

表4 抽出された化学物質の生態毒性レベル (その1)

化学物質名	n	短期 mg/L	中期 mg/L	長期 mg/L	PNEC* μg/L	EPIWIN より	
						水分配率(%)	残留期間(hr)
Endrin	802			1.10E-09	0.0000011	16.7	3600
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran	5		0.000007	4.1E-07	0.0000082	2.68	3600
Carbaryl	832	0.00085		6.9E-07	0.000069	99.4	900
Endosulfan	827			0.000001	0.00010	77.7	3600
Ethyl parathion	524			0.000002	0.00020	91.3	900
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	14			0.000006	0.00060	2.29	3600
TCDD, Dioxin	14			0.000006	0.00060	2.29	3600
Fenvalerate (Pydrine)	260			0.000007	0.00070	6.33	1440
Cypermethrin	206			0.00001	0.0010	4.22	3600
Esfenvalerate	44			0.00001	0.0010	6.33	1440
Fluorouracil	69			0.000015	0.0015	99.8	360
Permethrin	383			0.000018	0.0018	4.87	1440
Aldrin	325		0.000097		0.0019	2.74	3600
Parathion	524			0.00004	0.004	91.3	900
Tridemorph	7	0.00041			0.0041	7.56	900
3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl	3			0.00022	0.0044	2.16	3600
Caffeine	73	20		0.00005	0.0050	99.8	360
Oxychlorane	5	0.0026			0.0052	10.3	3600
Toxaphene	449			0.000054	0.0054	6.25	3600
DDT	904			0.00007	0.007	2.21	3600
Cadmium chloride (CdCl ₂)	2351			0.0001	0.010	99.8	360
Heptachlor	238		0.0005		0.010	4.02	3600
Carbofuran	189			0.00012	0.012	99.5	900
Malathion	966			0.00015	0.015	99.6	360
Pentachlorophenol	942			0.00016	0.016	19.3	3600

表4 抽出された化学物質の生態毒性レベル (その2)

化学物質名	n	短期 mg/L	中期 mg/L	長期 mg/L	PNEC*) μg/L	EPIWIN より	
						水分配率 (%)	残留期間 (hr)
Hexachlorocyclohexane	887			0.00017	0.017	68.6	3600
Lindane	821			0.00017	0.017	68.6	3600
DDD	63			0.00018	0.018	4.44	3600
Dieldrin	532			0.0002	0.020	16.7	3600
Methoxychlor	378			0.0002	0.020	20.6	3600
Cadmium	518			0.00025	0.025	82.5	360
Aroclor 1254	102			0.00032	0.032	2.31	3600
Chlordecone (Kepone)	140			0.00035	0.035	11.6	3600
Chloramphenicol	54		0.002		0.040	99.8	1440
Chlordane	218		0.002		0.040	3.51	3600
Tretinoin	4		0.0061		0.061	8.1	900
Mercury	230			0.0007	0.070	80.1	360
Diphenylphthalate	1	0.08			0.080	92.6	360
Benzo[a]pyrene	9		0.005		0.10	6.83	1440
Cobalt	2		0.05		0.10	82.4	360
Tributyltin	14			0.001	0.10	16.8	208
Benomyl	41		0.0056		0.11	99.7	3600
Binapacryl	12	0.015			0.15	63.2	1440
Aldicarb	76		0.0099		0.20	99.8	900
Heptachlor epoxide	7	0.02			0.20	24.3	3600
Aroclor 1248	44			0.0021	0.21	3.11	3600
Aroclor 1242	66			0.0023	0.23	3.26	3600
Erythromycin	17		0.015		0.30	97.1	3600
Trifluralin	129			0.003	0.30	13.1	3600
Hexachlorophene	13			0.0033	0.33	1.95	3600
Atrazine	474			0.0034	0.34	99.1	1440

表4 抽出された化学物質の生態毒性レベル (その3)

化学物質名	n	短期 mg/L	中期 mg/L	長期 mg/L	PNEC*) μg/L	EPIWIN より	
						水分配率 (%)	残留期間 (hr)
Nicotinamide	1	0.34			0.34	99.8	900
Benzophenone	21		0.024		0.48	98.4	360
Simazine	105	0.09		0.006	0.60	99.5	1440
Aroclor	39			0.0062	0.62	13.6	1440
Aroclor 1016	39			0.0062	0.62	13.6	1440
Musk ambrette	1	0.62			0.62	77.8	1440
Polychlorinated biphenyls (PCB)	5	0.31			0.62	3.26	3600
Di (2-ethylhexyl) adipate	1	0.66			0.66	16	208
Methomyl	140			0.0076	0.76	99.8	360
Chlorinated biphenyl	5			0.039	0.78	3.26	3600
Mirex	32	0.1			1.0	2.05	3600
Diethylstilbestrol (DES)	1	1.1			1.1	40.9	900
Oxytetracycline	18		0.055		1.1	99.8	1440
1,2-Dinitrobenzene	2	9.4	0.6		1.2	99.6	900
Metiram	16			0.012	1.2	99.8	1440
Cycloheximide	1	1.4			1.4	99.8	900
Cycloheximide	1	1.4			1.4	99.8	900
2,4,5-Trichlorophenoxy acetic acid	73	0.15			1.5	96.9	900
Aluminium	21			0.015	1.5	82.3	360
Amtriptyline	5	0.78			1.6	39.8	1440
Hexachlorobenzene	10			0.016	1.6	6.16	3600
Kelthane (Dicofof)	47			0.016	1.6	22.8	3600
Metribuzin	38			0.016	1.6	99.7	900
2,4-Dinitrotoluene	77	2.3		0.02	2.0	99.6	900
Lead acetate, basic/Lead di (acetate)	57			0.02	2.0	99.8	900

