

# タマネギ小核試験による園瀬川の水質調査

濱田 紘輝 前田 崇彰

## [概要]

私たちは、高校1年生のときにパックテストを使って園瀬川の水質調査をした。今度はタマネギを使って、園瀬川の水質調査を試みたいと思って調査した。

その方法は、水の中に遺伝毒性物質があれば、根端の分裂した細胞に小核異常が現れることを利用するもので、私たちは園瀬川の上流、中流、下流それぞれの場所で水を汲んで、その水でタマネギ種子を発芽させ、小核異常が生じた頻度を調べた。実験方法は園瀬川の3箇所です。資料水を採取し、その試料水を用いて、タマネギの種子を発芽させ、根を伸ばさせた。タマネギの分裂周期が24時間なので、この時間にした。そして、タマネギの根を色を1度にできる酢酸ダーリア液を用いて処理し、プレパラートを作った。そして、光学顕微鏡で検鏡した。1枚のプレパラートにつき、1000個の細胞を検鏡し、小核を生じた細胞数を記録した。園瀬川各地点の資料水、蒸留水、MMS各濃度について5枚ずつのプレパラートを観察した。MMS 0.125mM、0.25mM、0.5mM、1.00mM溶液を用いて、タマネギの種子を発芽させ、その結果をもとにMMSの検量線を引いた。(MMSとはメタンスルホン酸メチルの略で、今回は遺伝毒性の指標物質として用いた。)

結果は上流、中流はほとんど毒性物質がなく、下流では少し増加したが、それでも西川(2007)の芝生川で行った同様の実験と比べて、毒性物質の濃度はかなり低いものであった。

When we were in our first year of high-school , we investigated the Sonose river's water quality by using the packing test and seeds of onion.

We thought to investigate it in detail again by using the method.

This method uses onion seeds to detect water' anomalies . If an abnormality is found in the water, a small nuclear anomaly will appear in the cells of the onion seeds .We drew water from in beginning of the river , midstream and downstream , and raised the onion seeds in this water . the results showed that not so much poisonous material appeared in the headwaters and midstream water , however the number of poisonous material increased a little in the downstream waters . In brief , the amount of poisonous material was minimal compared with the same experiment . We did earlier in high-school .

Over all experiments illustrated that this river's water quality is mostly still beautiful .

### [研究の目的]

私たちの学校は、6年前から、近くを流れている園瀬川の水質を年1回、夏に調査している。水生昆虫採集、パックテストを行い、これまで概ね「きれいな水」と判定してきた。

課題研究で環境に関する調査をしてみたいと思っていたところ、タマネギを用いた小核試験によって水質の良し悪しがわかると知って、取り組むことにした。

タマネギを用いた小核試験とは、タマネギの種子を資料水を用いて発芽させ、水に遺伝毒性物質が含まれていれば、分裂期の細胞に小核を生じることを利用するもので、園瀬川の上流、中流、下流、それぞれについて調べることにした。

[小核試験について]きれいな水の場合、図1のような小核異常は見られず、遺伝毒性物質を含んでいる場合、DNAが傷つけられ、小核異常が見られる。

小核異常とは遺伝子を傷つけるような化学物質が、染色体を切断することによって小核が現れることである。細胞分裂の過程で、染色体は紡錘糸により両極へ移動する。しかし、DNAを傷つける遺伝毒性物質が存在するとDNAの修復が間に合わず、残った染色体には紡錘糸が付着しないので、断片が残り、小核を形成する。これは正常な細胞には見られない、細胞内に生じる核とは別の小さな核である。

この小核を生じた細胞の割合を算出することによって、遺伝毒性物質による水の汚染度合いを調べる方法である。

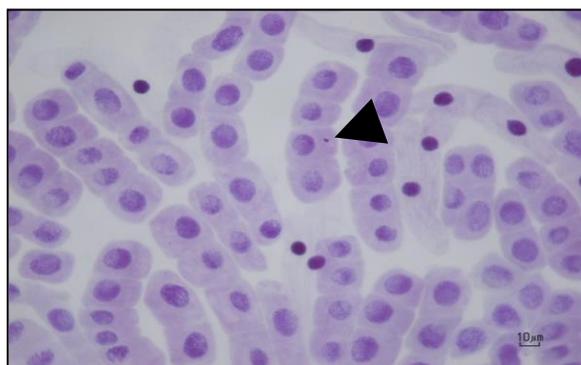


図1 小核異常（矢印が小核）

### ※分裂指数について

分裂指数とは細胞集団内の分裂期（M期）[前期、中期、後期、終期]の割合のことで、細胞の分裂指数は、集団内の細胞総数における分裂の頻度を示す。

$$\text{分裂指数} = \frac{\text{分裂期の細胞数}}{\text{観察した全細胞数}} \times 100 (\%)$$

分裂指数は「放射能による細胞への影響」や「ヒト心筋細胞が心筋梗塞後に分裂することを示す証拠」、また「染色体異常による小核の発生」などについての実験に用いられている。

