

総説

メダカを用いる小核試験

Micronucleus Test using Medaka Fish

高井 明德

要旨

メダカ (*Oryzias latipes*) を用い、直接 DNA に作用して小核を誘発する X 線照射および中性子線を含む原子炉放射線照射、さらに遺伝毒性物質暴露を行い鰓細胞における小核誘発の特性を分析し、メダカの鰓細胞を用いる小核試験は電離放射線だけでなく化学物質の遺伝毒性評価の信頼できる有用な試験系であることを示した。また、腎臓細胞における小核誘発の特性を分析し、腎臓細胞を用いる方法は鰓細胞を用いる方法に比べ感受性は低い信頼できる試験系であることを示した。メダカを用いる小核試験は、モデル魚類として水環境中の遺伝毒性物質の汚染モニタリングだけでなく、哺乳動物の代替としても用いることができると考える。

キーワード：小核試験、メダカ、鰓細胞、腎臓細胞、X 線、中性子線、化学変異原、遺伝毒性

1. はじめに

小核試験は、染色体異常に起因して生じ、間期細胞において観察できる小核 (micronucleus) を指標に、化学物質などの染色体異常誘発性を評価する試験系で、染色体異常を直接調べる染色体異常試験に比べ簡便に行え、再現性も高く、医薬品の遺伝毒性評価のための方法の一つとして広く用いられている¹⁻³⁾。

小核試験は水環境汚染における遺伝毒性物質の汚染モニタリングにも応用されるようになり、一般に貝類や魚類が用いられ、その有用性は評価されている⁴⁻⁶⁾。しかし、1990 年代前半の時点では、小核出現に関わる要因分析などの基礎研究やモデル魚類の確立に関する研究はほとんどなされていなかった。

メダカ (*Oryzias latipes*) は変異原性試験のための有用なモデル魚類と考えられ、哺乳動物の代替としても期待される。その背景として、遺伝学を含む広範な分野で研究がなされモデル動物としての有用性が認められ⁷⁻⁹⁾、生殖細胞を用いた突然変異検出系が確立している^{10, 11)}。しかし、小核試験のような短期試験系の開発はなされていなかった。

そこで、メダカを用いる小核試験系の開発を試みた。小核試験の対象とする組織は直接環境に接し、感受性が高いと考えられる鰓とし、鰓細胞の標本作製法を確立した。次いで、直接 DNA に作用して小核を誘発する X 線および中性子線を含む原子炉放射線の照射を行い、小核誘発の特性を分析した^{12, 13)}。さらに遺伝毒性物質 (化学変異原) 暴露¹⁴⁾ による小核出現の特性を分析し、電離放射線だけでなく化学物質の遺伝毒性評価の信頼できる有用な試験系であることを示した。また、内部組織への影響を検出するために腎臓についても分析を行い、腎臓を用いる小核試験は鰓細胞を用いる方法に比べ感受性は低い信頼できる試験系であることを示した¹⁵⁾。

本稿では、筆者らによるこれらメダカを用いる小核試験系の開発に関する一連の研究を紹介し、小核試験の方法を具体的に解説する。

[ここに入力]

2. 小核試験

1) 小核試験の特徴

小核は、染色体異常の内、染色体構造異常により生じた無動原体の染色体断片が、細胞分裂時に移動する染色体群から取り残され、移動した染色体群とは別に、核膜で包まれて形成される。一方、分裂装置の損傷により移動する染色体群から取り残された染色体が小核を形成する場合もあり、この場合、小核のサイズが大きいことが示されている^{1,2)}。

小核試験は染色体異常を間接的に簡便に検出できる試験法であるが、単なる染色体異常試験の簡便法ではなく、染色体異常試験にはない多くの特徴を備え、以下の長所があげられる³⁾。①どのような核型を持った生物でも実験材料とすることが出来る。②信頼性の高い判定が出来る。③異常の検出可能時間が長い。④紡錘体阻害剤の検出も可能。⑤バックグラウンドが安定している。⑥被検物質以外の化学物質での処理は不要。ただし、染色体異常の種類が特定できない点や染色体異常がすべて検出できるわけではない点が、染色体異常試験とは異なる。

2) 小核試験の歴史

小核試験は1959年に Evans¹⁶⁾ がソラマメを用いて電離放射線による小核誘発を観察し、小核により染色体異常を評価しようとしたことに端を発している。1970年代に Schmid¹⁷⁾ や Heddle¹⁸⁾ により哺乳類を用いる小核試験の研究が進められ、小核試験の基礎が築かれた。わが国では、1970年代後半武田薬品工業の山本・菊池^{19,20)}が研究をスタートさせ、その後、国立衛生試験所（現在、国立医薬品食品衛生研究所）の林が中心に、小核試験に蛍光色素である acridine orange (AO) 染色による精度の高い小核検出を可能にする方法を開発し²¹⁾、小核試験発展の基礎を築くと共に、国内共同研究により小核試験の実用化を推進した^{1,3)}。

