

## 9. 絶滅に瀕したミヤコタナゴの保存 および増殖に関する研究（その2）

I. 調査研究の目的

II. 化学物質の魚類に及ぼす細胞遺伝学的影響

1. キンギョ成魚の小核

2. タイリクバラタナゴ成魚の染色体異常および小核

3. ミヤコタナゴおよびタイリクバラタナゴ胚の染色体異常、小核および分裂後期異常

4. ミヤコタナゴ、タイリクバラタナゴおよびニジマス培養細胞の染色体異常および増殖抑制

III. むすび

宇都宮大学教育学部教授 小林仁道

宇都宮大学教育学部助手 上田高嘉



## I. 調査研究の目的

現在、多種の動植物が絶滅に瀕しており、それらの保護・保存に目が向けられている。ミヤコタナゴもその一つである。これまでの研究で、ミヤコタナゴの水槽内での飼育が他魚種に比べて特に難しいということではなく、人工受精も容易で、人工的な保存および増殖は可能であることがわかった。しかし、自然環境における存在および増殖の問題が解決された訳ではない。ミヤコタナゴはマツカサ貝という二枚貝に卵を産みつけるという特殊な生態をもっており、ミヤコタナゴの減少はその貝が生息できる環境が失われてきていることによるとの指摘もある。両者の生息に関わる環境要因として、河川の構造的な問題の他に水質が上げられる。河川は年々化学物質による水質汚染がすすんでいる。化学物質のミヤコタナゴおよびマツカサ貝への影響について明かにすることはミヤコタナゴの保存および増殖において極めて重要である。

我々人間は遠い昔より小動物を労る気持ちを持ち続けてきた。絶滅に瀕した種に対して持つ人間の哀れむ気持ちには計り知れないものがある。絶滅に瀕したミヤコタナゴの保存および増殖についての取り組みは、ひいては我々人間がおかれている環境についての整備への取り組みであり、河川美化意識の向上につながるものと考える。そこで、化学物質のミヤコタナゴおよびマツカサ貝への影響を細胞遺伝学的に明らかにし、ミヤコタナゴの保存および増殖について検討を行い、河川美化意識の向上に役立てることを目的とする。

## II. 化学物質の魚類に及ぼす細胞遺伝学的影響

我々は日常生活において 60000種類を越える化学物質に接しているといわれ、さらに年々数多くの新しい化学物質が作り出されている。それらの化学物質は我々の生活を豊かにする上で重要な役割を担っている。その反面、リスクを伴うことが多い。医薬品、食料添加物など人体に直接的に関わるものもあれば、工業製品など他の化学物質も含め、廃棄物として環境中へと流れ、間接的に関わってくるものもある。また、水圏環境中に流れ込んだ化学物質は、そこに生息する水生生物に直接または間接的に影響をもたらす。それゆえ、種々の化学物質の毒性について正確に把握することは重要な課題である。ここ数十年、多くの化学物質に対して種々の毒性試験が行われてきた。試験法の一つである変異原試験法は、化学物質の遺伝毒性についての評価を与えるとともに、発癌性、催奇形性が推し量れ、極めて重要な方法である。化学物質が与える細胞遺伝学的なダメージを評価する主な方法として、哺乳類を用いた *in vitro* での染色体異常試験 (Ishidate and odashima 1977) および *in vivo* での小核試験 (Shumid 1975, Mavournin et al. 1990) などが用いられてきた。魚類を用いた化学物質の毒性を試験する方法としては、死を指標とする方法、行動の変化をみる方法、呼吸量など生理変化を指標とする方法、細胞の形態をみる方法などがあるが、変異原試験に関する報告は極めて少なく、最近になってようやく行われるようになってきた。哺乳類を用いた試験との相関が掘めれば、魚類での試験結果からヒトに対する影響評価が行えるであろう。保護の面から試験動物として哺乳類を用いる

ことをできるだけ避けようとする動きがあり、一つの打開策になるかもしれない。また一方、化学物質の中には試験動物によって全く異なった影響を示すものがあって、哺乳類を用いた試験だけに頼る危惧が取り沙汰されており、それを補う意味においても魚類を用いた試験を加えることは重要であろう。また、化学物質の水圏環境への影響を評価する場合、そこに生息する魚類を試験動物として用いることには意味深いものがある。変異原試験は多世代におよぶ影響評価を含んでおり、魚類での試験は、魚類の保護および水産とも深く関わってくる。

変異原の魚類に与える影響に関する報告として、染色体異常、姉妹染色分体交換、小核および分裂後期での異常の分析を行ったものがあり、魚類を用いた変異原試験の可能性が示唆されている。

魚類の染色体は一般に小さくて、染色体異常の検出に困難な点が多く、染色体異常の報告のほとんどは数が少なく比較的大型の染色体をもつセントラル・マッドミノウ (Umbrina limi, 2n=22) を用いたものである。Kligerman et al. (1975) はセントラル・マッドミノウにX線照射を行い、腸、胃、腎臓およびえらの細胞でbreaks, gapsおよびtranslocationsの異常の増加を認めた。Mong and Berra (1979) も同様の実験で、えらと脾臓の細胞でchromatid breaks, gapsおよびchromatid exchangesの染色体異常の増加を観察した。in vitroでは、須山と江藤 (1980) セントラル・マッドミノウのリンパ球細胞にX線を照射し、dicentrics等の異常の増加を認めている。Al-Sabti (1986) は5種の変異原・発癌物質 (aflatoxin B1, aroclor 1254, benzo(a)pyrene, 20-methylcholanthrene およびbenzidine) のコイ (Cyprinus carpio) への注射による投与で、48時間後に染色体異常の増加を観察している。

