

東京大学大学院新領域創成科学研究科
環境学研究系自然環境学専攻
自然環境循環学分野

平成 30 年度

修士論文

単子葉植物 *Oryza sativa* を用いた
植物ホルモン（オーキシン）攪乱物質の検出法開発

Development of a series of bioassay methods to detect plant hormone (auxin)
disruptors using monocotyledonous plant *Oryza sativa*

2019 年 1 月 25 日提出

2018 年度 3 月修了

指導教員 山本 裕史 准教授

47-176627 山田 陽希

目次

1. 序論
 - 1-1 背景
 - 1-2 目的
2. 略語
3. イネを用いた発芽発根試験および成長影響試験
 - 3-1 目的
 - 3-2 材料・方法
 - 3-3 結果
 - 3-4 考察
4. イネ カルスを用いた組織誘導試験
 - 4-1 目的
 - 4-2 材料・方法
 - 4-3 結果
 - 4-4 考察
5. イネ Oc 培養細胞を用いた細胞増殖試験
 - 5-1 目的
 - 5-2 材料・方法
 - 5-3 結果
 - 5-4 考察
6. イネを用いた根長回復試験
 - 6-1 目的
 - 6-2 材料・方法
 - 6-3 結果
 - 6-4 考察
7. 参考文献
8. 謝辞

1. 序論

1-1. 背景

ホルモンは、一般的に動物の特定器官（内分泌器官）で合成・分泌される物質で、血液などを通して輸送され、標的器官においてその作用を示す生理活性物質を指す。その作用は、代謝の調節や恒常性維持および発生・生殖の制御など多岐に渡り、いまだに明らかになっていない作用も多い。米国の環境活動家であるシーア コルボーンは、その著書「奪われし未来」（1996年）の中で、ホルモンと類似作用を示す内分泌系かく物質が環境中には複数存在することを述べており、いわゆる環境ホルモン（内分泌攪乱物質）が世界中で注目されるきっかけとなった。このような物質が自然界で拡散し生物にばく露されると、発生異常や生殖器異常などによる個体群変動が起こることは想像に難くない。例えば、女性ホルモンの一種エストロゲンや界面活性剤の原料や石油系製品の腐食防止剤として加工利用されているノニルフェノールは生物のメス化を引き起こすことが知られている（井口, 1998）。メス化した個体が次世代生産に携わる場合、性比のバランスを崩すことで次世代の繁殖に影響を与える。従って、種の存続および生態系保全の為には、ばく露される可能性のある生物に対して内分泌攪乱の強度を測り、また内分泌攪乱物質のばく露程度を知る必要がある。このことから、これまでに、メダカなどの小型魚類やミジンコなどの甲殻類のモデル生物を用いた内分泌攪乱物質の検出法・スクリーニング手法が複数開発されている。例えば、化学物質の物理化学的な性質や生態影響等に関する試験法 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals（OECD テストガイドライン）記載では、TG229 や 230 などの魚類短期繁殖試験、TG240 のメダカ拡張 1 世代繁殖試験 Medaka Extended One Generation Reproduction Test（MEOGRT）等が挙げられる。

前述した様に、ホルモンは一般的に動物における生理活性物質を指すが、ホルモンに相当する生理活性物質は陸上植物にも存在する。しかしながら、①動物に相当する分泌器官や標的器官は存在しないため、輸送メカニズムは動物と異なる、②同一のホルモンであっても、作用部域や濃度の違いによりその作用は変化する、などの点で植物ホルモンは動物のホルモンとは異なる。植物ホルモンはこれまで、オーキシン、ジベレリン、サイトカイニン、アブシジン酸、エチレン、フロリゲンの6つが同定されており、それぞれは単独または相互作用しながら分化や形態形成、成長制御に関わっている（図1）。

そのうちの1つオーキシンは、植物ホルモンの中で最も早く発見・同定されたホルモンで、その研究の歴史も長い。オーキシンは、一般的に細胞伸長や細胞分裂を制御するホルモンとして知られているが（Takahashi et al., 2012）、C. Darwin and F. Darwin（1880）は、単子葉植物を用いた屈性に関する研究で、幼葉鞘の先端が光受容し、後にオーキシンと同定される成長促進物質が反光照射側に移動することで屈曲（Darwin et al., 1880）が制御され

ていることを 1880 年にすでに報告している。その後、成長促進物質は先端部で合成されること (Paal, 1919) や、屈曲角度がその物質の量に依存していること (Went, 1926) などが明らかにされた。1930 年には、成長促進物質が始めて単離・同定され、オーキシシン (インドール-3-酢酸 (IAA)) と命名された (Kögl and Thimann, 1934)。その後、オーキシシン作用の分子メカニズムに関する研究はなかなか進展せず、1980 年以降分子生物学的手法を用いた数々の研究によりオーキシシン作用の分子メカニズムは解明されるに至る。これまでに、オーキシシンの受容体は F-box タンパク質 transport inhibitor response 1 (TIR1) (Dharmasiri et al., 2005 ; Kepinski and Leyser, 2005) であることや、オーキシシンの活性部位としては二重結合を有する環状構造と、1 または 2 個の炭素原子を隔てた距離にカルボキシル基をもつことが重要であることが明らかになっている。

除草剤などの農薬の中には、植物ホルモンをターゲットとした、いわゆる植物ホルモンのアゴニスト (類似の作用を示す物質) あるいはアンタゴニスト (阻害作用を示す物質) が多数存在する。例えば 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) (図 1) はオーキシシンアゴニスト除草剤の 1 種であり、1942 年にオーキシシン作用が発見された最も古い化学農薬である。2,4-D の他にも、オーキシシンアゴニストのパラクロロフェノキシ酢酸 (4-CPA) (図 1) は発根促進剤として利用されている。また、ジベレリン GA_3 は (図 1) 約 130 種あるジベレリンの中でも農業に汎用されているジベレリンアゴニストである。 GA_3 は花粉および胚珠の形成過程に影響し、受精しない無種子果を作る目的で利用されている。

一方で、これまで一般化学物質や医薬品が植物ホルモンのアゴニストやアンタゴニストとして植物の生長や形態形成に影響を与える例は報告されていない。しかし、医薬品のなかにはオーキシシンと類似構造を有するものが多数存在し、Sigma-aldrich (現 MERCK) の調査によると 2003 年以降、インドール骨格を有する医薬品は 400 種以上、さらに誘導体を含めると数千の記載がある。オーキシシン輸送阻害剤として知られている 1-ナフチルフタラミン酸 (NPA) は、医薬品の中間体として産出し、また弱いオーキシシン活性があることも知られている (Katekar and Geissler, 1977)。

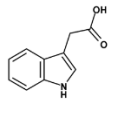
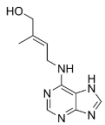
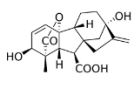
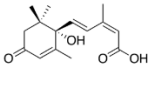
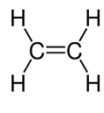
わが国では、一定の基準を満たした医薬品等の工場排水は基本的に河川等の公共用水域に排出されることから、陸上植物へのばく露は想定されていない。しかしながら、医薬品を使用したヒトや家畜の糞尿が河川の浚渫、下水汚泥の再利用によって生成した肥料などから植物にばく露される可能性は十分に考えられる。例えば、飼料に用いられたクロピラリド (図 1) を成分とするオーキシシン攪乱型の除草剤が、堆肥化しても十分に分解されず、残留したクロピラリドにより、その堆肥を用いた植物が生育異常をおこした報告もある (農林水産省, 2016)。

医薬品のうち、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は、体内で痛みや炎症などを引き起こすプロスタグランジン類の合成を抑えるよう作用するもので、近年、処方薬から市販薬まで幅広く活用されている。例えば、厚生労働省の薬事工業生産動態統計調査 (H25) による

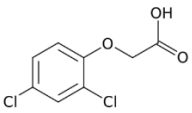
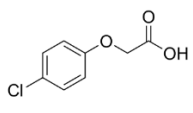
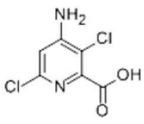
と、インドメタシン(図1)は筋肉痛などの抗炎症用湿布などへの使用が多く、年間に215,000 t生産されており、また、エトドラク(図1)は関節痛の消炎・鎮痛剤として使用が多く、年間36,202 t生産されている(厚生労働省., 2013)。NSAIDsの中には、インドール構造を有するものなどオーキシン作用を持つための条件にあてはまるものが多く存在し、インドメタシンやエトドラクはこの条件に合致している。また、インドメタシンにおいては環境中の予測濃度(PEC)と予測無影響濃度(PNEC)(水生生物に影響を与える濃度)の比較、PEC/PNECの値が0.1以上であった(岩根, 2004)。しかし、環境残留性や生物蓄積性は低いとされている。

本研究室では、これまで、複数のNSAIDsが双子葉植物において、オーキシンのアンタゴニストとして作用することなどを明らかにしてきた。しかしながら、オーキシンの作用や感受性は、双子葉植物と単子葉植物とで異なることが知られている。例えば、インドール酸ピルビン酸(IPA)生合成経路(トリプトファンからインドール酸ピルビン酸を介しIAAをつくるオーキシンの生合成経路の一部)は、様々な植物で保存されているが、インドール-3-アセトアルドキシム(IAOx)を介する生合成経路は、単子葉植物であるイネには存在しない(Sugawara et al., 2009)。また、イネ科植物に対する合成オーキシンの作用は、維管束組織の外側の細胞層(スクレレンキマ)があることで茎が捻転しにくくなり、維管束の機能損失を妨げる為、双子葉植物よりも小さくなる(伊藤, 2017)ことが知られている。

A

オーキシン (インドール3酢酸)	サイトカイニン	ジベレリン (GA ₃)	アブシジン酸	エチレン	フロリゲン
					FLOWERING LOCUS (FT) とよばれる遺伝子にコードされたタンパク質
細胞伸長促進 細胞分裂促進 茎・根伸長生長促進	維管束の形成 発芽促進 老化阻害	花芽の形成 葯の発達 細胞伸長促進	発芽抑制 気孔閉鎖	種子の発芽 果実成熟 離層形成	花芽形成

B

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)	4-CPA	クロピラリド
		

C

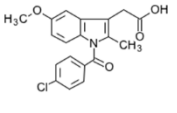
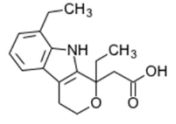
インドメタシン	エトドラク
	

図1 A: 植物ホルモン B: 農薬 C: 非ステロイド性抗炎症薬の化学構造

1-2. 目的

単子葉植物と双子葉植物とではオーキシシン作用が異なることから、イネ科などの主要穀物を含む単子葉植物におけるオーキシシン攪乱物質の影響評価および手法確立が必要とされている。

従って本研究では、1：単子葉植物（イネ：*Oryza sativa*）における NSAIDs のオーキシシン攪乱作用を検証する。これに伴う 2：単子葉植物における化学物質のオーキシシン様作用の検出法の開発の 2 つを主な目的とする。オーキシシンの特性である、外部処理による発芽発根に対する阻害作用 (①)、カルスの組織分化への影響 (②)、植物培養細胞の増殖に必要であること (③) を利用して NSAIDs の作用検証および評価試験法を開発した。

- ① イネを用いた発芽発根阻害試験および成長影響評価試験
- ② イネカルスを用いた組織誘導試験
- ③ イネ Oc 培養細胞を用いた細胞増殖試験

各実験における背景・目的は章ごとに示す。

2. 略語

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
4-CPA	4-Chlorophenoxyacetic Acid
BAP	6-Benzylaminopurine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
IAA	Indole-3-acetic Acid
IPA	Indole-3-pyruvic Acid
NAA	N-1-naphthaleneacetic acid
NPA	N-(1-Naphthyl)phthalamic Acid
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
OECD	Organization of Economics Cooperative Development
PEC	Predicted Environmental Concentration
PNEC	Predicted No-Effect Concentration
TIR1	transport inhibitor response 1

3. イネを用いた発根発芽試験および成長影響試験

3-1. 背景・目的

植物の影響評価試験法には、OECD テストガイドラインの No. 208 Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test (TG208) (OECD, 2006) などがある。しかしながら、一般的に陸上植物の影響評価試験は、発芽から結実までをばく露期間とするフルライフサイクル試験であり、ばく露期間が 14~21 日と長いこと、栽培規模も 6~7 m²と大きく実験室内での試験が困難であること、ばく露物質の濃度が変化してしまうことや外的条件を一定に保つことが難しいことなどの問題点があるため、本研究では、イネ日本晴 (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) を用いた、短期間・小スペースかつ、安定条件下で行える試験法の開発を行う。

イネへの高濃度 (0.1 μM 以上) オーキシシン外部処理は、発芽発根を阻害し、根の伸長抑制を引き起こすことが知られており、また、低濃度 (0.01 μM 以下) のばく露は、側根や冠根の形成を促進する (Inukai et al., 2005)。従って、発芽発根率や根長をエンドポイントとした短期間・小スペースかつ、実験室内で行える影響評価試験法の確立を目指す。また、双子葉植物においてオーキシシンアンタゴニストの作用が明らかになっている NSAIDs (インドメタシン、エトドラク、ケトプロフェン、イブプロフェン) の影響評価を、単子葉植物について、確立した試験法を用いて行う。

3-2. 材料・方法

3-2-1. 材料

生物種：

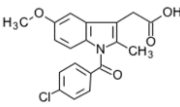
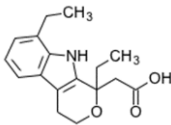
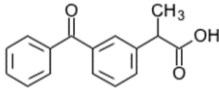
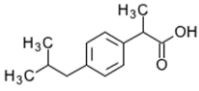
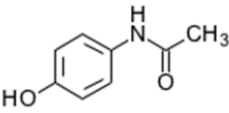
本実験は、平成 28 年度産の日本晴 (*Oryza sativa*. L cv Nipponbare) の種子を使用した。種子は (株) のうけんから購入し、未熟胚やカビのない粳種を選抜し実験に用いた。

