

Title	生物学実習テーマとしての化学物質の変異原性試験
Sub Title	Mutagenicity test of chemicals in laboratory of biology for students
Author	金谷, 信宏(Kanaya, Nobuhiro)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2001
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 No.29 (2001.) ,p.41- 54
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20010001-0041

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

生物学実習テーマとしての化学物質の変異原性試験

金 谷 信 宏

1 はじめに

近年、医薬品、農薬、食品添加物、化粧品など様々な化学物質が大量に開発され、市場に回っている。これらの登録・申請のために、急性毒性、慢性毒性、生殖毒性、発がん性、変異原性などを調べる毒性試験が行われている。最近、がんへの関心が高まっていることから、特に発がん性の有無が注目されている。発がん性試験には通常ラットとマウスが用いられる（白須，1991）。雌雄各群50匹以上、期間も1年半から2年半と長期間にわたるので、実験の設備だけでなく、動物の管理にも莫大な費用を要する。ところが、McCannら（1975）により発がん性物質の90%は突然変異をおこす変異原性物質でもあると指摘されてから、発がん性試験の前の予備的な試験として変異原性試験が位置付けられるようになった（石館，1988）。変異原性試験にはサルモネラ菌での突然変異を検出する復帰変異試験（エームス試験；Ames et al., 1975）、哺乳動物培養細胞や植物細胞を用い、遺伝子が凝縮された構造体である染色体の形や数が異常なものに変わることを調べる染色体異常試験（Evans, 1976；菊池1988；Kanaya et al., 1994）や、そのような染色体異常に起因する小核の誘発を調べる小核試験（Schmid, 1976；De Marco et al., 1988；林，1991）などがある。このような変異原性試験は簡単な設備で短期間に、しかも低コストで行なうことができるという利点がある。この試験で陽性となった化学物質についてさらに発がん性が調べられるのである。

著者が慶應義塾大学で担当している生物科学や生物学の講義テーマのひとつは突然変異である。突然変異は遺伝子に生じた傷が修復されずに残ったことにより、また、傷が間違っって修復されたことにより引き起こされる。遺伝子の傷は自然に生じる場合があるし、放射線や紫外線、そして発がん性物質を含む種々の化学物質などの、環境因子によってつけられる場合もある。このような遺伝子の傷は突然変異だけではなく、細胞分裂の時に観察される染色体の構造異常（染色体異常；図1B）の原因にもなる。染色体異常により生じた切断片は次の分裂の時に小核という小さい異常な核になる（図1B）。放射線や紫外線の照射量が多いほど、また化学物質の濃度が高いほど遺伝子の傷は増え、その結果突然変異、染色体異常および小核は増えてい

慶應義塾大学生物学教室（〒223-8521 横浜市港北区日吉4-1-1）：Mutagenicity Test of Chemicals in Laboratory of Biology for Students, by Nobuhiro KANAYA (Dept. of Biology, Keio University, Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223-8521, Japan)

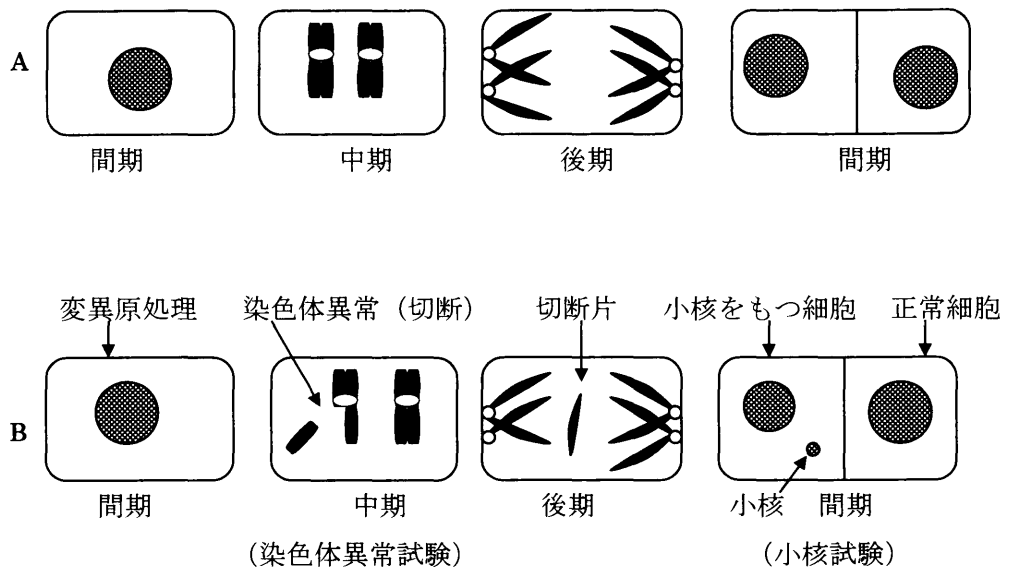


図1 変異原処理による染色体異常および小核の誘発。Aは変異原処理されていない細胞で分裂が正常に進んでいる。Bは変異原処理された細胞で、分裂中期に切断という染色体異常が現れている。このような染色体異常をもつ細胞の出現頻度を調べるのが、染色体異常試験である。切断片は後期を経て次の間期に小核として観察される。小核試験ではこの小核の出現数を数える。

く。

生物科学や生物学の実習テーマとして、化学物質の変異原性を調べる染色体異常試験や小核試験をとりいれた場合、学生は化学物質により遺伝子に傷がついたことを、染色体異常や小核として視覚的に認識できるであろう。しかもそれらの出現頻度が処理された化学物質の濃度に依存すること、すなわち、濃度が低いと頻度も低く、濃度が高いと頻度も高くなることを実際に確かめることにより、化学物質の変異原性は化学物質の種類だけでなく、その濃度も重要であることを理解できるのではないかと考えた。そこで、1993年4月から2000年8月まで、著者の担当する通学課程の生物科学、通信教育部の生物学実験、理工学部生物学実験（教職課程科目の生物学実験も含む）の実習テーマとして、化学物質による染色体異常試験や小核試験を試みた。そして、学生が調べた値とあらかじめ著者が調べておいた値を比較した。その結果、化学物質の濃度が高い場合、学生のだした値の平均値は著者の値より低いことがわかった。しかし、ほとんどの学生は化学物質の濃度が高いほど異常頻度が高いことを観察したことから、化学物質の変異原性を考える場合、濃度も重要であることが理解されたと思われた。また、これらの変異原性試験は初めて観察する人でも比較的簡単に行なうことができる、すぐれた試験法であることも示唆された。