姉妹染色分体交換 (SCE) とは、姉妹染色分体が同一箇所で切断され交換されて再結合される現象をいう。SCEは1957年にTayler et al. によって<sup>3</sup>H-チミジンを用いて見い出された。1970年代にはいるとオートラジオグラフ法に代わってBrdU (5-bromodeoxyuridine) で処理して蛍光色素あるいはギムザで染色する方法が開発され、容易に鮮明な分染像が得られるようになり、多くの研究がなされるようになった。Latt (1974) およびPerry and Evans (1975)などの研究から、SCEは染色体異常を誘発するよりもはるかに低い濃度でも誘起され、変異原物質を検索する有効な方法とされるようになった。今日、変異原試験法として一般的に用いられているが、SCEと染色体異常とは異なる機構で起こるものと考えられている。SCEの一部は突然変異と関連をもつであろうとされているが、SCEと突然変異を直接関連付ける報告はない。Kligerman and Bloom (1976) は初めて魚類に応用し、セントラル・マッドミノウの姉妹染色分体分染像 in vivoで観察した。その後 Kligerman (1979) は methyl methanesulfonateおよびcyclophosphamideをセントラル・マッドミノウの腹腔内に投与し、えら、腎臓および腸の細胞でSCE頻度の増加を認めた。Barker and Rackham (1979) は Ameaca splendens の培養細胞にethyle methanesulphonate, mitomycin C, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidineおよびmethyl methanesulphonateを添加し、ヒトやチャニーズハムスターなどに比べ感受性は低かったものの、SCEの増加を認めた。Alink et al. (1980) はイースタン・マッドミノウ (Umbrapygmaea) をライン川から採取した水で11日間飼育し、えらと精巣細胞でSCEの増加を観察した。

Vigfusson et al. (1983) は4種類の殺虫剤 (endrin, chlordane, diazinon およびguthion) を溶

かした水でセントラル・マッドミノウを11日間飼育し、3種類の殺虫剤で腸の細胞にSCEの有意な増加がみられたが、guthionでは変化は認められなかった。mitomycin Cでの試験も行い、マッドミノウと哺乳動物との結果がよく一致することを観察した。

小核試験は、Evans et al. (1959) がソラマメの根端細胞に電離放射線を照射し、小核の出現と染色体異常との関係を調べたことにはじまる。1970年代に入ると、哺乳類で小核が観察されるようになり、SchmidやHeddleらのグループによって今日の小核試験の基礎が確立された。その後、研究が進むとともに染色体異常と小核との関係が明確になり、1980年代に入って小核試験も変異原試験法の一つに加えられるようになった。小核試験では、被検物質によって細胞質中に取り残された染色体に由来する小核の出現頻度を計ることによって、染色体異常の誘発性を間接的に推定できる。最近、螢光染色法を導入することにより、小核の判定および幼若赤血球と成熟赤血球の識別が容易になり、標本観察の精度が高まった。実験操作が簡単なこともあって、哺乳類の変異原試験として定着するようになった。Hooftman and Raat (1982) はethyl methanesulphonate 水溶液中でイースタン・マッドミノウ (Umbra pygmaea) を3および6週間飼育後、末梢血中の赤血球を観察し、小核頻度の増加を認めた。また、3週間目では200mg/literの濃度で観察されなかった小核が6週間目では8mg/literでもみられ、小核試験が慢性毒性の試験に向いているのではないかと考えた。Al-Sabti (1986) はコイに5種の変異原・発癌物質（上述）を投与し、染色体異常とともに、赤血球中に小核の増加を認めた。Hose et al. (1987) は南カリフォルニアの汚染水域から採集された white croaker (Genyonemus lineatus) および kelp bass (Paralabrax clathratus) の赤血球中の小核の頻度を調べた。white croaker では通常の4倍、kelp bass では11倍という高い率であった。また、この小核頻度の高い雌からの卵では低い受精率で、次世代に及ぼす危険性を指摘している。

細胞分裂後期像異常の分析も毒性の程度を推し量る一つの方法であるが、Kocan et al. (1982) はニジマスの生殖細胞由来の培養細胞にN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-aminoacridine, benzo(a)pyrene, 3-methylcholanthrene, mitomycin, anthracene およびl-naphtholを添加し、分裂後期異常の増加を観察している。

本論では、ミヤコタナゴの存在と増殖という観点から、変異原物質の魚類への影響を細胞遺伝学的に検討した。試験動物としてはミヤコタナゴの他、近縁であるタイリクバラタナゴ、入手が容易であり育種魚として一般的なキンギョおよびニジマスを用いた。変異原物質としては、抗悪性腫瘍剤として一般に用いられ、種々の副作用もよく調べられているマイトイシンC (mitomycin C, 協和発酵工業社) "Azirizino [2', 3':3, 4] pyrrolo [1, 2- $\alpha$ ] indole-4, 7-dione - 6-amino-1, 1a, 2, 8, 8a, 8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl) 8a-methoxy-5-methyl-carbamate" を用いた。この物質は、哺乳動物を用いた試験で、染色体異常および小核の誘発、また強い発癌作用が確認されており、化学物質の変異原性を試験する際に陽性対照薬としてよく用いられている。

## 1. キンギョ成魚の小核

### (1) 血液塗抹標本の観察法

- ① 栃木県水産試験場にて飼育中のキンギョ (*Carassius auratus*) 成魚の腹腔内にマイトイシンC (MMC) を個体別に 2, 4, 10 および 20 mg/kg (体重) の濃度で各々 3 個体ずつ投与し、20°Cで飼育した。
- ② 投与後同一個体より連続的に 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 および 17 日目に尾部血管より採血し、牛胎仔血清で約 2 倍に薄め塗抹標本を作製した。
- ③ 5~10分のメタノール固定後、アクリジン・オレンジで 3~5 分間染色した。アクリジン・オレンジは 0.1% 水溶液を保存液とし、保存液 1 容をゼーレンゼンの磷酸緩衝液 (pH 6.8) 30 容で希釈した。
- ④ 染色後同一緩衝液で軽く洗い、同一緩衝液を用いてカバーグラスを掛け、蛍光顕微鏡で観察した。
- ⑤ 細胞質が赤色に染まった幼若赤血球中の小核をもった細胞の割合を求めた。