現在、医薬品の安全性評価における遺伝毒性試験の一つとして、マウスやラットなどげっ歯類を用い、骨髄または末梢血における幼若赤血球を観察する *in vivo* 小核試験が確立した試験法として広く用いられ、さらに赤血球以外の細胞の使用や培養細胞を用いる *in vitro* 小核試験も行われている³⁾。

3) AO 染色による赤血球を用いる小核試験^{1, 2, 3, 21)}

AO 染色は、哺乳類における赤血球を用いる小核試験において標準的な方法になっている。AO 染色では、DNA が緑色に RNA が赤色に染色されるので、核は緑色に細胞質は赤色に染まる。小核も核と同じく緑色に染まるので、ギムザ染色等に比べ小核の観察が容易で小核でない小粒を誤って小核と観察することも避けられる。観察者間でのデータの変異が少なく、精度の高い分析が可能であることが示されている。赤血球では幼若赤血球では細胞質に RNA が豊富に存在するので赤く染まり、成熟赤血球では赤く染まらない。そこで、細胞質が赤く染まる幼若赤血球のみを対象に小核頻度を求めることができる。

4) 小核試験の水環境汚染研究への応用

小核試験は、1980 年代中頃より水環境中における遺伝毒性物質の検出にも応用されるようになり、二枚貝と魚類を中心に水生生物を用いる小核試験が広く行われている。二枚貝では血球や腎臓、魚類では主に赤血球が用いられている。二枚貝ではムール貝が主に使用され、フィールドおよび実験室の両環境においてさまざまな研究が行われ、鰓細胞が血球に比べ効果的な組織として用いられてきた。魚類においてもフィールドおよび実験室の両環境における研究がなされてきた。これらの結果において水生生物を用いる小核試験は水環境における遺伝毒性物質検出そしてモニタリングの効果的な方法であることは示されているが、課題も残され、方法の確立にさらなる研究が必要とされる。魚類では、種間や個体間の感受性の大きな変動に影響する要因を明確にする必要がある⁶⁾。

3. メダカを用いる小核試験の開発

1) 使用するメダカ

本研究ではメダカの一変種ヒメダカを用いた（図 1）。ヒメダカは野生メダカの突然変異によって生じ、古くは江戸時代から飼育されている。メダカの体色は黒色素胞、黄色色素胞等から分泌される色素により決まり、遺伝的支配を受けている。ヒメダカは、黒色素胞が分布していないが、黄色色素胞が分布しているので、緋色（橙色）の体色を呈する。野生メダカの表現型は BR で示されるのに対し、ヒメダカは bR で示される。

[ここに入力]



図1 ヒメダカ（雌）。

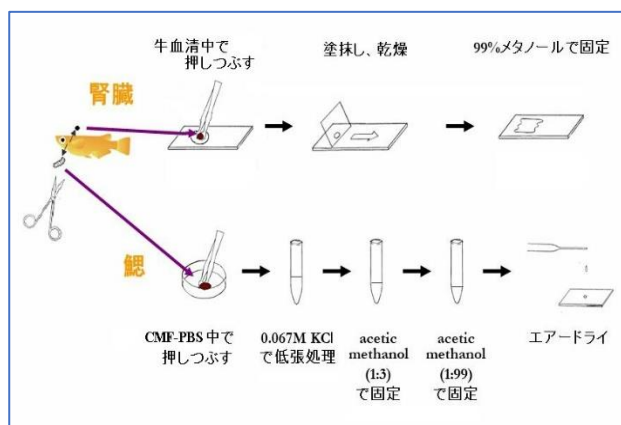


図2 小核試験の方法の概略図。

メダカの雌雄は、外見的に背鰭および尻鰭の形状で容易に判別できる。オスは背鰭と尻鰭に深い切れ込みがあり、背鰭が長く、尻鰭の幅が広い⁷⁾。

ヒメダカは大量に飼育されているので、近交系に近い遺伝的均質性を持っていると推測される。実験魚としては、近交系、さらにはクローンが望まれるが、近交系メダカを使用する前段階としてヒメダカ当年魚を用いた。なお、メダカでは近交系やクローンも作成されている^{7,8)}。