化学物質：

試験法開発のために、基準物質として人工オーキシシン 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を用いた。

NSAIDs の影響評価では、インドメタシン、エトドラク、ケトプロフェン、イブプロフェン、さらにネガティブコントロールとして非ピリン系解熱鎮痛薬アセトアミノフェン (NSAIDs とは分類が異なる) (表 3.1) の影響評価を行った。

表 3.1
使用した医薬品の名称、化学構造等一覧

分類	NSAIDs (非ステロイド性抗炎症薬)			
	アリール酢酸系		プロピオン酸系	
一般名	インドメタシン	エトドラク	ケトプロフェン	イブプロフェン
化学式	$C_{19}H_{16}ClNO_4$	$C_{17}H_{21}NO_3$	$C_{16}H_{14}O_3$	$C_{13}H_{18}O_2$
CAS 登録番号	53-86-1	41340-25-4	22071-15-4	15687-27-1
分子量	357.79	287.35	254.28	206.28
化学構造				
	非ピリン系解熱鎮痛薬			
一般名	アセトアミノフェン			
化学式	$C_8H_9NO_2$			
CAS 登録番号	103-90-2			
分子量	151.16			
化学構造				

3-2-2. 試験物質のばく露

アセトアミノフェン標準品 (Wako) と 2,4-D (Wako) は MilliQ 水に 10 mg/ml となるように溶解し、ストック溶液とした。また、インドメタシン (Wako)、エトドラク (Wako)、ケトプロフェン (Wako)、イブプロフェン (Wako) は 10 mg/ml となるように、900 μ l の MilliQ 水と 100 μ l の 1N NaOH を用いて溶解させストック溶液とした。

ばく露濃度は、2,4-D は 0.0625 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 4mg/L の 5 濃度、その他 5 種の医薬品は、6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L の 5 濃度とした。ばく露溶液は、ストック溶液を設定濃度になるように 1/2MS 培地 (表 3.2) に添加し、1N NaOH を用いて pH5.8 \pm 0.1 に調整した。ばく露溶液はガラスビース (ASONE BZ-1) 80 g を入れた PP ディスポビーカー50 ml (ニッコーハンセン) に、対照区として 1/2MS 培地 (pH5.8 \pm 0.1) を、ばく露区として、種々の設定濃度に調整したばく露溶液をそれぞれ 20 ml 加え、1 ビーカーあたり選別済みの 6 種子を播種した。また、試験は 3 連で行った。播種したビーカーは、ばく露溶液の蒸発を防ぐため、発泡スチロールの箱に入れ、30 $^{\circ}$ C 明所のインキュベーター (池田理化) 内で栽培した。発芽数、シュート長および根長の計測は、播種後 5 日目、7 日目に行った。

表 3.2 1/2 MS 培地

ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (Wako)	2.3 g
ニコチン酸 (Wako)	0.5 mg
ピリドキシリン塩酸塩(Wako)	0.5 mg
チアミン塩酸塩(Wako)	0.1 mg
+MilliQ up to	1000 ml

pH 調整後、ゲランガム (ナカイテラスク) 2 g、硫酸マグネシウム (Wako) 1 g を加えた。

3-2-3. 計測方法

植物体をビーカーから取り出し、発芽発根数を計測するとともに、画像として記録した。地上部（シュート）と地下部（種子根）の長さ（シュート長・根長と表記する）は、記録画像を用いて画像処理ソフト **image J** によって計測した。

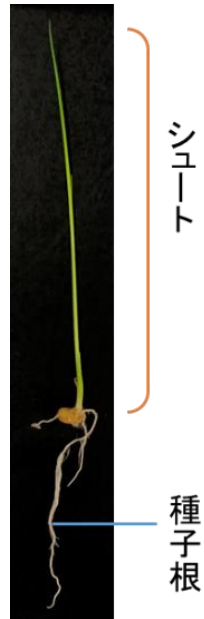


図 3.1 発芽 14 日目のイネシュート部と種子根

シュート：茎とその上の葉をまとめた総称

種子根：胚発生のときにつくられる幼根から由来した根

3-3. 結果

ガラスビースを用いた新規イネ発芽発根試験法の評価を行うため、人工オーキシンである2,4-Dを基準物質として、当該試験法を用いたばく露試験（ばく露濃度：0.0625,0.25,0.5,1,4mg/L）を行った（図3.2）。

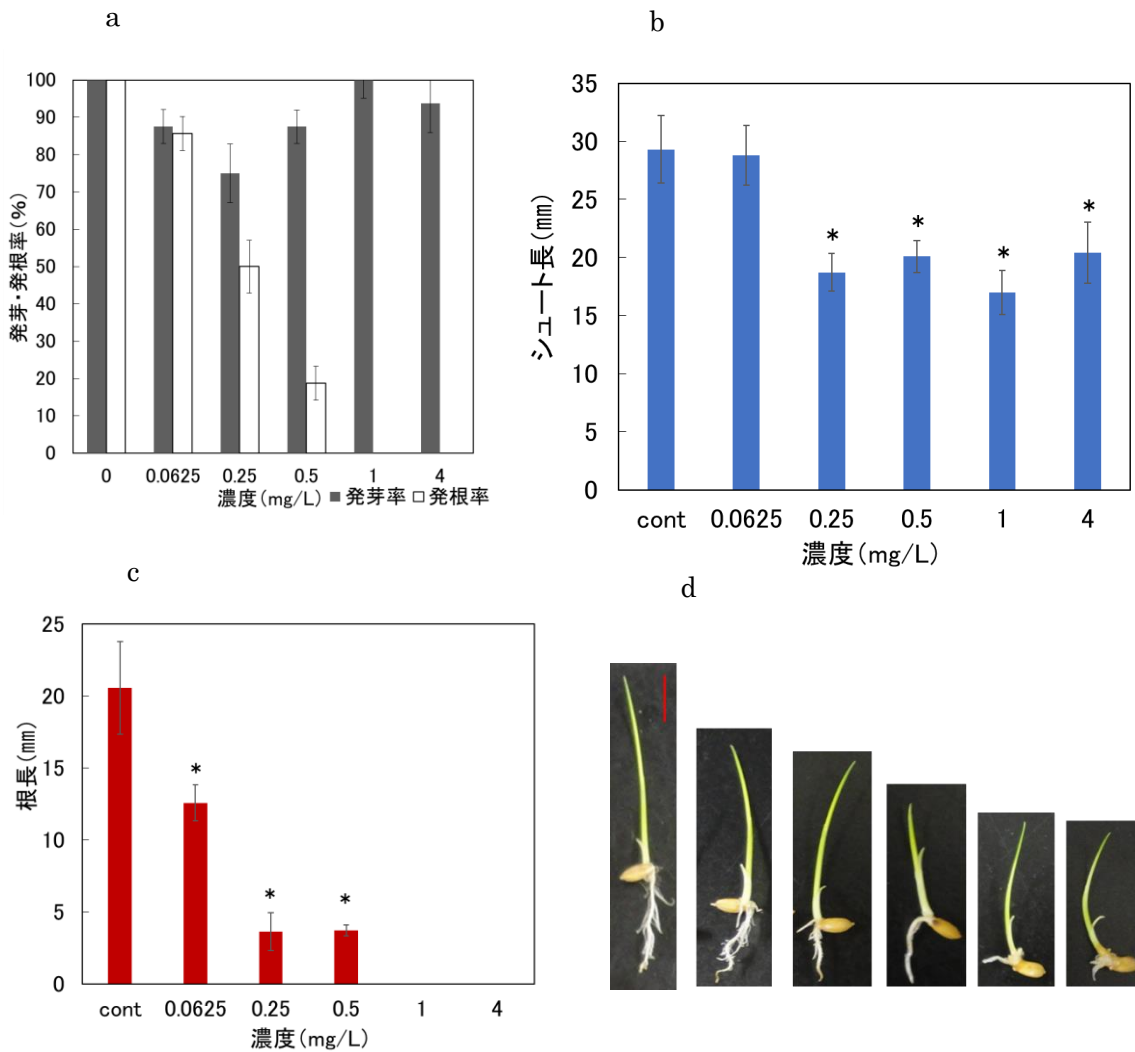


図 3.2 2,4-D ばく露 5 日目の阻害試験結果

a:発芽・発根率 b:シュート長 c:根長 d:形態比較 (bar=10mm)

n=3、エラーバーは標準誤差を示す。

Dunnett 検定により control と比較した場合の p 値を算出した* $p < 0.05$

2,4-D は、シュート長よりも根長への影響が大きく、濃度依存的に根長伸長が抑制された。対照区では根長平均は 20.6 mm であったが、ばく露区では、2,4-D の濃度が 0.0265 mg/L の場合 12.6mm、0.25 mg/L および 0.5 mg/L の場合、3.7mm、3.6 mm であった。根長の 50% 影響濃度は 0.08 mg/L と求められた。また、2,4-D の濃度が 1 mg/L および 4 mg/L の場合、発根は全く観察されなかった。発根率もまた濃度依存的に減少した。

NSAIDs 5 種 (インドメタシン、エトドラク、ケトプロフェン、イブプロフェン) および、ネガティブコントロールとして解熱鎮痛薬アセトアミノフェンの影響評価試験を開発した試験法を用いて行った。(図 3.3~3.7)

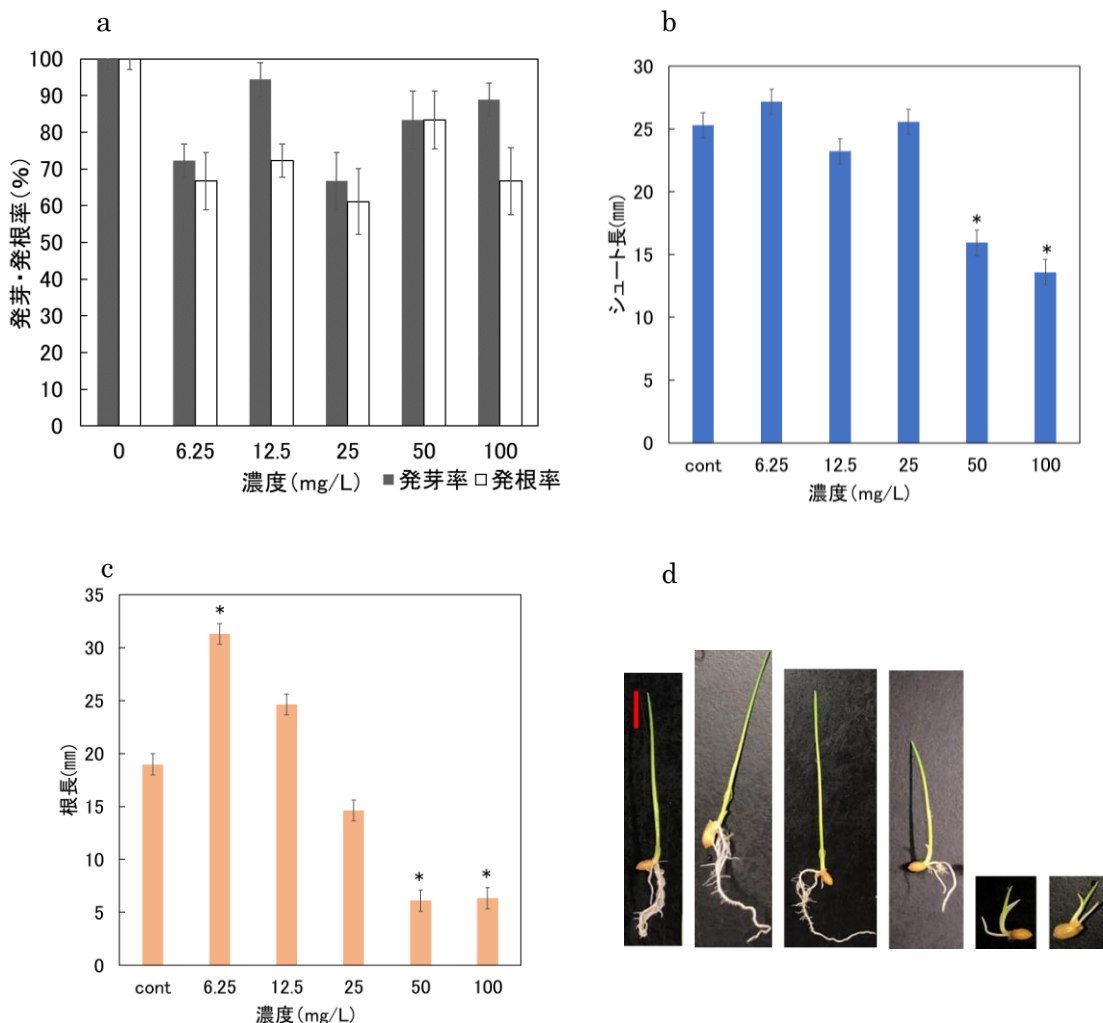


図 3.3 インドメタシン (6.25,12.5,25,50,100mg/L) ばく露 5 日目の阻害試験結果

a:発芽・発根率 b:シュート長 c:根長 d:形態比較 (bar=10mm)