## (2) 小核出現頻度

幼若赤血球中の小核をもった細胞の割合を表 1 に示した。また、0~3 個体（途中死亡個体があるので）の平均の経日変化を図 1 に示した。個体差はあるものの、マイトイシンC投与により小核の出現頻度の上昇が認められた。濃度による小核出現頻度の差は観察されず、その原因についての検討は今後の課題である。他の毒性試験においてキンギョは個体差が大きく、一般的な試験には適さないとの指摘があり、そのことが一つの原因として上げることができる。12 個体中 8 個体は 3~4 日目にモードがあった。4 mg/kg 投与の No. 5 の個体の 3 日目に最高値 7.74% を示した。小核を誘起するマイトイシンCの濃度はマウスでの試験と類似した (Sato et al. 1989)。

表 1 マイトイシンC (MMC) を腹腔内投与されたキンギョ (*Carassius auratus*) の小核を有した幼若赤血球の頻度 (%)

Specimen no.	MMC (mg/kg)	Days after treatment									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	17
1	2	0.00	0.10	0.75	1.84	1.32	1.42	0.53	0.00	0.14	0.09
2	2	0.19	0.10	0.20	1.40	3.40	1.35	0.61	0.17	0.09	0.00
3	2	0.00	0.00	0.66	1.14	1.18	0.36	0.48	0.46	0.18	0.00
4	4	0.10	0.30	0.09	1.86	2.05	0.82	1.67	0.37	0.37	0.00
5	4	0.20	0.00	2.36	7.74	7.22	3.94	2.11	1.04	0.00	-
6	4	0.00	0.10	0.09	0.46	0.28	0.55	0.57	1.06	0.19	-
7	10	0.10	0.40	1.94	2.53	2.43	1.98	1.23	0.50	0.44	0.09
8	10	0.00	0.10	0.38	0.46	1.44	3.27	2.33	0.51	0.38	-
9	10	0.20	0.10	0.00	0.27	0.28	0.38	0.20	0.74	0.09	-
10	20	0.00	0.60	0.94	0.55	0.68	0.54	0.77	0.51	-	-
11	20	0.10	0.29	0.89	1.57	1.88	1.54	-	-	-	-
12	20	0.30	0.89	0.82	1.87	-	-	-	-	-	-

- : Died

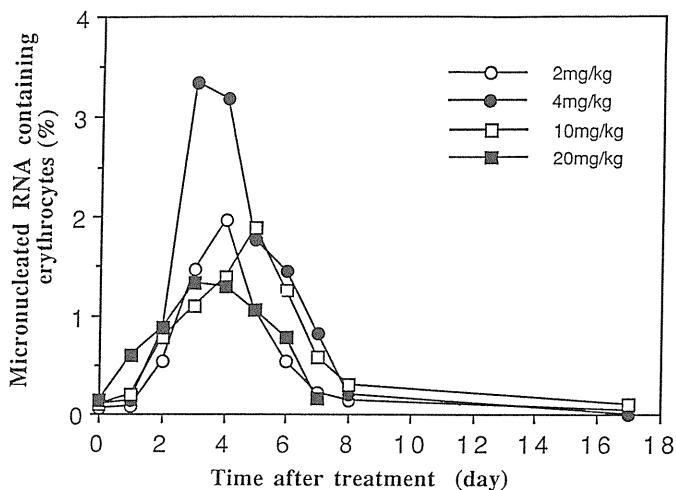


図1. マイトマイシンC (MMC) を腹腔内投与されたキンギョ (*C. auratus*) の小核を有した幼若赤血球 (Micronucleated RNA containing erythrocytes) 頻度の経日変化。

## 2. タイリクバラタナゴ成魚の染色体異常および小核

埼玉県漁業協同組合より購入したタイリクバラタナゴ (*Rhodeus ocellatus ocellatus*) の成魚を用いて、次の研究を行った。

### (1) 染色体異常

マイトマイシンCを 1.5~8 mg/kg (体重) の濃度で腹腔内に注射し、24~26°Cで飼育した。注射後 1~7 日目に個体を殺した後、腎臓とえらを取り出し、次の方で空気乾燥標本を作製した。

- ① 組織を A 液 (Eagle's MEM倍地 + 5 %牛胎仔血清 + 15mM HEPES + 0.005%コルヒチン、pH 7.0 に調整) で洗った。
- ② プラスティックペトリ皿内で組織をはさみで細かく刻んだ。
- ③ 約 5 ml の A 液を加え、ピペット操作で穩やかに攪はんした後、遠心管に移した。
- ④ 2, 3 分間静置し、大きな細胞塊を含まない上層部を別の遠心管に移し、室温 (26°C) で 30 分間静置した。
- ⑤ 1000 rpm で 5 分間遠心後上澄を捨て、0.5% KC1 水溶液を 5 ml 加え穩やかにピペット攪はんした後、30 分間の低張処理を行った。
- ⑥ 1000 rpm で 5 分間遠心後、細胞を 0.5 ml の 0.5% KC1 水溶液に浮遊させてからマイクロチューブ (1.5 ml 用、岩城硝子) に移し、1 : 3 の酢酸エタノールを 0.5 ml 加え、マイクロピペット用チップで穩やかに攪はん後、1000 rpm で 5 分間遠心した。
- ⑦ 2、3 回新しい 1 : 3 の酢酸エタノールに入れ換えた後、小量の 1 : 1 の酢酸エタノールに細胞を浮遊させた。
- ⑧ 細胞懸濁液をきれいに拭いたスライドグラス上に 1 滴落とし、自然乾燥させた。

