4. 今後の課題

23年度 LaMer 共同研究では、C 重油の水性画分暴露魚に対する細菌のFKCによる抗原刺激を行い、誘導される Th サブセットを解析した。その結果、炎症性サイトカインと比較して抗炎症性サイトカイン優位になっていたことから、Treg 側に偏って誘導されていることが考えられた。この状態は、感染症を発症するリスクが増加することを示しており、今後は感染試験なども実施していく必要があると考えられる。

また、22年度 LaMer 共同研究において、BaP を腹腔内接種することで体表面に激しい炎症応答が観察された。これは本研究結果と真逆の現象である。上述した通り、C 重油の水性画分には4環以下のPAH類が多数含まれており、5環以上のPAH類はほとんど含まれていないことから、このTh17 或いは Treg のどちらが優先して誘導されるのかは、PAH類の環の数や分子の形などに依存しているのだと考えられた。そのため、今後は4環以下のPAH類の単独暴露によって、どういった免疫細胞が誘導されるのかを確認していく必要があると考えられる。一方、PAH類は単独でも内分泌攪乱や催奇形性などの免疫毒性以外の毒性を有している。そのため、非毒性の AhR リガンドである 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) や 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE) を用いて、魚類の AhR を介した Th サブセットの誘導機構の解明も必要であると考えられる。