

小核試験による広石谷川の遺伝毒性調査

後藤田恵 柳谷佳歩 山形依舞

【概要】

広石谷川は広石銅山跡の側を流れており、魚類が生息していない。過去の研究では、水の分析において高い濃度の銅は検出されていない。そこで、私たちは改めて川の水で小核試験を用いて調べると同時にマンガンと亜鉛でも小核試験を用いて実験を行った。その結果、銅山跡から 50m 下流の地点で最も小核の発生率が高く、濁っていた。このことから、マンガンと亜鉛が小核発生を引き起こしているのではないかと考えた。今後の課題としては川の水の成分分析を進めたいと思っている。

The Hiroishi river flows near the Hiroishi mine and there are no fish. In previous studies, high concentrations of copper were not detected in the water analysis. So we conducted micronucleus test of the river again, at the same time we conducted micronucleus tests for manganese and zinc. As a result, the highest concentrations of micronucleus appeared 50 meters downstream of the mine. And the place was muddy. We learned that manganese and zinc bring about micronucleus action. In the future, we will analyze the components of the water from the river.

【研究動機・目的】

広石谷川は過去の魚類調査において水生生物が発見されていない。そこで、過去の研究では銅の流入の可能性を予測した実験が行われたが、水の分析においては高濃度の銅は検出されず、参考値ながらマンガンと亜鉛が検出された。そこで、私たちは改めて川の水で小核試験を行うと同時に、マンガンと亜鉛での小核発生率を調べることにした。

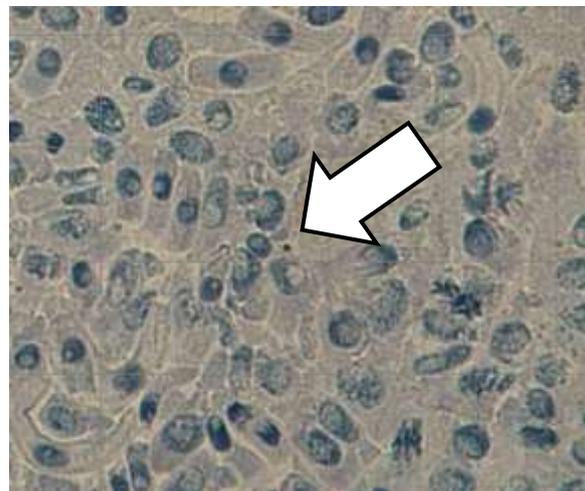
【小核試験】

細胞分裂において自然的、あるいは外因的に染色体の断片が生じることがある。これが、分裂終期に娘核に取り込まれずに細胞質中に残されると、通常の核よりも小さな小核となる。放射線や特定の化学物質によって生じた染色体損傷効果について小核形成を指標として調べる試験を小核試験という。

【広石谷川】

徳島県名西郡神山町阿野字広石を流れる広石谷川は鮎喰川（吉野川水系 一級河川）に合流している川で、広石銅山跡（主にキースラーガー；含銅硫化鉄鉱石や黄鉄鉱、黄銅鉱、磁鉄鉱を産