- ⑨ pH 5.8のゼーレンゼン緩衝液で5%にしたギムザ液で5~10分間染色した後、水洗いした。  
 ⑩ 1000倍の光学顕微鏡下で観察を行った。

無処理群では1個体当たり50核以上の分裂中期像の観察が可能であった。マイトマイシンC 1.5 ~ 4 mg/kg投与の1日目でも30核以上の中期像が得られた。投与群では無処理群にはみられないgaps, breaks, exchanges, micro chromosomesの染色体異常が観察された。一つでも異常を持った中期像を1個の異常中期像とし、その割合を表2に示した。マイトマイシンC投与により染色体異常を持つ中期像は明らかに増加し、4 mg/kg投与の2日目では中期像の75%が異常を含んでいた。

中期像の数はマイトマイシンC投与後減少傾向にあり、さらに6 mg/kgの1日投与および8 mg/kgの2日間投与では全く中期像が観察できず、マイトマイシンCによる増殖抑制と考えられる。4 mg/kgの3日間投与の1個体から中期像が得られなかったのは、マイトマイシンCの影響に個体差があること、4 mg/kgあたり中期像を得ることができる域値であることなどが考えられる。

4 mg/kg以下のマイトマイシンC投与後1日目の個体からは広がりのよい分裂中期像が得られ、染色体異常の有無も容易に判定ができ、投与後1日目のタイリクバラタナゴにおける染色体異常出現頻度の分析は化学物質の細胞に与える遺伝毒性の程度を推し量る一つの有効な方法と考えられる。

表2 マイトマイシンC (MMC) を腹腔内投与したタイリクバラタナゴ (*Rhodeus ocellatus ocellatus*) の染色体異常を有した細胞 (CAs) の頻度。

Exposure time (days)	MMC (mg/kg)	CAs	CAs (%)	Exposure time (days)	MMC (mg/kg)	CAs	CAs (%)
0	-	0/50	0.00	2	4	15/20	75.00
0	-	0/50	0.00	2	8	-	-
0	-	0/50	0.00	2	8	-	-
1	1.5	1/30	3.33	3	4	12/20	60.00
1	1.5	5/50	10.00	3	4	-	-
1	3	16/35	45.71	4	4	9/20	45.00
1	4	25/50	50.00	5	4	8/15	53.00
1	4	27/50	54.00	6	4	7/15	46.67
1	6	-	-	7	4	3/10	30.00

## (2) 小核

マイトマイシンCを1.5~8 mg/kg(体重)の濃度で腹腔内に注射し、24~26°Cで飼育し、1~7日に腎臓とえらから(1)項染色体異常と同様の方法で空気乾燥標本を作製し、1000倍の光学顕微鏡下で観察を行った。

間期核の近傍に存在する核様に染まる小体を染色体異常に由来する小核とみなし、赤血球を除く間期核に対する割合を求め表3に示した。赤血球を除いたのは、腎臓およびえらを摘出する際に混じる血液量がその都度異なり、空気乾燥標本に含まれる低張処理により形の崩れた赤血球の

表3 マイトマイシンC (MMC) を腹腔内投与したタイリクバ  
ラタナゴ (R. ocellatus ocellatus) の小核を有した細  
胞 (MN Cs)の頻度

Exposure time (days)	MMC (mg/kg)	MNCs	MNCs (%)	Mean of MNCs (%)
0	-	1/ 10287	0.0097	
0	-	1/ 7993	0.0125	0.0219
0	-	3/ 9736	0.0308	
0	-	4/ 11623	0.0344	
1	1.5	2/ 5857	0.0341	
1	1.5	5/ 9113	0.0549	0.0583
1	1.5	5/ 5821	0.0859	
1	2	2/ 5040	0.0397	
1	2	5/ 9051	0.0552	0.0529
1	2	5/ 7833	0.0638	
1	3	6/ 8608	0.0697	
1	3	9/ 9868	0.0912	0.0846
1	3	9/ 9684	0.0929	
1	4	0/ 4545	0.0000	
1	4	3/ 10139	0.0296	0.0394
1	4	3/ 5158	0.0582	
1	4	5/ 7178	0.0697	
1	6	3/ 7914	0.0379	
1	6	4/ 7442	0.0537	0.0494
1	6	4/ 7060	0.0567	
2	2	3/ 3947	0.0760	0.0760
2	4	1/ 7083	0.0141	0.0306
2	4	3/ 6380	0.0470	
2	8	1/ 5438	0.0184	
2	8	1/ 4351	0.0230	0.0243
2	8	1/ 3174	0.0315	
3	1.5	8/ 6963	0.1149	0.1149
3	3	4/ 7209	0.0555	0.0714
3	3	8/ 9163	0.0873	
3	4	7/ 16259	0.0431	0.0446
3	4	7/ 15188	0.0461	
3	6	3/ 6690	0.0448	0.0448
4	4	4/ 7823	0.0511	0.0511
5	4	2/ 8936	0.0224	0.0524
5	4	5/ 6078	0.0823	
6	4	3/ 6751	0.0444	0.0444
7	4	3/ 8715	0.0344	0.0344

数に差ができ、小核の頻度を求める上で誤差の原因となると考えたためである。表3からマイトイントマイシンC投与による小核の増加傾向がみられた。投与後1日目の標本では3mg/kgの濃度で小核出現率が最も高かった。1.5mg/kg投与の3日目に最高値を示した。同じ条件でも個体によって差がみられた。

