

原 著

農薬によるヒト末梢血培養リンパ球での姉妹染色分体交換の誘発について

飯 島 純 夫・延 原 弘 章¹⁾・竹 下 達 也・日 暮 眞²⁾

山梨医科大学保健学Ⅱ教室, 東京大学医学部母子保健学教室 (現昭和大学医学部公衆衛生学教室¹⁾),
東京大学医学部母子保健学教室²⁾

抄 録: ヒト末梢血リンパ球を用い, 近年発癌性と突然変異誘発性との関連で注目されている染色体の姉妹染色分体交換 (SCE) を指標として, Parathion (PT), Malathion (MT), Dimethoate (DA), Fenitrothion (FT), Paraquat (PQ), Gibberellin (GB) の6種類の農薬のSCE誘発能を検討した。

その結果, GBを除く他の5種類の農薬でSCEの誘発が認められた。PT, MT, DA, PQについては他の細胞系を用いた従来の報告に類似しており, 従来ほとんど報告がみられていないFTとGBについては, ヒトリンパ球を用いた今回の検討では, FTに強いSCE誘発能があることが, またGBの場合には1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という高い濃度でもSCEが誘発されないことが明かとなった。

キーワード 姉妹染色分体交換, ヒトリンパ球, 農薬

I. はじめに

戦後のわがくにの農薬の使用量は急速に増加し, 農作物の大増産に大きく寄与してきたが, 一方では人の健康や自然環境に被害を与えるものがでてきた。

農薬のうち, 毒性が強いものと残留性が大きいものについては, 使用禁止を含む使用規制が行われているが, 発がん性, 変異原性 (突然変異誘発性), 催奇形性のいわゆる特殊毒性については, その影響が現われるまでに長期間を有し, 次世代への影響も考慮しなければならない。そのため, 近年発癌性・突然変異誘発性との関連で, 注目されている染色体の姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange; 以下 SCE と略記) を指標として, ヒト末梢血リンパ球を用い

て *in vitro* での検討を行なった。

SCE とは, 染色体のそれぞれの染色分体 (姉妹染色分体) が, 一見, 同一の部位で完全に入れ替わる現象である。この現象は, はじめ Taylor¹⁾により, ³H-thymidine で標識したオートラジオグラフィーにより観察され, その後, Latt²⁾ や Perry & Wolff³⁾ らの開発した, 蛍光ギムザ (Fluorescence plus Giemsa; FPG) 法により極めて容易に観察できるようになった。

SCE は, 染色体 DNA の損傷修復を反映する現象と考えられている⁴⁾ が, 種々の染色体傷害物質によって, 染色体構造異常がほとんど起きない低濃度で, 高頻度 SCE を誘発することが報告されている⁵⁾⁶⁾。このため, SCE を指標とした染色体 DNA 傷害の検討が数多くなされ, 現在では, 遺伝毒性学上重要な指標としての位置を確立しつつある⁷⁾。

このような SCE の鋭敏さに加えて方法の簡便さ, 定量性の良さ, 判定の容易さ, 短時間でできることなどから, 遺伝毒性, 突然変異原性, 発がん性などのスクリーニング法として期待さ

〒409-38 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110

1) 〒142 東京都品川区旗の台1-5-8

2) 〒113 東京都文京区本郷7-3-1

受付: 1990年7月31日

受理: 1990年9月30日

れている⁸⁾。

本研究で用いた農薬は, Parathion, Malathion, Dimethoate, Fenitrothion (以上有機リン系殺虫剤), Paraquat (除草剤), Gibberellin (生長調節剤) である。これらは, Parathion を除き, すべて現在日本で使用されている農薬である。

Parathion, Malathion, Dimethoate, および Paraquat の4種類については, すでに他の細胞系において, SCE 誘発能が検討されているが, ヒト末梢リンパ球では行われていない。Fenitrothion については *in vitro* での報告はみられず, Gibberellin については, まったく報告はなされていない。

II. 材料および方法

健康な成人3名(男2名, 女1名)の全血を用いて, ヒト末梢リンパ球培養法により72時間培養を行った。薬物の添加は, 培養開始時に行い, 72時間追加した。培養後, 低張・固定処理をほどこし染色体標本を作成し, 数日後, FPG法で分染を行った。これを光学顕微鏡で観察し, 細胞あたりのSCE頻度を数えた。

A. 培養液

培養液は, RPMI 1640 (GIBCO) を使用し, 15% fetal bovine serum (GIBCO), 1% penicillin-streptomycin solution (GIBCO) を混和して用いた。これに5-bromo-2' deoxyuridine (SIGMA) を終末濃度が $40\mu\text{M}$ となるように, さらに Phytohemagglutinin (GIBCO) を3%加えた。

