

タマネギ実生根端細胞を用いる小核試験

高井 明徳*

大阪信愛女学院短期大学

小核試験は、遺伝毒性試験の一つとして、その簡便性と高い再現性で広く用いられている。植物を用いる方法は、哺乳類などの動物を用いる方法に比べより簡便に行え、その一つとしてタマネギの実生根端細胞を用いる小核試験があり、放射線や化学物質、環境汚染の変異原性の解析に用いられている。本稿ではタマネギの実生根端細胞を用いる小核試験について解説する。

1. はじめに

小核試験は、染色体異常に起因して生じる小核を観察する方法、すなわち染色体異常を間接的に検出する試験法であり、遺伝毒性試験の一つとして、その簡便性と再現性の高さから広く用いられている[1,2]。

遺伝毒性とは遺伝物質に損傷を与える性質で、遺伝毒性物質により突然変異や染色体異常が誘発される[3]。1970年代に入ると Ames 試験などにより発がん物質の多くが遺伝毒性を示すことが明らかにされ、発がんのきっかけをつくるイニシエーションが突然変異によると考えられるようになった。同時に環境中には発がん性物質またはその可能性のある遺伝毒性物質が多数存在することが明らかになった。そこで、長期にわたり、費用もかかる発がん性試験に対し、短期間で容易に結果が得られる遺伝毒性試験が、発がん物質のスクリーニング法として期待されるようになった。しかし、遺伝毒性試験で発がん物質を確実に検出できるわけではなく、一方、遺伝毒性試験は発がん性だけでなく、遺

伝的影響を及ぼす物質の検出など別に重要な役割もある[3,4]。

小核試験は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ている。林[1]によると以下の長所があげられている。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。被検物質以外の化学物質での処理は不要。

小核試験は 1959 年に Evans ら[5] 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、1970 年代に Schmid [6] や Heddle [7] により哺乳類を用いた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[8,9]が研究をスタートさせ、その後、国立医薬品食品衛生研究所（当時は国立衛生試験所）の林[1]が中心に大きく発展させた。医薬品の安全性評価においては、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る小核試験が確立した試験法として用いられている[10]。

一方、植物を用いる小核試験は、動物を用いる方法に比べ、より簡便に行える点で有用性は高い。植物を用いる方法としては、ソラマメやタマネギ、ムラサキツユクサを用いる方法が報告され、放射線や薬品、環境汚染の遺伝毒性評価に応用されている。PubMed [11] で検索すると、植物を用いる小核試験は、その報告の大多数が 1990 年代後半以後になされている。このように、ここ 10 年ほどの間に急速に応用が進んできた。

Akinori Takai :
Micronucleus Test Using Root-tips of Onion
Seedlings.
Human and Environment Vol. 2 (2009)

*大阪信愛女学院短期大学
〒538-0053 大阪市鶴見区鶴見 6-2-28
Tel: 06-6180-1041, Fax: 06-6180-1045
E-mail: takai@osaka-shinai.ac.jp