2 標本作製

2-1 染色体異常試験

材料はチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHO 細胞) で、培養は10%牛胎児血清、ペニシリン・ストレプトマイシン、抗 PPLO 試薬を含むマッコイ 5 A 培地 (いずれも GIBCO 製) で、37℃で行なった (Kanaya, 1996)。対数増殖期に1時間、血清を含まない培地で溶かしたマイトマイシン C (MMC; 協和発酵) 処理を行ない、洗浄後通常の培地で24時間培養した。MMC の濃度は0.14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.4 μM) と0.70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2 μM) で MMC 処理なし (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の陰性対照も用意した。固定前3時間コルセミド (GIBCO) 処理して、細胞分裂を中期でとめた。分裂中期の細胞を遠心分離により集め、0.075M の塩化カリウム溶液で低張処理し、メタノール：酢酸 (3:1) 混合液で固定した。細胞の懸濁液をスライドガラス上に落とし、空気乾燥後にギムザ液で染色し、オイキットで封入して染色体異常試験の標本とした。

2-2 小核試験

材料はソラマメ (*Vicia faba* L. cv. Wase.; サカタのタネ) の根端細胞で、処理や標本作製は Kanaya ら (1994) の方法を一部変え、次のように行なった。種子を一晩水に漬けてからパーミキュライトに蒔き、20℃に4日間おき発芽させた。芽生えの根端と芽の先端を各5mm 切り、パーミキュライトに戻した。3日後側根が1-2 cm に伸びた芽生えを、蒸留水で溶かした MMC やマレイン酸ヒドラジド (MH; 和光純薬) で3時間処理した。MMC の濃度は0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1 μM) と1.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5 μM) で、MH の濃度は112 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1mM) と560 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5mM) であった。化学物質処理なし (濃度0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の陰性対照も用意した。処理後水道水で洗浄し、20℃で48時間回復させ、エタノール：酢酸 (3:1) で根端を固定した。根端を水道水で洗浄し、1規定塩酸に置き換え、60℃で8分間加水分解した。根端を水道水で洗浄後、シッフ試薬で1時間染色した。MMC 処理された根端と、陰性対照の根端をスライドガラス上で押しつぶし、スライドガラスをドライアイス上に置き、カバーガラスを剝した。空気乾燥後、オイキットで封入し、小核試験の標本とした。MH 処理根端の押しつぶし標本は学生自らが作製し観察に使用した。

3 学生実習

3-1 染色体異常試験

学生はまず、陰性対照 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の標本を光学顕微鏡 (オリンパス CH 型; 600倍) で観察し、正常な CHO 細胞の中期細胞 (図 2 A) をスケッチする。CHO 細胞の染色体数は 19~23 本の場合が殆どなので、その範囲内であることを確認し、図 2 A に示されているように、染色体の長さや動原体の位置の違いに注意してスケッチする。次に0, 0.14, 0.70 $\mu\text{g}/\text{ml}$

の MMC 処理された中期細胞をそれぞれ 30 個調べ、図 3 に示されている染色分体切断、染色体切断、染色分体交換、二動原体、リングなどの染色体異常をもつ中期細胞 (図 2 B) が見つかったらその細胞を 1 個スケッチする。異常頻度は染色体異常をもつ細胞の出現頻度であらわす。すなわち、1 つでもそれ以上でも、とにかく異常があれば 1 つの異常細胞としてカウントする。観察結果を表にまとめ、グラフにして提出する。著者は提出された表をもとに、結果をクラスごとに集計し、異常頻度の平均値を算出した。著者の平均値は任意に選んだ 10 枚の標本を同じ型の顕微鏡で同じ倍率で観察して得られた。学生各自のデータを分析し、異常頻度が MMC の濃度が高いほど高かった、すなわち濃度依存性があったのか、低い濃度ほど頻度が高くなったり、陰性対照と同じだったり、それよりも頻度が低かったりと濃度依存性がなかったのかに分けて、それらの割合を算出した。

3-2 小核試験

実習では、 $0.33\mu\text{g/ml}$ と $1.65\mu\text{g/ml}$ の 2 つの濃度の MMC を調べたクラスと、高い濃度 ($1.65\mu\text{g/ml}$) の MMC と MH を調べたクラスがある。いずれも、学生はそれぞれの処理あたり間期細胞を 500 個以上調べ、視野中に観察された小核の数を数え、500 細胞あたりの小核数を算出、表にして提出する。MMC 処理だけの場合はさらにその結果のグラフも提出する。正常な間期細胞 (図 4 A)、小核をもつ間期細胞 (図 4 B)、そして分裂後に小核になると思われる切断片をもつ後期細胞 (図 4 D) もそれぞれスケッチする。著者の平均値は 10 枚の標本を観察して得られた。MMC 処理の濃度依存性の分析は染色体異常試験同様、提出された表のデータをもとに行ない、小核数が MMC 濃度が高いほど多かった (濃度依存的であった) もの、高い濃度ほど小核が少なかったり、陰性対照の方が多かったりと、MMC 濃度に依存的でなかったものに分けてそれらの割合を算出した。

MH 処理された根端細胞を観察したクラスでは、まず陰性対照と、 $1.65\mu\text{g/ml}$ の MMC 処理根端細胞を観察する。その後で、コード番号をつけられ濃度が $112\mu\text{g/ml}$ なのか $560\mu\text{g/ml}$ なのかわからないようにされた MH 処理根端を、各自が押しつぶし、その標本を観察する。これはブラインドテストと呼ばれる方法で、濃度が高い程頻度が高くなるだろうという先入観なしに観察できるメリットがある。このケースでは MMC 処理は陽性対照として使い、MMC 処理により誘発された小核数が陰性対照での小核数より高いかどうかもチェックした。2 種類の濃度の MH 処理根端は、それぞれ同じくらの人数が観察できるように配布した。

4 結果と考察

4-1 染色体異常試験

CHO 細胞での染色体異常試験における、すべてのクラスの平均値と著者の平均値は表 1 と図 5 に示された。それぞれの濃度でクラスにより値のばらつきは著しかったが、すべてのクラスの平均値は MMC の濃度が高い程高く、濃度依存性が確かめられた。表 1 に示されたよう

