〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
26 (2) 99-102 (1980)

水銀化合物およびセレン化合物の同時処理による ヒトリンパ球の染色体異常誘起について

佐谷戸安好, 中室克彦
国立衛生試験所¹⁾

Chromosomal Aberrations in Cultured Human Lymphocytes induced by Simultaneous Treatment with Mercury Compounds and Selenium Compounds

YASUYOSHI SAYATO and KATSUHIKO NAKAMURO
National Institute of Hygienic Sciences¹⁾

(Received December 19, 1979)

Chromosomal aberrations induced by simultaneous treatment with mercury compound and selenium compound in human lymphocyte cultures were studied. When cultures were treated with methylmercuric chloride (MMC) or mercuric chloride alone, MMC showed higher activity for chromosome damage than mercuric chloride. Regarding effects of selenium compounds on the chromosomal aberrations induced by mercury compounds, selenious acid showed a marked protection effect against chromosome breakage by MMC or mercuric chloride. However, sodium selenate enhanced the chromosome-breaking activity of MMC and mercuric chloride.

On the other hand, MMC or mercuric chloride showed a protective effect against chromosome breakage by selenious acid. Mercuric chloride was more protective than MMC to human lymphocytes.

Keywords—chromosomal aberration; mercury compound; selenium compound; human lymphocyte; lymphocyte culture; simultaneous treatment

結 言

無機水銀およびメチル水銀の哺乳動物に対する毒性は、セレン酸あるいは亜セレン酸塩の同時投与により軽減することが知られている。²⁻⁷⁾ また最近、哺乳動物細胞に対する有機水銀化合物の細胞毒性が亜セレン酸の共存によって抑制されることが報告されつつある。⁸⁻¹⁰⁾ と

ころで、水銀化合物あるいはセレン化合物単独の染色体異常誘起性、細胞毒性に関する研究¹¹⁻¹⁴⁾ は行われているが、水銀およびセレン化合物共存下における哺乳動物細胞に対する染色体異常誘起性については研究されていない。著者らはすでにセレン化合物単独処理時のヒトリンパ球の染色体異常誘起性について報告¹³⁾ した。そのた

- 1) Location: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo, 158, Japan. (東京都世田谷区上用賀1-18-1).
- 2) J. Parizek, I. Ostadalo, *Experientia*, **23**, 142 (1967).
- 3) H.E. Ganther, C. Goudie, M.L. Sunde, M.J. Kopecky, P. Wagner, Oh, Sang-Hwan, W.G. Hoekstra, *Science*, **175**, 1122 (1972).
- 4) B.R. Stillings, H. Lagally, P. Bauersfeld, J. Soares, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **30**, 243 (1974).
- 5) H. Iwata, H. Okamoto, Y. Ohsawa, *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **5**, 673 (1973).
- 6) S. Potter, G. Matrone, *J. Nutr.*, **104**, 638 (1974).
- 7) 小宮和英, 小池いずみ, 河内佐十, 桜井 弘, 衛生化学, **23**, 235 (1977).
- 8) M. Kasuya, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **35**, 11 (1976).
- 9) S.D. Potter, G. Matrone, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **40**, 201 (1977).
- 10) 青島恵子, 加須屋実, 三宅浩次, 産業医学, **21**, 374 (1979).
- 11) G. Fiskesjö, *Hereditas*, **64**, 142 (1970).
- 12) M. Kasuya, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **23**, 136 (1972).
- 13) K. Nakamuro, K. Yoshikawa, Y. Sayato, H. Kurata, M. Tonomura, A. Tonomura, *Mutation Res.*, **40**, 177 (1976).
- 14) L.W. Lo, J. Koropatnick, H.F. Stich, *Mutation Res.*, **49**, 305 (1978).

め、本研究においては、まず、水銀化合物単独処理時のヒトリンパ球に対する染色体異常誘起性の検討を行い、さらに、水銀化合物とセレン化合物を共存させたときの染色体異常誘起性について研究を進め知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 金属化合物 塩化メチル水銀 (CH_3HgCl)、塩化第二水銀 (HgCl_2)、セレン酸ナトリウム (Na_2SeO_4) および亜セレン酸 (H_2SeO_3) は試薬特級 (和光純薬製) を用いた。

2. 染色体試験 健康な成人男子の静脈血をヘパリンでぬらした注射筒で採血し、試験管に移し入れ、3—4時間静置する。その後、リンパ球を含む血漿を分離する。リンパ球の培養は、著者がすでに報告した方法¹³⁾で、72時間 CO_2 インキュベーター中で培養した。水銀およびセレン化合物を蒸留水に溶解したものを培養終了24時間前に、一定濃度で培地に添加した。培養終了後、標本は常法通り操作を行い、flame-drying method によって作成した。さらに、ギムザ染色を行い、顕微鏡下で染色体異常を観察した。