表4 抽出された化学物質の生態毒性レベル (その4)

化学物質名	n	短期 mg/L	中期 mg/L	長期 mg/L	PNEC ^{a)} μg/L	EPIWIN より	
						水分配率 (%)	残留期間 (hr)
Nordihydroguaiaretic acid	1	2			2.0	63.8	900
Aroclor 1260	27			0.021	2.1	1.88	3600
Nonylphenol	25			0.024	2.4	12.4	900
3,5-Dibromo-4-hydroxybenzotrile	94	0.041		0.028	2.8	96.4	900
Dinoseb	81			0.028	2.8	94.8	900
Etomidate	49	0.28			2.8	98.8	360
Manganese	2		1.4		2.8	82.4	360
Maneb	53			0.032	3.2	99.8	900
Manzeb (Mancozeb)	77			0.032	3.2	99.8	900
Sodium hypochlorite	377			0.032	3.2	99.8	360
Butylbenzene, n-	12	0.34			3.4	82.1	360
Propranolol	4	1.7			3.4	97.7	360
Propranolol	4	1.7			3.4	97.7	360
Chlorine dioxide	12	0.35			3.5	81.7	360
Toxynil	6	0.35			3.5	96.1	900
Dodecachloropentacyclodecane	32			0.04	4.0	2.05	3600
Dichlorophenol	3	2.2			4.4	97.7	900
Nickel	97			0.05	5.0	82.2	360
Aroclor 1232	10			0.066	6.6	64.4	900
Nitrofen	54			0.067	6.7	55	1440
Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	31			0.077	7.7	10.5	360
Selenium	59			0.08	8.0	98.5	360
Ferrous sulphate (anhydrous)	57		0.41		8.2	99.8	360
Dihexyl phthalate (DHP)	9			0.084	8.4	18.8	208
Amitriptyline hydrochloride	4		0.85		8.5	99.6	900

表4 抽出された化学物質の生態毒性レベル (その5)

化学物質名	n	短期 mg/L	中期 mg/L	長期 mg/L	PNEC ^{a)} μg/L	EPIWIN より	
						水分配率 (%)	残留期間 (hr)
Zineb	18			0.089	8.9	99.8	900
Phenytoin	4	4.5			9.0	99.3	900
6-Aminonicotinamide	2		4.6		9.2	99.8	900
Butylated hydroxyanisole	11	1			10	95.4	900
Butylhydroxyanisole	11	1			10	95.4	900
Dibutyl phthalate	83			0.1	10	89.7	208
Di-n-butylphthalate (DBP)	83			0.1	10	89.7	208
Sodium azide	39			0.1	10	86.8	360
Butylbenzylphthalate/Butylhydroquinone-t	81			0.12	12	76.2	360
Divanadium-pentaoxide	103			0.12	12	99	360
Hexane	25			0.12	12	88.4	208
Aroclor 1221	9			0.13	13	64.4	900
1,2-Dibromo-3-chloropropane	6	10	0.78		16	90.8	900
Dipropyl phthalate	4			0.9	18	98.3	360
Nicotine	17			0.18	18	99.8	900
Chromium	122	0.022		0.19	19	82.4	360
Bisphenol A	24	4.6	1		20	96.8	900
Nitrobenzene	63			0.2	20	97.6	360
Carbon-disulphide	7	2.1			21	80.1	360
Glyceryl trinitrate/Nitroglycerin	79		1.2		24	99.7	900
Polychlorinated biphenyl (aroclor 4465)	1	25			25	2.04	3600
Styrene	84			0.28	28	98	360
Lead	41			0.29	29	82.1	900
Biphenylol	15	0.71		0.35	35	98.8	360
Phthalic acid	1	36			36	99.8	360
Arsenic	19			0.49	49	79.9	360

表4 抽出された化学物質の生態毒性レベル (その6)

化学物質名	n	短期 mg/L	中期 mg/L	長期 mg/L	PNEC ^{a)} μg/L	EPIWIN より	
						水分配率 (%)	残留期間 (hr)
2,3-Epoxypropan-1-ol	2	53			53	99.8	360
Phenazone (Antipyrine)	3	35			70	99.8	360
Chinomethionate	4	37			74	92.1	900
Carbon-monoxide	1	75			75	79.9	360
Propylthiouracil	1		43		86	99.8	900
Hydrogen peroxide	8			0.9	90	99.8	360
Acetaminophen	12	9.2			92	99.8	360
Paracetamol	12	9.2			92	99.8	360
2-Ethylhexanoic acid	2	650	47		94	99.4	208
Thiourea	4			4.8	96	99.8	360
Dichlorophenoxyacetic acid 2,4-	220			1	100	98.8	900
Warfarin	10	12			120	99.2	900
Ampicillin	1	130			130	99.8	900
Alcohol (Ethanol)	88		7		140	99.6	208
Diazepam	6	14			140	98.8	900
Amitrole	24	22		1.68	168	99.8	360
Tetracycline	2		85		170	99.8	1440
2-Methoxyethyl acetate	1	190			190	99.8	360
Sodium chloride	237			2	200	99.8	360
Curcumin	2	230			230	97	900
Salicylic acid	1	230			230	99.6	360
Isoniazid	10	24			240	99.8	900
Methyl chloride	2	270			270	80.5	360
Diethylphthalate	50			3.2	320	99.7	360

表4 抽出された化学物質の生態毒性レベル (その7)