2) 小核試験のための組織と標本作製

ほ乳類を用いる小核試験では主に赤血球が用いられてきた。魚類を用いる小核試験も、同様に赤血球を用いる方法で行われてきた⁶⁾。

哺乳類では幼若赤血球を用いる方法が確立しているが、魚類では全血を観察する方法が一般的である。幼若赤血球のみの観察は、遺伝毒性物質が作用した赤血球のみを対象として、その影響による小核誘発を検出できる。この場合、蛍光染色により幼若赤血球が明確に識別されるので、蛍光顕微鏡を用いて観察することになる。一方、全血を観察す

ると、赤血球の寿命に関係して遺伝毒性物質の長期間の影響による小核の蓄積を検出できる。

赤血球を用いる小核試験の標本作製は塗抹法により容易に作成でき、個体を殺す必要もない。しかし、魚類においては小核出現の頻度が低く実用的とは言えない状況もあった。

そこで、メダカを用いる小核試験では、細胞再生系であり、常に外界の水環境に接し、変異を受けやすいと考えられる鰓細胞に着目した。鰓細胞を用いる方法については、先行研究により赤血球に比べ小核頻度が高いことが示されていた^{5, 22)}。

鰓細胞を観察するための標本作製については、いくつかの方法が考えられたが、染色体標本作製法（空気乾燥法）に基づき作成することにした。赤血球の塗抹標本作製に比べ複雑であるが、良質の標本が作製されることが期待された。鰓細胞の標本は、Takai & Ojima²³⁾ による染色体標本作製法に基づき作製した。この方法は細胞分裂期にある細胞を効果的に分離することができ、細胞再生系である鰓細胞において分裂期にある細胞の分離に効果的と考えられた。具体的には、組織を先の平たいピンセットで押しつぶし、遊離細胞を収集した。細胞分裂期の細胞は組織から剥離しやすい状態にあるので、効果的に遊離細胞を集めることができた。また、この方法では、組織片の混入も少なくすることができた。

染色体標本作製においては、出来るだけ細胞質を除くことが重要であるが、小核試験では細胞質を残す必要があり、低張処理を短くするとともに（染色体標本作製では20分のところを3分にした）、酢酸アルコール固定において、最終の標本作製前の固定における酢酸の濃度を低くし（酢酸とメタノールの比率を1:3から1:99にした）、細胞質を残す方法を確立した¹²⁾（図2）。

一方、内部組織への影響等を考える上で、魚類では造血器官である腎臓に着目し、腎臓細胞と鰓細胞における小核出現様相を比較することにした。腎臓標本作製については、基本的には血液の標本作製同様、塗抹標本作製法に従ったが、遊離の腎臓細胞は牛血清中で鰓細胞と同様に組織を押しつぶし、得られた浮遊細胞を用いた。生理食塩水ではなく牛血清中に細胞を浮遊させることで良質の標本が作製できた¹⁵⁾（図2）。

[ここに入力]

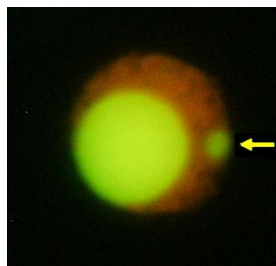


図3 鰓細胞における小核（矢印）。核及び小核は緑に細胞質は赤く染まる。

3) 標本の染色と小核の観察

標本の染色は、Hayashi らによる AO 染色法²¹⁾に従い、小核は赤く染まった細胞質中にあり、緑色に染まった核の周辺に、核と同色の蛍光を発する球状の小体として認めた（図3）。

観察は、細胞質が赤く染まった細胞のみを行い、1 個体について 1000 個の細胞を観察した。小核を有する細胞数（MNC）の総観察細胞数に対する相対比を MNC 頻度とした¹²⁾。

4. メダカを用いる小核試験の実施

1) 鰓細胞における小核出現の分析—自然誘発小核と X 線誘発小核の比較¹²⁾

メダカを用いる小核試験の開発にあたり、まず自然に誘発される小核および X 線照射により誘発される小核の特性を分析した。X 線は直接 DNA に作用して二本鎖切断により小核を誘発することから、小核誘発特性分析の基本と考えた。また、用いるメダカの体重や性についても試験を行う上で重要な要素となるので小核誘発との関連性を調べた。

無処理のヒメダカ 30 個体、4Gy の X 線の全身照射を行ったヒメダカ 30 個体について、鰓細胞における小核を分析した。X 線照射は、近畿大学原子力研究所において、日立メディコ社製の X 線発生装置 MBR-1505R を用い、140KV、4mA、1mm Al のフィルターの条件で行った。線量率は 0.5Gy/min であった。

1 個の細胞で 2 個の小核が観察されたのは X 線照射群において、30 個体中 2 個体で認められただけであり、基本的に MNC は小核数と一致すると考えられる。