©2009 大阪信愛女学院短期大学

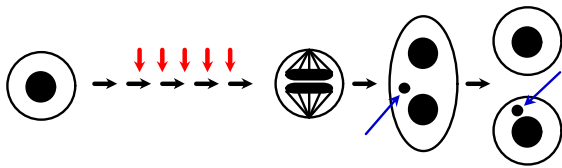


図1 小核形成過程。

赤矢印：小核誘発作用、青矢印：小核。

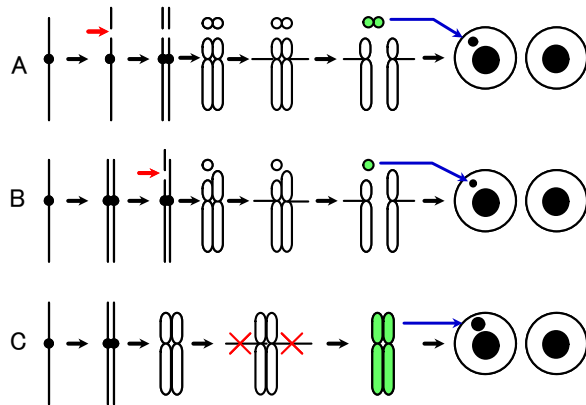


図2 染色体切断および紡錘体形成阻害による小核形成過程。A: 染色体切断による小核形成、B: 染色体複製後の姉妹染色分体切断による小核形成。C: 紡錘体形成阻害による小核形成。赤矢印：小核誘発物質による染色体切断、赤×印：紡錘体形成阻害、青矢印：小核形成。

タマネギの実生（発芽種子）根端細胞を用いる小核試験は、Fujikawa ら[12]、Alcaide ら[13] による研究があり、その有用性について評価がなされている。本稿では、タマネギの実生根端細胞を用いる小核試験について解説する。

2. 小核試験

2.1. 小核形成の原理

電離放射線や染色体異常誘発物質などの作用により DNA の 2 本鎖が切断し (DSB)、染色体が切断すると、染色体断片が生じる。染色体断片は細胞分裂の後に独立した核を形成する (図 1、図 2 AB)。この核は、主核の近傍に小粒として現れる。染色体切断が染色体の複製前と複製後に起こる場合があり、状況は少し異なる (図 2 AB)。染色体切断が染色体の複製前におこる場合は、切断した染色体断片は複製後 2 つの姉妹染色分体から成る染色体断片となり、小核となる。一方、染色体複製後に生じた染色体断片は 1 つの姉妹染色分体のみから成る。両者を比較すると前者が倍の DNA 量を有するが、通常の観察では両者の違いは判定でき

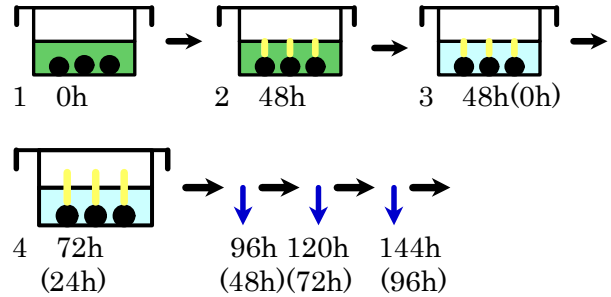


図3 タマネギの種の培養と薬品処理。1-2：薬品中で 48 時間（2 日間）培養。2-3：発芽種を蒸留水で洗い、蒸留水中で培養。4：薬品処理終了後、24 時間間隔で標本作製。（ ）内の時間は薬品処理終了後からの時間。

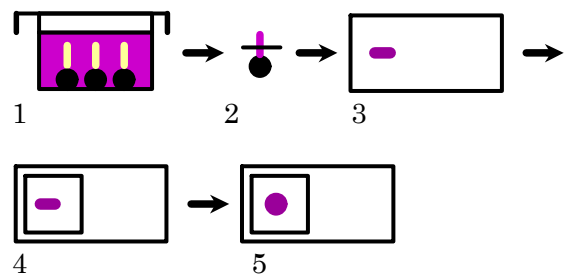


図4 小核標本作製。1：Dahlia violet 染色液で 15 分間染色し、2：発芽根端を 2mm 程切り取り、3：スライドガラス上に置き、4：50%グリセロールを少量滴下しカバーガラスをかけ、5：押しつぶす。

ない[1]。

一方、紡錘体形成阻害剤などの作用により紡錘体が形成されない染色体 1 から数個が 1 つの小核を形成する場合がある (図 2 C)。この場合は、一般に小核のサイズは染色体断片により生じる小核に比べ大きい [1,12]。

