

論文

核分裂中性子とX線による一年生キク科植物ハプロパップスの 発芽種子根端分裂細胞における小核形成

半本 秀博¹⁾, 米澤 義彦¹⁾, 伊藤 哲夫²⁾
近藤 宗平²⁾

Induction of micronuclei in the root tip cells of *Haplopappus germinating seeds by fission neutrons and X rays*

Hidehiro HANMOTO¹⁾, Yoshihiko YONEZAWA¹⁾, Tetsuo ITOH²⁾
and Sohei KONDO²⁾

(Received September 30, 1992)

Seeds of *Haplopappus gracilis* ($2n=4$), an annual Compositae, were soaked in water for 24 hr and then irradiated with fission neutrons from the 1-wattage reactor, UTR-KINKI, or X rays. The root tip cells were inspected at 48 hr post-irradiation for evidence of chromosome damage using micronucleus as endpoint. The frequency of neutron-induced micronuclei increased almost linearly as the dose increased up to as much as 1.2 Gy. X-ray-induced micronuclei showed an exponential dose-response relation. From dose-response data, we estimated that the dose necessary to induce micronuclei at a frequency of 5 per 1,000 cells was 1.2 Gy for neutrons and 8.6 Gy for X rays. Thus, to induce chromosome damage in the somatic cells of germinating *Haplopappus* seeds, fission neutrons were much more effective than X rays.

1. はじめに

近畿大学原子炉 (UTR-KINKI) は、最大出力がわずかに 1W の超低出力炉であるため残量放射能は無視できるほど低く、炉心近くでは ²³⁵U 核分裂による速中性子が γ 線と同程度得られ、生物材料に速中性子を照射する実験には、他に比類がないほど、好都合な原子炉である。この原子炉で得られる核分裂中性子の

生体影響を評価する実験系の開発を目的として、近畿大学原子炉等利用共同研究「生物の放射線影響に関する研究」班が組織され、1980年より研究が続けられている。本研究は、この共同研究の一環として、ハプロパップスの染色体に対する原子炉中性子とX線の影響を比較したものである。

ハプロパップス *Haplopappus gracilis* は北アメリカ大陸原産の一年生キク科植物で、その染色体数は $2n=4$ である (Jackson, 1957)。この2対の染色体は、

¹⁾〒772 徳島県鳴門市鳴門町高島 鳴門教育大学生物学教室

²⁾〒577 東大阪市小若江3-4-1 近畿大学原子力研究所

¹⁾Department of Biology, Naruto University of Education, Takashima, Naruto, Tokushima 772

²⁾Atomic Energy Research Institute, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577

長さ、動原体の位置、付随体の有無などにより容易に区別されるため (Tanaka, 1967), 本種は放射線による染色体異常の細胞遺伝学的解析に格好の材料と考えられる。しかし、放射線によって誘発される染色体異常には切断、転座、逆位、二動原体染色体、染色体環などがあり、それらの分類と定量にはかなりの熟練を必要とする。また、分析の対象が分裂期中期であるため、分析できる細胞数に限度がある。そこで、中性子照射による染色体異常の分類と定量は将来の課題とし、本研究では小核を染色体異常の指標として採用した。小核は分裂期の遅滞染色体や染色体断片に由来し、分析の対象は間期である。そのため、一度に多数の細胞を対象とすることが可能であり、また、その分析も比較的容易である (Evans *et al.*, 1959)。

実験に当たっては、まず小核の観察に適した種子の状態、放射線の照射時期などについて、X線を用いて検討した。その結果も併せて報告する。

2. 材料と方法

実験に用いたハプロパップス *Haplopappus gracilis* (Nutt.) Gray は、広島大学理学部附属遺伝子保管実験施設において系統保存されている KH-1 系統である。広島大学から分譲された休眠種子は、使用するまでシリカゲルの入った容器に入れて密封し、冷蔵庫に保存した。実験には、肉眼または実体顕微鏡により稔性のある種子を選抜して使用した。

(1) 種子の発芽処理

ハプロパップスの休眠種子の種皮には発芽抑制物質が含まれており、汚紙を敷いたペトリ皿に直接播種する方法では発芽しないので (Sparvoli *et al.*, 1966), Yonezawa and Tanaka (1973) の方法に従って発芽処理を行った。すなわち、種子を10%オスバン液 (1%塩化ベンザルコニウム溶液, 大五栄養化学) で5分、ついで20%アンチホルミン液 (1%次亜塩素酸ナトリウム溶液, 和光純薬) で5分消毒し、水道水で十分水洗した。その後、種子を三角フラスコに移し、種子1個当たり約 1ml の蒸留水を加えて、エアーポンプで通気しながら24時間吸水させた。吸水処理を24時間としたのは、24時間処理した種子は、8, 12, または16時間処理したものに比べて発芽率が高く、また、成長段階が比較的良好で揃うことが予備実験において確認されたためである。