化学物質名	n	短期 mg/L	中期 mg/L	長期 mg/L	PNEC*) μg/L	EPIWIN より	
						水分配率 (%)	残留期間 (hr)
2-Ethoxyethyl acetate	32	41			410	99.7	360
Hexan-2-one	1	430			430	97.9	208
Nitrotoluene-m	18			7.4	740	98.5	900
Potassium chloride	256	76			760	99.8	360
Ethylene glycol monoethyl acetate	32		40		800	99.7	360
Theophylline	4	430			860	99.8	360
Phenobarbital	4	484			968	99.8	900
Diethylnitrosamine	8		100	10	1000	99.7	900
Metronidazole	7			13	1300	99.8	900
Acetylsalicylic acid	8	134			1340	99.8	360
Imidazolidine-2-thione	24			18	1800	99.8	360
Ethylene glycol monoethyl ether	1	1890			1890	99.8	360
2-Ethoxyethanol	1	1900			1900	99.8	360
Carbon tetrachloride	36	0.2		70	7000	79.2	1440
2-(2-Methoxyethoxy)ethanol	1	7500			7500	99.8	360
Digoxin	2	10000			10000	99.8	3600
Aspirin	8			130	13000	99.8	360
2-Methoxyethanol	1	16000			16000	99.8	360
Ethylene glycol monomethyl ether	1	16000			16000	99.8	360
Lead 2,4,6-trinitro-m-phenylene dioxide	6	1600			16000	99.8	900
Dimethylformamide, N,N-	70		1000		20000	99.8	360
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	29		3900		78000	99.8	360

全化学物質数 : 173

n:出力データ数, 173/576, *) :PNECの計算は, 短期毒性に対して N<3, N<6, N=>6 の場合 1000, 500, 100 を, 中期毒性に対して N<3, N<6, N=>6 の場合 500, 100, 50 を, 長期毒性に対して N<3, N<6, N=>6 の場合 100, 50, 10 を, それぞれ適用した。

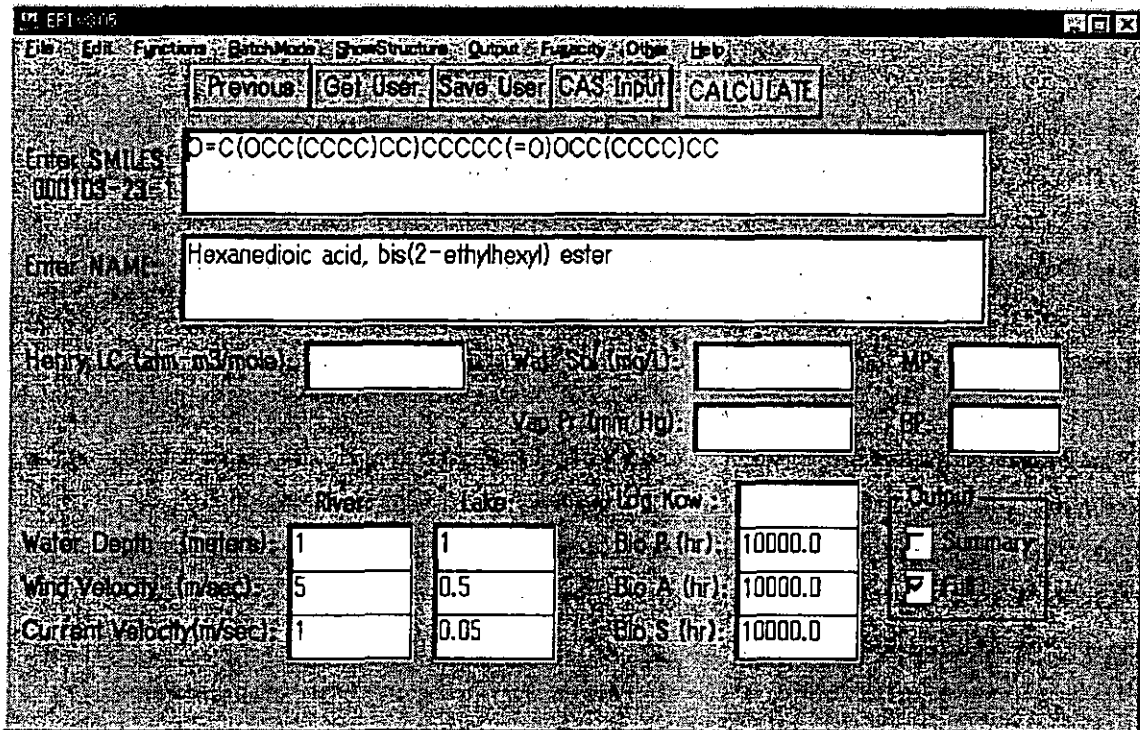


図 1 EPIWIN の初期画面

SMILES : O=C(OCC(CCCC)CC)CCCC(=O)OCC(CCCC)CC CHEM:Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester
CAS NUM: 000103-23-1 MOL FOR: C22 H42 O4 MOL WT : 370.58

