

フナおよびオイカワの赤血球を用いた小核試験の 河川の汚染モニタリングへの効果的適用

たか い あき のり わた べ ゆ み
高井 明徳・渡部 由美

Akinori Takai and Yumi Watabe: The micronucleus test using erythrocytes of *Carassius* species and *Zacco platypus* for effective monitoring of genotoxic pollutants in river water. *Memoirs of Osaka Shin-Ai College* 37(2003).

Abstract. To evaluate the micronucleus test using fish peripheral erythrocytes to detect genotoxic pollutants in the water environment, we examined the frequencies of micronucleated erythrocytes in the observation of 10,000 erythrocytes per individual in *Carassius* species and *Zacco platypus*, captured in upstream, midstream and downstream of Tomio River, which runs through the residential area of Nara. The frequencies were significantly higher in all sampling stations than those in goldfish bred in clean water under the laboratory conditions. But the frequencies of micronucleated erythrocytes in the observations of 3,000 erythrocytes per individual in both species were significantly higher in only a sampling station. These results indicated that the observations of 10,000 erythrocytes per individual were effective to detect genotoxic pollutants more than those of 3,000 erythrocytes per individual. The frequencies of micronucleated immature erythrocytes showed no significant increase in all sampling stations from the control levels.

Keywords: micronucleus test, erythrocyte, immature erythrocytes, genotoxic pollutant, cyprinid fish

1. はじめに

小核試験は染色体異常の間接的な検出法として、簡便な操作性、結果の信頼性の高さなどの点で変異原性を検出するための遺伝毒性試験の1つとして化学物質の安全性評価に広く用いられている^{1,2)}。

最近、河川や湖沼、海域等、水環境における変異原物質の汚染が報告され^{3,4)}、簡便に行える小核試験の水生物への応用が期待されるようになった⁵⁾。魚類を用いた小核試験は少なくはないが、河川等の汚染モニタリン

グへの適用例はまだ少ない^{5,6)}。

魚類の小核試験は哺乳類同様一般に赤血球を用いて行われており⁶⁾、我々も都市近郊の住宅域を流れる河川で採集したフナおよびオイカワについて末梢赤血球における小核出現頻度を調べ、採集魚を用いる小核試験のモニタリングへの適用の可能性について検討した⁷⁾。その結果、小核試験の有用性は示されたが、小核を持つ赤血球の頻度が低いので、検出感度を上げるために観察細胞数を増加させる必要性が示された⁷⁾。

そこで、本研究ではこの点に着目し、観察細胞数を1個体当たり3,000個から10,000個に増加させると共に、幼若赤血球のみを選別して調べる方法を併せて行い、小核試験の効果的な適用について検討を行った。

2. 材料と方法

1) 試料魚と採集地

奈良県を流れる富雄川の上流域(高山橋)、中流域(近大橋)、下流域(小泉橋)で採集したフナ*Carassius species*およびオイカワ*Zacco platypus*、両種各10個体を用いた。ただしオイカワに関しては下流域では採集できなかった。採集時の水温は、上流は24℃、中流は28℃、下流は28℃であった。対照群として実験室内でカルキ抜きした水道水を用いて23℃で飼育したキンギョ*Carassius auratus* 5個体を今回の研究に用いた。

2) 小核試験法

塗抹標本は、魚体尾柄部よりヘパリンで内壁を濡らした注射器で採取した末梢血を、直前にスライド上に1滴滴下した牛血清に混合するように1滴滴下し、カバーガラスで細胞層が1層になるように塗抹し作製した。

標本は翌日99%メチルアルコールに5分間浸し、固定した後、アクリジン・オレンジ染

色液により染色し⁸⁾、蛍光顕微鏡で観察した。染色液はpH6.8のリン酸緩衝液で希釈した40 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のものを用い、染色は簡便法により染色液をスライドガラスに滴下し、カバーガラスをかけて染色し、観察した。

全赤血球10,000個を観察し、小核を持つ赤血球の数を記録した。また、細胞質が赤く染まる幼若赤血球のみ1,000個を観察し、小核を持つ赤血球の数を記録した。小核は核の周辺に現れる輪郭が明瞭な球状の小体として認めた(Fig. 1)。統計的差異はFisherのexact testにより検定した。

3. 結果

フナにおける小核を持つ赤血球の頻度(小核赤血球頻度)、幼若赤血球における小核赤血球頻度、および幼若赤血球の頻度をTable 1に示す。小核赤血球頻度は全赤血球および幼若赤血球共に上流<中流<下流で、数値的には似た値を示した。幼若赤血球は、そのものの頻度自体にバラツキがある上に、一般的に頻度の低いものが多く、1,000個の幼若赤血球の観察が困難な0.5%未満のものもしばしば認められた。