マイトイントマイシンC投与による小核の増加傾向がみられたが、個体差のあること、試験供与個体が少なかったこともあり、明確な結果が得られたとは言い難い。Al-Sabti (1986) は5種の化学物質の腹腔内投与により1~7%のコイ(*Cyprinus carpio*)の赤血球に小核を認め、また上述したようにマイトイントマイシンC腹腔内投与により同程度の頻度でキンギョ(*C. auratus*)の幼若赤血球内に小核が観察されており、ここでの小核頻度は細胞増殖の活発な組織を用いたにしては低い値とみられる。その原因の一つとして、標本内に細胞質の残っている細胞がほとんどなく、間期核のすぐ近傍にある小体だけを小核とし、紛らわしいものは除外したため、多くの小核をカウントし残した可能性が上げられる。細胞質ができるだけ残るような方法(例えばスライドグラスへ広げる際の細胞懸濁液の酢酸濃度を下げるとか)の開発により小核の識別を容易にする努力も必要であろう。標本内における細胞塊の多少、細胞濃度、染色の良否など小核頻度算定時に誤差の原因となり、標本の均一化も今後心掛けねばならない。

### (3) 染色体異常および小核

成魚7個体の腹腔内に各々4mg/kg(体重)のマイトイントマイシンCを投与し、24~60°Cで飼育した。1、2、3、4、5、6および7日目に1個体ずつ殺傷し、腎臓およびえら細胞より染色体標本を、尾部血管より採取した血液より塗抹標本を作製した。染色体空気乾燥標本は2の(1)項と同様に、塗抹標本は1項のキンギョと同様に作製した。また、染色体異常は2の(1)項と同様に、小核は1項のキンギョと同様に分析された。

投与後1~7日目の染色体異常および小核を持った細胞の割合を表4に示した。経日的に大き

表4 4mg/ml(体重)のマイトイントマイシンC(MMC)を投与したタイリクバラタナゴ(*R. ocellatus ocellatus*)の染色体異常を有した細胞(CAs)および小核を有した幼若赤血球(MNREs)の頻度。

MMC (day)	CAs	CAs (%)	MNREs	MNREs (%)
0	0/30	0.00	0/1000	0.00
1	3/5	60.00	2/1018	0.20
2	5/6	83.33	10/1002	1.00
3	9/14	64.29	8/1000	0.80
4	5/11	45.45	5/1008	0.50
5	5/9	55.56	7/1005	0.70
6	3/6	50.00	6/1007	0.60
7	2/7	28.57	2/1000	0.20

な変化は見られなかったが、マイトイシンCの投与による染色体異常および小核の増加が認められた。(1)項と同様に、gaps, breaks, exchanges, micro chromosomesの染色体異常が観察された。2日目の標本では83.3%の中期像が染色体異常を含んでいた。(1)項でも述べたように、良質の染色体標本が安定して得られ、タイリクバラタナゴにおける染色体異常出現頻度の分析は化学物質の細胞に与える遺伝毒性の程度を推測する一つの有効な方法と考えられる。塗抹標本でのアクリジン・オレンジ染色はキンギョと同様に小核の識別、幼若赤血球と成熟赤血球の区別が比較的容易に行え、大まかにではあるが投与による小核の増加を観察することができた。2日間投与で最高値1.00%を示した。個体差があること、各濃度1個体ずつの試験であることを考慮すると、経日変化が捕らえられなかつことはやむを得ないと考える。

### 3. ミヤコタナゴおよびタイリクバラタナゴ胚の染色体異常、小核および分裂後期異常

#### (1) 人工受精法

ミヤコタナゴ (Tanakia tanago) は栃木県水産試験場で飼育中の個体を、タイリクバラタナゴ (R. ocellatus ocellatus) は埼玉県漁業協同組合で購入した個体を用いて、次の方法で人工受精を行つた。

- ① 産卵管の伸長した雌を取り上げ、90mmプラスティックペトリ皿に水を満たし、産卵管の先端を液中に入れ、腹部を軽く圧して採卵した。
- ② 卵が軽く浸るまで水を捨ててから、婚姻色が現れた雄を取り上げ、腹部を軽く圧して水中に放精した。
- ③ ペトリ皿を軽く動かして精子が全体に行き渡るようにした後、少量の水を加えた。
- ④ 数分後、数回水を取り替え、余分な精子を洗い落とした後、水を満たした。
- ⑤ 受精後約10分にマイクロプレート（96穴、Flow社）に水あるいはマイトイシンC水溶液を分注し、1穴に3個ずつ受精卵を入れ、光りを遮り17~19°Cに保つた。

#### (2) 空気乾燥標本作製法

各条件について受精卵3個から、次の方法により1個の標本を作製した。

- ① 受精後約1日の卵をA液（上述）に取り、卵膜と卵黄を除いた胚細胞塊3個を 1.5mlのAがはいった1本のマイクロチューブ（1.5ml用、岩城硝子社）に移し、30分間室温（26°C）で静置した。
- ② 1000 rpmで5分間遠心後上澄を捨て、1mlの0.6%ケエン酸ナトリウム水溶液を加え、チップで穩やかに攪はんし、2分間室温で静置した。
- ③ 1:3の酢酸エタノールを0.5ml加え、チップで穩やかに攪はんした後、1000 rpmで5分間遠心した。
- ④ 上澄を捨て、1:3の酢酸エタノールを1.5ml加え穩やかに攪はんした後、1000 rpmで5分間遠心した。
- ⑤ 上澄を捨て、小量の1:1の酢酸エタノールを加え、チップで穩やかに攪はんした後、裏面を水で濡らしたスライドグラス上に1滴落とし、自然乾燥させた。

⑥ ゼーレンゼンの磷酸緩衝液 (pH 5.8) で 5 % にしたギムザ液で 5 ~ 10 分間染色した。

⑦ 600 ~ 1000 倍の光学顕微鏡下で観察を行った。

マイクロチューブおよびマイクロピペット用チップを用いることにより細胞の損失が抑えられ、低張液にクエン酸ナトリウムを用いることにより細胞を容易に解離することができ、分裂頻度も高く、染色体の 1 本 1 本がよく伸長した良質の標本が安定して得られた。また、これまでの胚からの標本では染色体の流失が時々あり、正確な染色体数が捕らえにくくことがあったが、今回の方法では染色体の流失がほとんどなく、極めて利用価値の高い方法と考えられる。