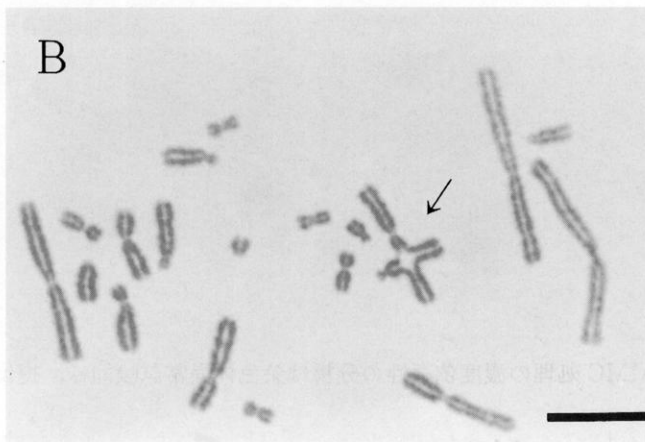
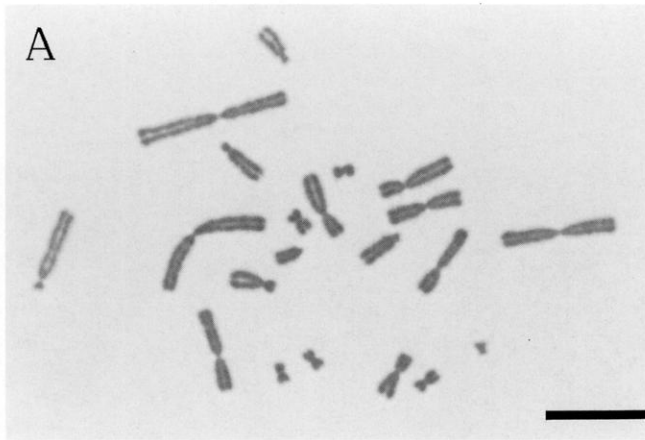


図2 チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHO細胞）の中期細胞。Aは正常細胞で染色体が21本ある。染色体の長さとかびれ（動原体）部分の位置の違いがわかる。BはマイトマイシンC処理された細胞で、矢印は染色分体交換の異常。スケールはいずれも10 μ m。

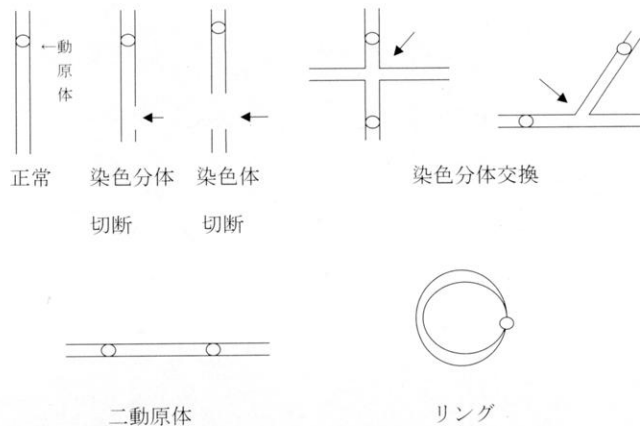


図3 実習で観察した染色体異常の種類。動原体部分は○で示している。

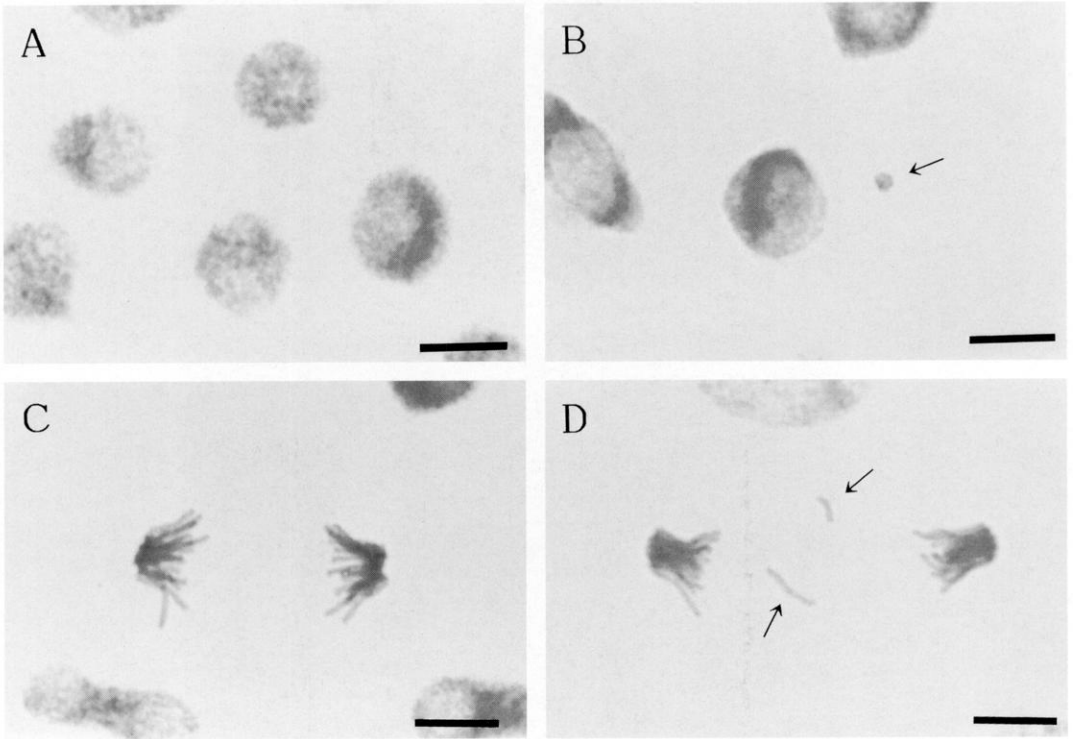


図4 ソラマメ根端細胞。Aは正常な間期細胞で、Bは小核(矢印)をともなう間期細胞。Cは正常な後期細胞でDは切断片(矢印)をもつ異常な後期細胞。いずれも核や染色体は染まっているが、細胞の仕切りははっきり見えない。スケールはいずれも $10\mu\text{m}$ 。