無処理群 30 個体の内、雄は 15 個体で、平均体重は 188 ± 57mg、雌は 15 個体で 154 ± 59mg であった。無処理個

体の鰓細胞における MNC 頻度は、雄では 0—2‰、雌では 0—3‰の間に分布し、平均は雄・雌共に 0.8‰で雌雄間に有意な差は示されなかった。また、雌雄共に MNC 頻度と体重との相関は示されなかった（雄： $r=-0.041$ 、 $P=0.89$ 、雌： $r=-0.256$ 、 $P=0.50$ ）。雌雄の MNC 頻度の平均は 0.8‰で、95%CI（信頼限界）は 0.4—1.4‰であった。

X 線処理群（X 線を全身照射後 24 時間）30 個体について、16 個体は雄で、平均体重は 132 ± 32mg、雌は 14 個体で 151 ± 49mg であった。MNC 頻度は、雄では 3—11‰、雌では 4—10‰に分布し、平均は雄が 7.8‰（=124/16000）、雌が 6.5‰（=91/14000）で、有意な性差は認められなかった。また、雌雄共に MNC 頻度と体重との相関は示されなかった（雄： $r=-0.34$ 、 $P=0.39$ 、雌： $r=0.22$ 、 $P=0.46$ ）。雌雄の MNC 頻度の平均は 7.2‰で、95%CI は 6.2—8.1‰であった。

さらに、無処理群、X 線処理群のいずれにおいても MNC 頻度はポアソン分布から期待される分布とほぼ一致した（ $P<0.05$ 、Kolmogorov-Smirnov の 1 試料検定）。

これらの結果は、メダカの鰓細胞を用いる小核試験は、メダカの体重や性に関わらず使用でき、ポアソン分布に従うことから遺伝毒性の検出系として信頼できるものであることを示す。このような結果は、観察の対象となる細胞が遺伝的に変異のない均質な細胞再生系の細胞が適切に採取され、適切な標本が作製され、適切に観察されていることを示すものであり、ヒメダカの使用、鰓細胞の標本作製法および AO 染色法による観察が適切であることを示している。ただし、今回の結果は X 線照射における結果であり、化学物質については別に確認する必要がある。

2) X 線および原子炉放射線の全身照射を受けた個体の小核誘発の分析と RBE の算出¹³⁾

本研究では、メダカに X 線および中性子線を含む原子炉放射線を照射して、時間および線量応答関係を分析した。さらに、X 線に対する中性子線の生物効果比 RBE を算出した。

X 線照射および原子炉放射線照射を、それぞれ異なる 3 種類の線量で照射し（X 線—1Gy、2Gy、4Gy、原子炉放射線—0.4Gy、0.8Gy、1.6Gy）、12 時間、24 時間、36 時間、48 時間、72 時間、96 時間後に各群 5 個体について MNC 頻度を調べた。X 線照射および原子炉放射線照射は、

近畿大学原子力研究所において行った。X線照射は、日立メディコ社製のX線発生装置MBR-1505Rを用い、140KV、4mA、1mm Alのフィルターの条件で行った。線量率は0.5Gy/minで、総線量は1、2、4 Gyであった。原子炉放射線照射については、出力1Wの近畿大原子炉で原子炉放射線照射した。線量率は0.4 Gy/hであり、総線量は0.4、0.8、1.6 Gyであった。

- X 線と原子炉放射線は、線量と MNC 頻度の間に直線的線量反応関係を示し、式 $F=a+bD$ (F : MNC 頻度、 D : 線量) で示される。 a はコントロールにおける MNC 頻度である。原子炉放射線には速中性子線とガンマ線が 1:1 の割合で含まれるので、速中性子線の線量効果関係が示され、速中性子線の X 線に対する生物効果比 RBE を算出した (詳細は原論文¹³⁾を参照のこと)。

この結果は、メダカ鰓細胞を用いる小核試験は、DNAの二本鎖切断による小核を検出する短期試験系として信頼できるものであることを示すもので、遺伝毒性物質検出系として水環境汚染モニタリング等に応用できることを示すものである。

メダカを用いる小核試験は水環境中における遺伝毒性物質の影響評価への応用を目的とするので、X線および原子炉放射線の照射研究において、その信頼性が評価されたことに基づき、具体的に化学物質に対する小核誘発特性の分析を行った。