河川で採集した魚種には対照群が存在しないが、実験室内で汚染されていない水で飼育した同属種であるキンギョを河川で採集した

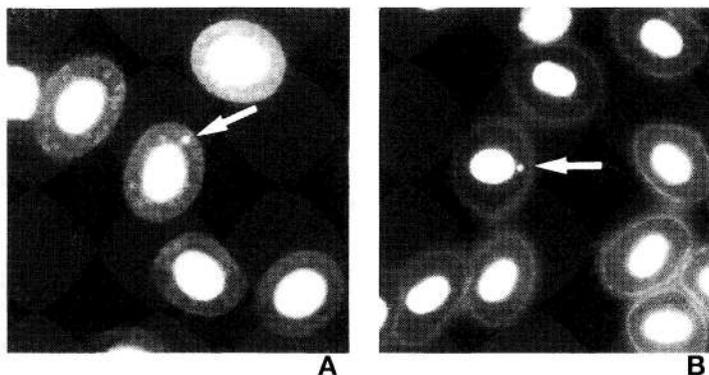


Fig. 1 Micronucleated erythrocytes in (A) *Carassius species* and (B) *Zacco platypus* collected from the Tomio River, Nara, Japan. Arrows indicate micronuclei.

フナの対照群とすることができると考え、小核赤血球頻度を調べた結果、全赤血球および幼若赤血球共に小核は認められなかった。

対照群に対して各採集地における小核頻度を比較すると、いずれの採集地点も全赤血球における小核赤血球頻度が有意な増加として認められたが、幼若赤血球ではいずれの地点

においても有意差は認められなかった。

オイカワにおける小核赤血球頻度をTable 2に示す。オイカワは一般にフナに比べてやや低い小核赤血球頻度を示したが、有意な差ではなかった。オイカワについては単純に別属のキンギョのデータを対照群とすることができないが、便宜的に対照群として比較した

Table 1 Frequency of micronucleated erythrocytes in *Carassius* species collected from the Tomio River, Nara, Japan

Locality	Frequency of micronucleated erythrocytes				Frequency of immature erythrocytes (%)		
	in all erythrocytes		in immature erythrocytes		Individuals	Mean±S.D.	
	Individuals (/10000)	Mean ± S.D. (%)	Individuals (/1000)	Mean ± S.D. (%)			
Upstream	1	1	0.016 ± 0.017**	0	0.014 ± 0.038	9.4	3.68±4.59
	2	2		0		12.4	
	3	4		—		0	
	4	4		1		1.2	
	5	2		0		0.5	
	6	0		0		1.7	
	7	0		0		2.4	
	8	0		0		1.8	
Midstream	1	0	0.026 ± 0.017**	0	0.040 ± 0.055	9.4	6.03±9.74
	2	3		1		6.9	
	3	5		0		1.7	
	4	2		—		0	
	5	4		1		28.5	
	6	2		—		0	
	7	1		—		0	
	8	4		0		1.7	
Downstream	1	4	0.043 ± 0.021**	0	0.067 ± 0.082	0.5	1.85±2.09
	2	4		—		0	
	3	5		0		6.1	
	4	9		2		3.8	
	5	3		—		0.2	
	6	4		1		1.2	
	7	2		0		1.6	
	8	3		1		1.4	
Goldfish	1	0	0.000 ± 0.000	0	0.000 ± 0.000	6.2	1.96±2.17
	2	0		0		2.3	
	3	0		0		1.5	
	4	0		—		0.0	
	5	0		0		4.1	

** : significant difference from the data of goldfish at $p < 0.01$.

ところ上流域、中流域共に小核赤血球頻度の有意な増加が認められた。

今回、全赤血球の観察数を増加させることによる小核赤血球の検出感度の上昇を調べるため、個体当たり3,000個観察した場合の

データと比較した。3,000個の観察ではフナについて小核赤血球頻度の最も高い下流域のみ対照群に対して有意な増加が認められ (Table 3)、10,000個観察のデータの小核検出感度が上昇したことが示された。

Table 2 Frequency of micronucleated erythrocytes in *Zacco platypus* collected from the Tomio River, Nara, Japan

Locality	Frequency of micronucleated erythrocytes				Frequency of immature erythrocytes (%)		
	in all erythrocytes		in immature erythrocytes		Individuals Mean±S.D.		
	Individuals (/10000)	Mean ± S.D. (%)	Individuals (/1000)	Mean ± S.D. (%)	Individuals	Mean±S.D.	
Upstream	1	0	0.014 ± 0.015	—	0.020 ± 0.045	0	1.63±1.86
	2	1		0		0.8	
	3	1		—		0.2	
	4	2		0		1.8	
	5	4		1		1.5	
	6	3		0		3.5	
	7	0		—		0	
	8	0		0		5.2	
Midstream	1	1	0.021 ± 0.016	—	0.020 ± 0.045	0	0.48±0.47
	2	2		0		1.4	
	3	3		0		0.5	
	4	2		0		0.4	
	5	5		1		0.8	
	6	3		—		0.1	
	7	0		—		0	
	8	1		0		0.6	