発芽処理を行った種子は、湿った汚紙を敷いた直径 9 cm のガラス製のペトリ皿に移して発芽させた。発

芽処理及び種子の発芽は、いずれも20°Cに保った恒温器内で行った。

(2) 放射線の照射

X線の照射には、日立メディコ社製のX線発生装置 MBR-1505R を用いた。照射は、ガラス製のペトリ皿に材料を入れ、140 kVp, 4.5 mA, 1.0 mm Al と 0.2 mm Cu フィルターの条件で行った。線量率は 65 R/min (ビクトリン線量計による測定) であった。

核分裂中性子線は、材料を入れた直径 3 cm のプラスチック製のペトリ皿を近畿大学原子炉 (UTR-KINKI) の炉心中央部から上下 5 cm 以内に置いて、2, 4 または 6 時間照射した。

近畿大学原子炉ではすでに詳細なドシメトリーが行われ、核分裂中性子線とともにほぼ同線量の γ 線が放出されていることが明らかになっている。安瀨ら (1989) によると、炉心中央部での核分裂中性子線と γ 線の線量率は、ヒトの組織吸収線量に換算して、それぞれ1時間あたり 0.20 Gy 及び 0.22 Gy である。

本研究では、 γ 線の最高線量 1.3 Gy でもその効果は無視できるので、原子炉放射線の照射は、中性子のみを照射したものとした。また、吸収線量推定のための元素分析を行っていないので、暫定的に、0.2 Gy/hr を中性子の線量率とした。中性子とX線の生物効果の比較に際しては、X線の照射線量 R は $1R=0.95$ Gy として吸収線量 Gy に換算した。

(3) 小核の観察

小核の観察は、通常の酢酸オルセイン染色一押しつぶし法によって行った。すなわち、発芽種子全体を水冷した45%酢酸で15分間または水冷した酢酸アルコール (酢酸: エタノール=1:3) で1時間固定した後、これを60°Cに保った解離液 (1 規定塩酸: 45%酢酸=2:1の混合液) で15秒間処理した。解離処理した種子から根端分裂組織のみをスライドガラス上に取り、酢酸オルセインで30~60分間染色したのち、押しつぶし法によってプレパラートを作成した。プレパラートを $\times 400$ で検鏡し、細胞質内のオルセインに濃染する小さな球体を小核として検出した (Fig. 1)。

原則として、各実験区ごとに5根端を用いてプレパラートを作成し、各プレパラートごとに1,000個以上の細胞を観察し、分裂指数、間期核における小核の出現数などを記録した。各照射群における小核の出現誘発頻度 F は次式から求めた。

$$F = \frac{\text{検出された小核の数}}{\text{調べた細胞の数}} \quad (1)$$

また、誘発頻度 F_{ind} は次式から求めた。

$$F_{ind} = F - F_0 \quad (2)$$

ただし、 F_0 は対照群における小核の出現頻度。

3. 結果及び考察

(1) 胚軸の長さで分裂指数

Fig. 2 は、24時間の発芽処理後、種子を沍紙を敷いたペトリ皿に移して発芽させ、発芽種子の胚軸の長さで分裂指数の関係を調べた結果である。胚軸の長さが3 mm 未満のときの分裂指数は1%未満であり、ほとんど細胞分裂が行われていないことを示している。しかし、その後の胚軸の伸長とともに分裂指数は増加し、胚軸の長さが6 mm 前後のときに最大となった。このことは、発芽の初期段階における胚軸の伸長は個々の細胞の伸長成長によるものであり、胚軸の長さが3 mm に達した時期にはじめて細胞分裂が開始されることを示唆している。