- (1) メダカを遺伝毒性物質で 24 時間処理し、処理後 24 時間、48 時間に鰓を採取し、標本を作製する。
飼育は 25℃の恒温器内で行う。
- (2) 遺伝毒性物質での処理のために、200 mL の飼育水（蒸留水 100 mL+環境水 100 mL）を入れた 500 mL ビーカーを準備し、各ビーカーに 11 匹のメダカを入れ、遺伝毒性物質を入れ、24 時間処理した。処理後、遺伝毒性物質を含む処理水を除き、飼育水で数回すすぎ、新しい飼育水で飼育した。
24 時間飼育後 5 匹、48 時間飼育後残り 5 匹を用いた。

Mitomycin C (MMC) : 30, 60, 120 μ M
Cyclophosphamide (CP) : 0.7, 1.4, 2.8mM
Eethylmethanesulfonate (EMS) : 0.25, 0.5, 1mM
Diethylnitrosamine (DEN) : 0.5, 1, 2, 4, 8mM
Colchicine (COL) : 0.25, 0.5, 1 μ M

変異原物質で処理されたメダカの鰓細胞における小核は、すべての遺伝毒性物質で有意な増加を示した。MNC 頻度の最大値は、いずれの遺伝毒性物質も、処理後 48 時間において示され、MMC では 4.5 ± 1.3 (120 μ M, 48h)、CP では 9.8 ± 4.1 (8000, 48h)、EMS では 3.5 ± 1.1 (0.5mM, 48h)、DEN では 4.0 ± 1.4 (1mM, 48h)、CLH では 4.6 ± 1.5 (0.5 μ M, 48h)であった。

5

[ここに入力]

では 0–1mM、CLH では 0–0.5 μ M で示されたが、それ以上の高用量域では MNC の増加は認められなかった。X 線や中性子線照射では 12 時間おきに調べた結果では照射後 24 時間で MNC 核頻度のピークを示したが、化学物質の遺伝毒性作用は、作用機構と毒性との関係で、複雑な様相を示すので、今回の結果もそのような状況を反映していると考えられる。

小核の主核に対する直径比及び体積比を調べた結果、核の直径に対する小核の直径の比率は X 線では 0.17 ± 0.06 、COL を除く全ての遺伝毒性物質により誘発された小核は、X 線により誘発された小核と有意差はなかったが、COL は 0.34 ± 0.12 で、有意に大きなサイズのの小核であった ($P < 0.01$)。この結果は、COL を除く遺伝毒性物質による小核は、X 線同様 DNA 二本鎖切断により生じた染色体断片であり、一方、COL は異数性誘発剤であり、COL による小核は染色体を 1 から数本含んだものであることを示すものと考えられる。

今回の結果において、メダカの鰓細胞を用いる小核試験は、各種遺伝毒性物質について、24 時間処理を行い、処理後 24 時間および 48 時間において検出できることが示された。また、DEN のように代謝活性を必要とする間接変異原、CLH のように異数性誘発剤にも適用できることが示された。今回の研究で、メダカの鰓細胞を用いる小核試験は水環境中の遺伝毒性物質を検出する系として有効であることが示された。メダカは小型で少量の飼育水で飼育できるので、化学物質の暴露を行うには都合がよい。

今後、環境汚染の重要課題である重金属の検出系としての有用性についての検討が課題である。

4) 腎臓における小核誘発の特性¹⁵⁾

3)に示した鰓細胞の小核試験を行った個体と同じ個体について、腎臓を用いる小核試験を行った。無処理および X 線処理したヒメダカ各 30 個体において、1 個の細胞で 2 個の小核が観察されたケースはなく、基本的には MNC は小核数と一致すると考えることができる。

無処理群 30 個体の内、雄は 16 個体で、雌は 14 個体で、無処理個体の鰓細胞における MNC 頻度は、雄では 0–2‰、雌では 0–3‰の間に分布し、平均は雄 $0.4 \pm 0.6\%$ (/16000)、雌 $0.4 \pm 0.8\%$ (/14000) で雌雄間に有意な差

は示されなかった。また、雌雄共に MNC 頻度と体重との相関は示されなかった (雄: $r = -0.45$, $P = 0.79$ 、雌: $r = 0.06$, $P = 0.84$)。雌雄の MNC 頻度の平均は $0.4 \pm 0.7\%$ であった。

X 線処理群 (X 線を全身照射後 24 時間) 30 個体について、16 個体は雄で、雌は 14 個体であった。MNC 頻度は、雌雄とも 1–5‰に分布し、平均は雄が $2.5 \pm 1.1\%$ (/16000)、雌が $2.9 \pm 1.3\%$ (/14000) で、有意な性差は認められなかった。また、雌雄共に MNC 頻度と体重との相関は示されなかった (雄: $r = 0.66$, $P = 0.54$ 、雌: $r = -0.16$, $P = 0.58$)。雌雄の MNC 頻度の平均は $2.6 \pm 1.1\%$ であった。