### (3) 染色体異常および小核

受精後 1 日目の胚は囊胚期前後とみられた。胚にみられた染色体異常を持つ分裂中期像および小核を持つ間期細胞の割合を表 5 に示した。gaps, breaks, exchanges, micro chromosomes の染色体異常が観察されたが、一つでも染色体異常を含む分裂中期像を 1 個の異常中期像とした。マイトマイシン C 投与による染色体異常および小核の増加が認められた。0 ~ 2  $\mu\text{g} / \text{ml}$  では濃度の増加に伴って異常も増加した。ミヤコタナゴで試験された 400  $\mu\text{g} / \text{ml}$  以上では胚形成が認められなかった。200  $\mu\text{g} / \text{ml}$  では両種とも全ての中間像が染色体異常を含んでおり、多くの染色体に異常が認められダメージの大きさがうかがえた。また分裂中期像の頻度が低く、分裂抑制を受けているように見受けられた。胚での試験は分化との関わりからも興味深いものがあり、さらに検討をすすめていきたい。

表 5 マイトマイシン C (MMC) を水浴投与したタイリクバラタナゴ (R. ocellatus ocellatus; RB) およびミヤコタナゴ (Tanakia tanago; MB) の染色体異常を有した細胞 (CAs) および小核を有した細胞 (MNECs) の頻度。

Species	MMC ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )	CAs	CAs (%)	MNECs	MNECs (%)
RB	0	0/30	0.00	0/ 300	0.00
	0.2	0/18	0.00	1/ 241	0.41
	0.2	1/31	3.23	5/1126	0.44
	2	1/18	5.56	3/ 140	2.14
	2	1/20	5.00	17/ 760	2.24
	20	14/30	46.67	9/ 179	5.03
	20	43/51	84.31	150/ 736	20.38
MB	200	2/ 2	100.00	34/ 186	18.28
	0	0/30	0.00	0/ 300	0.00
	100	32/43	74.42	30/ 571	5.25
	200	26/26	100.00	38/ 239	15.90
	400	-	-	-	-
	800	-	-	-	-

#### (4) 細胞分裂後期異常

受精後約10時間（17～19°C）の胚からコルヒチン処理せずに(2)項の方法で空気乾燥標本を作製すると、多数の分裂後期像が観察できた。20 μg / mlの濃度の水溶液中で飼育された胚では異常分裂と思われる後期像が観察された。後期像の異常頻度も化学物質の変異原性を推測する一つの目安になるのではないかと考えられる。

### 4. ミヤコタナゴ、タイリクバラタナゴおよびニジマス培養細胞の染色体異常および増殖抑制

#### (1) 培養細胞系の樹立

哺乳類用の人工培地をそのまま魚類に適用できることが多く、様々な魚類で培養細胞系が樹立されている。魚類は変温動物であり、細胞培養に適した温度は生息する水温に関連すると考えられており、コイ・フナ類では25～30°C、サケ・マス類では20°C前後で培養されることが多い。本論では次の3種の培養細胞系を樹立し、試験に供した。

##### (a) ミヤコタナゴおよびタイリクバラタナゴ

ミヤコタナゴ (*T. tanago*) は栃木県水産試験場で飼育中の個体を、タイリクバラタナゴ (*R. ocellatus ocellatus*) は埼玉県漁業協同組合より購入した個体を用いて、鰓から培養細胞系を樹立した。

- ① 尾鰭を約5 mm × 5 mmの大きさに切り取り、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素約1%）に4～10°Cで5～10秒間浸し殺菌した。
- ② 培養液 (Eagle's MEM培地+10%牛胎仔血清+15mM H E R E S + 100IU/mlペニシリン、pH 7.0に調整) で2回洗浄後、プラスティックペトリ皿 (60mm, コーニング社) 内ではさみにより細片化した。
- ③ 培養液を約4 ml加えて軽くゆすった後、蓋をしてパラフィルムで封をした。
- ④ 17～20°Cで閉鎖系にて培養した。
- ⑤ 7～10日に1回培養液の半量を新しいものと入れ換えた。
- ⑥ 細胞がペトリ皿のほぼ底面全体を占めた時に、シリコンゴム片で底面をこするようにして細胞を剥がし、組織片と共にプラスティックフラスコ (25cm<sup>2</sup>, コーニング社) に移した。
- ⑦ 細胞がペトリ皿のほぼ底面全体を占めるまで、7～10日に1回培養液の半量を新しいものと入れ換えた。
- ⑧ その後、細胞増殖の状態をみて、ピペット操作あるいはシリコンゴム操作で細胞を剥がして1/2～1/4の細胞数で継代を続けている。初代培養から最初の継代までミヤコタナゴでは約4カ月、タイリクバラタナゴでは約2カ月要した。
- ⑨ 現在のところ、ミヤコタナゴは約16カ月間 (30代以上累代中)、タイリクバラタナゴは約6カ月間 (10代以上累代中) 維持されている。

組織細胞は *in vivo* から *in vitro* へ移されると、生体内での諸性質が変化あるいは消失していく。核型も変化する性質の一つである。ミヤコタナゴおよびタイリクバラタナゴの培養細胞の染色体数を表6に示した。両種とも正常の染色体数は2n=48であるが、タイリクバ

表6 ミヤコタナゴ (*T. Tanago*; MB) およびタイリクバラタナゴ (*R. ocellatus ocellatus*; RB) 培養細胞の染色体数。

Species	Passages	Chromosomal numbers										
		43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
MB	5				1	1	48					
	25		1		2	7	3	7	14	11	2	3
RB	10				1		3	46				

ラタナゴでは10累代において染色体数には変化がみられないが、ミヤコタナゴは5累代では正常と変わらなかったが、25累代ではモードが50本のところに移り、分布も広がって、核型の変化がうかがえる。