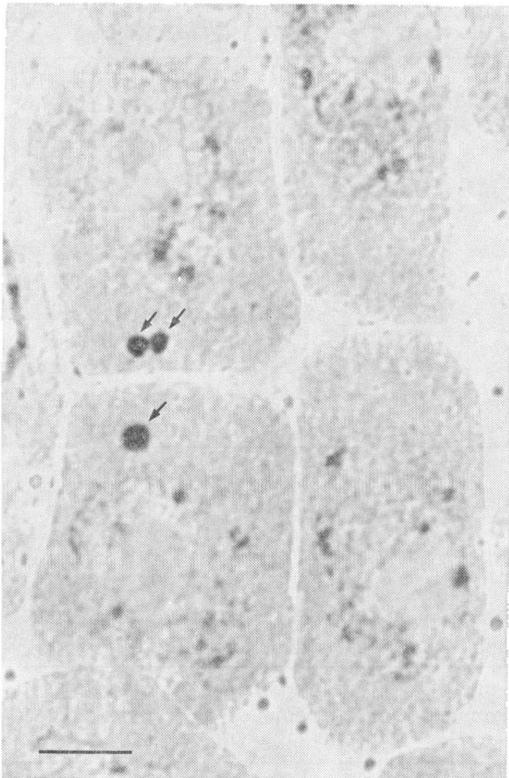


Fig. 1. Cells with micronuclei produced in the root tip cells of germinating *Haplopappus* seeds irradiated with 0.8 Gy of fission neutrons. Arrows indicate micronuclei. Bar is 5 μ m.

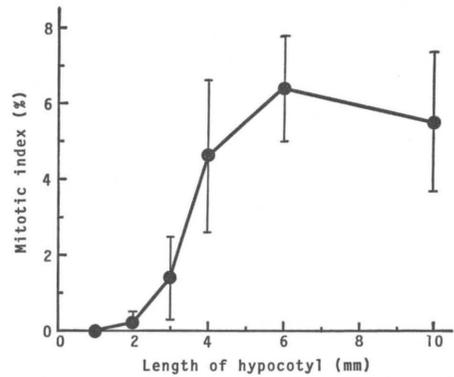


Fig. 2. Mitotic indexes for the root tip cells of germinating *Haplopappus* seeds in relation to the hypocotyl length. Vertical lines show standard deviations.

(2) 放射線照射と発芽率

Table 1 は、24時間の発芽処理直後にX線または中性子照射した種子の発芽率についてまとめたものである。照射群の一部において対照群に比べて発芽率がやや低くなっているものもあるが、線量依存的な低下は認められず、X線でも中性子でも本実験で用いた線量範囲内では種子発芽に対する顕著な影響は見られなかった。

(3) 分裂指数と小核形成率

Fig. 3 は、24時間の発芽処理した種子を沍紙を敷いたペトリ皿の中で24時間発芽させた後に900 RのX線を照射し、照射後24時間目に分裂指数と小核の誘発頻

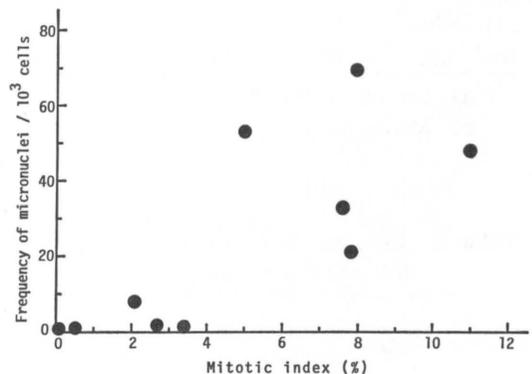


Fig. 3. Frequencies of micronuclei versus mitotic indexes at 24 hr post-irradiation in the root tip cells of germinating *Haplopappus* seeds. Irradiations was conducted with 900 R of X-rays at 24 hr after the seeds were soaked in water for 24 hr.

半本他：核分裂中性子とX線による一年生キク科植物ハプロパップスの発芽種子根端分裂細胞における小核形成

Table 1. Germination rates (%) of *Haplopappus* seeds irradiated with Xrays and fission neutrons after being soaked in water for 24 hr

Irradiation	Dose (R or Gy)	No. of seeds examined	Germination rate (%) ^{a)}
Xrays	0	100	15
	300	100	12
	900	100	23
	1800	100	15
Fission neutrons	0	100	15
	0.4	100	17
	0.8	100	27
	1.2	100	17

a) Determined at 48 hr post-irradiation.