このように小核試験は、染色体切断を引き起こす物質だけでなく染色体の異数性をもたらす物質も検出できる。

2.2. 植物を用いる小核試験

先に述べたように、植物を用いる小核試験はここ 10 年ほどの間に急速に応用が進められてきた。PubMed での検索によると、ソラマメを用いる方法については、約 60 報の論文が出ている。大多数が 1990 年代に入ってからで、その 40 報以上は 1990 年代後半以後である。タマネギを用いる方法は約 30 報の報告があり、大多数が 1990 年代後半以後である。タマネギを用いる場合は、通常のタマネギ球根の根端細胞を用いる場合と実生（発芽種子）の根端細胞を用いる場合がある。

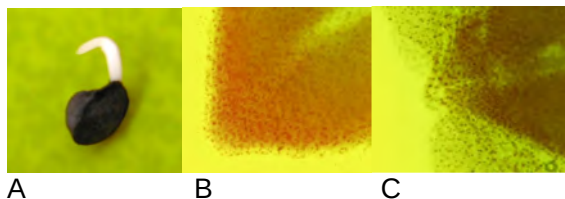


図5 A: タマネギ実生、B: 根端、C: 根端を軽く押しつぶした様子。

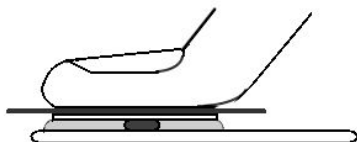


図6 押しつぶし法。上から、親指、ろ紙、カバーガラス、試料（50%グリセロールで充たされている）、スライドガラス

3. 小核試験法

3.1. タマネギ実生を用いる小核試験法

半本[14]は、タマネギ実生を用いる根端細胞の観察法について報告している。この方法は染色法において、塩酸前処理を行わず、染色を行うという簡便で優れた方法である。染色液に塩酸を含ませることで、塩酸前処理を省いている。Fujikawa ら[12]、Alcaide ら[13]等は半本の方法に基づき小核試験を行った。以下に示す方法は、半本および Alcaide らの報告に基づくものである。

3.2. タマネギの培養・薬品処理 (図3)

- ① 6cm 径のシャーレにティッシュペーパーを折りたたんで敷き、播種用のペーパーベッドをつくる。
- ② 薬品を溶解させた溶液 6ml を加え、ペーパーベッドを浸らせる。
別途、コントロールのために、蒸留水 6ml でペーパーベッドを浸らせる。
- ③ タマネギの種を、適当な間隔で播く。
- ④ シャーレに蓋をして、ビニールテープで密封し、恒温器 (25℃) に入れる。
- ⑤ 48 時間 (2 日間) 培養する。
- ⑥ 発芽したタマネギの種を蒸留水で数回よく洗う。
- ⑦ 別のシャーレにティッシュペーパーを敷き蒸留水で浸し、その上に薬品処理した発芽種を移し培養する。
- ⑧ 薬品処理後、24 時間間隔 (0、24、48、72 時間) で標本作製する。

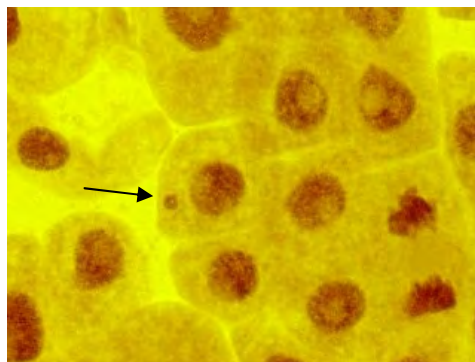


図7 根端細胞と小核を有する細胞 (矢印: 小核)。

3.3. 標本作成 (図4)

染色はダリア・バイオレット (Dahlia violet) 染色液で行う [14]。Dahlia violet 染色原液は、0.5 g の Dahlia violet (和光紙薬) を 100ml の 30% の酢酸に溶かして作る。

Dahlia violet 染色液は、Dahlia violet 染色原液と 1M の塩酸を 7 : 3 で混合したものを用いる。

- ① Dahlia violet 染色液で発芽根を 15 分間染色する。
- ② 発芽根端部を 2mm 程度切り取り (図5)、スライドグラスの上にのせる。
- ③ 50%グリセロール (グリセリン) を少量滴下し、カバーガラスをかける (図5 B)。
- ④ ろ紙をかぶせ、上から親指で圧をかけ押しつぶす (押しつぶし法) (図5 C、図6)。