結 果

1. 水銀化合物の染色体異常誘起性について

塩化第二水銀および塩化メチル水銀によるヒトリンパ球に対する染色体の構造異常および異常発生率を Table I に示す。すなわち、塩化第二水銀は $64 \times 10^{-6}\text{M}$ 以上の作用濃度において細胞毒性が強く、染色体異常分析が不可能であることを認めた。また、 $4-32 \times 10^{-6}\text{M}$ では、作

用濃度が上昇するに従い、gap, break の発生頻度は上昇するが、全異常発生率が約20個/100細胞付近で、あまり強い異常を示さないことを認めた。これに対し、塩化メチル水銀は $0.5-4 \times 10^{-6}\text{M}$ の低濃度処理において、濃度が上昇するに従い、構造異常として gap 以外の break, exchange が増加し、全異常発生率も増加することを示した。また、塩化メチル水銀の染色体異常誘起性は塩化第二水銀に比べはるかに高いことを示した。

2. 水銀化合物およびセレン化合物共存時の染色体異常誘起性について

亜セレン酸の共存が塩化メチル水銀あるいは塩化第二水銀の染色体異常誘起性に与える影響について検討を行った。Fig. 1 に示すごとく、塩化メチル水銀を $0.5-4 \times 10^{-6}\text{M}$ 、塩化第二水銀を $4-32 \times 10^{-6}\text{M}$ の濃度範囲のものに、亜セレン酸を $4 \times 10^{-6}\text{M}$ (染色体異常発生率約20個/100細胞を示す濃度) の一定濃度で同時処理したものは、塩化メチル水銀、塩化第二水銀単独処理時よりも染色体異常誘起率が減少することを示した。また、亜セレン酸の処理濃度を高めると、異常発生率の抑制がさらに強まることを示した。これら亜セレン酸の水銀化合物に対する染色体異常誘起性の抑制効果は塩化第二水銀より塩化メチル水銀に対し強く現われることを認めた。

これに対し、Fig. 2 に示すごとく、セレン酸ナトリウムを、異常発生率をほとんど示さない $4 \times 10^{-6}\text{M}$ の濃度で水銀化合物に共存させた時、塩化メチル水銀および塩化第二水銀による染色体異常発生率は亜セレン酸共存時の現象とは反対に高まる結果を示した。

TABLE I. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes exposed to Mercury Compounds

Compound	Dose ($\times 10^{-6}\text{M}$)	Number of cells	Chromosomal aberration			Total aberration ^{a)}
			Chromatid gaps	Chromatid breaks	Chromatid exchanges	
HgCl_2	$64^c)$	—	—	—	—	—
	32	100	15	3	0	18 (18.0) ^{b)}
	16	100	13	3	0	16 (16.0)
	8	100	6	1	0	7 (7.0)
	4	100	7	0	0	7 (7.0)
CH_3HgCl	$8^c)$	—	—	—	—	—
	4	100	23	50	4	77 (77.0) ^{b)}
	2	100	24	31	3	58 (58.0) ^{b)}
	1	100	16	22	1	39 (39.0) ^{b)}
	0.5	100	6	7	0	13 (13.0)
Control	0	600	38	1	0	39 (6.5)

a) Numbers in parentheses show number of aberrations per 100 cells.

b) Significantly different from control at 1 % level.

c) At these dose chemicals were so toxic that chromosomal aberrations could not be observed. Data represent the summation of two separate experiments.

Fig. 1. Effects of Selenious Acid on Chromosomal Aberrations induced by Methylmercuric Chloride or Mercuric Chloride in Human Lymphocyte Cultures

—●—: CH_3HgCl .
 —○—: $\text{CH}_3\text{HgCl} + \text{H}_2\text{SeO}_3$ ($4 \times 10^{-6}\text{M}$).
 —○—: $\text{CH}_3\text{HgCl} + \text{H}_2\text{SeO}_3$ ($6.5 \times 10^{-5}\text{M}$).
 —■—: HgCl_2 .
 —□—: $\text{HgCl}_2 + \text{H}_2\text{SeO}_3$ ($4 \times 10^{-6}\text{M}$).

Fig. 2. Effects of Sodium Selenate on Chromosomal Aberrations induced by Methylmercuric Chloride or Mercuric Chloride in Human Lymphocyte Cultures

—●—: CH_3HgCl .
 —○—: $\text{CH}_3\text{HgCl} + \text{Na}_2\text{SeO}_4$ ($4 \times 10^{-6}\text{M}$).
 —■—: HgCl_2 .
 —□—: $\text{HgCl}_2 + \text{Na}_2\text{SeO}_4$ ($4 \times 10^{-6}\text{M}$).