出）の側を流れており、銅山跡から下流の松尾川との合流地点までの区間においては過去の魚類調査において水生生物が生息していない。



【実験材料】

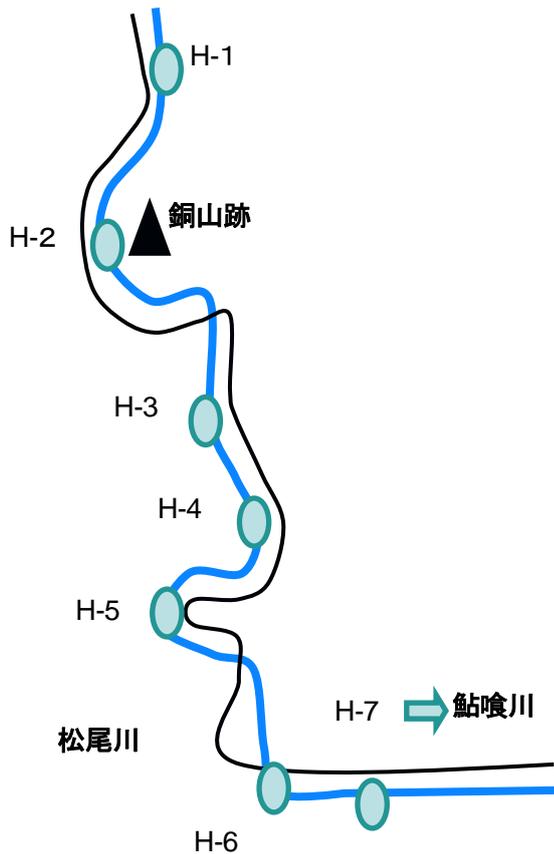
材料：タマネギの種子

試薬：硫酸マンガン（100ppm）、硫酸亜鉛（100ppm）、酢酸ダーリア、塩酸 1mol/L）カルノア液、蒸留水、グリセリン、広石谷川の水、

【実験方法】

・ 採水

広石谷川の7箇所を調査地点として採水を行った。銅山跡より上流で1箇所、銅山跡横で1箇所、銅山跡から50mおきに3箇所、松尾川と鮎喰川の合流地点で1箇所、鮎喰川より下流で1箇所の計7箇所で採水を行った。



I 播種

ろ紙を敷いたシャーレにタマネギの種子10個をまいて、試料水2mlを入れ、25℃で48時間発根させる。その後、蒸留水2mlを加えて24時間発根させ、カルノア液で固定する。

II プレパレート作成

酢酸ダーリア：塩酸を7：3の割合で入れてよく混合する。その後、染色液にタマネギの根端をつけて25℃で15分間染色させる。染色した根端をスライドガラス上で1mm程度に切り取り、グリセリンを加えてからカバーガラスをかける。スライドガラスは各項目につき5枚作成

した。

III 検鏡・計測

顕微鏡で観察した細胞をスライドガラス1枚につき5箇所検鏡する。全体の細胞数と小核を生じている細胞を計測し、小核の発生率を算出する。



図3 広石銅山跡

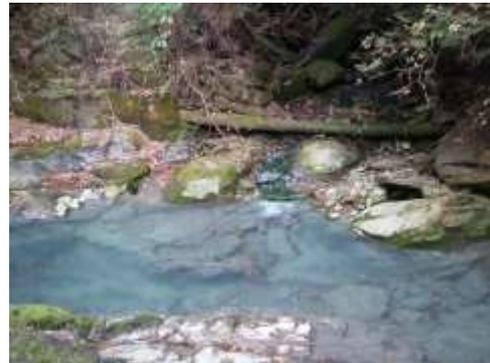


図4 広石谷川採水地点 (H-3)



図5 広石谷川採水地点 (H-4)

【実験結果】

表1 マンガンによる小核発生率

Mn濃度 (ppm)	計測細胞数 (個)	小核数 (個)	小核発生率 (×10 ⁻² %)	標準偏差 (×10 ⁻² %)
0	17065	1	0.59	0.73
1	12429	1	0.80	1.30
25	27911	2	0.72	1.54
50	12983	2	1.54	1.95
75	17302	3	1.73	1.05
100	14173	6	4.23	3.57

表2 亜鉛による小核発生率

Zn濃度 (ppm)	計測細胞数 (個)	小核数 (個)	小核発生率 (×10 ⁻² %)	標準偏差 (×10 ⁻² %)
0	17069	1	0.59	0.59
1	17993	3	1, 11	1, 11
25	19150	3	1, 57	1.57
50	16990	4	2.35	2.36
75	12479		3, 11	3, 11
100	9782	4	4.09	4.09