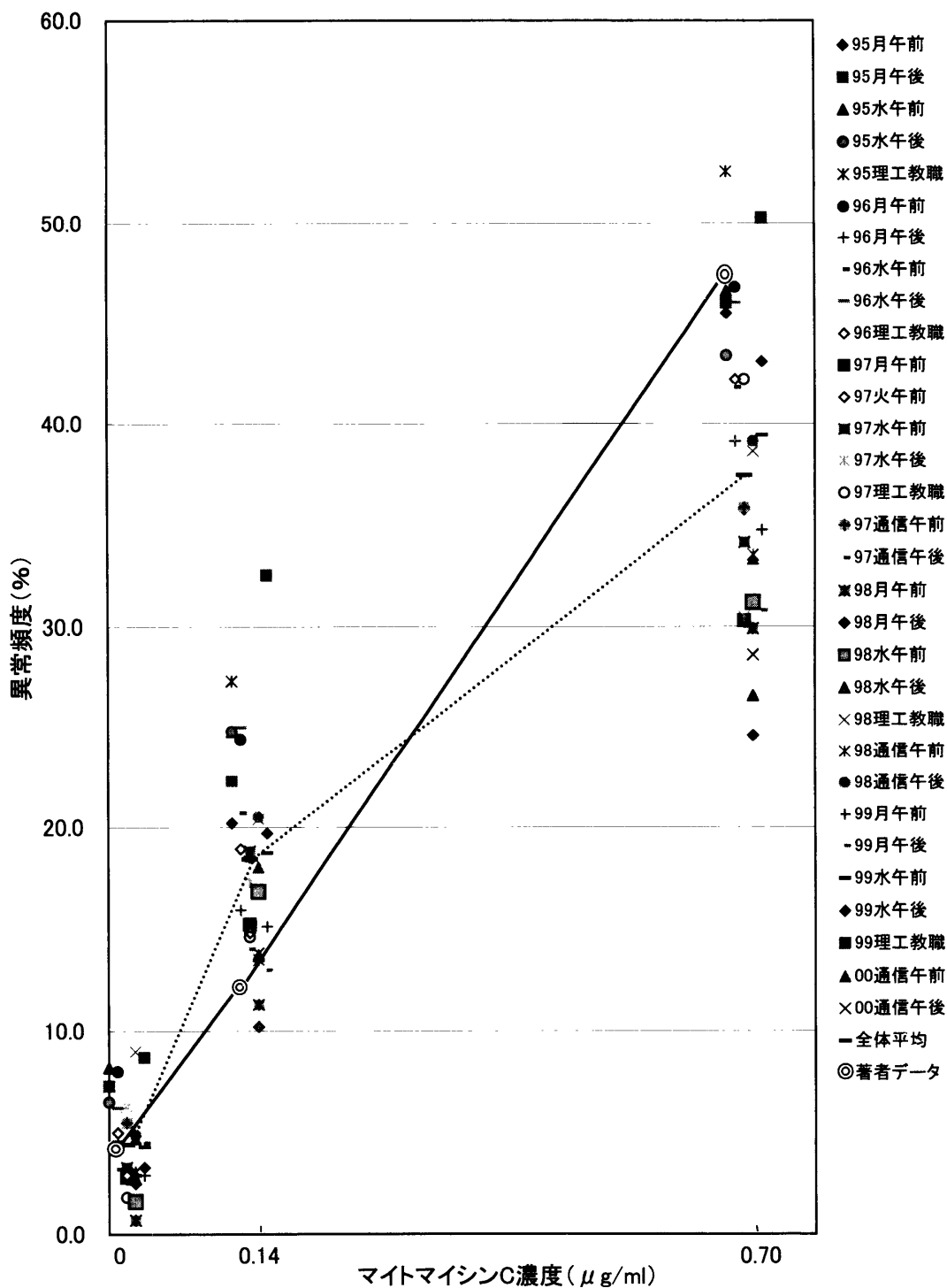


図5 マイトマイシンCによる染色体異常試験結果。各クラスの染色体異常出現頻度の平均値(表1参照)が示されている。全体の平均値は点線で、著者の平均値は実線で結ばれている。

表1 マイトマイシンC (MMC) によるチャイニーズ・ハムスター培養細胞での染色体異常試験

年度	クラス	MMC 0 μ g/ml				MMC 0.14 μ g/ml			
		人数	平均値 ^a	標準偏差	Min-Max ^b	人数	平均値 ^a	標準偏差	Min-Max ^b
1995	月午前	48	4.3	4.7	0-20.0	48	20.2	8.6	6.7-43.0
1995	月午後	38	7.3	9.2	0-27.0	38	22.3	8.8	9.0-43.0
1995	水午前	52	8.2	7.7	0-30.0	52	24.8	11.4	3.0-46.0
1995	水午後	50	6.5	8.6	0-46.6	50	24.8	13.3	3.0-66.6
1995	理工教職	11	7.3	8.6	0-28.0	11	27.3	9.8	16.6-45.0
	1995小計	199	6.6	7.8	0-46.6	199	23.4	10.8	3.0-66.6
1996	月午前	37	8.0	9.7	0-33.0	37	24.4	11.9	3.3-50.0
1996	月午後	11	4.6	4.0	0-10.0	111	15.9	4.0	6.7-20.0
1996	水午前	61	3.2	4.5	0-20.0	61	20.7	11.9	0-46.7
1996	水午後	48	6.2	9.2	0-37.0	48	25.0	12.0	6.0-57.0
1996	理工教職	22	5.0	7.8	0-34.0	22	18.9	11.2	3.3-40.0
	1996小計	179	5.3	7.7	0-37.0	179	22.1	9.7	0-57.0
1997	月午前	25	2.8	6.9	0-26.7	25	15.2	8.5	0-33.0
1997	火午前	26	2.9	3.2	0-10.0	26	14.8	7.7	3.0-30.0
1997	水午前	45	3.3	4.5	0-13.3	45	18.8	8.2	3.0-43.3
1997	水午後	39	6.3	10.6	0-37.0	39	17.3	13.8	3.0-63.0
1997	理工教職	20	1.8	4.7	0-20.0	20	14.6	8.9	0-33.0
1997	通信午前	42	5.5	6.7	0-23.3	42	18.5	11.5	3.3-67.0
1997	通信午後	39	2.5	4.9	0-26.6	39	14.0	10.9	2.8-53.0
	1997小計	236	3.8	6.6	0-37.0	236	16.5	10.5	0-67.0
1998	月午前	27	0.7	1.8	0-7.0	27	11.3	10.7	0-47.0
1998	月午後	52	2.5	3.4	0-13.0	52	10.2	5.6	0-27.0
1998	水午前	51	1.6	2.5	0-10.0	51	16.8	8.0	3.0-32.4
1998	水午後	47	2.7	3.2	0-16.6	47	13.7	8.1	3.3-43.3
1998	理工教職	16	9.0	4.6	3.3-19.4	16	20.4	6.3	13.3-34.0
1998	通信午前	43	3.1	5.1	0-23.3	43	13.5	10.8	0-43.3
1998	通信午後	44	4.9	8.9	0-40.0	44	20.5	13.3	3.0-60.0
	1998小計	280	3.0	5.1	0-40.0	280	14.8	9.9	0-60.0
1999	月午前	34	2.9	4.4	0-17.0	34	15.1	9.9	0-37.0
1999	月午後	19	4.5	4.9	0-13.0	19	13.0	8.9	0-30.0
1999	水午前	61	4.3	7.8	0-46.7	61	18.7	12.9	0-56.7
1999	水午後	49	3.3	5.8	0-27.0	49	19.7	11.4	3.3-50.0
1999	理工教職	10	8.7	9.2	0-33.0	10	32.5	9.6	16.7-47.0
	1999小計	173	4.0	6.5	0-46.7	173	18.4	12.0	0-56.7
2000	通信午前	39	4.7	6.5	0-23.3	39	18.0	12.1	0-46.6
2000	通信午後	41	2.7	3.9	0-13.3	41	13.8	9.0	0-36.6
	2000小計	80	3.7	5.4	0-23.3	80	15.8	10.8	0-46.6
	総計	1147	4.4	6.7	0-46.7	1147	18.4	11.0	0-67.0
	著者合計	10 ^c	4.3	3.2	0-10.0	10	12.3	4.5	6.7-20.0