n=3、エラーバーは標準誤差を示す。

Dunnett 検定により control と比較した場合の p 値を算出した* $p < 0.05$

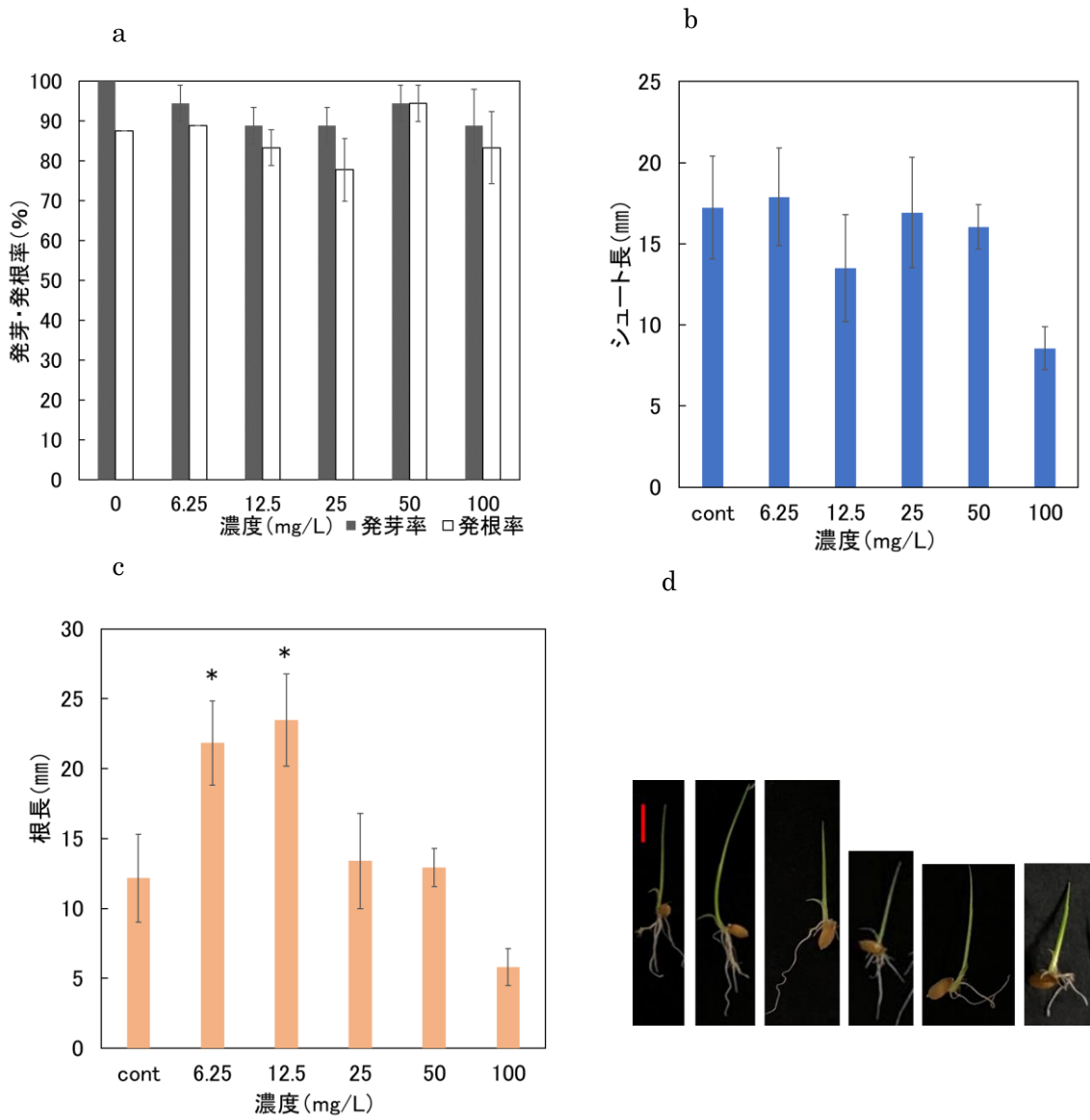


図 3.4 エトドラク (6.25,12.5,25,50,100mg/L) ばく露 5 日目の阻害試験結果

a:発芽・発根率 b:シュート長 c:根長 d:形態比較 (bar=10mm)

n=3、エラーバーは標準誤差を示す。

Dunnnett 検定により control と比較した場合の p 値を算出した* $p < 0.05$

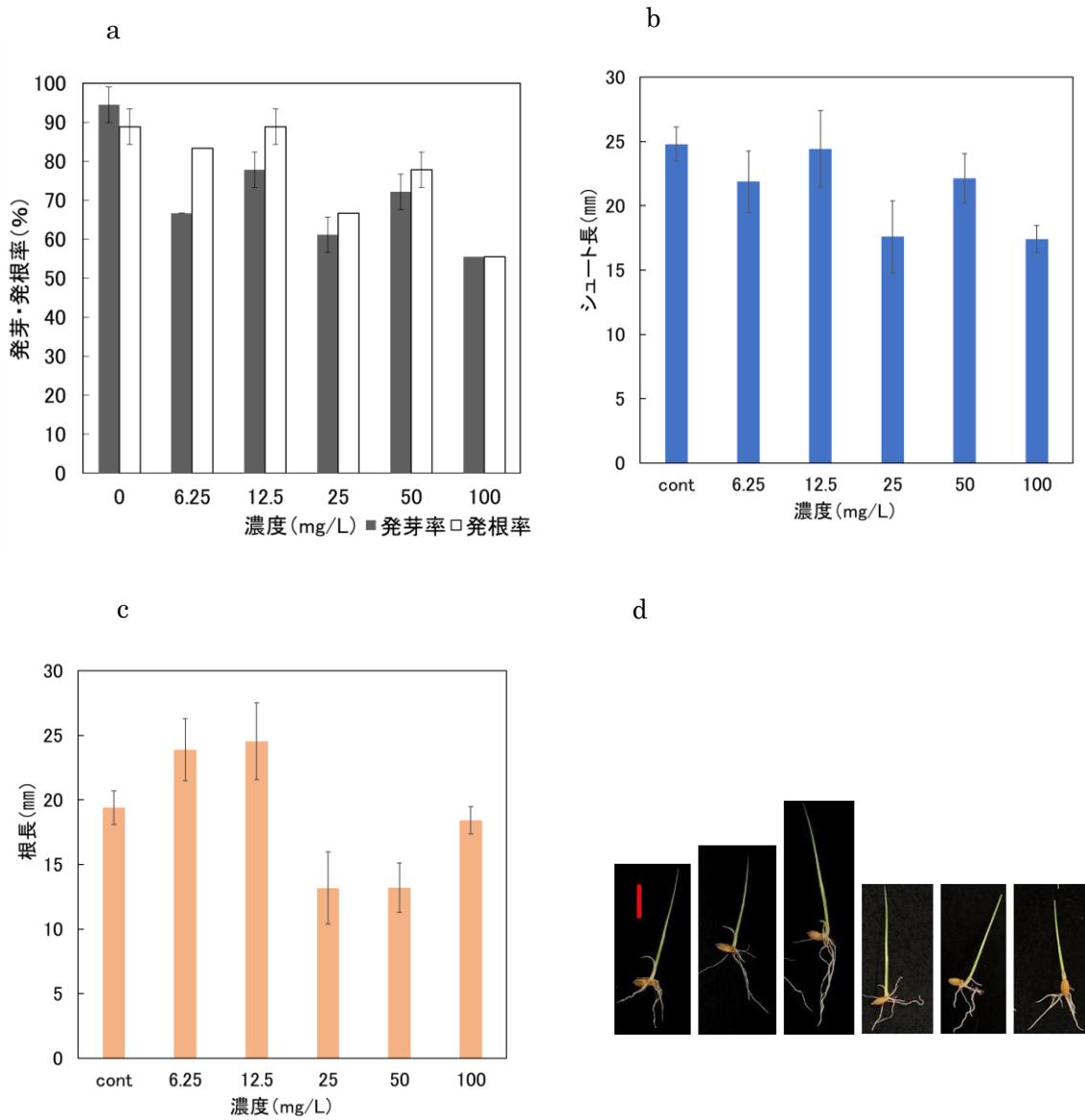


図 3.5 イブプロフェン (6.25,12.5,25,50,100mg/L) ばく露 5 日目の阻害試験結果

a:発芽・発根率 b:シュート長 c:根長 d:形態比較 (bar=10mm)

n=3、エラーバーは標準誤差を示す。

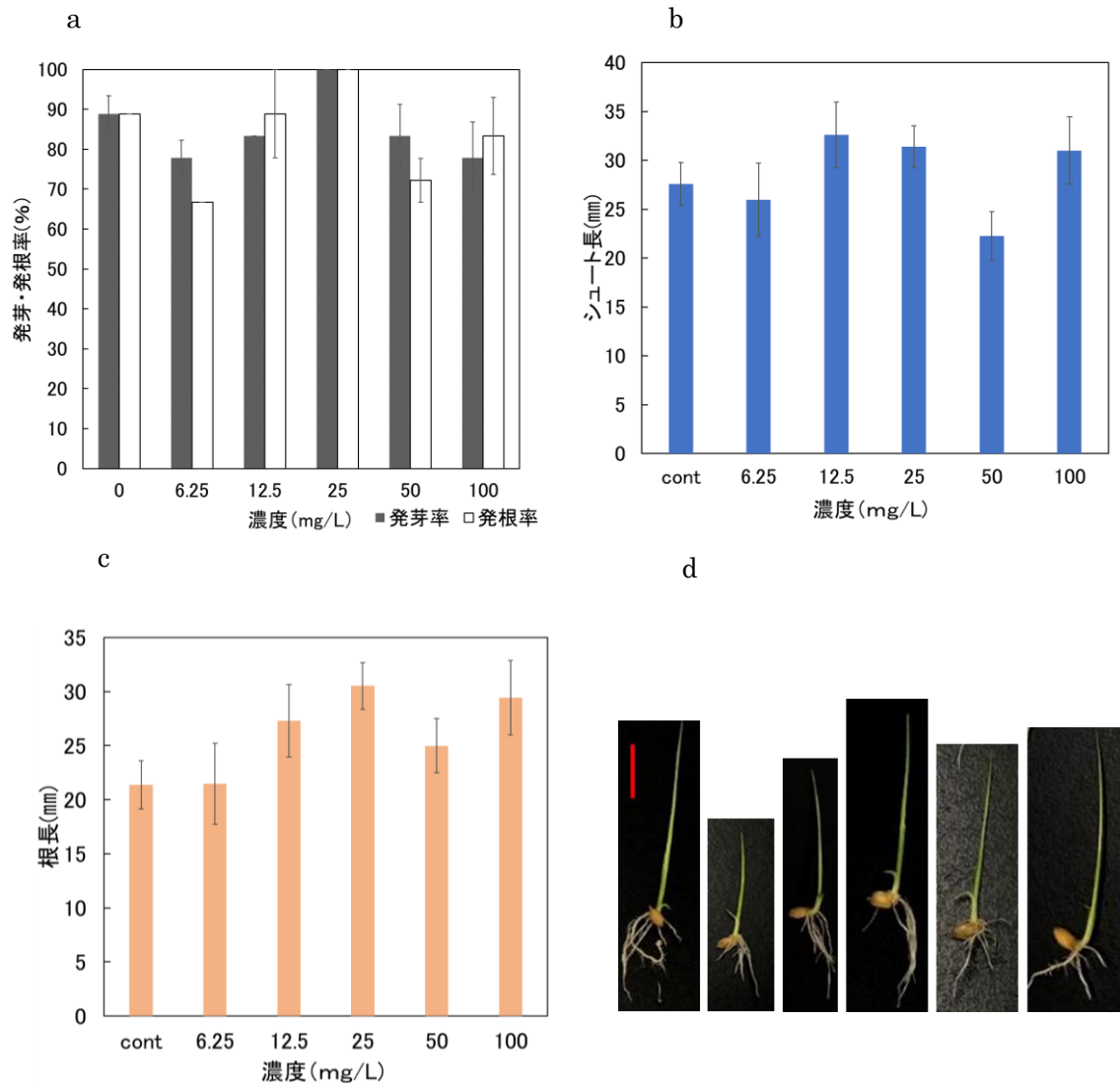


図 3.6 ケトプロフェン (6.25,12.5,25,50,100mg/L) ばく露 5 日目の阻害試験結果

a:発芽・発根率 b:シュート長 c:根長 d:形態比較 (bar=10mm)