つぎに、Fig. 3. に示すごとく、著者らがすでにセレン化合物のうちで染色体異常誘起性の最も高いことを認めた亜セレン酸に対する水銀化合物の影響について検討を行った。すなわち、亜セレン酸を $4-16 \times 10^{-6}\text{M}$ 濃度で処理し、染色体異常を発生させる濃度で、塩化メチル水銀は $1 \times 10^{-6}\text{M}$ あるいは塩化第二水銀を $4 \times 10^{-6}\text{M}$ 共存

Fig. 3. Effects of Methylmercuric Chloride or Mercuric Chloride on Chromosomal Aberrations induced by Selenious Acid in Human Lymphocyte Cultures

—△—: H_2SeO_3 .
 —○—: $\text{H}_2\text{SeO}_3 + \text{CH}_3\text{HgCl}$ ($1 \times 10^{-6}\text{M}$).
 —□—: $\text{H}_2\text{SeO}_3 + \text{HgCl}_2$ ($4 \times 10^{-6}\text{M}$).

させたところ、いずれの水銀化合物の共存時においても亜セレン酸の異常発生率を減少させるが、塩化第二水銀共存時の方が、塩化メチル水銀共存時よりも抑制効果が大きいことを認めた。

考 察

水銀化合物は古くからタマネギの根端細胞や哺乳動物細胞などに対し、C-mitosis を起こすことが知られている。¹⁵⁾ また、マウスの L5171Y 細胞あるいはニワトリ胎児の後根神経節組織培養における各種水銀化合物の毒性は、いずれも無機水銀より有機水銀の方が高いことが報告されている。^{12,16)} 著者らの検討した塩化第二水銀および塩化メチル水銀のヒトリンパ球に対する染色体異常誘起性において、塩化第二水銀は細胞毒性が強く現われる直前の $32 \times 10^{-6}\text{M}$ 付近で弱い染色体異常誘起性を示した。これに対し、塩化メチル水銀は塩化第二水銀より、はるかに低濃度の $0.5-4 \times 10^{-6}\text{M}$ で高い染色体異常誘起性を示すことを認めた。これらの結果から、塩化メチル水銀の方が染色体異常誘起性が高いことから、ここに用いた水銀化合物においては、細胞毒性^{12,16)} と染色体異常誘起性の間に関連性を有することを認めた。

最近、培養細胞において無機水銀あるいは有機水銀の細胞毒性に対する亜セレン酸による軽減作用に関する報告がなされている。⁸⁻¹⁰⁾ そこで、著者らは水銀化合物とセレン化合物の同時処理によるヒトリンパ球の染色体異常誘起性について検討を行った。すなわち、塩化メチル水銀および塩化第二水銀の染色体異常誘起性が4価セレンを含む亜セレン酸の添加によって抑制されることを認

15) C. Ramel, *Hereditas*, **61**, 208 (1969).

11) N. Nakazawa, F. Makino, S. Okada, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 489 (1975).

めた。しかし、6価セレンを含むセレン酸ナトリウムの添加によって異常誘起性が増加することを認めた。これらの結果は、ラット大脳組織培養¹⁰⁾あるいは Chang の肝細胞や 3T3 細胞⁹⁾に対する塩化第二水銀の細胞毒性を亜セレン酸が防御することを述べた報告と同様の傾向を示すことが考えられた。しかし、塩化メチル水銀のラット小脳の神経組織培養における神経毒性に対して、セレン酸、亜セレン酸がいずれも防御効果を示した Kasuya の報告⁸⁾とは多少異なることを認めた。これらの報告と著者らの実験結果を考え合わせると、この塩化第二水銀および塩化メチル水銀の染色体異常誘起性の亜セレン酸による抑制効果は細胞毒性の抑制作用と類似の作用によって起こることが考えられる。

一方、著者らがすでに報告した亜セレン酸の染色体異

常誘起性¹³⁾を水銀化合物が抑制するか否かについて検討を行った。すなわち、塩化第二水銀および塩化メチル水銀は、いずれも亜セレン酸の染色体異常誘起性を明らかに抑制することを示した。また、この抑制効果は塩化第二水銀の方が強いことを示した。

以上の結果から水銀化合物と亜セレン酸は、お互いの染色体異常誘起性を抑制する作用を有することを認めた。また、水銀化合物の染色体異常誘起性のセレンによる抑制効果は水銀化合物のセレンによる毒性軽減作用の機序を究明するために重要な事実を与えたものと考えられる。

謝辞 本研究は厚生省がん研究助成金によって行ったことを記して感謝する。