さらに、無処理群、X 線処理群のいずれにおいても MNC 頻度はポアソン分布から期待される分布とほぼ一致した ($P < 0.05$ 、Kolmogorov-Smirnov の 1 試料検定)。これらの結果は、メダカの腎臓細胞を用いる小核試験系は遺伝毒性物質の検出系として信頼できるものであることを示す。

しかし、鰓細胞の結果と比較すると、4Gy 照射群で腎臓細胞が有意に低い MNC 頻度であった ($P < 0.01$)。無照射群では腎臓の頻度がやや低かったが有意な差ではなかった。単純に感受性だけで判断すると、直接外界に接している鰓細胞を用いる方法を主として、腎臓を用いる方法は補助的な使用が考えられる。しかし、今回の結果は X 線照射後 24 時間における小核頻度に基づくものであり、時間応答の分析、さらに環境中の遺伝毒性物質暴露における結果についても分析し、腎臓細胞における小核出現の背景を明らかにすることは今後の課題である。

5. メダカを用いる小核試験の方法

1) 標本作製法

【1】鰓細胞を用いる小核試験¹²⁾ (図 2)

- (1) 鰓を切り取り、CMF-PBS* (Ca^{2+} , Mg^{2+} free phosphate buffered saline) で洗った後、35mm シャーレに移す。*組成 (1L): NaCl 0.8g、KCl 0.2g、 Na_2HPO_4 1.15g、 KH_2PO_4 0.2g。
- (2) 少量の CMF-PBS を加え、先の平たいピンセットでよく押しつぶし、約 1.5 mL の CMF-PBS を加える。
- (3) 組織片など含まない上澄みを 2mL のマイクロチューブに移す。

[ここに入力]

- (4) 800rpm、5 分間の遠心分離を行い、上澄みを除く。
- (5) 0.068M (mol/L) KCl を約 1.5 mL を加え、よく攪拌し、3 分間低張処理を行う。
- (6) 低張処理終了時に、酢酸－メタノール (1:3) 固定液を数滴加え、軽く攪拌する。
- (7) 遠心分離し、上澄みを除き、固定液を約 1 mL 加えよく攪拌し、約 10 分間放置する。
- (8) 上記操作を再度行う。
- (9) 遠心分離し、上澄みを除き、1:99 酢酸－メタノール固定液 (1%酢酸を含むメタノール液) を少量加え、よく攪拌する。
- (10) きれいに磨いたスライドガラス上に細胞浮遊液を 1 滴滴下し、自然乾燥させる (空気乾燥標本、エアドライ標本)。
細胞の広がりが悪いときは、再度遠心分離し、固定液を交換する。
細胞浮遊液は、-20℃で保存可能である。

【2】腎臓細胞を用いる小核試験¹⁵⁾ (図 2)

- (1) ホールスライドに牛血清 0.01 mL 入れる。
- (2) 腎臓を取り出し、牛血清中に移す。
- (3) 先の平たいピンセットでよく押しつぶす。
- (4) マイクロピペットで細胞浮遊液を吸い取り、きれいに磨いたスライドガラス上に 1 滴滴下する。
- (5) カバーガラスで、スライドガラス上に塗抹する (塗抹標本作製)
- (6) そのまま一昼夜放置する。
- (7) 99%メタノールで 5 分間固定を行う。
- (8) 自然乾燥させる。

【3】血液を用いる小核試験

- (1) 尾柄部を切り取り、流れ出てくる血液をマイクロピペットで吸い取り、きれいに磨いたスライドガラス上に 1 滴滴下する。
- (2) カバーガラスで、スライドガラス上に塗抹する (塗抹標本作製)
- (3) そのまま一昼夜放置する。
- (4) 99%メタノールで 5 分間固定を行う。
- (5) 自然乾燥させる。

2) 標本の染色と観察

- (1) 0.004%の Acridine orange (AO, Difco) 染色液をスライド上に滴下する。
0.1%の AO 水溶液を保存液として作製し、使用時に 0.2mL の AO 保存液を 4.8mL の CMF-PBS で希釈して使用する。AO 保存液は冷暗所で冷蔵保存する (数週間は保存可能)。
- (2) カバーガラスをかけて、ろ紙で余分の染色液を除く。数分放置する。
- (3) 蛍光顕微鏡で観察する (ブルー励起フィルター、オレンジ系接眼フィルター使用)。蛍光が強い場合、CMF-PBS で洗浄し、カバーガラスをかけて、余分の液を除き観察する。
- (4) AO 染色で核は緑に、細胞質は赤く染まる。
- (5) 観察は 100 倍の対物レンズで行い、赤く染まる細胞質が明瞭な細胞のみを観察する。
- (6) 小核は、赤く染まる細胞質中であって、核の周囲に核と同色の染色を示す球状の物体として認める (図 3)。
- (7) 観察する細胞数は 1 個体 1000 個とし、小核細胞数 (MNC) を算定する。