n=3、エラーバーは標準誤差を示す。

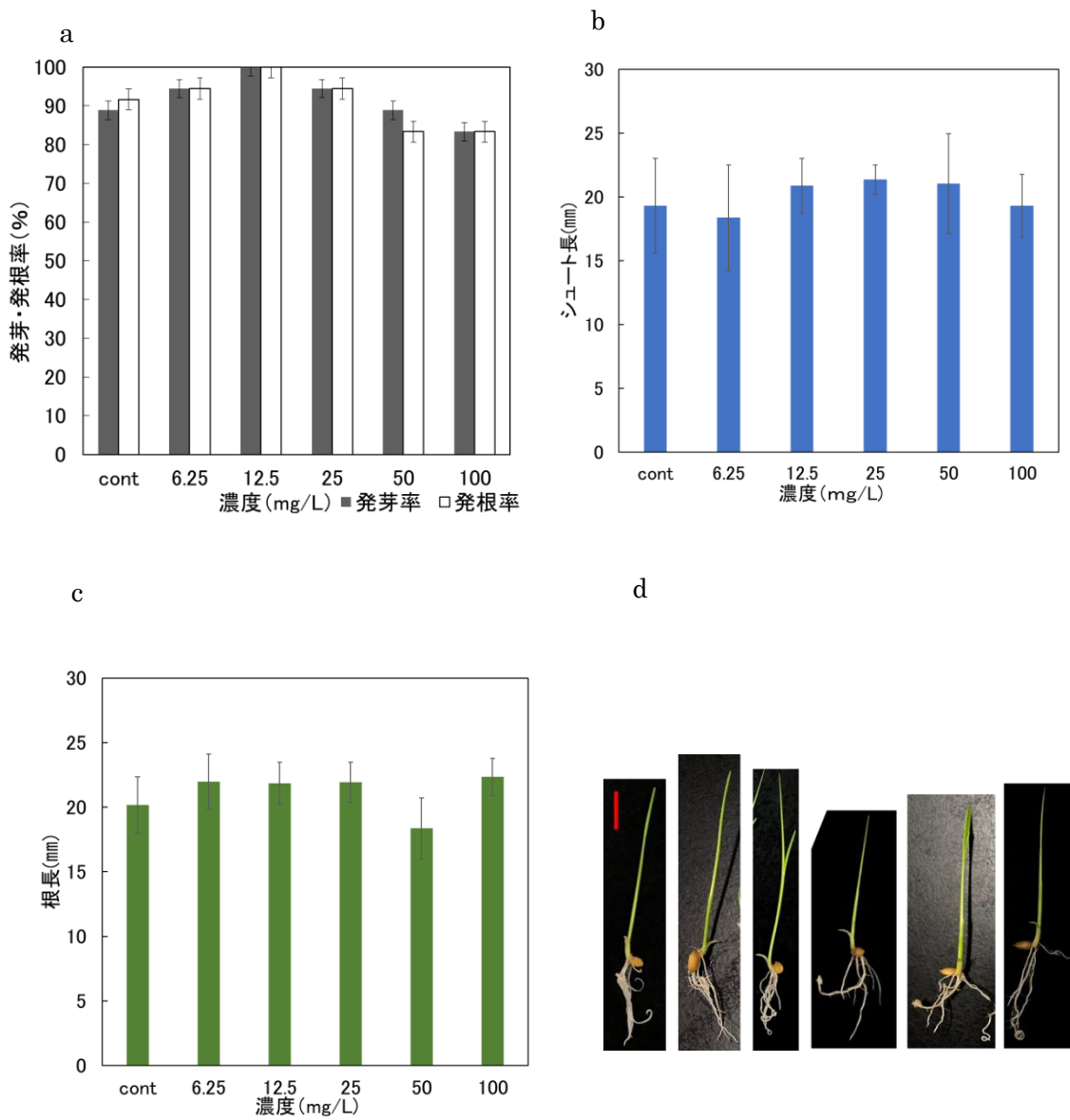


図 3.7 アセトアミノフェン (6.25,12.5,25,50,100mg/L) ばく露 5 日目の阻害試験結果

a:発芽・発根率 b:シュート長 c:根長 d:形態比較 (bar=10mm)

n=3、エラーバーは標準誤差を示す。

インドメタシンのばく露は、低濃度域（6.25～12.5 mg/L）で根の伸長を促進し、高濃度域（50～100 mg/L）で根の伸長を抑制した。対照区では根長平均は 19 mm であったのが、ばく露区では、インドメタシン濃度 6.25 mg/L の場合 31.3 mm、12.5 mg/L の場合 24.6 mm であり、インドメタシン濃度 50 mg/L および 100 mg/L では約 6 mm であった（図 3.3）。エトドラクのばく露は、インドメタシンのばく露結果と同様に低濃度域（6.25～12.5 mg/L）で根の伸長を促進し、高濃度域（50～100 mg/L）で根の伸長を抑制した。対照区では根長平均は 12 mm であったが、ばく露区では、エトドラク濃度 6.25 mg/L の場合 20.6 mm、12.5 mg/L の場合 23.6 mm であった。エトドラク濃度 100 mg/L の場合、根長は 5.8 mm であった（図 3.4）。また、発根率も濃度依存的に減少した。イブプロフェンのばく露もまた、低濃度域（6.25～12.5 mg/L）で根の伸長を促進し、高濃度域（25 mg/L 以上）で根の伸長を抑制した。対照区では根長平均は 19 mm であったが、ばく露区では、イブプロフェン濃度 6.25 mg/L の場合 23.9 mm であり、12.5 mg/L の場合 24.5 mm であった。イブプロフェン濃度 25 mg/L および 50 mg/L の場合、根長は 13.2 mm であった（図 3.6）。

一方で、ケトプロフェンは、高濃度域において根長平均が増加し抑制影響は全濃度区において見られなかった。対照区では根長平均は 21.4 mm であったが、ばく露区ではケトプロフェン濃度 25 mg/L の場合 30.5 mm であり、100 mg/L の場合で 29.4 mm であった。また、ネガティブコントロールとして用いたアセトアミノフェンのばく露は、根の生長に大きな影響を与えなかった。対照区では根長平均は 20.2 mm であったが、ばく露区では、根長平均は 18.4 mm～22.4 mm であった（図 3.7）。

根長抑制影響が観察されなかったケトプロフェンに関して、高濃度域（12.5,50,200 mg/L）でのばく露試験を行ったところ、200 mg/L の場合でも根の生長に対する抑制影響は観察されなかった（図 3.8）。

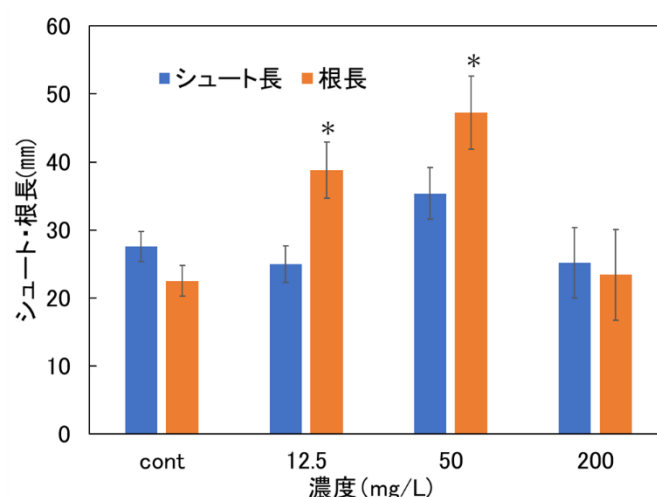


図 3.8 ケトプロフェン(12.5,50,200 mg/L) ばく露阻害試験結果 (シュート長・根長)

エラーバーは標準誤差。

Dunnett 検定により control と比較した場合の p 値を算出した* p<0.05

3.4. 考察

イネを用いた影響評価試験法（発芽発根阻害試験・成長影響試験）を開発した

基準物質 2,4-D のばく露試験の結果、根長を濃度依存的に抑制した。これは、人工オーキシシン 2,4-D の既知の事実（オーキシシンの外生投与による根長抑制作用）と一致し、先行研究と同等レベルでの影響であることを確認した（Inukai et al.,2005）。従って、OECD のテストガイドラインよりも簡便化したこの発芽発根阻害試験および成長影響評価試験が試験可能だと結論した。しかし、試験法として確立するためには TG208 と比較した正当性の検証や長期ばく露による影響評価・試験条件の詳細な検討などさらなる研究が必要である。

また、当研究室で行われた双子葉植物において行った成長阻害試験では、低濃度ばく露による根長の伸長作用は確認されなかった。オーキシシンの生合成を阻害するアリールオキシフェノキシプロピオン酸（AOPP）群の1つジクロホップメチルは、広葉植物では耐性を有するが、イネ科植物では感受性が見られる（Burton et al., 1989）。また、同様にオーキシシン攪乱作用のある除草剤のキンクロラックは、イネ科のなかでも、感受性植物と耐性植物に分類される（Koo et al,1991）。このように、植物の科や属の違いによって、オーキシシンの感受性も異なることが知られており、本試験と過去の知見との相違は、単子葉植物と双子葉植物間での感受性差によるものだと考えられる。

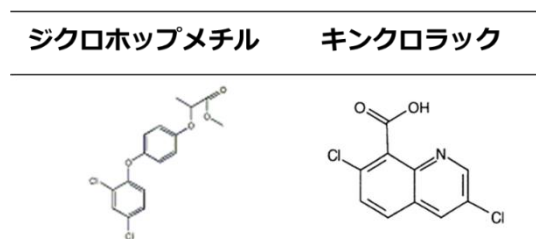


図 3.11 ジクロホップメチル・キンクロラック 化学構造

インドメタシン・エトドラクがイネに強い影響を与えた

本試験でのインドメタシンとエトドラクの低濃度域ばく露は、根長の伸長促進作用を示し、高濃度で根長を抑制した。また、イブプロフェンにおいても同傾向であるが影響は小さく、ケトプロフェンに関しては影響が認められなかった。従って、イネにおいては NSAIDs の中でもアリール酢酸系（インドメタシン・エトドラク）が強く影響することが示唆された。プロピオン酸系（イブプロフェン・ケトプロフェン）と比較してアリール酢酸系の化学構造は複雑であることで、オーキシシンの受容体と結合しやすくなったと考えられる。

インドメタシンとエトドラクはオーキシシン攪乱作用を示す可能性がある

一般毒性は、濃度依存的な根長抑制を示すため、インドメタシンとエトドラクのばく露による根長促進作用はオーキシシン攪乱作用である可能性が示唆された。イネのオーキシシン合成阻害剤（オーキシシン攪乱物質）の低濃度処理による根の伸長、側根数の減少、高濃度処理による根およびシュートの伸長阻害、冠根数の減少はオーキシシン欠損表現型の特徴的な性質である（Akani et al., 2009 ; 中村ら, 2015）という報告がある。これら、オーキシシンの攪乱作用をもつ物質の示すイネの形態と本試験のインドメタシンとエトドラクばく露による形態と一致しているため、この根長促進作用はオーキシシン攪乱作用を評価する上で重要な項目になると考えられる。

本研究において、ネガティブコントロールとして用いたアセトアミノフェンは、オーキシシンやNSAIDsとは構造が異なっており、カルボキシル基をもたない。オーキシシン作用を示す化合物の特徴の1つ、オーキシシン基本構造にはカルボキシル基があるため、オーキシシン受容体の活性部位に結合出来ず、オーキシシンの攪乱作用を示さなかったのだと考えられる。

4. カルスを用いた組織誘導試験

4-1 目的

イネを用いた発芽発根阻害試験・成長影響試験の結果から、NSAIDs がオーキシン攪乱作用を示す可能性が示唆されたものの、NSAIDs の一般毒性として作用も完全には排除できない。そこで、植物ホルモンの組織分化誘導能を利用した、イネカルス細胞を用いた組織分化影響評価試験の確立を目指した。また、NSAIDs (インドメタシン、エトドラク) の影響評価を確立した試験法を用いて行う。

4-2 材料・方法

4-2-1.材料

カルスは、発芽発根試験同様に平成 28 年度産の日本晴 (*Oryza sativa*. L cv Nipponbare) の種子から作出したものを用いた。

4-2.2 カルスの誘導・培養

イネの種子 (発芽発根試験で用いたものと同じ種子) をもみすり器 TR-130 (ケツト科学研究所) で少量ずつ脱穀し、緑がかったものや未熟種子を除き、完熟種子を選抜した。この種子を 50 ml コニカルチューブに入れて蒸留水で 3 度洗浄後、30%次亜塩素酸ナトリウム溶液 (Wako) を加えローテーターで回転攪拌しながら 20 分滅菌した。滅菌後、種子を滅菌蒸留水で洗浄し、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を 2 mg/L 含む固形カルス培養培地 (表 4.1) (pH5.7±0.1) に 10~12 粒ずつ播種した。そして、室内の 30℃明条件に設定したインキュベーターを使用し、2 週間に 1 回培地交換をしつつ、1 ヶ月培養した。増殖したカルスを種子から取り、カルスのみを新しい培地に移した。カルス増殖のため、28℃明条件で 1 週間~10 日間培養した。

表 4.1 カルス培養培地

ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (Wako)	4.6 g
MS ビタミン	1 ml
Myo-inositol	100 mg
スクロース	30 g
2,4-D	2 mg
+MilliQ up to	1000 ml

pH 調整後、ゲランガム (ナカイテラスク) 2 g、硫酸マグネシウム (Wako) 1 g を加えた。

4-2-3.カルスの再分化・再分化培地の検討

作出したカルスの再分化条件を検討する目的で、植物ホルモン（オーキシシン：2,4-D もしくはナフタレン酢酸（NAA）、サイトカイニン：ベンジルアミノプリン（BAP）の添加量を検討した。過去の知見（Ebiamadon et al., 1990 ; Kawakami et al., 1995）を参考に植物ホルモンを表 4.3 の濃度で添加し、2 週間～3 週間目の分化率を計測した。反復は 2 プレートで行った。

表 4.2 植物ホルモン 添加量

		濃度(mg/L)				
2,4-D (オーキシシン)	0	0.05	0.1		0.2	
BAP (サイトカイニン)	2	1	1	0	1	2

4-2-4.医薬品ばく露方法の検討

1. 固形培地法

2,4-D 0.2 mg/L BAP 2 mg/L を加えた再分化培地 (1) (pH5.7±0.1、ゲランガム 2g、硫酸マグネシウム 1g) を 24 穴プレートに分注し、継代しているカルスを 1 ウェルあたり 1 塊（直径約 2mm）ずつ移植した。ばく露溶液の pH 調節が出来ないため、ばくストックは、DMSO（最終添加濃度 0.1%以下）で溶解させた 10 mg/ml のストックを作成した。そして、インドメタシン 2.5 mg/L, 5 mg/L, 20 mg/L のばく露溶液を各ウェル 50 µl 添加し、1 濃度区あたり 12 ウェル用いた。