### [実験方法]

(1) 次の3箇所で、6月3日（晴れ）にプラスチックボトル2本に約10ずつの資料水を採取した。その際、水温も計った。学校へ持ち帰った水は、5℃で保存した。

- ①上流 佐那河内村 一ノ瀬 2月3日  
14:50 11.1℃
- ②中流 上八万町 西光寺 2月3日  
15:12 11.2℃
- ③下流 上八万町 大坪 2月3日  
15:33 11.5℃



図2 園瀬川採水地点

(2) 播種

試料水 2ml をろ紙をひいたシャーレに入れ、タマネギの種子を 10 粒ずつ播き、25℃の恒温器中で 48 時間おいた後、蒸留水に変えて 24 時間おいた。また、蒸留水で同様にしたものも 72 時間おいた。

(3) プレパラート作製

- ①固定・解離・染色 酢酸ダーリア液 1 mol/l と塩酸を 7 : 3 で混合し、35℃に保ったものにタマネギの根を 15 分間浸した。
- ②次に発芽した根を 2 分～30 分間、水洗いをした。
- ③それをスライドガラスにのせ、先端 1 mm をとり、カバーガラスをかけて、押しつぶした。
- ④光学顕微鏡 400 倍で検鏡した。1 枚のプレパラートにつき、1000 個の細胞を観察し、小核を生じた細胞数を記録した。各地点の資料水、蒸留水、MMS 各濃度について 5 枚ずつのプレパラートを観察した。  
MMS 0.125 mM、0.25 mM、0.5 mM、1.00 mM 溶液を用いて (2) (3) と同様に発芽させ、プレ

パラートを作成した。その結果をもとに MMS の検量線を引いた (図 3)。

※ MMS とはメタンスルホン酸メチルの略で、今回は遺伝毒性の指標物質として用いた。

※ これは、(KURIYAMA ら 2005 年)によって小核形成の退化などの毒性が報告されているので、この実験に適していると考えた。

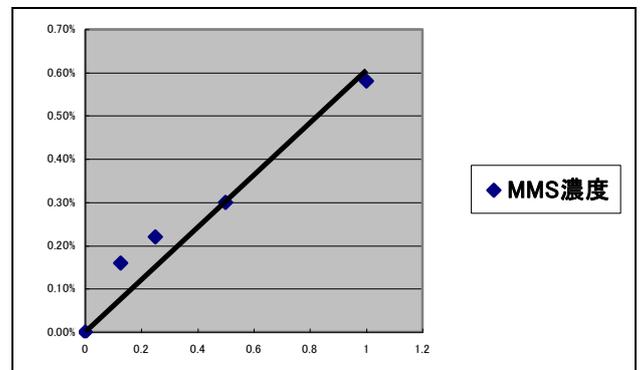


図3 MMS を用いた検量線

[結果]

(1) 小核試験の結果から、遺伝毒性物質は MMS 濃度に換算すると上流で 0.01 mM、中流で 0.01 mM、下流で 0.57 mM と同等の遺伝毒性物質が含まれていると考えられる。

蒸留水と上流、中流ではあまり違いがなかった。下流では換算 MMS 濃度が増加した。

(2) 上流では、分裂する細胞の数が多いが、中流・下流と格段に少なくなった。また、MMS 溶液も濃度が高くなるにつれて、分裂する細胞の数が少なくなった。

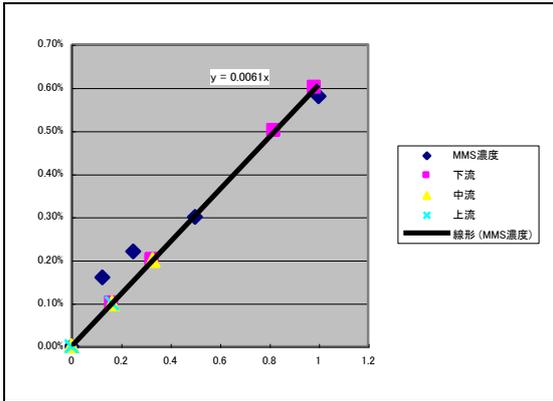


図4 MMS濃度と小核頻度の関係

[考察]

小核頻度は上流、中流では蒸留水とあまり違いはなく、また、下流では上流・中流と比較してMMS換算濃度が5.7倍となった。下流で小核頻度が増えたのは、上流・中流との間にたくさんの住宅があり、そこから流される生活排水や畑などに使われる農薬が原因ではないかと考える。

分裂指数においては、蒸留水と比較して、資料水の値が低く、また、遺伝毒性物質であるMMS溶液の値はさらに低い。このことから、資料水に何か細胞分裂を阻害する物質が含まれていることも考えられる。

しかしながら、西川(2007)の小松島市芝生川における小核試験の数値と比較してもその値はかなり小さい。1年生のときの水生昆虫の調査では園瀬川の水は「きれいな水」と判定された。今回の調査においても、遺伝毒性物質については「きれいな水」とであると推察される。

[参考文献]

西川 智行 , 2007, 「タマネギ小核試験による河川水中の細胞毒性物質の検出」, 鳴門教育大学修士論文,