- Log Octanol-Water Partition Coef (SRC): Log Kow (KOWWIN v1.66 estimate) = 8.12
- Boiling Pt (°C): 379.21 Melting Pt (°C): 8.96 VP(mm Hg, 25 °C):3.2E-006 MP:-67.8 °C
BP (exp database): 417 °C VP:8.50E-07 mm Hg at 20 °C
- Water Solubility at 25 °C (mg/L): 0.0005452 log Kow used: 8.12 (estimated)
Water Sol (Exper. database match) = 0.78 mg/L (22 °C)
- ECOSAR Class Program (ECOSAR v0.99f): Class(es) found: Esters
- Henry's Law Constant (25 °C) [HENRYWIN v3.10]:
Bond Method: 5.16E-005 atm-m3/mole Group Method: 2.13E-005 atm-m3/mole, Exper Database: 4.34E-07 atm-m3/mole
Henry's LC [VP/WSol estimate[EPI values]: 2.862E-003 atm-m3/mole
- Probability of Rapid Biodegradation (BIOWIN v4.00):
Linear Model:1.1363 Non-Linear Model:0.9999
- Expert Survey Biodegradation Results:
Ultimate Survey Model:3.2573(days-weeks) Primary Survey Model:4.3091 (hours-days)
Readily Biodegradable Probability (MITI Model): Linear Model:0.8893 Non-Linear Model:0.9316
- Atmospheric Oxidation (25 °C) [AopWin v1.90]: Hydroxyl Radicals Reaction:
OVERALL OH Rate Constant = 25.3514 E-12 cm3/molecule-sec
Half-Life =0.422 Days (12-hr day; 1.5E6 OH/cm3) Half-Life = 5.063 Hrs
Ozone Reaction: No Ozone Reaction Estimation
- Soil Adsorption Coefficient (PCKOCWIN v1.66): Koc:4.863E+004 Log Koc:4.687
- Aqueous Base/Acid-Catalyzed Hydrolysis (25 °C) [HYDROWIN v1.67]:
Total Kb for pH > 8 at 25 °C : 6.832E-002 L/mol-sec
Kb Half-Life at pH 8: 117.423 days Kb Half-Life at pH 7: 3.215 years
- BCF Estimate from Log Kow (BCFWIN v2.14):Log BCF =1.782 (BCF = 60.52) log Kow used: 8.12 (estimated)
- Volatilization from Water:
Henry LC: 4.34E-007 atm-m3/mole (Henry experimental database)
Half-Life from Model River: 2599 hours(108.3 days) from Model Lake : 2.851E+004 hours (1188 days)
- Removal In Wastewater Treatment (%)
Total removal:94.02 Total biodegradation:0.78 Total sludge adsorption:93.24 Total to Air:0.00
- Level III Fugacity Model:

	Concentration (percent)	Half-Life (hr)	Emissions (kg/hr)
Air	1.04	10.1	1000
Water	10.8	208	1000
Soil	31.4	208	1000
Sediment	56.8	832	0

Persistence Time: 355 hr

図2 : Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester のEPIWINによる出力 (要約)

EPA 計算

化学物質検索: 表示 | 化学物質性表示詳細 | 計算結果の表示 | データベース更新 | 予備

ファイル | 手番: 64175 | Ethanol 実行中
CAS No: 64175

終了 | 検索 | ファイルへ書き出し | CSVファイル | Option1

データの複製チェック | 中止 | 化学物質リスト

CAS Number	Chemical Name	Aquatic	Terrestrial
100005	1-Chloro-4-nitrobenzene	-1	0
100016	4-Nitrobenzenamine	-1	0
100027	4-Nitrophenol	-1	0
10004441	5-Methyl-3(2H)-isoxazolone	-1	0
100061	4-Methoxyacetophenone	-1	0
100092748	Suquin	-1	0
100118	1-(Bromomethyl)-4-nitrobenzene	-1	0
100163	(4-Nitrophenyl)hydrazine	-1	0
100174	1-Methoxy-4-nitrobenzene	-1	0
100210	1,4-Benzenedicarboxylic acid	-1	0
10022318	Barium nitrate	-1	0
10022681	Nitric acid, Cadmium salt tetrahydrate	-1	0
1002284	3-Hexyn-1-ol	-1	0
1002364	2-Heptyn-1-ol	-1	0
10024938	Neodymium chloride	-1	0
1002535	Dibutylstannane	-1	0
100254	p-Dinitrobenzene	-1	0
10025737	Chromium chloride	-1	0
10025748	Dysprosium chloride	-1	0
10025760	Europium chloride	-1	0
10025828	Indium chloride	-1	0
10025919	Antimony trichloride	-1	0
10025986	(SP-4-1)-Dipotassium tetrachloropalladate (2-)	-1	0
10025997	(SP-4-1)-Dipotassium tetrachloroplatinite	-1	0
10026081	Thorium chloride	-1	0
10026116	Zirconium chloride	-1	0

図3 作成したプログラムの初期画面

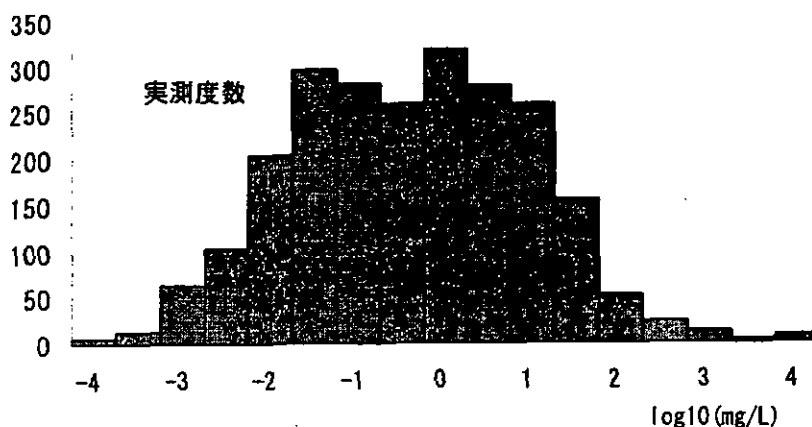


図4 Cadmium chlorideの生態毒性データの分布

n=2351. 本物質の表4で示されるPNEC値は $0.01 \mu\text{g/L} = 10^{-5} \text{ mg/L}$ [$\log_{10}(\text{PNEC}) = -5$]である。

環境中生物への免疫影響に関する情報収集及び試験法の調査

研究者 武田量雄 (株) 三菱化学安全科学研究所

研究要旨

水環境中において魚類は多種多様な化学物質に暴露されており、それにより免疫機能に異常を来させば生体の恒常性維持に何らかの影響を被る可能性がある。同時に、魚類は疾病の原因となる多くの細菌やウイルスにもさらされており、これら疾病への抵抗性も低下する可能性がある。本研究の目的は、魚類の免疫機能への有害影響を簡便に検出できる計測手法を開発し、魚類免疫系に影響を及ぼす化学物質群を未然に明らかにすることにある。