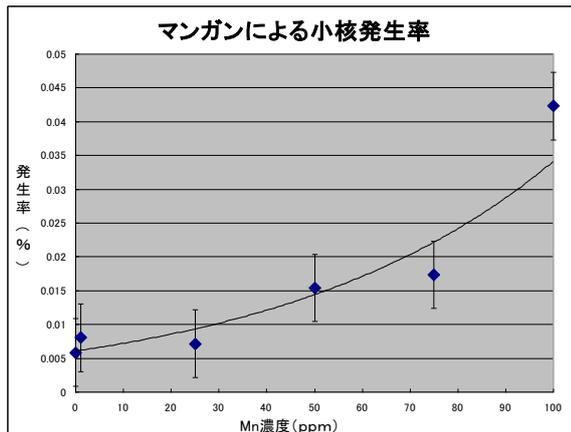


図6 マンガンによる小核発生率

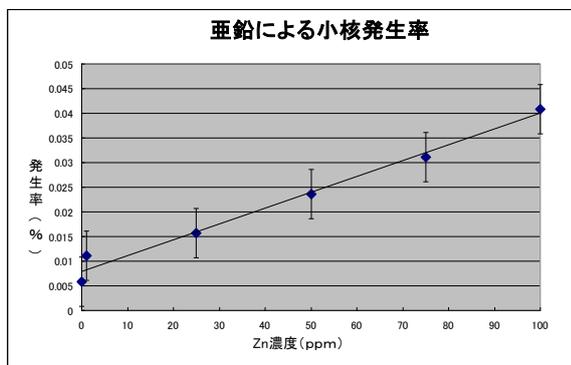


図7 亜鉛による小核発生率

表3 広石谷川の各採水地点における小核発生率

広石谷川採水地点	計測細胞数 (個)	小核数 (個)	小核発生率 (×10 ⁻² %)	標準偏差 (×10 ⁻² %)
H-1	17006	2	1.18	1.07
H-2	20681	3	1.45	1.47
H-3	19253	6	3.12	2.56
H-4	18848	3	1.59	1.42
H-5	19075	2	1.05	1.51
H-6	17417	3	1.72	2.36
H-7	25078	3	1.20	1.06

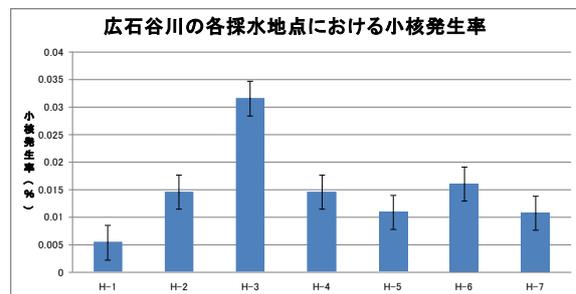


図7 広石谷川の各採水地点における小核発生率

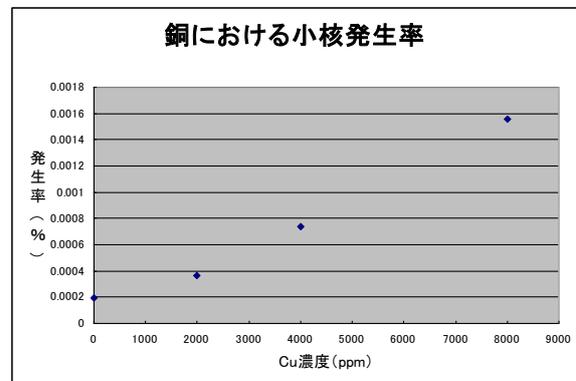


図8 先行研究銅の検量線

【考察】

図6, 図7より, マンガン亜鉛ともに濃度が高くなるにつれて小核の発生率が高くなることが分かった。このことより, とともに小核発生を誘発する能力があることが分かった。

また先行研究の銅の検量線 (図8) と比較すると, 銅では8000ppmに及ぶ小核発生がマンガンだと50ppm, 亜鉛だと30ppmのように銅よりもはるかに少ない量でもマンガンや亜鉛では小核

発生が起こっている。このことより、マンガンや亜鉛のほうが核に与える影響が大きいのではないかと考えた。

さらに図7のグラフにおいては、先行研究と同様に銅山跡よりも下流で小核の発生率が高くなっていった。このことから、銅山跡からは何か遺伝毒性を含む物質が流入しているということが改めて確認できた。採水地点の中でも最も小核の発生率が高かったのは、銅山跡より50m程度下流のH-3であった。また、そのH-3においては採水時に青白く濁っていた。この最も小核の発生率が高かったH-3をマンガンと亜鉛の検量線で見ると、マンガンでは約90ppm、亜鉛では約70ppmに相当することがわかる。

【今後の課題】

現在は、広石谷川の水の分析を原子吸光光度計を用いて調べると同時に、マンガンと亜鉛を混合した試料水で小核発生を調べるなどの実験を進めている。また、今回行った小核試験の実験をEDTAを用いて調べてみたいと思っている。

【参考文献】

http://ideacon.jp/contents/inet/vol10/vol10_m01_zn.pdf

水生生物の生息状況から見た亜鉛の環境基準について

http://www.waseda.jp/environm/menu/houki/houki_odaku.html

水質汚濁にかかる基準

【謝辞】

今回の研究に際しまして、各発表会においての指導助言および、タマネギ種子や器具、試薬のご提供をいただいた、鳴門教育大学自然・生活系教育部自然系コース（理科）の米澤義彦教授。夜遅くまでのご指導や化学分野に関してのアドバイスを下さった、城南高校教員の泉先生へこの場を借りて御礼申し上げます。

【感想】

今回の実験を通して、遺伝毒性について知ることが出来た。また、今まであまり知らなかった小核試験や小核についても知ることができ、とても勉強になった。今後も遺伝毒性の原因が分かるよう実験を進めたいと思う。