a, 異常をもつ細胞の出現頻度 (%) = $\frac{\text{異常を持つ細胞数}}{\text{観察細胞数}} \times 100$

b, 最小値-最大値

c, 標本を10枚観察

結果

MMC0.70 μ g/ml				濃度依存性有り	濃度依存性無し
人数	平均値 ^a	標準偏差	Min-Max ^b	人数 (%)	人数 (%)
48	45.5	16.1	20.0-80.0	48(100.0)	0 (0.0)
38	46.0	11.1	26.7-70.0	38(100.0)	0 (0.0)
52	46.6	14.5	16.6-66.6	51 (98.1)	1 (1.9)
50	43.4	12.9	20.0-70.0	47 (94.0)	3 (6.0)
11	52.6	9.7	40.0-70.0	11(100.0)	0 (0.0)
199	45.7	13.9	16.6-80.0	195 (98.0)	4 (2.0)
37	46.8	20.6	13.3-90.0	36 (97.3)	1 (2.7)
11	39.1	8.3	26.7-53.3	11(100.0)	0 (0.0)
61	41.8	18.0	2.0-76.0	55 (90.2)	6 (9.8)
48	46.0	17.8	6.7-86.0	43 (89.6)	5(10.4)
22	42.2	18.8	10.0-90.0	22(100.0)	0 (0.0)
179	43.9	18.1	2.0-90.0	167 (93.3)	12 (6.7)
25	30.3	13.4	10.0-66.0	22 (88.0)	3(12.0)
26	35.7	13.3	10.0-53.3	24 (92.3)	2 (7.7)
45	34.1	11.4	3.0-60.0	42 (93.3)	3 (6.7)
39	30.5	15.2	3.0-60.0	35 (89.7)	4(10.3)
20	42.2	18.0	3.3-70.0	19 (95.0)	1 (5.0)
42	35.8	12.2	20.0-60.0	38 (90.5)	4 (9.5)
39	30.0	13.8	8.0-66.6	35 (89.7)	4(10.3)
236	33.6	14.0	3.0-70.0	215 (91.1)	21 (8.9)
27	29.9	17.7	6.7-83.0	22 (88.9)	3(11.1)
52	24.6	10.0	3.3-56.7	47 (90.4)	5 (9.6)
51	31.2	11.3	10.0-60.0	50 (98.0)	1 (2.0)
47	26.6	11.1	3.0-47.0	43 (91.5)	4 (8.5)
16	38.6	9.3	26.7-58.3	16(100.0)	0 (0.0)
43	33.5	20.4	3.3-90.0	33 (76.7)	10(23.3)
44	39.1	20.5	10.0-93.0	39 (88.6)	5(11.4)
280	31.1	15.7	3.0-93.0	252 (90.0)	28(10.0)
34	34.7	13.6	10.0-60.0	32 (94.1)	2 (5.9)
19	30.8	12.1	10.0-50.0	18 (94.7)	1 (5.3)
61	39.4	17.4	6.7-76.6	58 (95.1)	3 (4.9)
49	43.1	14.8	10.0-70.0	47 (95.9)	2 (4.1)
10	50.3	8.8	30.0-60.0	10(100.0)	0 (0.0)
173	39.2	15.8	6.7-76.6	165 (95.4)	8 (4.6)
39	33.3	17.3	4.5-90.0	34 (87.2)	5(12.9)
41	28.6	16.3	2.7-63.3	33 (80.5)	8(19.5)
80	30.9	16.9	2.7-90.0	67 (83.8)	13(16.2)
1147	37.4	16.5	2.0-90.0	1061 (92.5)	86 (7.5)
10	47.7	9.2	33.3-66.7		

に、全体1147名中1061名と、92.5%の学生は濃度依存的な結果を示した。結果が濃度依存的でなかった人は86名(7.5%)と少なかった。全体の平均値と著者の結果とを比較してみると、0 $\mu\text{g/ml}$ ではそれぞれ4.4%と4.3%と、ほぼ同じ値であったが、0.14 $\mu\text{g/ml}$ では18.4%と12.3%と学生の方が高い値を示し、0.70 $\mu\text{g/ml}$ では37.4%と47.7%と、学生の平均値の方が逆に低い値になった。0.14 $\mu\text{g/ml}$ で学生の平均値が高くなったのは、低い濃度とはいえ、MMCで処理しているから異常は起こるはずだという先入観をもってしまい、例えば染色体が重なっているだけのものを染色分体交換にしたり、動原体が端にある染色体を染色体切断にしたことによるのではないかと推測された。0.70 $\mu\text{g/ml}$ では学生の平均値の方が低かったが、これは染色分体交換のようなはっきりとわかる異常は見逃さなかったが、染色体の短い部分の