魚類マクロファージは、硬骨魚類の免疫と生体防御において重要な役割を担っていると言われている。そこで、魚類マクロファージの細胞培養技術とその特性（化学走化性、貪食能等）を検討し、化学物質による影響を定量的に評価可能な毒性スクリーニング手法を確立することとした。

初年度は、文献調査及びコイを用いた腹腔マクロファージの採取法および単離法を考案した。腹腔マクロファージを採取するための刺激物質には毒性の弱いグリコーゲンを用い、細胞は 30℃で定着させた。マクロファージの同定法としては非特異的エステラーゼなどの染色を、細胞の機能としては接着能、貪食能、化学走化性が考えられる。その結果、蛍光ラテックスビーズ (Fluoresbrite beads, 1.75 μ) への貪食活性が認められ、マクロファージ特有な機能が確認できた。次年度は、最適と思われる細胞数、培養条件などの検討、非特異的エステラーゼ等の染色方法、走化性測定法などを検討すると同時に、その他の免疫細胞への影響も調べていく予定である。

A. 研究目的

水環境中において魚類は多種多様な化学物質に暴露されており、それにより免疫機能に異常を来させば生体の恒常性維持に何らかの影響を被る可能性がある。同時に、魚類は疾病の原因となる多くの細菌やウイルスにもさらされており、これら疾病への抵抗性も低下する可能性がある。本研究の目的は、魚類の免疫機能への有害影響を簡便に検出できる計測手法を開発し、魚類免疫系に影響を及ぼす化学物質群を未然に明らかにすることにある。

魚類マクロファージは、硬骨魚類の免疫と生体防御において重要な役割を担っていると言われている。そこで、魚類マクロファージの細胞培養技術とその特性（化学走化性、貪食能等）を検討し、化学物質による影響を定量的に評価可能な毒性スクリーニング手法を確立することとする。

B. 方法

研究調査方法は以下のように実施した。

- ①化学物質による魚類免疫機能への影響についての情報収集
- ②マクロファージ採取，単離法の情報収集
- ③マクロファージの同定・機能特性（化学走化性，貪食能等）検討

C. 結果

①化学物質による魚類免疫機能への影響についての情報収集

魚類における免疫機能の低下は水環境に存在する多種多様なウイルス，バクテリア，寄生虫などに対する生体防御機能を低下させ，ひいては個体群の減少を引き起こす可能性もある。環境汚染物質は魚類の免疫力を抑制または増大させる可能性があり，免疫抑制により免疫担当細胞が豊富な肝，脾，腎臓中において細胞内抗酸化作用を持つSODを減少させると考えられている¹⁾。

魚類における生体防御は哺乳類同様，非特異的生体防御と特異的生体防御に分けることができ，様々な血液細胞と因子が役割を担っている。非特異的生体防御としては，粘液および粘液中の生体防御因子，皮膚・鱗による物理的障壁，体液中の防御因子，好中球・マクロファージによる貪食などによる防御を行っており，特異的生体防御としては，抗原の提示，ヘルパーTリンパ球・Bリンパ球の活性化，抗体産生と感作リンパ球の産生，補体・好中球・マクロファージの機能上昇などによる防御を行なっている²⁾（図1）。しかしながら，化学物質による魚類免疫機能への影響は，哺乳類での知見に比べ格段と少なく，マクロファージを対象としたものがいくつか挙げられる程度である³⁻¹⁴⁾。