※AO 染色に関する詳細は、文献(1)(2)に記されているので参照のこと。

6. おわりに

メダカの鰓細胞を用いる小核試験は、以下の結果に基づき、水環境における電離放射線および化学物質の遺伝毒性評価の信頼できる有用な短期試験系であることが示された。

X 線および速中性子線照射により、体重や性に関わりなく用いることができ、小核は DNA 二本鎖切断により生じ、その出現はポアソン分布に従うことが示された。水環境中における作用機構の異なる遺伝毒性物質 (直接変異原、間接変異原、異数性誘発剤) の 24 時間暴露に対して、いずれにおいても 48 時間後に MNC 頻度が最大となり、有意な増加を示した。メダカは少量の飼育水で飼育できるので、水環境における化学物質暴露を行う上で都合がよい。

腎臓を用いる小核試験についても鰓細胞に比べ感受性は低い、鰓細胞同様信頼できる試験系であることが示さ

[ここに入力]

れ、鰓細胞を用いる小核試験の補助的使用が可能であることが示された。

以上の結果より、小核試験においてメダカはモデル動物として有用性を備え、水環境中の放射線影響評価や汚染モニタリングだけでなく、哺乳動物の代替としての応用も期待される。鰓細胞を用いる小核試験は 2011 年の東北大地震における福島第一原子力発電所事故における周辺地域のメダカへの放射線影響評価に応用された²⁵⁾

今後、メダカを用いる小核試験は、多くの化学物質の適用により、その特性がより明確にされるとともに、フローサイトメトリーや画像処理などの応用により自動化が実現できれば、遺伝毒性評価の強力な試験系として、応用価値が高まると考える。

謝辞

本稿に示したメダカの小核試験に関する研究を進めるにあたり、近畿大学名誉教授の藤川和男先生（当時、原子力研究所教授、後に理工学部生命学科教授）には、終始丁寧なご指導並びに研究支援をいただき、ここに深く感謝の意を表します。

これらの研究の推進には、同大学理工学部生命学科の加川尚教授（当時講師）に協力いただいた。化学物質に関する研究においてはふみ技術士事務所所長中川雅博博士（当時大阪信愛学院短期大学非常勤講師）に協力いただいた。

本研究における原子炉放射線および X 線照射実験は、近畿大学原子力研究所において行ったが、近畿大学原子炉等利用共同研究（1999-2012 年）に採択されて、原子炉の使用ができ、研究を進めることができた。原子力研究所の所長をはじめ教職員の皆様には大変お世話になった。生物分野の研究総括責任者の米澤義彦鳴門教育大学名誉教授には貴重なご意見をいただいた。研究を推進するにあたり、当時原子力研究所に所属されていた大阪大学名誉教授の近藤宗平先生と京都大学名誉教授の武部啓先生には激励のお言葉をいただいた。

メダカの小核試験に関する研究を評価いただき、「哺乳動物の代替としてのメダカの小核試験系の開発」について、平成 18 年度及び平成 19 年度の土川記念哺乳動物研究基金を受けることができた。

魚類の小核試験を始めるきっかけとなったのは、当時国

立衛生試験所変異遺伝部室長（後に国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部室長、部長、食品安全評価研究所所長、理事長を歴任）の林真先生に声をかけていただいたことがきっかけで、本格的に研究を行うことになった。令和 7 年に「水生生物の細胞遺伝毒性を指標とした水質汚染モニタリング法の開発に関する研究の検討会委員」（国立衛生試験所）に、続いて「水質汚染モニタリングのための遺伝毒性を指標としたバイオセンサー系の開発の検討会委員」の委嘱を受け、研究も支援いただいた。この委員会のメンバーの先生方には大変お世話になった。上野紘一近畿大学名誉教授には、研究推進に終始大変お世話になった。元日東電工株式会社主任研究員浅野哲秀氏には研究推進にご支援いただいた。祖父尼俊雄元国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部長、木苗直秀静岡県立大学名誉教授（元学長）、若林啓二元国立がん研究センター研究所長、上田高嘉宇都宮大学名誉教授には貴重なご意見をいただいた。