Table 3 Frequency of micronucleated erythrocytes in *Carassius* species and *Zacco platypus* in the observation of 3000 erythrocytes

Species	Locality	Frequency of micronucleated erythrocytes	
		Individuals (/3000)	Mean ± S.D.(%)
<i>Carassius</i> species	Upstream	0,0,2,1,1,0,0,0	0.016 ± 0.025
	Midstream	0,0,2,0,1,1,0,1	0.021 ± 0.025
	Downstream	1,2,2,2,0,1,0,2	0.042 ± 0.030 **
<i>Zacco platypus</i>	Upstream	0,0,0,0,1,1,0,0	0.008 ± 0.015
	Midstream	0,0,1,0,1,1,0,0	0.013 ± 0.017
Goldfish		0,0,0,0,0	0.000 ± 0.000

** : significant difference from the data of goldfish at $p < 0.01$.

4. 考 察

魚類を用いる小核試験による河川の汚染モニタリングは、河川水中の汚染物質による複合的な遺伝毒性影響を知ることができるだけでなく、生物濃縮や蓄積による河川水中の濃度以上の影響を知ることができる点で、また、Ames試験のように濃縮等の操作なしで直接汚染水の影響を知ることができる点で有用であると考えられる。

魚類を用いる小核試験による変異原性を指標とする水質汚染のモニタリングを進める上で2つの基本的なモデルが考えられる。第1は、実際に生息する魚類を調べる方法であり、第2は適切な実験魚を実験室内で一定条件のもと河川水で飼育する方法である。

我々は前者の方法を試み、その結果を報告したが⁷⁾、変異原物質検出の感度を高めるために赤血球の観察数を増加させることが課題として提示された。そこで、本研究では、前回の研究における赤血球の観察を3,000個から10,000個に増加させた。また、検出感度を高めるための別の方法として幼若赤血球のみを観察する方法を併せて行った。

その結果、3,000個の観察では小核赤血球の対照群に対する有意な増加はフナの下流域でのみ認められたが、10,000個の観察ではフナ、オイカワ共にすべての地点で有意な増加として認められ、観察数の増加の効果が示された。

一方、幼若赤血球のみを観察する方法では、数値的には全赤血球における小核赤血球頻度と似た値を示したが、有意な増加としては示されなかった。また、幼若赤血球自体、頻度が低いものが多い上に、0.5%未満の1,000個の赤血球を観察することが困難な低頻度のものもしくは認められ、幼若赤血球のみの観察は実用性に問題があることが示された。なお、魚類の幼若赤血球の頻度は一般に1~5%とされるので⁹⁾、今回の結果が特別なものではないといえる。

幼若赤血球は存在期間の短い新生の赤血球であるので、化学薬品などの影響評価や限られた期間における影響を調べるためには精度も高く効果的であるが、汚染モニタリングの目的で採集魚に適用する場合、大多数が寿命の長い成熟赤血球である全赤血球を観察する方が、化学物質の生物濃縮や蓄積効果、小核の蓄積効果も含め、望ましいと考えられる。

今回の採集魚における小核赤血球の有意な増加に関するリスク評価については今後の課題である。採集魚を用いた小核試験による汚染モニタリングについての問題点等についてはすべて述べているのでここでは省略する⁷⁾。

参考文献

- 1) Schmid W. : The micronucleus test, *Mutation Res.*, **31**, 9-15(1975)
- 2) Heddle J. A., Cimino M. C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M. D., Tucker J. D., Vanparrys Ph., MacGregor J. T. : Micronucleus as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future, *Environ. Mol. Mutagen.*, **18**, 277-291(1991)
- 3) 小野芳朗 : 水中の変異原・発がん物質, *Environ. Mutagen Res.*, **19**, 63-69(1997)
- 4) 中室克彦 : 水環境中の変異原物質の運命, *Environ. Mutagen Res.*, **21**, 159-164(1999)
- 5) 林 真 : 小核試験による評価法, 水環境学会誌, **19**, 775-779(1996)
- 6) Al-Sabti K., Metcalfe C. D. : Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutation Res.*, **343**, 121-135(1975)
- 7) 高井明德, 石川 卓, 林 真, 上野紘一 : フナおよびオイカワの赤血球を用いた小核試験による河川の汚染モニタリングへの適用の可能性, 生活衛生, **47**, 17-23(2003)
- 8) Hayashi M., Sofuni T., Ishidate Jr. M. : An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, **120**, 241-247(1983)
- 9) 川津浩嗣 : 血液検査法, 実験動物としての魚類—基礎実験法と毒性試験—(江上信雄編), ソフトサイエント社, pp.228-242(1981)