また、再分化培地 (2) (表 4.3) を用いたばく露では、12 穴プレートに分注し、同様にカルスを移植した。DMSO で溶解させたストックを用いて、インドメタシン 6.25, 12.5 mg/L、エトドラク 3.125, 6.25, 12.5 mg/L、アセトアミノフェン 6.25, 12.5 mg/L のばく露溶液を各ウェル 100 µl 添加し、1 濃度区あたり 6 ウェル使用した。また、コントロールには DMSO 0.1%の滅菌 MilliQ 水を添加した。

2. 液体培地法

液体の再分化培地 (2) に NaOH で溶解させたストックを用いて、インドメタシン 6.25, 12.5 mg/L、エトドラク 3.125, 6.25, 12.5 mg/L、アセトアミノフェン 6.25, 12.5 mg/L のばく露溶液を添加して、pH を pH5.7±0.1 に調節した。ばく露溶液が添加された培地を 12 穴プレートに 1 濃度区あたり 6 ウェル分注し、1.同様にカルスを移植した。また、コントロールには DMSO 0.1%の滅菌 MilliQ 水を添加した。

4-3. 結果

2,4-D 0.2 mg/L BAP 2 mg/L で培養したカルスの再分化率は 14 日目で 30.8%、21 日目で 42.3%であり、最も高かった（表 4.3）。また、BAP 存在下で誘導後 21 日目の再分化率は BAP 欠損培地に比較して 1 mg/L 添加でおよそ 1.3 倍に、2 mg/L 添加でおよそ 2.3 倍に向上した。さらに、オーキシシン（2 mg/L）を含む誘導培地から、低オーキシシン濃度培地に移植ことで再分化が誘導された。また、サイトカイニンを多く含む培地では、シュートの分化が多く観察され、BAP 2 mg/L 添加培地では 14 日目でシュートの分化率 20.0~27.3 %、21 日目で 40.0~45.5 %であった。

表 4.3 再分化培地に添加した植物ホルモン量と移植後 14 日目・21 日目のルート分化率

植物ホルモン (mg/L)		分化率 \pm S.E.(%)	
2,4-D	BAP	14 日目	21 日目
0.0	2.0	10.0 \pm 5.0	12.5 \pm 4.2
0.05	1.0	0.0	7.5 \pm 4.2
0.1	1.0	0.0	7.5 \pm 2.2
0.2	0.0	15.9 \pm 6.72	18.2 \pm 8.5
	1.0	21.1 \pm 5.5	23.2 \pm 9.2
	2.0	30.8 \pm 9.19	42.3 \pm 0.3

2,4-D 0.2 mg/L BAP 2 mg/L の添加培地が最も高い分化誘導率を示したため、この濃度設定を組織誘導条件とした。しかし、当該条件再分化培地（1）を用いて、インドメタシンのばく露試験（固形培地へのばく露）を行ったところ、ばく露区および対照区において組織分化は全く観察されなかった。

よって、他の知見（Kawakami et al., 1995 ; 石黒、富澤, 2012）を参考に再度再分化培地の検討を行った。植物ホルモンは、オーキシシン(NAA) 0.002 mg/L、サイトカイニン(BAP) 2 mg/L（もしくは 0 mg/L）添加し、再分化培地（2）（pH5.7 \pm 0.1）を作成した（表 4.4）。反復は 2 プレートで行い、再分化率を計測した。

表 4.4 再分化培地 (2)

ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類	4.6g
MS ビタミン	1 ml
スクロース	30 g
D-ソルビトール (TCI)	30 g
Casamino acid (BD)	2 g
Myo-inositol	100 mg
+MilliQ up to	1000 ml

pH 調整後、固形培地の場合、ゲランガム 2 g、硫酸マグネシウム 1 g を加えた。

再分化培地 (1) と比較し、再分化培地 (2) では BAP 2 mg/L 添加培地でのルート再分化率が 14 日目で 4%、21 日目で 16% であり、BAP 欠損培地の再分化率は 14 日で 23 %、21 日で 36% であった (表 4.5, 図 4.1)。シュートの分化率は BAP 添加により向上したが、根の分化率は BAP 欠損培地で 36% であり、BAP 添加培地より高かった。NAA0.002-BAP 欠損培地を組織誘導条件とした。

表 4.5 再分化培地 (2) 移植後 14 日目・21 日目の再分化率

植物ホルモン (mg/L)		分化率±S.E.(%)			
BAP(2)		14 日目		21 日目	
NAA 0.002	あり	Root	3.9±0.05	Root	15.5±5.3
		Shoot	37.4±4.7	Shoot	64.7±0.5
	なし	Root	23.0±2.1	Root	36.3±5.5
		Shoot	3.85±0.1	Shoot	15.4±3.2

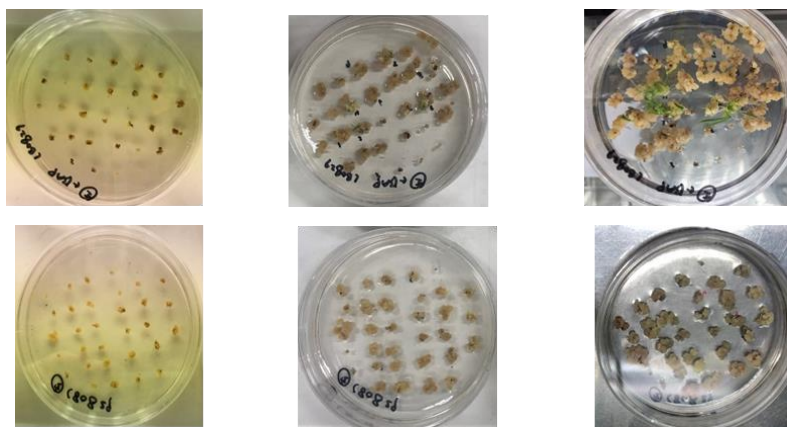


図 4.1 再分化培地 (2) 移植時 (左)、14 日目 (中央)、21 日目 (右) の形態
上段 BAP 2 mg/L 添加培地、下段 BAP 欠損培地。

ばく露方法に関して、固形培地を用いたばく露方法（1.）と、液体培地を用いたばく露方法（2.）を検討した結果、液体培養を行ったカルスについては、滅菌が上手くいかず、コンタミネーションをおこしてしまう個体が多く見られた。従って、固形培地に添加するばく露方法（1.）を用いることとした。

また再分化培地の NAA の添加量を 0.02 mgにする（オーキシンの濃度を濃くする）と、再分化率（ルート）は 14 日目および 21 日目で 25%であり、オーキシンの濃度が濃くなると再分化が起りにくくなることが確かめられた（表 4.6）。同時に、エトドラク 3.125, 6.25, 12.5 mg/L でばく露を行ったところ、濃度に依存して再分化率が低下したが、カルスの増殖は確認できた（表 4.6, 図 4.2）。

表 4.6 再分化培地（NAA 0.02 mg/L）に移植し
エトドラクをばく露した 14 日目、21 日目の再分化率

植物ホルモン (mg/L)	医薬品(mg/L) エトドラク	分化率(%)			
		14 日目		21 日目	
		Root	Shoot	Root	Shoot
NAA 0.02	0	25.0	8.3	25.0	16.7
	3.125	8.3	0.0	16.7	0.0
	6.25	0.0	0.0	8.3	0.0
	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0

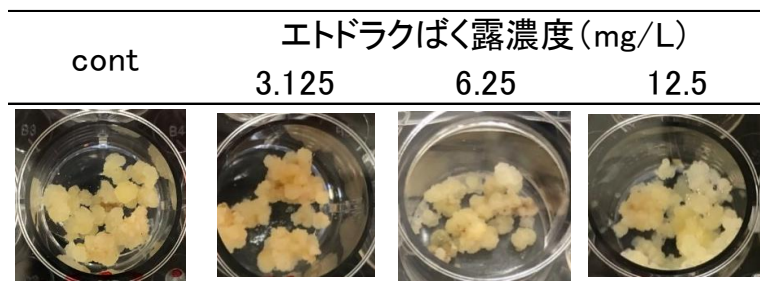


図 4.2 エトドラクばく露 21 日目のカルス増殖量比較

NAA0.002 mg/L- BAP 欠損培地を用いて、インドメタシン 6.25,12.5 mg/L、エトドラク 3.125,6.25 mg/L、アセトアミノフェン 6.25,12.5 mg/L をばく露した。インドメタシン、エトドラクにおいてシュートおよびルートどちらの分化率も著しく低下し、21 日目のコントロールのルート分化率が 72.2%であるのに対し、エトドラク 3.125mg/L ばく露のルート分化率は 8.3%であり、ほとんどの個体がカルスの状態で増殖していた（表 4.7）（図 4.3）。それに対して、アセトアミノフェンにおいては 6.25mg/L ばく露の 21 日目の再ルート分化率は 66.7%、12.5mg/L でも 33.3%であり、再分化が確認できた。

また、1 ウェルあたりのカルスの生重量を計測したところ、コントロールの生重量平均が500 mgに対し、全てのばく露区についてカルスの量は同等(455~482 mg)であった(図 4.4)。増殖したカルスの1粒当たりの重さがおよそ 20 mg であった。

表 4.7 インドメタシン、エトドラク、アセトアミノフェンばく露による
14 日目、21 日目、28 日目の再分化率

<シュート分化率>

植物ホルモン (mg/L)	医薬品(mg/L)	分化率 (%)		
		14 日目	21 日目	28 日目
NAA 0.002	cont	50.0	58.3	75.0
	インドメタシン	6.25	0.0	0.0
		12.5	8.3	8.3
	エトドラク	3.125	0.0	0.0
		6.25	0.0	0.0
	アセトアミノフェン	6.25	33.3	33.3
12.5		66.7	66.7	

<ルート分化率>

植物ホルモン (mg/L)	医薬品(mg/L)	分化率 (%)		
		14 日目	21 日目	28 日目
NAA 0.002	cont	41.7	72.2	83.3
	インドメタシン	6.25	0.0	0.0
		12.5	0.0	0.0
	エトドラク	3.125	0.0	8.3
		6.25	0.0	0.0
	アセトアミノフェン	6.25	66.7	66.7
12.5		0.0	33.3	

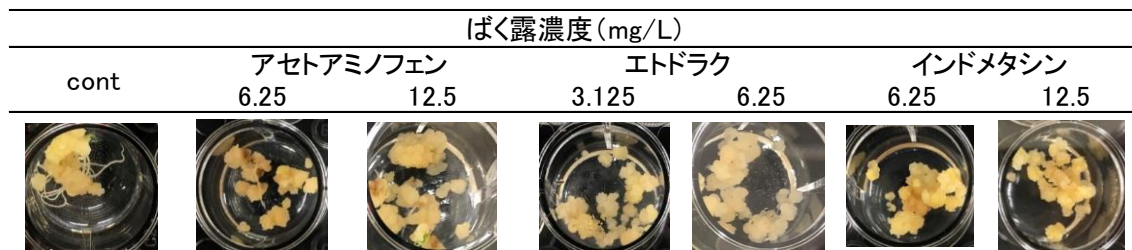


図 4.3 インドメタシン、エトドラク、アセトアミノフェンばく露による
21 日目の再分化の様子

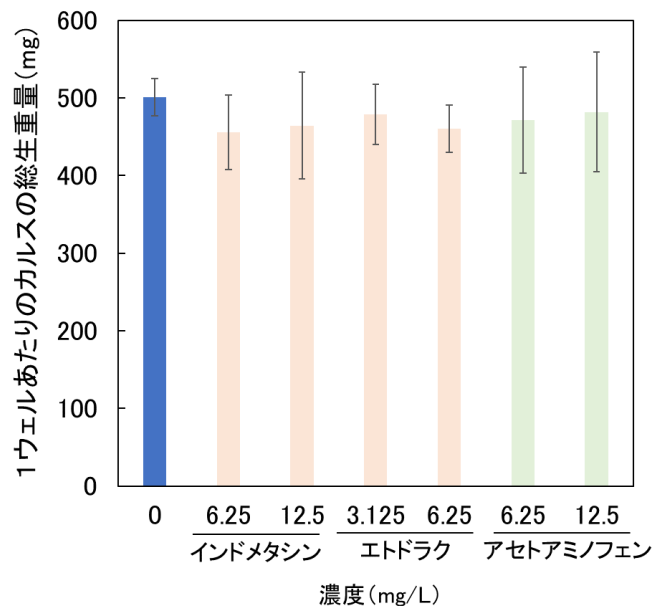


図 4.4 インドメタシン、エトドラク、アセトアミノフェンばく露による
28 日目の 1 ウェルあたりのカルス生重量

4-4. 考察

カルスを用いた組織誘導試験を開発した

NAA0.002 mg/L・BAP 欠損の固形の再分化培地において NSAIDs のインドメタシンおよびエトドラク、アセトアミノフェンのばく露を行った結果、インドメタシンやエトドラクにおいては、アセトアミノフェンやコントロールと異なる形態形成が観察された。また、カルスの増殖を数値化するために生重量を計測し、比較することができた。従って、カルスを用いた組織誘導試験が開発可能であると結論した。しかし、再分化培地の組成やばく露方法の検討を行ったが、期間が 3 週間程度と長く、濃度保持の観点で未だ懸念はある。また、カルス 1 塊あたりの重さも 20mg と重く、生重量の計測も精密には行えない。従って、今後評価法として利用するためには、より詳細な研究が必要である。

再分化培地の検討で行った、2,4-D 0.2 mg/L BAP 2 mg/L の添加した再分化培地 (1) を用いたインドメタシンのばく露試験において、ばく露区および対照区において組織分化は全く観察されなかった。再分化は増殖能の高い生産されたばかりの新鮮なカルスであるか否によって大きく左右される (大源ら., 1995) と報告されていることから、移植したカルスの状態に原因があったと考察した。従って、カルス培養培地から再分化培地 (2) に移植する前に、新しいカルス培養培地に移植し 7 日間培養させ、増殖しているものを選抜する過程を加えた。