以上の皆様に深く感謝の意を表します。

最後に恩師関西学院大学名誉教授故小嶋吉雄先生に心より感謝の意を表します。

引用文献

- (1) 林真：小核試験．サイエンス社（1991）.
- (2) 林真：小核試験．毒性試験講座 12 変異原性・遺伝毒性．地人書館，147－154（1991）
- (3) Hayashi M.: The micronucleus test－most widely used in vivo genotoxicity test－. Gene. Environ. 38, 18（2016）
- (4) Al-Sabti, K. and Metcalfe, C.D. : Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, Mutation Res. 343, 121-135（1995）
- (5) Hayashi, M., Ueda, T., Ueno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, T., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T. and Ojima, Y.: Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. Mutat. Res. 399, 125-133（1998）.
- (6) Bolognesi, C. and Hayashi, M. Micronucleus assay in aquatic animals. Mutagenesis 26, 205-213（211）
- (7) 岩松鷹司：新版 メダカ学全書．大学教育出版（2006）

[ここに入力]

- (8) 江上信夫, 山上健次郎, 嶋昭紘編: メダカの生物学. 東京大学出版会 (1990)
- (9) J. Wittbrodt, J., Shima, A. and Scharl, M. : Medaka—a model organism from the Far East, Nat. Rev. Genet. 3, 53-64 (2002)
- (10) Shima, A. and Shimada, A. : Development of a possible non-mammalian test system for radiation-induced germ-cell mutagenesis using a fish, the Japanese medaka (*Oryzias latipes*), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 2545-2549 (1991)
- (11) Shimada, A. and Shima, A. : Combination of genomic DNA fingerprinting into the medaka specific-locus test system for studying environmental germ-line mutagenesis, Mutation Res. 399, 149-165 (1998).
- (12) Takai, A. Kagawa, N. and Fujikawa, K. : Susceptibility of male and female medaka (*Oryzias latipes*) fish to spontaneous and X-ray induction of micronuclei in gill cells, Mutat Res 558, 131-136 (2004)
- (13) Takai, A. Kagawa, N. and Fujikawa, K. : Dose- and time-dependent responses for micronuclei induced by X-rays and fission neutrons in gill cells of medaka (*Oryzias latipes*), Environ. Mol. Mutagen. 44, 108-112 (2004)
- (14) Takai, A., Kagawa, N., Nakagawa, M., Watabe, Y. and Fujikawa K.: Frequency and size of micronuclei induced in gill cells of medaka fish (*Oryzias latipes*) after whole-body exposure to clastogenic chemicals. Drug Chem. Toxicol. 38, 67-72 (2015)
- (15) Takai, A., Kagawa, N. and Fujikawa, K.: Comparative susceptibility of kidney and gill cells of medaka fish (*Oryzias latipes*) to spontaneous and X-ray-induced micronucleus formation. Gene. Environ. 30, 48-52 (2008)
- (16) Evans, H.J., Nearly, G.J. and Williamson F.S. : The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen Part II . Chromosome damage: the production of micronuclei. Int. J. Radiat. Biol. 3, 216-229 (1959)
- (17) Schmid, W. : The micronucleus test. Mutat. Res. 31, 9-15 (1975)
- (18) Heddle, J.A. : A rapid in vivo test for chromosome damage. Mutat. Res. 18, 187—190 (1973)
- (19) Yamamoto, K.I. and Kikuchi, Y. : A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. Mutat. Res. 71, 127-131 (1980)
- (20) 山本好一 : 小核試験. 環境変異原実験法, 講談社, 197-207 (1980)
- (21) Hayashi, M., Sofuni T. and Ishidate Jr M. : An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. Mutat. Res. 120, 241-247 (1983)
- (22) Manna, G.K. and Sadhukhan, A. : Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT). Cur. Sci. 55, 498-501 (1986)
- (23) Takai, A. and Ojima, Y. : Comparative studies of karyotypes and distributions of nucleolar organizer regions of pomacentrid fishes. I, Proc. Japan Acad. 63B, 17-20 (1987)
- (24) Ayaki, T., Fujikawa, K., Ryo, H., Itoh, T. and Kondo, S. : Induced rates of mitotic crossing over and possible mitotic gene conversion per wing anlage cell in *Drosophila melanogaster* by X rays and fission neutrons. Genetics 126: 157-166 (1990)
- (25) Maruyama, K., Wang, B., Doi, K., Ishibashi, K., Ichikawa, S., Furuhashi, Y., Kubota, M. and Watanabe, Y.: Radiation effects on wild medaka around Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant assessed by micronucleus assay. J Radiat Res. 62(1), 79–85 (2021)

受理 2023 年 3 月 27 日

公開 2023 年 3 月 31 日

<連絡先>

高井 明德 (Akinori Takai)

〒536-8585 大阪府大阪市城東区古市 2-7-30

大阪信愛学院大学

E-mail : takai@osaka-shinai.ac.jp