(b) ニジマス

栃木県水産試験場にて飼育中ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) から得られた人工受精発眼卵1個から次のような方法で培養細胞系を樹立した。

- ① 卵表を次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素約1%）に4～10°Cで約60秒間浸し殺菌した。
- ② 培養液で洗浄後、卵膜と卵黄を取り除き、再び培養液で洗った。
- ③ プラスティックペトリ皿（60mm、コーニング社）内ではさみにより細片化し、後の操作は(a)項のタナゴとほぼ同様に行った。細胞はピペット操作のみで剥がした。
- ④ 現在まで約23カ月間（60代以上累代中）維持されている。

(2) 染色体異常

10累代のタイリクバラタナゴの培養細胞にマイトマイシンCを添加して、次の方法で染色体異常頻度を調べた。

- ① ほぼ等しい細胞濃度で13枚の60mmプラスティックペトリ皿（コーニング社）に継代し、48時間後に空気乾燥標本を作製した。
- ② 標本作製4、17、22、26、41および48時間前にマイトマイシンCを0.16および0.33μg/mlの濃度となるように加えた。
- ③ また、分裂中期像を蓄積するため標本作製4時間前にTN-16 (3-(1-anilinoethylidene)-5-benzylpyolidine-2, 4-dione, 和光純薬社) を0.3mg/mlの濃度となるように加えた。
- ④ トリプシン溶液（0.15%トリプシン、0.3mM EDTA・2Na）を用いて剥がされた細胞を遠心管（10ml用）に集めた。
- ⑤ 後の操作は2の(1)項⑤～⑩と同様に行った。

gaps, breaks, exchanges の染色体異常が観察された。一つでも染色体異常を含んだ中期像を1個の異常中期像とした。マイトマイシンC投与により経時に染色体異常の増加傾向がみられた（表7）。0.16μg/mlでは4時間後に1.30%の異常中期像が観察されたが、0.33μg/mlで

表7 マイトマイシンC (MMC) を添加したタイリクバラタナゴ (*R. ocellatus ocellatus*) 培養細胞における染色体異常を有した細胞 (CAS) の頻度。

Culture no.	MMC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Treatment (h)	CAS	CAS (%)
1	0	0	0/30	0.00
2	0.16	4	1/17	1.30
3	0.16	17	4/44	9.10
4	0.16	22	10/43	23.26
5	0.16	26	3/21	14.29
6	0.16	41	11/11	100.00
7	0.16	48	8/10	80.00
8	0.33	4	0/50	0.00
9	0.33	17	2/27	7.41
10	0.33	22	3/35	8.57
11	0.33	26	2/16	12.50
12	0.33	41	11/14	78.57
13	0.33	48	7/7	100.00

は認められなかった。0.16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では22時間後に 23.26%、4 時間後には 100%に達しているが、0.33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では22時間後は10%以下で、100%に達したのは48時間後であり、少し遅れた反応であるように見受けられる。また、投与時間が長くなるほど分裂中期像が得にくくなり（分裂頻度の低下）、マイトマイシンC投与により分裂抑制が働いているものと考えられる。

### (3) 細胞増殖抑制

15累代のミヤコタナゴの培養細胞および62累代のニジマスの培養細胞を用いて、マイトマイシンCの細胞増殖への抑制作用について調べた。

- ① 等しい細胞濃度で30枚のプラスティックペトリ皿 (35mm, コーニング社) に分注した。
- ② 両培養細胞とも、マイトマイシンCを0.002, 0.005, 0.02および0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度となるようにペトリ皿に添加し（各濃度ペトリ皿3枚）、パラフィルムで封をして閉鎖系にて17~19°Cで培養した。

2日目と5日目に、各条件についてペトリ皿3枚ずつペトリ皿当たりの細胞数を血球計算盤で算定し、その平均を細胞数として、表8に示した。ミヤコタナゴおよびニジマス共に、マイトマイシンC濃度の増加に伴い細胞数の増加が鈍る傾向が示された。ミヤコタナゴの0.2および0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ニジマスの0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度では、2日目より5日目の方が細胞数が少なかった。

表8 マイトマイシンC (MMC) を添加したミヤコタナゴ (*T. tanago*; MB) およびニジマス (*Oncorhynchus mykiss*; RB) 培養細胞のペトリ皿当たりの細胞数。

Species	Days	MMC ( μg / ml)				
		0.2	0.02	0.005	0.002	0
MB	2	$3.01 \times 10^5$	$3.43 \times 10^5$	$2.97 \times 10^5$	$3.22 \times 10^5$	$3.68 \times 10^5$
	5	$1.59 \times 10^5$	$3.17 \times 10^5$	$6.25 \times 10^5$	$7.98 \times 10^5$	$9.62 \times 10^5$
RB	2	$1.38 \times 10^5$	$1.59 \times 10^5$	$1.98 \times 10^5$	$1.43 \times 10^5$	$2.24 \times 10^5$
	5	$1.56 \times 10^4$	$1.80 \times 10^5$	$2.71 \times 10^5$	$3.08 \times 10^5$	$6.77 \times 10^5$

また、マイトマイシンC濃度が高くなるに従って浮遊する細胞が目立つようになる。上述したようにマイトマイシンCに細胞増殖抑制作用があり、カウント細胞数の減少には、細胞が何らかのダメージを受けペトリ皿底面から離脱することと、増殖抑制を受けることが大きく関与しているものと考えられる。培養液への添加による細胞数の変化の分析も化学物質の毒性を推し量る一つの手段となることが示唆された。Kocan et al. (1979) は8種類の変異原・発癌物質 (ethyl m-ethanesulfonate, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, benzo(a)pyrene, 3-hydroxy benzo(a)-pyrene, 3-methylcholanthrene, 9-aminoacridine, 2-acetamidofluorene, 2-aminofluorene)を3種の魚類培養細胞 (ニジマス生殖巣由来、ブルーギル幼魚由来、スチールヘッド胚由来) およびヒトの培養細胞に72時間添加し、細胞数のカウントを行った結果、魚類細胞でも物質濃度の増加に伴い細胞数の減少が観察され、ヒトと同様の反応であることを示した。