インドメタシン・エトドラクは一般毒性とは異なるホルモン攪乱作用を示した

再分化培地を用いた、インドメタシン、エトドラク、アセトアミノフェンのばく露試験においてカルスの生重量を比較したところ、インドメタシンやエトドラクはカルスの増殖には影響していなかった。このことから、一般毒性の作用がないことが示唆された。しかし、分化を顕著に抑制したため、オーキシン攪乱作用があることが示唆された。

双子葉植物のニンジン¹のカルスを用いた当研究室での先行研究では、NSAIDs²ばく露によって再分化が促進された。また、イネを用いた成長影響試験の結果もふまえて、インドメタシンやエトドラクはオーキシンのアンタゴニストであると予測した。従って、このカルスを用いた本試験において、それらの NSAIDs をばく露すると、ニンジンと同様に再分化が促進され、コントロールよりも分化が早まると仮説をたてた。しかし本実験では、インドメタシンとエトドラクのばく露においては分化が抑えられ、カルスは増殖する結果であった。また、培地内のオーキシン量を増やした場合にカルスの再分化も遅くなったため、ばく露により分化ではなくカルスの増殖が観察されたことは、仮説と反する結果になった。

カルスは、サイトカイニンのオーキシン制御や外部処理のオーキシン量の低下により、再分化が引き起こされる。(Iwase et al., 2011 ; Pernisová et al., 2009)。カルスにオーキシン輸送阻害剤 NPA を処理したところ、カルスの表面細胞層のオーキシン応答領域が未分化のカルスと類似し、再分化時に誘発される遺伝子の発現が抑えられた (Cheng et al., 2013) という報告もある。すなわち、オーキシンの輸送阻害がおこるとカルスの再分化が抑制される。

従って、本実験においてインドメタシンやエトドラクは、オーキシンアンタゴニストとして機能することでカルス内のオーキシン濃度をコントロールよりも低下させ、その結果根が分化するオーキシン/サイトカイニン比から外れ、カルスは組織に分化することなくカルスのまま増殖したのだと考えた。また、この作用は、再分化開始時に増加する内生オーキシン量を抑制することにもつながっている。本実験において、インドメタシンやエトドラクのばく露により再分化が抑制された結果においても、これらの物質にオーキシンアンタゴニスト作用があることを示唆できる結果だと考えた。

また、イネカルスにおいてオーキシンが過剰な培地に長期間培養すると再分化能が低下し、再分化がほとんどおこらなくなる (前田, 2000) という報告がある。しかし、エトドラク 6.125、12.5mg/L で約 1 か月間培養したカルスを再分化培地に移植したところ、再分化は活発に行われていた。このことから、再分化培地内のオーキシン量が高濃度になった、つまりエトドラクがオーキシンアンタゴニスト作用を示していないことが示唆された。

5. イネ Oc 培養細胞を用いた細胞増殖試験

5-1. 目的

イネ Oc 培養細胞 (Baba et al., 1986) *Oryza sativa* L. C5924 は、オーキシン存在下のみで増殖が可能な突然変異株で、分化能力も有しない。このイネ Oc 培養細胞を用いれば、オーキシン攪乱物質の検出が発芽発根試験やカルス試験に比較して容易にでき、かつ対象化学物質の作用機序解明 (アゴニスト (作用促進) であるのか、アンタゴニスト (作用阻害) であるのか) を行える。よって本章では、イネ Oc 培養細胞を用いたオーキシン攪乱物質の簡易スクリーニング法の開発を行った。本試験法は、オーキシン添加培地と無添加培地の 2 つの試験からなっており、原理的にオーキシン添加培地では、アンタゴニストの検出、無添加培地では、アゴニストの検出が可能であると考えられる。

5-2. 材料・方法

5-2-1.材料

本実験は、イネ Oc 培養細胞 (Baba et al., 1986) *Oryza sativa* L. C5924 という種から作られたサスペンションカルチャー (理化学研究所から分譲) を用いて行った。

5-2-2.Oc 培養細胞培養

培養細胞は細胞間接着が弱く、カルスのように再分化せず細胞塊のまま増殖を続ける懸濁細胞である。スモールスケールで培養、試験が行える上に、定期的な継代培養により維持することが出来る。培養方法は理研のプロトコル (http://www.brc.riken.jp/lab/epd/plant/c107_method.php?file=1548324166_21669800.log) を参考に行った。300 ml の三角フラスコに 2,4-D を終濃度 0.2 mg/L になるように添加した MS 培地を 80 ml 分注し、イネ Oc 培養細胞を 8ml 加え継代した。26°C 暗所 120rpm で振とうさせ、7 日間培養した後継代した。

5-2-3.前培養

培養した細胞を攪拌させ、300ml のフラスコに 8ml 採取した。30ml の MS 培地を加え、よく攪拌させピペットを用いて培地を捨てた。この洗浄操作を 3 回繰り返した。この洗浄だけでは、2,4-D を添加していない MS 培地 (オーキシン無添加培地) で培養したものと、2,4-D を添加した MS 培地 (オーキシン添加培地) で培養したものと 1 週間後の細胞増殖に差は見られなかった。従って、80 ml の MS 培地を加え、7 日間の前培養を行った。このオーキシン無添加培地で 7 日間培養したものを試験に用いた。

5-2-4.前培養 (2)

理研の小林研究員のプロトコル (付録 1) を参考に行った。培養した細胞を静置し、沈殿した懸濁培養細胞 9 ml を 15 ml コニカルチューブに採取した。100×g で 5 分遠心した後、上清を捨て、細胞量 (PCV ; packed cell volume) が約 2 ml になるように調節した。10 ml の MS 培地を加え、よく攪拌し再度 100×g で 4 分間遠心し、上清を捨てた (洗浄)。この洗浄を 10 回繰り返した。60ml のオーキシン添加および無添加培地を 300 ml 三角フラスコに移植した。上記同様の培養条件で 7 日間培養した。よく攪拌した後、4 ml の細胞懸濁液を採取した。100×g で 5 分間遠心分離後、細胞量と乾燥重量を測定した。

上記のオーキシン無添加培地で 7 日間培養した細胞を攪拌させ 6 ml 採取し、60 ml の新しい MS 培地の入ったフラスコに移植した。移植方法を 2 通り設定し、①オーキシン無添加培地 (MS 培地) から MS 培地に移植、②オーキシン無添加培地からオーキシン添加培地に移植した。①、②各 3 本ずつ 7 日間培養した。よく攪拌した後、4 ml 細胞懸濁液を採取した。100×g で 5 分間遠心分離した後、細胞量を計測した

5-2-5.化学物質ばく露・重量計測

カルスを用いた組織誘導試験と同様に DMSO (最終添加濃度 0.1%以下) で溶解させた 10 mg/ml のストックを作成し、化学物質を MS 培地 (±2,4-D) に添加し、1 濃度あたり 3 連でばく露試験を行った。ばく露した化学物質は NASIDs のインドメタシン 6.25,12.5,25 mg/L、エトドラク 6.25mg/L、ネガティブコントロールのアセトアミノフェン 6.25 mg/L、オーキシンアゴニストのナフチル酢酸 NAA 1 mg/L である。

イネ Oc 培養細胞は、直径 20-30 μm 程度であり、集合体をつくりやすいため、濁度計による細胞数の計測が行えなかった。そこで (酒井, 2008 ; Yamazaki et al.,2009) のプロトコルを参考に湿重量、乾燥重量測定を行った。事前に孔径 μm の 47mm のガラスフィルター-GA-100 (ADVANTEC) を 1 枚ずつアルミホイルで包み、100℃のオーブンで 1 時間乾燥させその後デシケーターで吸湿した。ばく露後 5 日目,7 日目に各フラスコから 5 ml 採取し、乾燥させたフィルターを用いて吸引濾過を行った。この操作をフラスコ 1 本あたり 2 回行った。電子天秤で重量を計測し、1ml あたりの湿重量を算出した。また、オーブンでフィルターを 1 時間乾燥させ、電子天秤で重量を計測し、1ml あたりの乾燥重量も算出した。

5-3. 結果

初期細胞乾燥重量が約 1 mg/ml になるように培養を行ったところ、オーキシン添加培地においては 7 日間で初期細胞重量の 8~11 倍に増殖した (図 5.1 a~c)。オーキシン添加培地にインドメタシンを 6.25,12.5,25 mg/L ばく露した結果、オーキシン添加培地において 7 日目の増殖量平均が 8.1 mg/ml であるのに対して、6.25 mg/L ばく露では 4.8 mg/ml、12.5 mg/L では 2.7 mg/ml、25 mg/L では 1.5 mg/ml と細胞の増殖量は減少した (図 5.1a)。また、オーキシン無添加培地にインドメタシンを 6.25,12.5,25 mg/L ばく露した結果、オーキシン無添加培地は 7 日目の増殖量平均が 6.0 mg/ml であるのに対し、6.25 mg/L ばく露では 3.5 mg/ml、12.5 mg/L では 1.9 mg/ml、25 mg/L では 1.1 mg/ml と濃度依存的に細胞の増殖量は減少した (図 5.1b)。エトドラク (ED) とアセトアミノフェン (AA) に関しても同様に、オーキシン無添加培地に 6.25 mg/L ばく露した結果、細胞の増殖量はオーキシン添加培地の 7 日目の増殖量平均が 8.2 mg/ml であるのに対し、エトドラク、アセトアミノフェンともに 4.2 mg/ml であった。従って、エトドラク、アセトアミノフェンのばく露により増殖量は減少した。さらに、オーキシン無添加培地にオーキシンアゴニスト NAA を、オーキシン (2,4-D) 添加培地と同量の 1mg/L ばく露した結果、7 日目の増殖量は 10.1 mg/ml であり、オーキシン添加培地の増殖量 10.8 mg/ml と同程度に回復した (図 5.1c)。

細胞の洗浄を行い、オーキシン無添加培地に移植しても、その時の細胞の状態によって増殖量に差があるものの 2 週間は培養可能であった (図 5.1 b~c 2,4-D 無添加)。また、前培養 (2) を用いてオーキシン無添加培地、オーキシン添加培地で増殖量を比較した結果、オーキシン無添加培地、添加培地ともに 7 日間では細胞量は約 1ml、乾燥重量も 13.4 mg/ml であった (図 5.2 7 日目)。このことから、洗浄方法によらず 7 日間では増殖量の差が現れないことが確認できた。さらに 7 日間培養した結果は、14 日間オーキシン無添加培地で培養した細胞は増殖量が 9.56 mg/ml に、7 日間オーキシン添加培地で培養した細胞は 13.7 mg/ml となり、オーキシン添加により増殖量が回復することが分かった。(図 5.2 14 日目参照)。