Table 2. Frequencies of micronuclei in the root tip cells of germinating *Haplopappus* seeds irradiated with Xrays as dry seeds or after being soaked in water for 24 hr

Irradiation	Dose (R)	No. of roots observed	No. of cells observed	No. of micronuclei detected ^{a)}	Induced frequency of micronuclei per 10 ³ cells	Mitotic index ^{b)} (%)
Dry seeds	0	7	14757	6	0	7.7±2.0
	1800	5	10757	38	3.1	5.7±1.6
Germinating seeds at 0 hr after soaking	0	5	7576	26	0	9.0±0.2
	300	5	6583	17	-1.2	5.7±3.0
	600	5	8012	34	0.8	7.4±1.9
	900	5	7455	62	4.9	6.8±1.7
	1200	5	7292	97	9.9	7.8±1.4
	1500	5	7642	168	18.6	7.4±0.9
	1800	3	3984	180	41.8	7.6±3.0
Germinating seeds at 24 hr after soaking	0	4	10162	13	0	7.0±3.1
	100	4	9449	15	0.3	6.3±3.4
	300	3	10519	28	1.4	7.9±1.4
	900	6	8764	162	17.2	4.8±2.5

a) Scored at 48hr following soaking.

b) Mean±standard deviation

Table 3. Frequencies of micronuclei in the root tip cells of germinating *Haplopappus* seeds following irradiation with fission neutrons after being soaked in water for 24 hr

Dose (Gy)	No. of roots observed	No. of cells observed	No. of micronuclei detected ^{a)}	Induced frequency of micronuclei per 10 ³ cells	Mitotic index ^{b)} (%)
0	5	6688	30	0	7.6±1.8
0.4	5	6324	42	2.1	8.3±2.0
0.8	7	11696	92	3.4	8.3±2.1
1.2	5	6010	60	5.5	8.8±2.5

a) Scored at 48 hr post-irradiation

b) Mean±standard deviation

度の関係を調べたものである。分裂指数が3.5%以下の場合には小核の誘発頻度は1%未満であり、分裂指数が5%以上の場合には2%以上であった。このことは、小核は分裂期の染色体断片や遅滞染色体に由来するものであり、間期におけるDNAの損傷が分裂期を経過することによって顕在化するという考え (Evans *et al.*, 1959) とよく一致するものである。

5%以上の分裂指数を示す胚軸の長さは約5mm以上であるが (Fig. 2), 分裂指数の変異の幅が大きいため、以後の実験では胚軸の長さが4~7mmのものを用いることとし、最初に分裂指数を観察し、分裂指数が3.5%以下のものは小核の観察の対象から除外した。

(4) X線の照射時期と小核の誘発頻度

Table 2 は、X線を発芽処理の前(乾燥した状態)、24時間の発芽処理直後(ほとんどの種子は未発芽である)及び処理後24時間目(発芽処理開始後48時間後、発芽した種子では胚軸の長さが1~3mmになっている)に照射し、小核の誘発頻度を調べた結果である。

乾燥種子に1800R照射した群の小核の誘発頻度は、発芽処理直後に1800R照射した群の1/10以下であった (Table 2)。これは、吸水種子の放射線感受性は乾燥種子よりも高いという従来の報告 (松尾・山口, 1964参照) と一致する。

発芽処理直後にX線を900R照射した群と発芽処理後24時間目に900R照射した群を比較すると、発芽処理の24時間後にX線を照射した方が、小核の誘発頻度が約2倍高いことがわかった。また、発芽処理直後の300R照射では、小核の出現頻度は対照以上に増加していないが、発芽処理後の24時間目の300Rの照射では有意な増加がみられた。これらの結果は、休眠種子の細胞の大半はG₁期にあるので (Miah and Brunori, 1970; Ancora *et al.*, 1972), 24時間の発芽処理直後では大半の細胞はG₁期のままであり、発芽処理後24時間目ではS期に達していると考え、他の植物で得られている知見と一致する。しかし、ハプロポップスにおける放射線感受性の細胞周期依存性は、今後の研究課題である。

(5) 原子炉内中性子照射による小核形成

24時間の発芽処理直後に原子炉内中性子照射を行い、照射48時間後に小核の誘発頻度を調べた結果をTable 3とFig. 4に示している。Fig. 4より明らかに、中性子による小核の誘発頻度は最高線量1.2Gyまではほぼ直線的に増加した。これは、X線照射による誘発頻度と線量の関係が指数関数的であったことと対照的である。

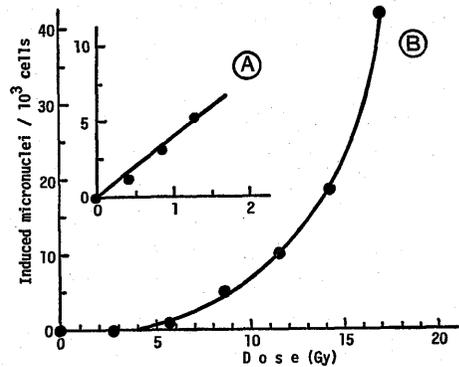


Fig. 4. Dose-response relation of micronuclei induced in the root tip cells of germinating *Haplopappus* seeds after irradiation with fission neutrons (A) and X rays (B) (data from Tables 2 and 3).