B. 培養の方法

A. で作成した培養液をプラスチック製培養用 tube に5mlずつ分注し, 濃度調節した農薬を添加した。そこへ, 通常のヘパリン採血を行った被検者の血液を約0.3ml加え, 37°CのCO₂インキュベーターにて, 遮光して72時間培養した。培養終了の4時間前に, colcemid (GIBCO) を終末濃度が $0.2\mu\text{M}$ となるように加え, 分裂を停止させた。

C. 低張

培養終了後, 直ちに1500rpmで5分間遠沈して集めた細胞に, 低張液(0.075M KCl)を加えて, 約10mlとし, 15分間低張処理を行った。

D. 固定

低張処理を行った後, 固定液(酢酸1:エタノール3)を少しずつ加え, ゆるやかに固定を行い, 1500rpmで5分間遠沈した。上澄を捨てて, 同じ操作を2度繰り返した。

E. 標本の作成

最後に遠沈したあと, 細胞浮遊液を0.2~0.3ml残して上澄を捨てた。これをあらかじめ60%酢酸につけておいたスライドガラス上に数滴滴下し, 90°Cのホットプレート(平沢製作所)上で乾燥させた。

F. 分染

姉妹染色分体の分染は Goto ら⁹⁾の方法によった。

G. 検鏡

作成した各標本について, 光学顕微鏡下(1000倍)で観察し, 染色体同志の重なるのいなく染色された, 第2回分裂期にある分裂像について, SCE数をかぞえた。分析細胞数は, 各系列25個とした。

H. 使用農薬とその調節

使用した農薬は, Parathion (PT), Malathion (MT), Dimethoate (DA), Fenitrothion (FT), Paraquat (PQ), Gibberellin (GB) の6種類(いずれも和光純薬工業)である。PT, MT, DA, FTは, 水にほとんど不溶であるため, エタノール(EtOH)を溶媒として用いた。濃度系列は, GBが, 30, 100, 300, 1000 $\mu\text{g/ml}$ で, それ以外の農薬は, 原則として3, 10, 30, 100 $\mu\text{g/ml}$ とした。MTのみ, これ以外に200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも行った。

EtOHを溶媒としたとき, 培養液中のEtOHは1%以下となるようにし, EtOHを溶媒としたものについては, EtOH1%を添加したものを対照として用いた。

表1 Frequencies of SCEs induced by agricultural chemicals

	Parathion	Malathion	Dimethoate	Fenitrothion	Paraquat	Gibberellin
untreatment	7.64±0.42 7.60±0.71 7.56±0.56					
EtOH 1%	8.32±0.69 8.00±0.65 7.84±0.64					
3μg/ml	8.96±0.56 7.92±0.47 7.68±0.50	8.28±0.58 8.20±0.59 7.88±0.55	8.68±0.55 8.92±0.66 8.72±0.56	8.88±0.49 7.96±0.60 9.04±0.63	7.65±0.56 7.60±0.52 8.76±0.59	
10μg/ml	10.32±0.49* 8.96±0.54 11.40±0.76***	8.16±0.36 8.12±0.58 7.72±0.43	8.12±0.47 9.40±0.58 8.04±0.58	11.12±0.77** 9.28±0.69 9.76±0.58*	8.00±0.62 8.16±0.55 8.36±0.61	
30μg/ml	11.76±0.60*** 11.96±0.64*** 11.60±0.67***	8.12±0.57 8.04±0.43 8.96±0.72	11.12±0.67** 11.84±0.75*** 12.04±0.74***	14.00±0.79*** 12.52±0.53*** 13.48±0.92***	9.08±0.66* 9.04±0.51 9.36±0.60*	7.84±0.64 7.16±0.51 8.48±0.68
100μg/ml	P.G. P.G. P.G.	9.32±0.65 9.52±0.76 10.68±0.66**	17.92±0.71*** 16.68±0.71*** 18.08±0.95***	P.G. P.G. P.G.	10.88±0.83*** 10.64±0.55*** 10.52±0.67***	7.44±0.47 8.28±0.60 7.96±0.69
200μg/ml		23.24±1.12*** P.G. P.G.				
300μg/ml						7.44±0.61 7.92±0.66 8.00±0.57
1000μg/ml						8.12±0.53 7.80±0.50 7.88±0.56

Mean±S.D.; *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001; P.G.=Poor Growth