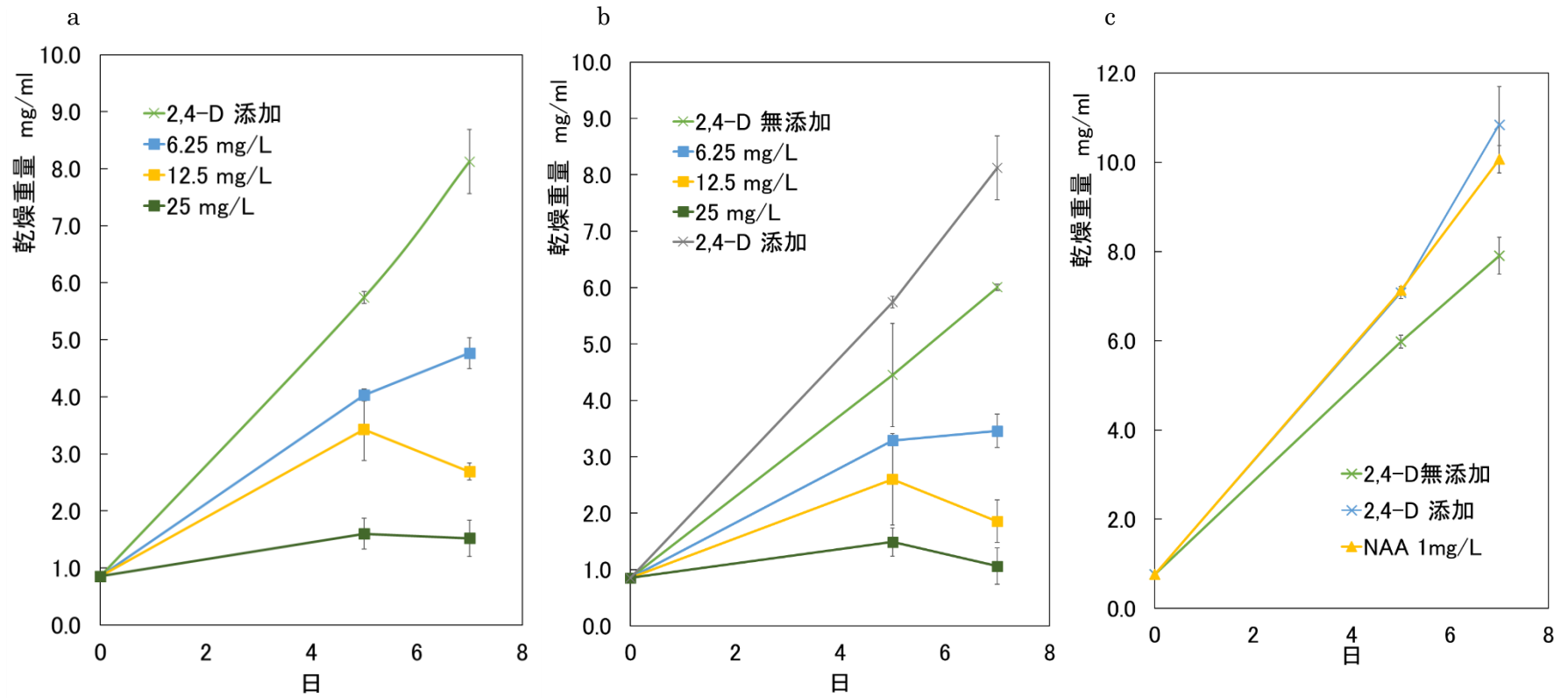


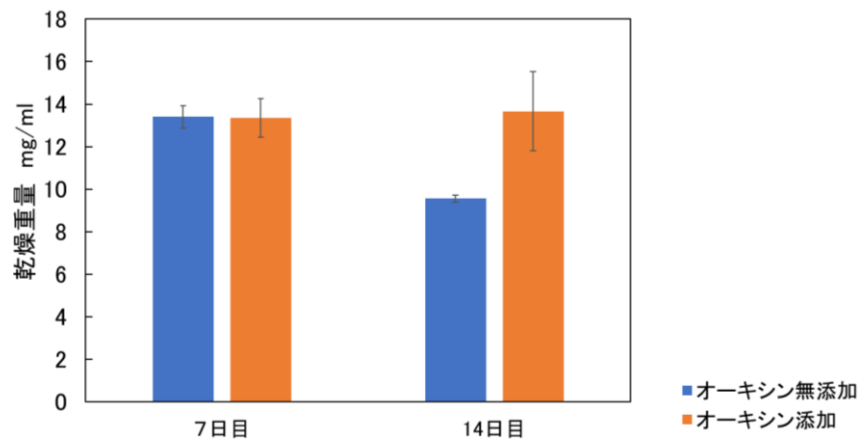
図 5.1 Oc 培養細胞増殖量

a: オーキシン添加培地にインドメタシン 6.25,12.5,25 mg/L ばく露

b: オーキシン無添加培地 (MS 培地) にインドメタシン 6.25,12.5,25 mg/L ばく露

c: オーキシン無添加培地に NAA 1 mg/L ばく露

A



B

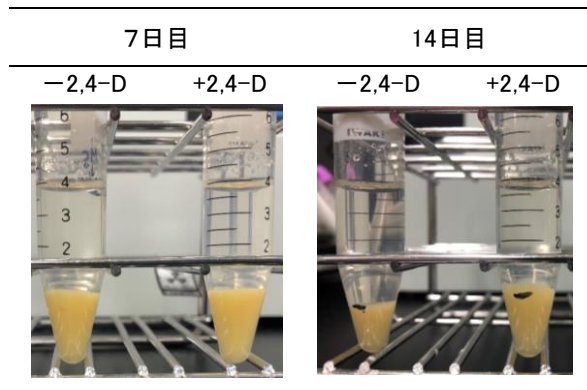


図 5.2 オーキシンの無添加培地、オーキシンの添加培地培養による 7 日目および 14 日目
A:乾燥重量 B:細胞量 (PCV)

5-4. 考察

イネ Oc 培養細胞を用いた細胞増殖試験を開発した

イネ Oc 培養細胞を用いた増殖試験の結果、オーキシシン添加培地に NSAIDs インドメタシンおよびエトドラクを 6.25 mg 添加しても増殖量はオーキシシン添加培地のようには増加せず、濃度依存的に減少した。従って、オーキシシンアゴニストイネやカルスで影響がみられなかった濃度において増殖量の差が認められた。イネのカルスの組織誘導試験と比較して、ばく露方法や培地組成も簡単であり、感度が高くリスクを大きくとらえる（安全側な）簡易スクリーニングに利用できることが示唆された。また、オーキシシン無添加培地にオーキシシンアゴニスト NAA を 1 mg 添加すると増殖量がオーキシシン添加培地と同様に回復したことから、オーキシシンのアゴニスト作用の検出が行えることが示唆された。

開発した試験法を用いて、オーキシシンのアゴニストおよびアンタゴニストが検出できる NSAIDs はオーキシシンアンタゴニストとして作用することが示唆された

イネの発芽発根阻害試験および成長影響評価試験、イネのカルスの組織誘導の結果をふまえてイネ Oc 培養細胞を用いた細胞増殖試験結果を考察すると、オーキシシン添加培地にばく露すると増殖量を抑制する、オーキシシンアンタゴニストの検出が行えることが示唆された。従って、オーキシシンアゴニストおよびアンタゴニストどちらの検出も行えるため、イネ Oc 培養細胞を用いた細胞増殖試験は化学物質の作用機序を解明する試験として使用出来ることが示唆された。このことから、インドメタシンとエトドラクがオーキシシンのアンタゴニストとして作用することが示唆された。

一方で、アセトアミノフェンは、Oc 培養細胞においては 6.25 mg/L のばく露で増殖量に影響を及ぼすことが分かった。アセトアミノフェンばく露による増殖量の減少は、イネの発芽発根や成長、およびカルスの再分化に影響しないという結果も踏まえると、葉害影響と捉えられる。カルス、Oc 培養細胞、植物体と細胞の状態も生長に必要な植物ホルモン、代謝の方法も異なっているため、その形態により影響する濃度が変化するの言うまでもない。この Oc 培養細胞は、植物細胞の有用物質の大量生産や組織特異的な生合成経路の研究に使用されることが多く、イネ Oc 培養細胞自体とオーキシシンの関係については研究されていない。従って、本実験において、アセトアミノフェンが増殖量の低下を引き起こし、インドメタシンが植物体よりも低濃度で増殖阻害を引き起こした理由は、振とう培養という物理的なストレスと外的要因による影響を受けやすい培養細胞は植物体よりも感受性が高いからだと考えられる。また、培地に添加する 2,4-D 量を多くしても増殖量には変化が見られなかったが、培地の量や継代量が増えることによって増殖に大きく差が現れたことから、この Oc 培養細胞は細胞自身から分泌される物質が細胞増殖の促進効果（コンディショニング効果）による影響を強くうけることが分かった。この特徴も Oc 培養細胞が個体や組織と比較して感受性が高い理由であると考えられる。

6. イネを用いた根長回復試験

6-1. 目的

イネ、カルスおよび Oc 培養細胞を用いた影響評価試験の結果から、NSAIDs のオーキシシンアンタゴニストとしての作用をさらに検証するために、イネを用いて人工オーキシシン 2,4-D と NSAIDs の同時ばく露による根長回復性試験の確立を目指した。根長を抑制する濃度の 2,4-D に、根長伸長作用がみられた濃度の NSAIDs (インドメタシン、エトドラク) の同時ばく露を行い、2,4-D の根長伸長抑制作用を阻害するか否か、確立した試験法を用いて NSAIDs の影響評価を行う。

6-2. 材料・方法

6-2-1. 材料

発芽発根試験同様、平成 28 年度産の日本晴 (Oryza sativa. L cv Nipponbare) を用いた。

6-2-2. 方法

低濃度域のインドメタシン (6.25, 12.5, 25 mg/L) と、2,4-D (0.1 mg/L) の混合ばく露溶液を作成し、イネを用いた発芽発根阻害試験・成長影響試験と同様 (3-2-2 参照) にばく露試験を行った。対照実験としてアセトアミノフェン (6.25, 12.5, 25 mg/L) と 2,4-D (0.1 mg/L) の同時ばく露および 2,4-D (0.1 mg/L) の単独ばく露試験を行った。

6-3. 結果

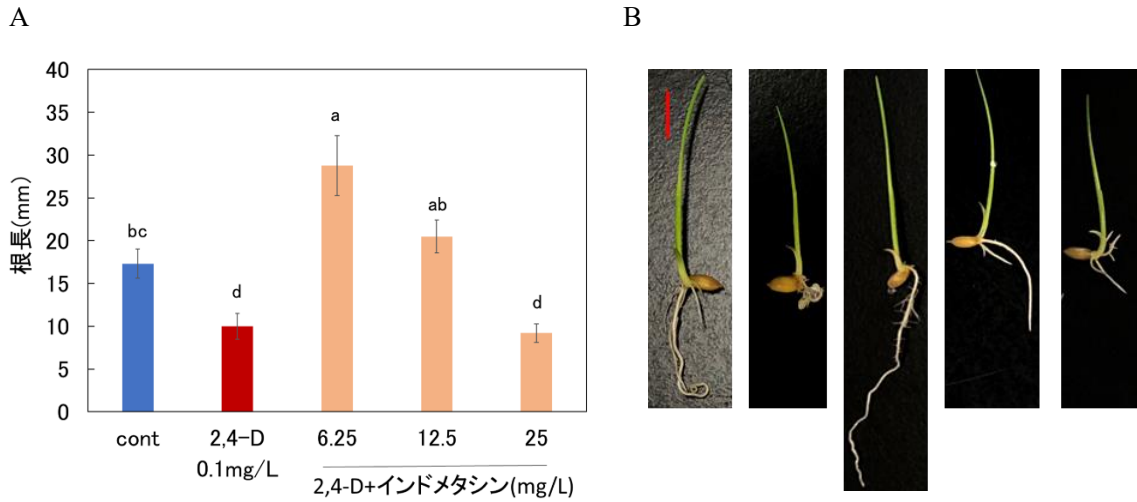


図 6.1 2,4-D (0.1 mg/L)とインドメタシン(6.25,12.5,25 mg/L) 同時ばく露試験 (5 日目)

A : 根長比較 B : 形態比較 エラーバーは標準誤差を示す。

TUKEY の多重比較検定の結果、異なるアルファベット間に 5%水準の有意差あり。

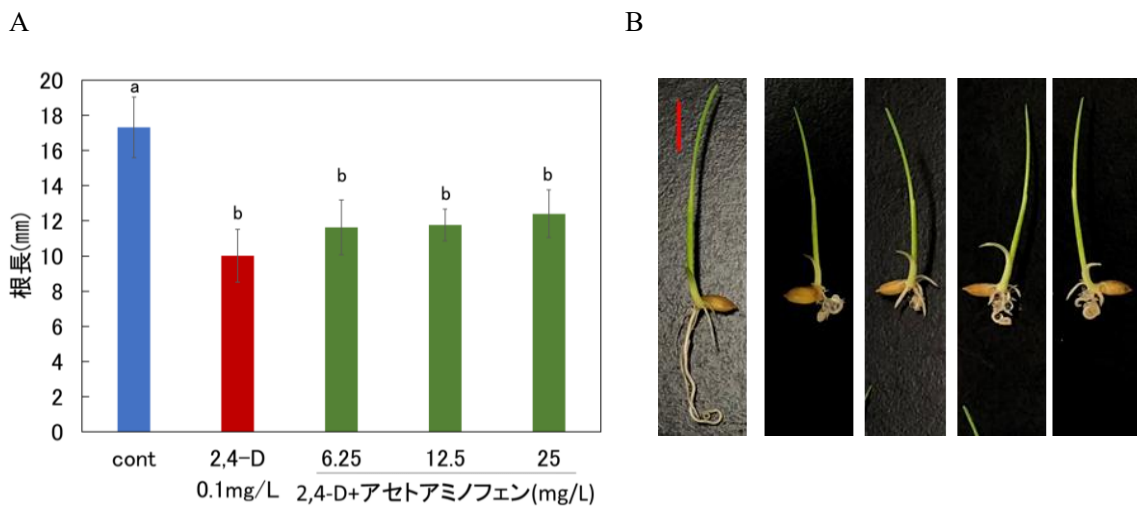


図 6.2 2,4-D (0.1 mg/L)とアセトアミノフェン (6.25,12.5,25 mg/L) 同時ばく露試験(5 日目)

A : 根長比較 B : 形態比較 エラーバーは標準誤差を示す。

TUKEY の多重比較検定の結果、異なるアルファベット間に 5%水準の有意差あり。

インドメタシン 6.25, 12.5, 25 mg/L に 2,4-D (0.1 mg/L) を同時添加し、ばく露試験を行ったところ、インドメタシン 6.25, 12.5 mg/L と 2,4-D 0.1 mg/L の混合ばく露では、2,4-D 0.1 mg/L の単独ばく露で観察されていた根長伸長抑制が阻害され、根の成長が回復した。2,4-D 0.1 mg/L の単独ばく露では、根長平均は 10 mm であったが、インドメタシン 6.25 mg/L と 2,4-D 0.1 mg/L の混合ばく露では 28.8 mm あり、インドメタシン 12.5 mg/L と 2,4-D 0.1 mg/L の混合ばく露では 20.5 mm であった (図 6.1) また、インドメタシン 25 mg/L と 2,4-D 0.1 mg/L の混合ばく露では、根長平均は 9.2 mm であり、根の成長回復はみられなかった。また、エトドラクにおいても 6.25, 12.5, 25 mg/L に 2,4-D を同時添加し、ばく露試験を行ったところ、7 日目の個体においてエトドラク全ての濃度で根の成長が回復した。

一方で、アセトアミノフェンと 2,4-D 0.1 mg/L の混合ばく露では、アセトアミノフェン単独ばく露では観察されなかった根の成長阻害が観察された。アセトアミノフェンの単独ばく露では、根長平均は 18.4 mm~22.4 mm であったが (図 3.7)、アセトアミノフェンと 2,4-D 0.1 mg/L の混合ばく露では根長平均が 11.8 mm~12.4 mm であった (図 6.2)。