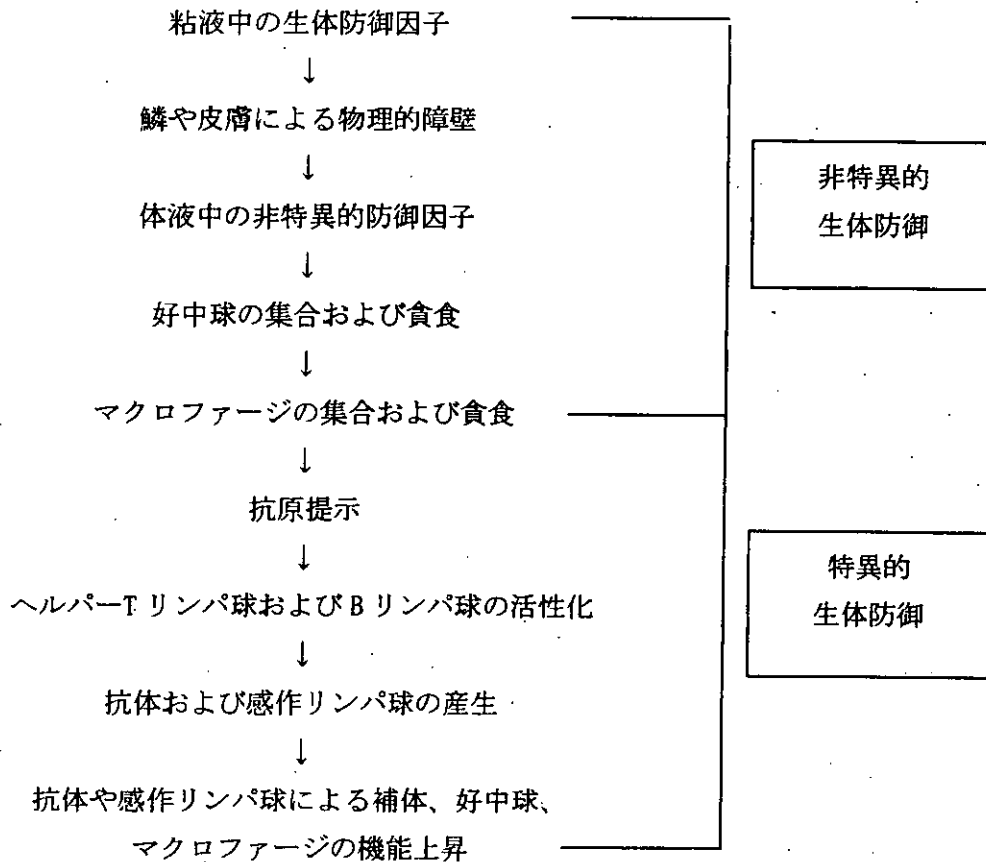


図1 生体防御の時間的流れ

マクロファージは魚体内の各組織（心臓，鰓，腎臓，脾臓，腸）や腹腔内に分布しており，異物や自己の老廃物の排除に働いている。そして貪食による非特異的生体防御，活性化による特異的生体防御を担っており，感染防御機構の一つとして重要であると言われている²⁾。魚類におけるマクロファージは腎臓もしくは腹腔内から採取するのが一般的で，マクロファージの機能は，反応性酸素中間体（ROI）の生成，食作用，化学走性，細胞のメラニン蓄積を測定することなどで評価できると考えられる。

以下にマクロファージをバイオマーカーとした化学物質影響の事例を紹介する。

ダイオキシンやPCBs³⁾，PAHs⁴⁾，重金属⁵⁾などに暴露された魚類でのマクロファージ変化や，PAHで誘導された魚類腎臓マクロファージの機能変化，カドミウムによるニジマス腹腔内マクロファージ機能の低下などが報告されている^{6,7)}。魚類マクロファージはその量および機能において汚染物質暴露により変化すると言われ，野外で採取した魚と室内で育てた魚のマクロファージ活性の変化は汚染物質暴露と有意に関連するといわれる⁸⁻¹¹⁾。また，病理組織学的には汚染環境に生息している魚類の肝臓，腎臓，脾臓におけるマクロファージの増加が報告されており，マクロファージ形成が非特異的なストレス指標と

して提案されている^{12,13)}。脾臓マクロファージの増加およびヘモンデリン沈着症もまた原油に慢性的に暴露された魚で観察されている^{14,15)}。しかしながら、野外採取の場合は非汚染域の魚との比較も必要であり、組織変性が汚染物質、環境ストレス（飢餓、熱ストレス、疾病等）、年齢などによるものか、要因の解明も今後の課題であるとしている。

以上のように、化学物質により魚類免疫機能が影響を受ける可能性が示唆されているものの、その知見はマクロファージを用いた知見ですら少なく、貴重な水産資源を守る上でも免疫学的知見を増やしていく必要があると考える。

② マクロファージ採取、単離法の情報収集

本研究では、実験室内での手法を確立する前に、以下のような情報収集を実施した。

魚類免疫系への1次毒性スクリーニングとしては、再現性がよく、より迅速に判定可能なスクリーニング系を確立する必要がある。そのためにはマクロファージ細胞を継代し、株化したものを用いることができれば効率的であり、以下にあげたいいくつかの報告¹⁶⁻¹⁹⁾では、樹立細胞の使用が可能である旨も記載されている。しかしながら、一般に免疫細胞は継代により本来の機能を失うことが多いため、魚類免疫細胞を扱う研究者も株化細胞を用いず実験毎に細胞を個体より取り出し調製するか、凍結保存して用いることが多い。したがって、細胞が持つ本来の免疫機能を指標とするならば、現段階で株化細胞を使用するのは得策ではないと考え、生体から取り出したマクロファージを利用することとした。そこで、文献調査し¹⁶⁻²¹⁾、次頁のようなコイを用いた腹腔マクロファージの採取法および単離法を考案した。腹腔マクロファージを採取するための刺激物質には毒性の弱いグリコーゲンを用い、細胞は30℃で定着させた。今後は、最適と思われる細胞数、培養条件なども検討する必要がある。

③ マクロファージの同定・機能特性（化学走化性、貪食能等）検討

同定法としては非特異的エステラーゼなどの染色を、細胞の機能としては接着能、貪食能、化学走化性が考えられる。その結果、蛍光ラテックスビーズ（Fluoresbrite beads, 1.75 μ）への貪食活性が認められ、マクロファージ特有な機能が確認できた。その他、非特異的エステラーゼ等の染色、ケモタクシスチャンパー等を用いた走化性については、手法論を含め現在検討中であるが、以下に操作フローの概要を示した。条件が整備された段階で、数種の化学物質の機能障害を調べる予定である。

コイ腹腔マクロファージの採取法

刺激物質の腹腔内注射

1. コイ約 200g (ロットNaチェック) を MS222 (*1) の 100ppm 溶液中で麻酔し、体重測定
2. 腹側を 70%エタノールで消毒し、腹腔内注射 (0.5%グリコーゲン/PBS を 10mL 注入)
3. 1~3 日間飼育 (絶食)

腹腔内細胞採取

1. コイを MS222 の 100ppm 溶液中で麻酔し、体重測定
2. 頭上部部分切断で屠殺、頭部を下にして血液除去
3. 腹側を 70%エタノールで消毒
4. 冷 PBS (-) 10~20mL (200g 魚の場合) を下腹部中央部分より腹腔注入 (25G 程度)
(含 100units/mL ペニシリンG, 100 μ g/mL ストレプトマイシン)
5. 腹膜マッサージ
6. 腹部を横にして下横腹に留置針 (20G 程度) を入れ、腹腔液を回収するか、腹筋を切開し腹腔内液を吸い取る (数回)
7. ポリプロピレンチューブ遠心管に入れ (氷冷), 遠心 (400g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C)
(多量の血液が混入した場合は使用しないか, または, 遠心後 0.2%NaCl で 30 秒処理し, 即同量の 1.6%NaCl を加え等張とし, 再遠心後, 上清除去する。)
8. 上清除去, 冷 L-15 培地を加え懸濁 (氷冷中で 5~6 時間保存可能)
9. 細胞数測定 (目的にあわせ, 濃度調製。マクロファージとして 5×10^5 cells/mL が通常か)