Ⅲ. 実験成績

3名の被検者より得られた染色体標本により、各々の1細胞あたりのSCE頻度の検討を行った。1回の実験は、前述の3名のうちひとりの末梢血液ですべて行い、それを3回繰り返し実施するかたちで行った。結果を表1に示した。

PTは10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、被検者間にばらつきがみられた。しかし、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、いずれの被検者においても、有意な増加 ($P < 0.001$) をみせ、対照群の1.5倍近くにまでなった。また、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、いずれの被検者においても分裂像が得られなかった。

MTにおいても、被検者間のばらつきがみられた。30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、いずれの被検者においても、有意な増加は認められなかった。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、1例が有意な増加 ($P < 0.01$) をみせ、他は、増加の傾向はみせたものの、有意な差は得られなかった。200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、1例が対照群の3倍近くまで増加したが、他では、分析に十分な分裂像が得られなかった。

DAでは30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、いずれも被検者においても有意な増加をみせ、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、いずれも2倍以上に増加した。

FTの場合10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、有意差のあるものとなないものの両方があったが、いずれも増加の傾向にあった。30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、いずれも対照群に比較して1.5倍以上に増加し、有意差 ($P < 0.001$) も認められた。なお100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、いずれの被検者においても、分裂像はほとんど得られなかった。

PQは30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で増加の傾向をみせ、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、いずれの被検者においても、有意な増加をみせた。

GBは、いずれの被検者においても、どの濃度でも、SCE頻度に変化をもたらさなかった。

Ⅳ. 考察

今回のPHA幼若化ヒトリンパ球を用いた、SCE誘発能に関する実験ではPT, MT, DA, FT, PQでは、SCEの有意な増加が認められたが、GBについては、差が認められなかった。

Sobtiら¹⁰⁾は、ヒトリンパ芽球様細胞をもちいて、SCE誘発能の検討を行い、DA 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、PT 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MT 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で有意な増加 (いずれも $P < 0.01$) を認めた。Nishioら¹¹⁾は、CHO細胞をもちいて、SCE誘発能の検討を行った。それによれば、PT 0.3mM ($\equiv 87\mu\text{g}/\text{ml}$)、MT 0.3mM ($\equiv 99\mu\text{g}/\text{ml}$) で有意な増加 (いずれも $P < 0.01$) を示した。また、彼らはPT, MTの代謝産物であるパラオクソン、およびマラオクソンについても、同じ実験を行い、パラオクソン 0.1mM ($\equiv 29\mu\text{g}/\text{ml}$)、マラオクソン 0.1mM ($\equiv 33\mu\text{g}/\text{ml}$) で、有意な増加が認められ、代謝産物がより大きなSCE誘発能をもつことを示している。Chenら¹²⁾は、チャイニーズハムスターV79をもちいて、SCE誘発能の検討を行った。それによれば、MT 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で1.5倍以上、DA 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で2倍近くにまで増加した。Nicholasら¹³⁾は、ヒト胎児線維芽細胞をもちいて、MTのSCE誘発能を検討した。培養開始4時間後1回投与と、4、24時間後2回投与とを行い、いずれも20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で有意な増加 ($P < 0.001$) をみせた。また、1回投与と2回投与とを比較して、2回投与のほうがSCEが上昇することを示した。Nicoteraら¹⁴⁾は、チャイニーズハムスター線維芽細胞を用いて、PQのSCE誘発能をみたところ、0.1mM ($\equiv 26\mu\text{g}/\text{ml}$) で有意な増加 ($P < 0.01$) を認めた。また、Wangら¹⁵⁾はrat tracheal epithelial cellではSCEの有意な増加を認めたものの、CHO細胞では有意な増加は認められなかったと報告している。

以上の結果は、いずれも今回の実験による結果と合致するものである。しかし、MTについては、他の細胞系では、PTやDA程度のSCE

誘発能をみせているが、本実験では、PT や DA に比べ、SCE 誘発能はかなり弱い。また、Sobti らの報告¹⁰⁾では PT が DA よりも強い SCE 誘発能を持つようにみえるが、本実験では 30 μ g/ml では大差なかった。

他の報告が、チャイニーズハムスター由来の細胞あるいは、Bリンパ球由来の継代培養株を用いたのに対して、本実験では、PHA 幼若化ヒトリンパ球を使用している。このため、使用した細胞の感受性の差が、このような違いをもたらした1つの要因と考えられる。