表2 マイトマイシンC (MMC) によるソラマメ根端細胞での小核試験結果

年度	クラス	人数	MMC 0 $\mu\text{g/ml}$			MMC 0.33 $\mu\text{g/ml}$			
			平均値 ^a	標準偏差	Min-Max ^b	人数	平均値 ^a	標準偏差	Min-Max ^b
1993	月火土 ^c	22	2.6	3.8	0-14	22	14.5	8.6	4-27
1994	理工教職	21	1.1	1.9	0-7	21	13.2	7.3	6-35
1994	通信午前	39	4.8	8.6	0-30	39	12.7	27.6	0-175
1994	通信午後	42	2.3	2.8	0-12	42	7.3	6.0	1-23
	1994小計	102	3.0	5.6	0-30	102	10.6	17.7	0-175
	総計	124	3.0	5.5	0-30	124	11.3	16.6	0-175
	著者合計	10 ^d	1.9	1.4	0-4	10	14.6	8.0	7-32

a, 小核数/500細胞

c, 各クラスの人数が少なかったのでデータを合わせた

b, 最小値-最大値

d, 標本を10枚観察

表3 マレイン酸ヒドラジド (MH) によるソラマメ根端細胞での小核試験結果

年度	クラス	人数	MH 0 $\mu\text{g/ml}$			MH 112 $\mu\text{g/ml}$			
			平均値 ^a	標準偏差	Min-Max ^b	人数	平均値 ^a	標準偏差	Min-Max ^b
1995	月午前	54	3.6	3.6	0-21	26	9.2	11.2	1-52
1995	月午後	36	3.4	5.0	0-20	16	11.9	9.7	0-37
1995	水午前	42	3.7	4.8	0-19	20	12.1	9.5	1-39
1995	水午後	23	3.2	6.4	0-22	16	8.9	8.5	2-33
	1995小計	155	3.5	4.7	0-22	78	10.4	9.9	0-52
1997	月午前	22	1.6	1.7	0-5	8	7.5	7.8	0-19
1997	火午前	24	1.5	1.9	0-8	12	7.3	3.9	0-15
1997	水午前	44	2.2	4.3	0-18	19	8.8	10.1	0-36
1997	水午後	40	4.4	4.9	0-29	20	15.0	16.1	0-58
	1997小計	130	2.6	4.0	0-29	59	10.4	11.7	0-58
	総計	285	3.1	4.4	0-29	137	10.4	10.7	0-58
	著者合計	10 ^c	1.9	1.4	0-4	6	18.9	6.1	10-30

a, 小核数/500細胞

b, 最小値-最大値

c, 標本を10枚観察

切断を見逃したことによるのではないかと推測された。しかし、顕微鏡で染色体異常を見るのはこの日がはじめてであることを考慮すると、この値の違いは重要ではないと思われる。課題である染色体異常のスケッチを見ると全員が染色体異常を観察できていたこと、および92.5%の学生は濃度依存性を確認できたこと(表1)は有意義であった。従って、化学物質のもつ変異原性の強さは、その濃度に依存することを視覚的に認識するという、この実習の目的は十分に達成されたと思われる。

4-2 小核試験

ソラマメを使ったMMCによる小核試験の結果は表2と図6に示されている。

MMC1.65 μ g/ml				濃度依存性有り	濃度依存性無し
人数	平均値 ^a	標準偏差	Min-Max ^b	人数 (%)	人数 (%)
22	60.8	24.5	26-107	22(100.0)	0 (0.0)
21	29.1	14.3	11- 73	21(100.0)	0 (0.0)
39	51.0	33.5	13-182	35 (89.7)	4(10.3)
42	35.9	17.6	10- 92	39 (92.9)	3 (7.1)
102	40.2	24.2	10-182	95 (93.1)	7 (6.9)
124	43.9	26.6	10-182	117 (94.4)	7 (5.6)
10	62.7	24.4	36-114		

MH560 μ g/ml				MMC 1.65 μ g/ml			
人数	平均値 ^a	標準偏差	Min-Max ^b	人数	平均値 ^a	標準偏差	Min-Max ^b
28	5.9	3.8	1-15	54	28.8	9.4	5- 54
20	7.5	6.1	1-27	36	28.1	15.1	8- 79
22	9.1	7.0	1-31	42	44.3	20.3	7- 96
7	8.1	6.5	0-21	23	30.9	15.5	5- 82
77	7.4	5.7	0-31	155	33.2	16.4	5- 96
14	6.9	6.1	0-19	22	30.4	10.7	12- 54
12	3.6	4.1	0-10	24	34.7	13.6	14- 60
25	6.2	8.2	0-32	44	46.0	24.0	10-128
20	3.9	4.1	0-18	40	44.9	13.7	27- 81
71	5.3	6.2	0-32	130	40.9	18.5	10-128
148	6.4	6.0	0-32	285	36.7	17.8	5-128
6	5.5	2.8	3-10	10	62.7	24.4	36-114