3.4. 小核観察法

核の周辺に現れた核と同じ染色性の小粒を小核 (図7) とする。疑似小核には注意をする。主核と比べ染色性が異なっていたり輪郭がぼやけていたりすると、小核ではない可能性がある。

細胞を 1000 個から 2000 個観察し、細胞 1000 個あたりの小核数を算定する。種子 5・6 個程度観察し、平均をとる。

3.5. 小核試験を行うにあたって

小核試験を行う場合、試験する薬品の用量ならびに薬品処理後の時間が重要になってくる。

薬品処理後の時間については、Alcaide ら[13]によると、X-線では、照射後 24 時間で小核頻度はピークを示す。一方薬品では、薬品の種類や濃度により、ピークを示す時間は異なる。一般に、薬品処理後、24 から 72 時間の間でピークが示される。状況により、12 時間間隔など間隔を狭めて標本作製する。

薬品処理による小核頻度は必ず無処理のコントロール (陰性コントロール) における小核頻度と比較する。他に、標準的な遺伝毒性物質を用いる陽性コントロー

ルも用いる場合がある。陽性コントロールとしてはマイトマイシン C がよく使用される。紡錘体形成阻害剤としてはコルヒチンがよく使用される。

薬品の用量は一般に公比 2 で等比級数的に 3 から 4 段階の用量群を設ける (例: 2、4、8、16)。一般に高い用量から試験する必要がある、最高用量としては致死量の一手手前の量を用いる。遺伝毒性は、用量と比例関係があり、閾値がないとされている。よって高用量で影響を調べ、低用量では比例的に減少すると考える。しかし、高用量では小核頻度が低くなる場合がある。また、低用量で閾値が存在するという考えもある。

試験実施にあたっては別途文献[1,2,10,15 等]を参考にされたい。

文 献

- [1] 林真: 小核試験. サイエнтиスト社, 東京 (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] 菊池康基, 津志本元, 三宅幸雄: 遺伝毒性試験用語集. サイエнтиスト社 (1995)
- [4] 石館基: 変異原性試験の役割. 毒性試験講座 12 変異原性・遺伝毒性. 地人書館, 1-8 (1991)
- [5] Evans H.J., Nearly G.J., 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)
- [6] Schmid W.: The micronucleus test. Mutat. Res. 31, 9-15 (1975)
- [7] Heddle J.A.: A rapid in vivo test for chromosome damage. Mutat. Res. 18, 187-190 (1973)
- [8] 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)
- [9] 山本好一: 小核試験. 環境変異原実験法, 講談社, 197-207 (1980)
- [10] 医薬品日臨床試験ガイドライン研究会編: 医薬品日臨床試験ガイドライン解説 2010. 薬事日報社 (2010)
- [11] PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- [12] Fujikawa K., Endo S., Itho T., Yonezawa Y., Hoshi M.: Dose estimations of fast neutrons from a nuclear reactor by micronuclear yields in onion seedlings. J. Radiat. Res. 40 Suppl., 28-35 (1999)
- [13] Alcaide E.A., Tanaka A., Ikeda H., Fujikawa K.: Development of a micronucleus assay in the root tips of *Allium cepa* seedlings as a detector of chemical clastogens. Environ. Mutagen Res. 22, 9-14 (2000)
- [14] 半本秀博: タマネギおよびソラマメの根端細胞における体細胞分裂の日周期性. 生物教育 28(1), 47-51 (1988)
- [15] 三宅幸雄, 森田健, 若田明裕, 朝波省吾, 島田弘康編: 医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A. サイエнтиスト社 (2000)

人と環境 Vol. 2 (2009)

大阪信愛環境総合研究所編集

©2009 大阪信愛女学院短期大学