また、これまで *in vitro* で SCE 誘発能が調べられていなかった FT と GB については、本実験の結果、FT に SCE 誘発能があることが、はじめて確認された。FT は、他の有機リン系殺虫剤に比べ、急性毒性が比較的弱いためよく使われるが、今回の実験では、30 μ g/ml でみると SCE 誘発能は、6種類の農薬の中では最も強いという結果がでた。一方、*in vivo* で FT に曝露した菜園作業者の末梢リンパ球を用いた報告¹⁶⁾では SCE の有意な上昇を認めている。GB は、他の10倍の濃度で実験を行ったが、SCE 頻度は、どの濃度でも変化はなかった。SCE は、一般に染色体構造異常などよりも鋭敏な DNA 損傷の検出系であり、また、簡単に、定量性が良く、判定が容易である。さらには、SCE の長所をあげるとすれば、*in vivo* でも、*in vitro* でも、哺乳動物を用いて行うこともでき、対象が限定されないということがあげられる。また、直接作用原だけでなく、代謝活性化を必要とする間接作用原も検出できる。さらには、SCE 分析法は、ヒト集団のモニタリングにも応用できる。とくに、ヒト集団のモニタリングについては、将来有望視されているところである。農薬散布者について行われた調査では、じゅうぶんな防護をしていない人に、高頻度の SCE がみられたという報告¹⁷⁾もある。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金（一般研究 C）によって行われた。

文 献

- 1) Taylor JH. Chromosome reproduction. *Int Rev Cytol* 1962; **13**: 39–73.
- 2) Latt SA. Microfluoretric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; **70**: 3395–3399.
- 3) Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; **251**: 156–158.
- 4) Kato H. Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BUdR-labeling method. *Int Rev Cytol* 1977; **49**: 55–97.
- 5) Latt SA. Sister chromatid exchange, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; **71**: 3162–3166.
- 6) Perry P, Evavs HJ. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 1975; **258**: 121–125.
- 7) 森本兼囊, 小泉 明. 公衆衛生における細胞遺伝学研究 (その2) : 姉妹染色分体交換 (SCE) と環境科学. *公衆衛生* 1984; **48**: 359–370.
- 8) 西 義介, 乾 直道. SCE と他の Biological Endpoint との関連性. *トキシコロジーフォーラム* 1984; **7**: 328–343.
- 9) Goto K, Maeda S, Kano Y, Sugiyama, T. Factor involved in differential Giemsa staining of sister chromatid. *Chromosoma* 1978; **66**: 351–359.
- 10) Sobti RC, Krishan A, Pfaffenberger, CD. Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells *in vivo*. *organophosphates*. *Mutat Res* 1982; **102**: 89–102.
- 11) Nishio A, Uyeki EM. Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by organophosphate insecticides and their oxygen analogs. *J Toxicol Environ Health* 1981; **8**: 939–946.
- 12) Chen HH, Hsueh JL, Sirianni SR, Huang CC. Induction of sister-chromatid exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorus pesticides. *Mutat Res* 1981; **88**: 307–316.
- 13) Nicholas AH, Vienne M, van den Berghe H. Induction of sister-chromatid exchanges in cultured human cells by an organophosphorus insecticide: Malathion. *Mutat Res* 1979; **67**:

- 167-172.
- 14) Nicotera TM, Block AW, Gibas Z, Sandberg AA. Induction of superoxide dismutase, chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by paraquat in chinese hamster fibroblasts. *Mutat Res* 1985; **151**: 263-268.
- 15) Wang TC, Lee TC, Lin MF, Lin SY. Induction of sister-chromatid exchanges by pesticides in primary rat tracheal epithelial cells and Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 1987; **188**: 311-321.
- 16) Rupa DS, Rita P, Reddy PP, Reddi OS. Screening of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of vegetable garden workers. *Hum Toxicol* 1988; **7**: 333-336.
- 17) Crossen PE, Morgan WF, Horan JJ, Stewart J. Cytogenetic studies of pesticide and herbicide sprayers. *N Z Med J* 1978; **88**: 192-195.

Induction of Sister Chromatid Exchanges in Human Lymphocytes by Agricultural Chemicals in vitro

Sumio Iijima, Hiroaki Nobuhara¹⁾, Tatsuya Takeshita, and Makoto Higurashi²⁾

Department of Health Sciences, Yamanashi Medical College, ¹⁾Department of Public Health, Showa University School of Medicine, and ²⁾Department of Maternal and Child Health, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

Frequencies of sister chromatid exchanges (SCEs) in human lymphocytes by six agricultural chemicals, i.e. parathion, malathion, dimethoate, fenitrothion, paraquat and gibberellin were observed. Relatively high SCE inductions were observed in human lymphocytes by these chemicals except gibberellin. Gibberellin did not appear to induce SCEs up to 1000µg/ml.

Key words: sister chromatid exchanges, human lymphocytes, agricultural chemicals