### III. むすび

本研究では変異原性・発癌性物質としてよく知られているマイトマイシンCのミヤコタナゴ、タイリクバラタナゴ、キンギョおよびニジマスへの細胞遺伝学的な影響について調査し、化学物質の魚類への影響について概観をみることができた。そして、ミヤコタナゴの自然環境における保存および増殖には水質の汚染を監視していくことも重要な要素であることが示唆された。

また、本研究を通じて得られた成果の一つとして、魚類を用いた変異原試験法の可能性がみられることを上げることができよう。哺乳類で一般に用いられている染色体異常および小核試験が魚類にも適用できる可能性が示された。染色体異常を持つ細胞の頻度は小核を持った細胞頻度よりも一般に高い。試験の感度の良否は、異常細胞の比率だけでなく、観察細胞総数にも依存するものであり、小核試験では染色体異常試験よりもはるかに多くの細胞を観察するので概に小核試験の感度が悪いとはいえないであろう。小核試験は操作も簡単であり、一般に染色体数が多く、その大きさも小さい魚類には適した方法といえるかもしれない。Hooftman and Raat (1982) はイースタン・マッドミノウ (U. Pygmaea) を濃度を変えた ethyl methansulphonate の溶液中で飼育してその毒性を調べ、投与後3週

目よりも6週目の方が小核の頻度が高いことを観察し、小核試験が慢性毒性の評価に有効であるとしている。長期間の投与、水浴投与などによる小核出現頻度の分析を早急に行っていきたい。水浴投与は魚類の特徴を生かす上でも意味は大きい。多くの課題が残されてはいるが、小核試験は間接的に染色体異常の程度が推し量れる簡便な方法の一つで、今後有用性が増すことであろう。しかし一方、染色体異常の種類と癌原性との関係については今のところ明確ではないが、両者に関係が存在するのであれば、今後染色体異常の種類の識別が重要となってくる。染色体の1本1本の識別にはQ, G, Rなどの分染像を得ることが不可欠であるのだが、これまでに分染から詳細に魚類の染色体異常が分析された例はない。魚類の染色体は一般に数が多く、その大きさも小さく、そのことが大きな障害となっていることは確かであるが、冷血動物と温血動物とでは塩基組成（G CとA Tの割合）に根本的な違いがあり、そのことが魚類で詳細な分染像が得られない原因であるとする指摘もある（Medrano et al. 1988, Hellmer et al. 1991）。Replication banding法によりいくつかの魚種で好結果が得られており（Ojima and Ueda 1982, Hellmer et al. 1991）、魚類での有効な方法といえるかもしれない。魚類に適した分染法の開発が要求される。

タナゴ類は飼育管理が容易で人工的生産も可能であり、試験動物としても有用であると考えられる。特に胚を用いた試験は、良質の染色体標本が安定して得られるようになり、染色体異常および小核出現の増加が高い再現性で捕らえることができ、しかも受精卵は96穴の細胞培養用プレート内で大量に管理でき、今後の発展が楽しみな方法である。マイトイシンC以外の化学物質での試験を加えていくなど、他の魚種での比較検討も行っていきたい。

魚類を化学物質の遺伝毒性を評価する一つの試験動物として扱えるものと考えるが、魚類での遺伝毒性評価が水圏に生息する生物の評価であり、それが水質汚染度の指標となりうるであろうことも見逃せない。水質の汚染度を評価するには、水環境へ流出する可能性のある物質の毒性を調べる方法と、水環境を直接調べる方法があるであろう。後者の場合、現場から捕獲された魚類を試験する方法、現場から採取した水の試験動物への毒性を調べる方法などがあるだろう。それぞれ、魚種の選択、飼育条件、投与方法など適当な試験設定が要求される。直接採取した水の汚染度を評価するとき、河川水や海水に含まれる化学物質の濃度が低く変異原性評価が下しにくいときには、他の毒性試験に用いられるように、種々の抽出法、吸着法などによる濃縮操作を用いて効果を高める工夫も必要であろう。魚類での変異原試験結果が水質汚染度の指標となる可能性が強く感じられ、水質汚染の細胞遺伝学的監視システムの確立のため今後さらに多くの検討を行う予定である。

前回の研究で、ミヤコタナゴの人工的な保存および増殖が可能であることがわかった。しかし、生息地が限られており、水質汚染がすすむ現状にあっては、天然記念物に指定されて保護されているとはいえ、自然環境での絶滅がいつくるとも知れない。過去の長い生命の歴史の中で数多くの生物が絶滅してきた。それは自然の原理である。しかし、これほど短期間に数え切れない動植物種が絶滅し、絶滅に瀕している状況はなかったのではないか。人間によって自然の原理は大きく変えられ、今後の自然の成り行きは大きく人間がその鍵を握っているといえるだろう。先日の総理府の調査では自然環境保護への世間の関心が高まってきているという。経済発展重視のこれまでの姿勢が続くことの危険性を感じる人が増えてきたということなのかもしれない。世の中の流れを大きく変える原動力となる

のは、理屈ではなく、結局一人一人の気持ちの重なりであろうと思われ、この総理府の調査結果は大きな意味をもっていると考える。人間は遠い昔より小動物をいたわる気持ちを持ち続けてきた。環境中の一員としてしか存在し得ないと知るが故に内在されている優しさに違いない。絶滅に瀕した水生生物の保存および増殖への努力は、“絶滅に瀕している”ことの意味を考えさせ、この人間に内在する優しさを大きく膨らませる助けとなり、河川美化意識の向上につながるものと信じる。