6-4. 考察

NSAIDs はオーキシシアンタゴニストとして作用することが強く示唆された

インドメタシンおよびエトドラクの 2,4-D 同時添加によるばく露結果は、オーキシシ 2,4-D の根長伸長抑制を阻害し、根長の成長を回復した。従って、インドメタシンおよびエトドラクはオーキシシを阻害する作用、すなわちオーキシシアンタゴニストとして作用することが強く示唆された。しかし、オーキシシアンタゴニストとして評価するためには、高濃度域のばく露による根長伸長抑制が 2,4-D の添加によって回復するか否かを試験する必要があった。本試験では、2,4-D の作用を阻害することを示すに止まってしまった。

6. まとめ

本研究は、単子葉植物における化学物質のオーキシン様作用の検出法の開発および単子葉植物における非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) のオーキシン攪乱作用の検証を目的として行った。

まず、イネを用いた発芽発根阻害試験および成長影響評価試験では、日本晴 (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) を用いた、陸上植物の影響評価試験の簡便でかつ安定した試験法を人工オーキシン 2,4-D を用いて開発した。また、双子葉植物においてオーキシンのアンタゴニスト (阻害) 作用が明らかになっている NSAIDs (インドメタシン、エトドラク、ケトプロフェン、イブプロフェン) の影響評価を、開発した試験法を用いて行った結果、インドメタシンとエトドラクにおいて低濃度域 (6.25~12.5 mg/L) で根長の伸長促進、高濃度域 (50~100 mg/L) で伸長抑制の影響が認められた。また、2,4-D とインドメタシンの混合ばく露試験では、インドメタシンは 2,4-D による根長の伸長抑制作用を阻害し、根の成長を回復した。従って、インドメタシンおよびエトドラクはオーキシンアンタゴニストとして機能し、オーキシンを攪乱させることが示唆された。イブプロフェンにおいては同様の傾向を示したが、ケトプロフェンでは同じ濃度域でも影響がみられなかった。従って、イネにおいては NSAIDs の中でもプロピオン酸系 (イブプロフェン・ケトプロフェン) よりもアリール酢酸系 (インドメタシン・エトドラク) が強く影響すると示唆された。

次に、NSAIDs のばく露影響の一般毒性として作用を排除するために、植物ホルモンの組織分化誘導能を利用した日本晴のカルス細胞を用いた組織分化影響評価試験を行った。再分化 (組織誘導) 培地に移植したカルスにインドメタシンとエトドラクをばく露したところ、カルスの増殖には影響しなかったが、分化を抑制した。ばく露がカルスの増殖に影響しないことから、一般毒性とは区別でき、またオーキシンの阻害剤の添加により再分化は抑制される (Cheng et al., 2013) という報告や、オーキシンのアゴニスト (促進) 作用は観察されなかったことから、インドメタシンとエトドラクはオーキシンのアンタゴニストとして機能したことが示唆された。

試験対象の化学物質の作用機序 (アゴニスト・アンタゴニスト) 解明のためにイネ Oc 培養細胞 (*Oryza sativa* C5928 由来の懸濁細胞) を用いたオーキシン攪乱物質の簡易スクリーニング法の開発を行った。オーキシン (2,4-D) 添加培地で培養するイネ Oc 培養細胞を、インドメタシンもしくはエトドラクを添加したオーキシン無添加培地で培養し、細胞増殖試験を行った。その結果、オーキシンアゴニストのナフタレン酢酸 (NAA) 添加のように増殖量は増加しなかった。従って、インドメタシンとエトドラクはオーキシンアゴニストではないこと、この試験法において、オーキシン攪乱物質のスクリーニングと作用機序の解明が行えることが示唆された。

以上 3 つの実験結果から総合的に判断すると、インドメタシンとエトドラクの 2 つの NSAIDs はイネにおいてもオーキシナンタゴニストとして作用することが明らかになり、イネの発芽発根をエンドポイントとした影響評価試験、カルスの組織誘導率をエンドポイントとした影響評価試験、Oc 培養細胞の細胞増殖量をエンドポイントとした影響評価試験を開発し、単子葉植物における化学物質のオーキシン攪乱物質の検出が可能であることを明らかにした。また、双子葉植物のみならずイネにおいても NSAIDs の中にはオーキシンのアンタゴニスト作用することが強く示唆された。これは、増え続ける新規化学物質の中には、幅広い植物に影響を与えるものが存在しうることを示唆する結果と言える。

しかし、本実験では植物体、組織、細胞においての影響をみるにとどまってしまった。これらの試験に加え、医薬品をばく露した植物体やカルスをサンプリングし、Aux/IAA や SAUR 等 (Jain et al., 2006, Kant et al., 2009) のオーキシン応答遺伝子についてトランスクリプトーム解析を行い、オーキシン応答性の有無を解析することで、さらなる作用機序解明を行う必要がある。また、本研究では花芽や種子形成などの次世代に与える影響は明らかになっていないことから、今後慢性影響評価試験法の開発が課題であると考えている。環境中の生物に対する影響とは異なるが、オーキシンの脱分化 (カルス化) や再分化に携わる遺伝子や組み換えやゲノム編集植物を用いることで、ターゲットに対して明確に作用することを示すことが出来るかもしれない。オーキシン以外の植物ホルモンや、他の単子葉植物についての検出法が開発されることが望まれる。

(鈴木, 2012) によると、本研究で用いたインドメタシンやアセトアミノフェン、エトドラクは多摩川水系の河川水中で $0.2 \mu\text{g/L}$ 以下の濃度で検出されている。ばく露した最小濃度の約 10000 倍薄い濃度である。しかし、植物はこの水環境中の濃度が直接反映された濃度でばく露しないため、ばく露経路や土壌、植物中の蓄積や代謝も加味して考える必要がある。従って、その影響を知り、被害を未然に防ぐためのリスク管理が重要であり、この試験法開発は新規化学物質によってもたらされる人類のよりよい生活と生態系維持のバランスを保つことにつながると期待される。

7. 引用文献

Baba, A., Hasezawa, S. and Syono, K. (1986) Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Plant Cell Physiology* *27*, 463-471.

Brisibe, E.A., Taniguchi, T., and Maeda, E. (1990). In-vitro plant regeneration from morphogenic callus cultures of cultigens and wild oryza species. *Japanese Journal of Crop Science*. *59*, 557–565.

Burton, J.D., Gronwald, J.W., Somers, D.A., Gengenbach, B.G., and Wyse, D.L. (1989). Inhibition of corn acetyl-CoA carboxylase by cyclohexanedione and aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* *34*, 76–85.

Cheng, Z.J., Wang, L., Sun, W., Zhang, Y., Zhou, C., Su, Y.H., Li, W., Sun, T.T., Zhao, X.Y., Li, X.G., et al. (2013). Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiology* *161*, 240–251.

Darwin C. and Darwin F. (1880) *The Power of Movement in Plants*. London: John Murray.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* *435*, 441–445.

Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *The Plant Cell* *17*, 1387–1396.

Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., Inoue, Y., Seki, M., Sakakibara, H., Sugimoto, K., et al. (2011). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Current Biology* *21*, 508–514.

Jain, M., Kaur, N., Garg, R., Thakur, J.K., Tyagi, A.K., and Khurana, J.P. (2006). Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). *Functional Integrative Genomics* *6*, 47–59.

Kakani, A., Li, G., and Peng, Z. (2009). Role of AUX1 in the control of organ identity during in vitro organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin interaction in *Arabidopsis*. *Planta* *229*, 645–657.

Kant, S., Bi, Y.-M., Zhu, T., and Rothstein, S.J. (2009). SAUR39, a Small Auxin-Up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice. *Plant Physiology* *151*, 691–701.

Katekar, G.F., and Geissler, A.E. (1977). Auxin transport inhibitors: III. chemical requirements of a class of auxin transport inhibitors. *Plant Physiology* *60*, 826–829.

Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* *435*, 446–451.

Kögl, F, Erxleben, H and HaagenSmit, AJ (1934). Über die Isolierung der Auxine a und b aus pflanzlichen Materialien. *HoppeSeyler's Z. Physiology Chemistry* *225*, 215-229

- Kögl, F., Haagen-Smit, A.J., and Erxleben, H. (2009). Über ein neues Auxin („Hetero-auxin“) aus Harn. 11. Mitteilung über pflanzliche Wachstumsstoffe. Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie 228, 90–103.
- Koo, S., Kwon, Y., and Cho, Y. (1991). Differences in herbicidal activity, phytotoxic symptom and auxin activity of quinclorac among plant species compared with 2,4-D. Weed Research, Japan 36, 311–317.
- Maeda, E. (2000). A new approach to the Study on organogenesis of gramineous crop. Japanese Journal of Crop Science. 69, 1–11.
- OECD (2006). Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test, Paris, OECD Publishing.
- Paal A. (1919) Über phototropische Reizleitung. Jb wiss Bot 58:406–458
- Peer, W.A., Blakeslee, J.J., Yang, H., and Murphy, A.S. (2011). Seven things we think we know about auxin transport. Molecular Plant 4, 487–504.
- Pernisová, M., Klíma, P., Horák, J., Válková, M., Malbeck, J., Souček, P., Reichman, P., Hoyerová, K., Dubová, J., Friml, J., et al. (2009). Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 3609–3614.
- Shimada, T., Otani, M., and Ikuta, Y. (1999). Investigation of the callus induction medium and the regeneration medium in rice anther culture. Japanese Journal of Crop Science. 68, 151–154.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y., and Kasahara, H. (2009). “Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in arabidopsis.” Japanese Journal of Crop Science. 106 (13): 5430–35.
- Tanetani, Y., Kaku, K., Kawai, K., Fujioka, T., and Shimizu, T. (2009). Action mechanism of a novel herbicide, pyroxasulfone. Pesticide Biochemistry and Physiology 95, 47–55.
- Tsuda, E., Yang, H., Nishimura, T., Uehara, Y., Sakai, T., Furutani, M., Koshiba, T., Hirose, M., Nozaki, H., Murphy, A.S. (2011). Alkoxy-auxins are selective inhibitors of auxin transport mediated by PIN, ABCB, and AUX1 Transporters. Journal of Biological Chemistry. 286, 2354–2364.
- Went, F. (1926). On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Amsterdam 30, 10–19.
- Yamazaki, H., Ayabe, K., Ishii, R., and Kuriyama, A. (2009). Desiccation and cryopreservation of actively-growing cultured plant cells and protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 97, 151–158.
- Yang, S.F., and Hoffman, N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annual Review of Plant Physiology. 35, 155–189.

Yu, C., Sun, C., Shen, C., Wang, S., Liu, F., Liu, Y., Chen, Y., Li, C., Qian, Q., Aryal, B., et al. (2015). The auxin transporter, OsAUX1, is involved in primary root and root hair elongation and in Cd stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). *The Plant Journal*. *83*, 818–830.

Zhao, H., Ma, T., Wang, X., Deng, Y., Ma, H., Zhang, R., and Zhao, J. (2015). OsAUX1 controls lateral root initiation in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell & Environment* *38*, 2208–2222.

井口泰泉 (1998) 環境ホルモン (外因性内分泌攪乱化学物質) の環境生物に対する影響. 安全工学 *37*, 80-86.

石黒郁美, 富澤貴寿 (2012) 誰でも必ず成功するイネの遺伝子組み換え実験. 横浜市立大学学生論集 No.52 第1分冊

岩根泰蔵 (2003) 水環境中の医薬品化学物質. 国立環境研究所ニュース vol.22 No.4 12-14.

小林勝一郎, 與語靖洋, 杉山浩 (1995). ピラゾスルフロンエチルに対する感受性におけるイネ品種間差異. 雑草研究 *40*, 104–109.

鈴木俊也 (2012) 水環境中のヒト用医薬品の存在実態及び環境中濃度の予測. 東京都健康安全センター年報 *63*, 69-81.

酒井忠雄 (2008) 環境・分析化学実験 三共出版 第3版 第3章 84-85

大源正明, 川上 修, 長沢裕滋 (1995). コシヒカリカルスからの効率的な植物体再生条件. 北陸作物学会報 *30*, 83–85.

川上修, 津川秀仁, and 大槻義昭(1995). 日本晴カルスの植物体再分化におけるソルビトールとカザミノ酸の影響. 北陸作物学会報 *30*, 77–79.

厚生労働省 (2013) 薬事工業生産動態統計調査 (H25)

富田努, 谷日武, 前田英三 (1989). “イネカルスの再分化に対する硝酸銀の影響” 日本作物学会東海支部会報 *108*, 21–22

中村郁子, 佐藤明子, 渡部真由, 國土祐未子, 石井貴広, 菊地理絵, 箕雄介, 添野和雄, 嶋田幸久 (2015). イネにおける新規オーキシン生合成阻害剤 PPBo の作用解析. 植物化学調節学会代50回大会 講演要旨集 *2015*, 46–46.

農林水産省 (2016) 牛ふん堆肥中のクロピラリドが原因と疑われる園芸作物等の生育障害の発生の対応について

山岸隆博 (2017) 「植物ホルモン (オーキシン) 攪乱物質検出法の確立」 生物化学的測定研究会 第 22 回学術シンポジウム 要旨集

8. 謝辞

本研究をすすめるにあたり、熱心なご指導ご鞭撻を頂きました本学 山本裕史准教授そして国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター の山岸隆博研究員に深く感謝いたします。本学 奈良一秀教授には副査としてご助言を戴くとともに本論文のご指導をいただき感謝いたします。実験や研究、論文作成にあたりまして、多くの助言や指導をして頂きました環境リスク・健康研究センター のスタッフのみなさまに感謝しております。

本研究、論文作成にあたりまして、研究生活にて同期として協力し支えてくれた谷和音さん、ゼミにおいて様々な助言やコメントを賜りました自然環境学専攻の皆さま、ご協力を賜りました全てのみなさまに感謝申し上げます。