マクロファージの単離

付着法

1. 採取した腹腔細胞適当な細胞濃度に調整し、プレートに分注
実験目的により異なるが、モノレイヤーを作るには、96 穴プレートでは、 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個/ウェルを目安とする。
2. インキュベーター中に静置 (30 $^{\circ}$ C, 1~2 時間)。マクロファージはプレートに付着する。
3. プレートを振とうする (30 秒)。強く振とうすると、純度が高まる。
4. 培地と浮遊細胞を吸引除去し、温 PBS (-) で洗浄する。
5. 非付着細胞が除かれるまで、この操作を繰り返す (1~3 回)

食食活性(蛍光ラテックスビーズの食食)

準備

- ・ 10%FBS 含有培地(FBS は, 56℃30 分加熱で非活化したもの)
- ・ 8 well の Lab-Tek チャンバースライド(Nunc 社)
- ・ 1.72 μm の Fluoresbrite beads (Polysciences 社)
滅菌プラスチック遠心管にビーズを入れ70%エタノール 10mL で 20 分間滅菌する。遠心操作でエタノール除去(2 回)後、 2×10^7 個/mL となるように 10%FBS 含有培地で調製。
- ・ DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole)溶液 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ PBS)
- ・ ウシ血清アルブミン(BSA)溶液(1mg/mL)→PBS(-)で調製
- ・ L- α -リノホスファチジルコリン溶液(10 $\mu\text{g/mL}$)→上記 BSA 溶液で調製
- ・ ヒドロエチジン(hydroethidine)溶液(7mg/mL)→N,N-ジメチルアセタミドで調製
- ・ Vectashield Mounting Medium (H-1000): Vector 社から販売されている蛍光顕微鏡用サンプルのマウント用グリセリン

蛍光ラテックスビーズの食食測定(とりあえず改良法)

- ① $1 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL 細胞浮遊液、200 μL ずつ 8well チャンバーの well にまく
- ② 2~5 時間、30℃でインキュベート(細胞定着確認)
- ③ 培地と浮遊細胞をピペットで除去し、温 L-15 培地 200 μL 添加
非付着細胞が除かれるまで、この操作を繰り返す(1~3 回)
- ④ Fluoresbrite beads 2×10^7 個/mL 10%FBS 含有培地を 100 μL ずつ well に添加
- ⑤ 16~18 時間インキュベート
- ⑥ 培地をデカンテーションで除き、培地で 3 回洗浄
- ⑦ すばやく風乾(ヘアードライアー)
- ⑧ 4%ホルマリン/PBS(-)で 20 分間固定(氷上)
- ⑨ 蛍光顕微鏡でビーズ(→緑色)を取込んだ細胞を計測し、同視野中の全細胞数に対する比率を求める。(細胞壁への吸着はカウントしない)

{上記⑧の固定後、DAPI染色, ヒドロエチジン染色も可能かもしれないので、以下に示す。}

DAPI染色(核→青色), ヒドロエチジン染色(細胞質→赤色)

- ① 上記⑧の固定後、BSA 溶液(1mg/mL)を 10 容器用意し、スライドを順次浸けていく(洗浄)
- ② L- α -リノホスファチジルコリン溶液(10 $\mu\text{g/mL}$)に 30 分間浸け、細胞膜に穴をあける(パーミアリゼーション)
- ③ 洗浄
- ④ DAPI 溶液(0.1 $\mu\text{g/mL}$)をスライド上に落とし、10~20 分間放置
- ⑤ 洗浄

- ⑥ヒドロエチジン溶液(7mg/mL)に10~30分間入れる
- ⑦洗浄
- ⑧Vectashield Mounting Medium (H-1000)を1滴のせ、カバーガラスをのせる
- ⑨4°Cで一晩放置
- ⑩マニユキア液でカバーガラスの回りを封入する
→4°Cで保存すれば半年後でも観察可能。写真撮影による退色もない。
- ⑪蛍光顕微鏡で観察(フィルターUV370nm)

May Gruenward-Giemsa 染色

- ①蛍光ラテックスビーズの食食測定の⑧の固定後、May Gruenward-Giemsa 染色可能。
UVと可視光の両方で観察。

非特異的エステラーゼ <ナフチルブチレート法>

- ① 緩衝ホルマリン-アセトンで4°C、30秒間固定
- ② 水洗
- ③ 反応、室温、45分間

基質原液

1-Naphthyl Butyrate (α -")	100mg
ethylene glycol monomethyl ether (=2-methoxy ethanol)	5mL

4°Cに保存

反応液

基質原液	0.5mL
0.067mol/L リン酸緩衝液(pH6.3)	9.4mL
hexazotized pararosaniline *1	0.1mL

A: 4% Pararosaniline (Pararosaniline Hydrochloride 1gを2N塩酸25mLで加温しながら溶解)

B: 4%硝酸ナトリウム溶液

*1: AとBを等量混合、1分後に反応液に入れる

(反応液は使用直前に調製、よく混合し、ろ過する)

- ④ 水洗
- ⑤ 後染色: Mayer's Hematoxylin Solution(市販品)で、5分間染色
- ⑥ 水洗
- ⑦ 合成樹脂で封入

非特異的と特異的エステラーゼの二重染色

- ① 緩衝ホルマリン-アセトンで 4°C、30 秒間固定
- ② 水洗、風乾
- ③ 反応、室温、20~30 分間

A液:

1-Naphthyl Butyrate (α - β)	10mg
ethylene glycol monomethyl ether	0.5mL

(=2-methoxy ethanol)

4°Cに保存

B液:

0.067mol/L リン酸緩衝液 (pH6.3)	9.5mL
fast garnet GBC 塩	10mg

*1: AとBを等量混合、ろ過

(反応液は使用直前に調製)

- ④ 蒸留水で水洗
- ⑤ 反応、室温、15~20 分間

A液:

Naphthol AS-D Chloroacetate	1mg
N,N'-dimethylformamide	0.5mL

B液:

0.067mol/L リン酸緩衝液 (pH6.3)	9.5mL
fast blue BB 塩	5mg

*1: AとBを等量混合、ろ過

- ⑥ 流水で水洗 (15~20 分間)
- ⑦ 合成樹脂で封入
- ⑧ 後染色: Mayer's Hematoxylin Solution (市販品) で、5 分間染色
- ⑨ 水洗、風乾

マクロファージに特異的な α -ナフチル酪酸エステラーゼは、細胞質全体が暗赤色として、また顆粒球系細胞に特異的なナフトール-AS-D-クロロ酪酸エステラーゼは、青色の顆粒として染色される。

化学走性

試薬・器具

N-formylmethionyl leucocyl phenylalanine (FMLP)

ケモタクティックチャンバー (5 μ m ポアサイズのポリカーボネートメンブラン) (Nucleopore PVP; Coster Inc. USA)

- ①下室 (Bottom well) 部分に、70 μ L の chemoattractants (走化性因子) を入れる。
走化性因子としては、培地で調製した 10^{-8} M の FMLP、ブランクとして培地のみとする。
- ②上室 (Top well) には、200 μ L の $0.5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞を含む培地を入れる。
- ③30°C で 2~3 時間培養
- ④メンブランを取り外し、細胞浮遊面を培地 (FBS 含む) に浸す
- ⑤ラバーで遊走しなかった細胞を擦り取る
- ⑥スライドグラスに遊走細胞面 (メンブランを通して遊走し、下部側に付着した細胞部分) を上にし
てはる
- ⑦完全乾燥後、100%メタノールで固定、水洗
- ⑧ヘマトキシリンまたはギムザで染色
- ⑨顕微鏡で 10x200 視野における全細胞数を計数
(または 200~300 細胞面を数回、カウント)

参考文献

1. Anderson M. J., Barron M. G., Diamond S. A. Lipton J. and Zelikoff J. T. Biomarker selection for restoration monitoring of fishery resources, Environmental Toxicology and Risk Assessment: Modeling and Risk Assessment (Sixth volume), ASTM STP 1317, Dwyer F. J., Doane T. R. and Hinman M. L. eds., American Society for Testing and Materials (1997)
2. 魚病学概論, 室賀, 江草編, 恒星社厚生閣 (1996)
3. Safe S. H., Polychlorinated Biphenils (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment, Critical Views in Toxicology, 24, 87-149 (1994)
4. Weeks B. A. and Warinner J. E., Functional evaluation of macrophages in fish from a polluted estuary, Veterinary Immunology and Immunopathology, 12, 313-320 (1986)
5. Enane N. A., Fenkel K., O'Conner J. M., Squibb K. S. and Zelikoff J. T., Fish macrophages as an alternative model for mammalian phagocytes, Immunology, 80, 68-72 (1993)

6. Warinner J.E., Mathews E.S. and Weeks B.A., Preliminary investigations of the chemiluminescent response in normal and pollutant exposed fish, *Marine Environmental Research*, 24, 281-284 (1988)
7. Weeks B.A., Huggett R.J., Warinner J.E. and Mathews E.S., Macrophage responses of estuarine fish as bioindicators of toxic contamination, *Biomarkers of Environmental Contamination*, J.F. McCarthy and L.R. Shugart, Eds., Lewis Publishers, Boca Raton, pp193-201 (1990)
8. Zelikoff J.T., Wang W., Islam N., Twerdok L.E. Curry M., Beaman J. and Felscher E., Assays of reactive oxygen intermediates and antioxidant enzymes: Potential biomarkers for predicting the effects of environmental pollution, New York University School of Medicine, Institute of Environmental Medicine, and GEO-CENTERS, Inc., Frederick, MD (1996)
9. Zelikoff J.T., Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: An alternative animal model for immunological studies, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 45, 235-248 (1995)
10. Weeks B.A., Anderson D.P., DuFour A.P., Fairbrother A., Goven A.J., Lahvis G.P. and Peters G., Immunological biomarkers to assess environmental stress, *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, R.J. Huggett, R.A. Kimerle, Jr., P.M. Mehrle, and H.L. Bergman, Eds., Lewis Publishers, Ann Arbor, pp211-234 (1992)
11. Brazer V. S., Fournie J. W. and Weeks-Perkins B.A., Macrophage aggregates: Biomarker for immune function in fishes?, *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Modeling and Risk Assessment (Sixth volume)*, ASTM STP 1317, Dwyer F. J., Doane T.R. and Hinman M.L. eds., American Society for Testing and Materials (1997)
12. Hinton D.E., Baumann P.C., Gardner G.R., Hawkins W.E., Hendricks J.D., Murchelano R. and Okihiro M.S., Histopathologic biomarkers, *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, R.J. Huggett, R.A. Kimerle, Jr., P.M. Mehrle, and H.L. Bergman, Eds., Lewis Publishers, Ann Arbor, pp155-210 (1992)
13. Wolke R.E., Murchelano R.A., Dickenson C.D. and George C.J., Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 222-227 (1985)
14. Khan R.A., Histopathology in winter flounder, *Pleuronectes americanus*, following chronic exposure to crude oil, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 297-301 (1995)