(6) 原子炉中性子のX線に対する生物効果比 (RBE)

Fig. 4より1,000細胞当たり5個の小核を誘発するのに必要な線量を求めると、中性子では約1.2Gy, X線では8.6Gyであり、また、2.5個誘発するのに必要な線量は、中性子では0.6Gy, X線では7.0Gyであった。したがって、本研究で用いた中性子線量の範囲内では、中性子のX線に対するRBEは7以上になる。

近畿大学原子炉の核分裂中性子のX線に対するRBEは、これまでにキイロシヨウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の体細胞染色体組換えで5.7~6.0 (Ayaki *et al.*, 1990), ダイズ *Glycine max* の葉色に関する体細胞突然変異で17~25 (Itoh and Kon-do, 1991), イエギク *Chrysanthemum morifolium* の花色に関する体細胞突然変異の誘発で6~7 (池田ら, 1991)と推定されている。本研究の結果は、これらの結果と同様に、近畿大学原子炉中性子がX線よりも高い染色体損傷効果を有することを明らかにしたものである。しかし、本研究の中性子線量は、ヒト組織の吸収線量として得られたものであるため、正確なRBEは、ハプロポップス発芽種子根端を構成する各元素の重量割合に基づく吸収線量で求めなければならない。今後の課題とした。

(謝 辞)

本研究は、近畿大学原子炉等利用共同研究「生物の放射線影響に関する研究」の一部として行われたものである。共同研究班の代表として、いろいろとご援助

半本他：核分裂中性子とX線による一年生キク科植物ハプロパップスの発芽種子根端分裂細胞における小核形成

いただいた京都大学の武部啓教授に深謝する。また、本稿を査読され、貴重な助言をいただいた近畿大学の藤川和男助教授、ハプロパップスの種子を分譲していただいた広島大学の近藤勝彦教授にも感謝する。

引用文献

Ancora, G., Brunoi, A. and Martini, G., 1972. Total protein to DNA ratio in 2C nuclei of dry seed meristems in relation to chromosome and chromatid aberrations induced by X-irradiation. *Caryologia*, 25 : 373-381.

Ayaki, T., Fujikawa, K., Ryo, H., Itoh, T. and Kondo, S., 1990. Induced rate of mitotic crossing over and possible mitotic gene conversion per wing anlage cell in *Drosophila melanogaster* by X rays and fission neutrons. *Genetics*, 126 : 157-166.

Evans, H. J., Neary, G. J. and Williamson, F. S., 1959. 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. Rad. Biol.*, 3 : 216-229.

池田秀雄, 渡邊重義, 脇屋祥子, 近藤宗平, 伊藤哲夫, 森本幸弘, 1991. 核分裂中性子線またはX

線の照射をうけたイエギク *Chrysanthemum morifolium* Ram. における花色変異体の出現様相. 近畿大学原子力研究所年報, 28 : 9-18.

Jackson, R. C., 1957. New chromosome number for plants. *Science*, 126 : 1115-1116.

松尾孝嶺, 山口彦之, 1964. 放射線利用による育種上の諸問題. 松村清二, 田島弥太郎編: 放射線遺伝学. 裳華房, 東京, pp. 556-613.

Miah, A. J. and Brunoi, A., 1970. Chromosomal aberrations induced in meristematic regions of the embryos in X-irradiated dry seeds of *Vicia faba*. *Rad. Bot.*, 10 : 87-94.

Sparvoli, E., Helen, G. and Kaufmann, B. P., 1966. Duration of the mitotic cycle in *Haplophappus gracilis*. *Caryologia*, 19 : 65-71.

Tanaka, R., 1967. A comparative karyotype analysis in *Haplophappus gracilis* ($2n=4$) and *H. ravenii* ($2n=8$). *Cytologia*, 32 : 542-552.

安淵四郎, 星 正治, 伊藤哲夫, 久永小枝美, 丹羽健夫, 三木良太, 近藤宗平, 1989. プラスチック飛跡検出器 TS16N による極低出力原子炉内速中性子のドシメトリ. *RADIOISOTOPES*, 38 : 359-365.

Yonezawa, Y. and Tanaka, R., 1973. Autoradiographic studies on the incorporation of ^3H -amino acids into chromosomes during mitotic cell cycle of *Haplophappus gracilis*. *Bot. Mag. Tokyo*, 86 : 63-74.