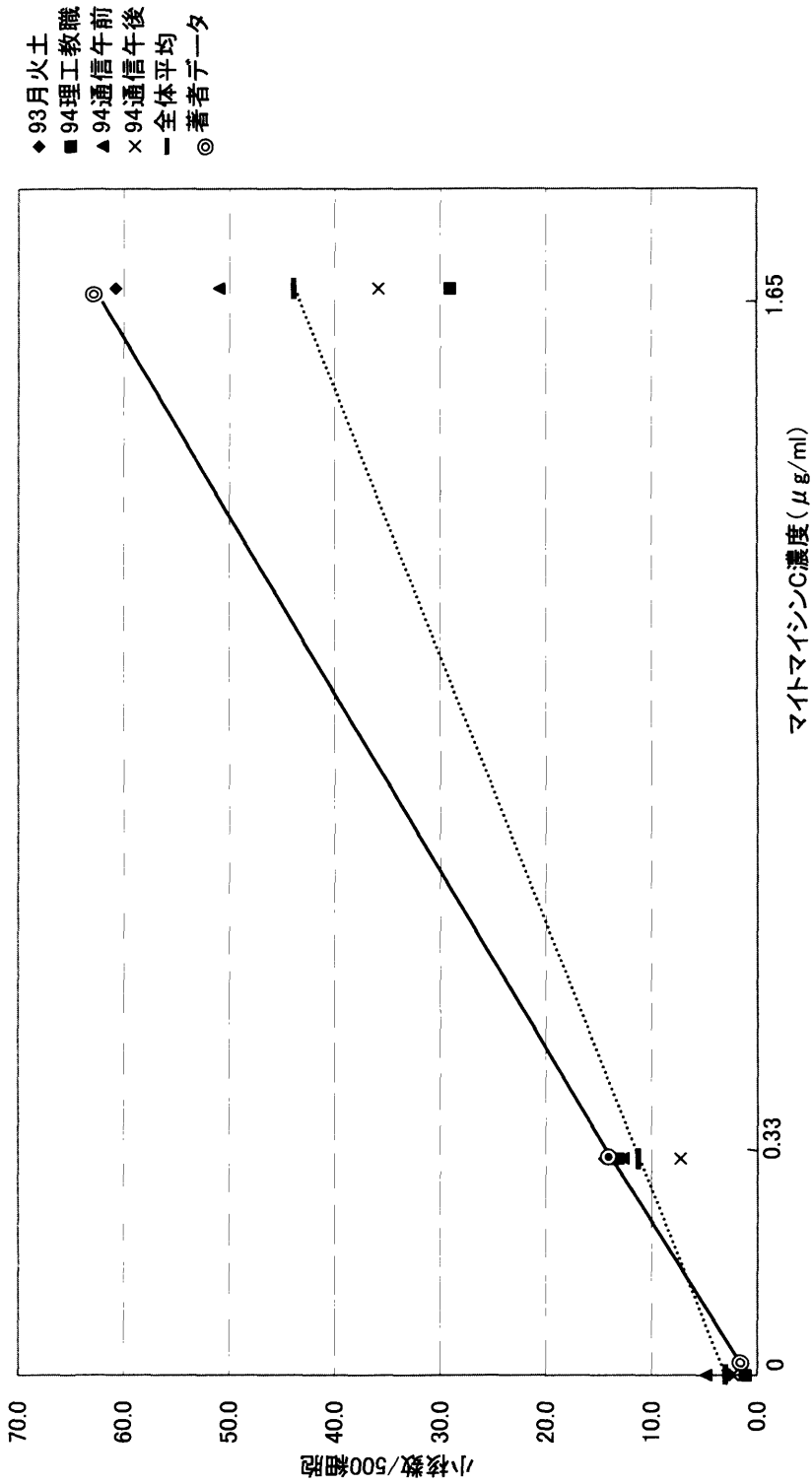


図6 マイトマイシンCによる小核試験結果。各クラスの500細胞あたりの平均小核数 (表2参照) が示されている。全体の平均値は点線で、著者の平均値は実線で結ばれている。

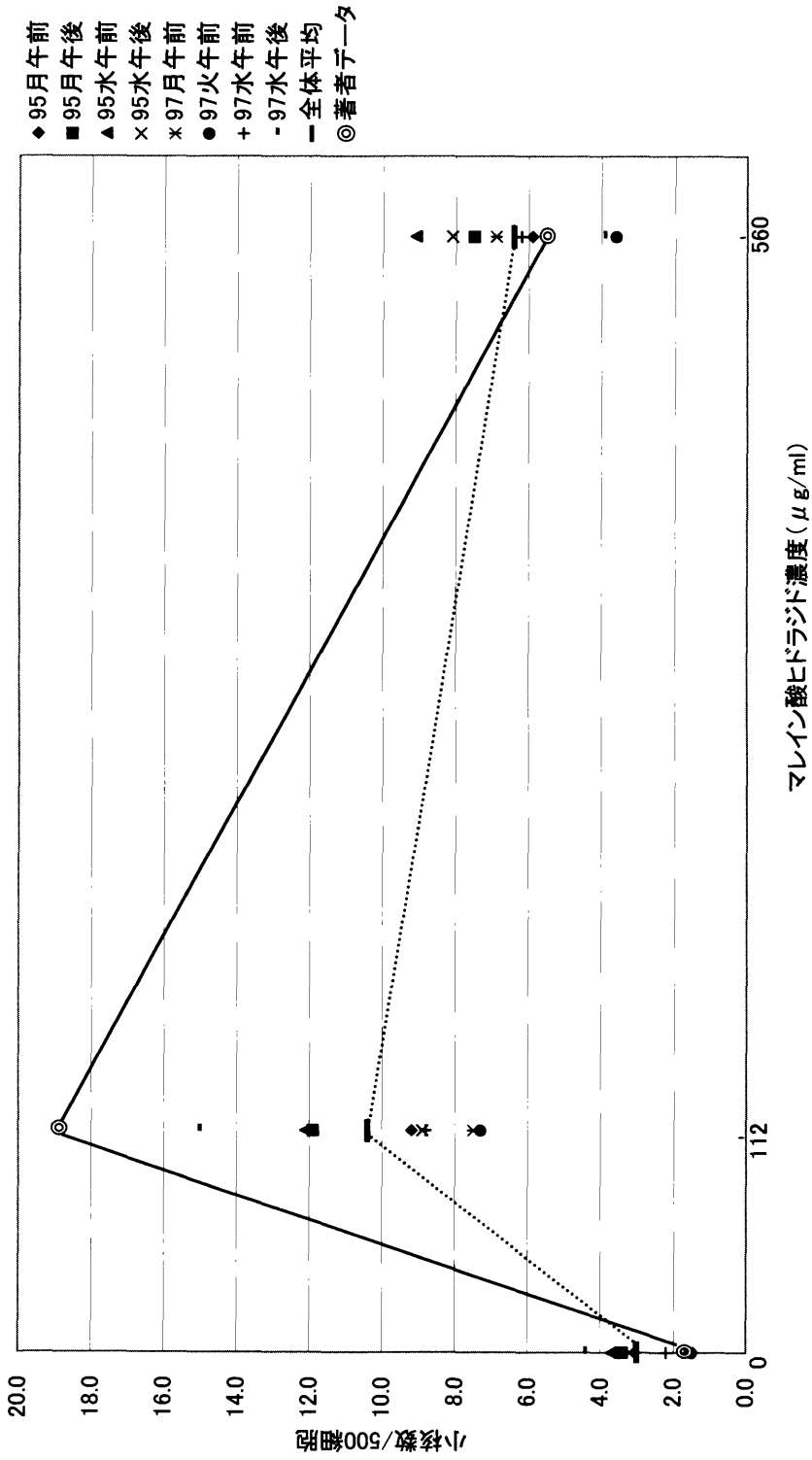


図7 マレイン酸ヒドロラジドによる小孩試験結果。各クラスの500細胞あたりの平均小孩数 (表3参照) が示されている。全体の平均値は点線で、著者の平均値は実線で結ばれている。

染色体異常試験と同様に、MMC 各濃度で、クラスによる値のばらつきは大きかったが、クラスごとの平均小核数は MMC の濃度が高い程高く、濃度依存性が確かめられた。表 2 に示されたように、全体124名中117名と、94.4%の学生の結果は濃度依存的で、そうでなかったのはわずか7名(5.6%)であった。全体の平均値と著者の平均値を比較してみると、0 μ g/ml では、3.0と1.9であり、0.33 μ g/ml では、11.3と14.6と、どちらもほぼ同じ値であったが、1.65 μ g/ml では43.9と62.7と学生の方が低い値を示した。表 2 に示されたように著者の1.65 μ g/ml の最小値-最大値は36-114と、染色体異常試験の MMC の結果(33.3-66.7%；表 1) と比べると、かなりばらつきがあった。小核を有する細胞が局在している傾向があったことから、学生が標本のどの部分を見たかによりデータが大きく振れたのだと考えられた。

MH の結果は表 3 と図 7 に示されている。陽性対照である1.65 μ g/ml の MMC 処理により出現した平均小核数は36.7で、表 2 の MMC だけの場合の43.9より少し低い値であったが、全員0 μ g/ml の陰性対照での小核数より高い値であった。また、間違いなく小核を持つ細胞をスケッチしていたことから、学生はきちんと小核を認識していると判断された。表 3 と図 7 に示されたように、112 μ g/ml の MH 処理の方が、その5倍の濃度(560 μ g/ml)の MH 処理のものよりも小核数が高かった。112 μ g/ml では全体の平均が10.4に対し、著者の値が18.9と著者の値の方が少し高めであったが、560 μ g/ml ではそれぞれ、6.4と5.5とほぼ同じであった。ブラインドテストによる実験なので学生は濃度の先入観なしで観察したのであるが、濃度による小核頻度の増減は両者とも同じ傾向を示したことから、学生の観察はかなり信頼できるものであったと考えられた。560 μ g/ml の MH 処理の標本では、分裂期の細胞は殆ど見られず、大部分間期細胞であった。このことから、560 μ g/ml MH 処理では細胞分裂が著しく阻害され、遺伝子に傷をつけられた細胞が次の分裂に進めなくなったため、小核として観察されなくなり、その結果濃度依存的にならず、高濃度の MH 処理により出現した小核数が低濃度の MH 処理のものより少なくなったのであろうと考えられた。

5 おわりに

以上の実習から、大部分の学生は初めて観察したにもかかわらず、MMC による染色体異常や小核の出現頻度が、MMC の濃度に依存することを確認することができた。また、MH のように濃度が高いと分裂が阻害され、むしろ頻度が下がるという特殊なケースも正しく観察できたと言える。このことから、変異原性試験のうちの染色体異常試験や小核試験は誰でも比較的簡単に行なうことができる試験法であることが示唆された。発がん性物質の予備的検出に使われる試験法が、難しいものでは普及しにくいので、この点でもこれらはすぐれた試験法だと思われる。

MMC は抗がん剤として、がんの治療に使われている薬剤であるが、それ自身発がん性物質でもある。MH は除草剤として使われており、特に植物細胞に染色体異常を起こすことが知られていて、動物での発がん性も疑われている(Swietlińska and Zuk, 1978)。我々の身のま

わりにはこの他にも、発がん性物質や発がん性が疑われている化学物質が多く存在する。それらのものを環境から完全に排除することが最良であるが、それは不可能なので、できるだけ摂取する量を少なくする、すなわち体内の細胞がさらされる化学物質の濃度を低く抑えることが重要であると考えられる。これらの化学物質により遺伝子に生じた傷は、細胞内の修復機構で大部分修復されるので、傷の量を可能な限り少なくすることが発がんを防ぐためには重要なのである。同様なことは発がん因子である、紫外線や放射線についてもいえる。どちらも完全に排除することはできないが、できるだけ浴びないようにすることは可能なのである。ただし、どのくらいなら安全なのかの評価が難しいので、化学物質もあわせて発がんの危険性が少ない量はどれくらいかという、安全基準を決めることが今後の課題であると思われる。

謝辞

本研究で使用した標本の一部は慶應義塾学事振興資金の援助を受けて作製されたものです。また、1993年から2000年までの著者の担当した学生の方々に、実習データを提供して頂いたことを感謝いたします。

参考文献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, **31**, 347-364.
- De Marco, A., S. Paglialunga, M. Rizzoni, A. Testa and S. Trinca (1988) Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated with heavy metals (cadmium and chromium) in the presence of NTA. *Mutation Res.*, **206**, 311-315.
- Evans, H.J. (1976) Cytological methods for detecting chemical mutagens. In "Chemical Mutagens. Principles and Methods for Their Detection", Vol. 4, pp. 1-29, ed. A. Hollaender, Plenum Press.
- 林 真 (1991) 小核試験, 石館 基編『毒性試験講座12: 変異原性, 遺伝毒性』, pp. 147-153, 地人書館
- 石館 基 (1988) 変異原性試験法ガイドラインの国内外の動向, 日本環境変異原学会哺乳動物試験分科会編『化学物質による染色体異常アトラス』, pp. 52-61, 朝倉書店
- Kanaya, N. (1996) Activation of aniline by extracts from plants and induction of chromosomal damages in Chinese hamster ovary cells. *Genes Genet. Syst.*, **71**, 319-322.
- Kanaya, N., B.S. Gill, I.S. Grover, A. Murin, R. Osiecka, S.S. Sandhu and H. C. Andersson (1994) *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutation Res.*, **310**, 231-247.
- 菊池康基 (1988) 染色体異常の意義, 日本環境変異原学会哺乳動物試験分科会編『化学物質に

よる染色体異常アトラス』, pp. 3-15, 朝倉書店

McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B. N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test : Assay of 300 chemicals. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 72, 5135-5139.

Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis. In "Chemical Mutagens. Principles and Methods for Their Detection", Vol. 4, pp. 31-53, ed. A. Hollaender, Plenum Press.

白須泰彦 (1991) 農薬の毒性試験, 白須泰彦編『毒性試験講座 17 : 農薬, 動物用医薬品』, pp. 2-8, 地人書館

Swietlińska, Z. and J. Žuk (1978) Cytogenetic effects of maleic hydrazide. Mutation Res., 55, 15-30.