短 報

塩化第二クロムおよび無水クロム酸による
培養ヒト白血球の染色体障害Chromosome Damage in Cultured Human
Leukocytes Induced by Chromium
Chloride and Chromium Trioxide

クロム作業者の高い肺がん発生率からクロムおよびクロム化合物の発がん性が疑われて以来^{1,2)}, いくつかの実験的研究がクロム化合物による発がんの可能性を強く示唆してきた^{3,4)}. ここではその発がん性との関連も深く, また突然変異誘発性や催奇性とも重要なかわりをもつ染色体異常誘発性について, 培養ヒト白血球を用いて細胞遺伝学的な立場からの実験的研究を行なった.

材料および方法 実験に用いるクロム化合物には, 3価クロム化合物である塩化第二クロム($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), および6価クロム化合物である無水クロム酸(CrO_3)を選んだ. いずれも水溶性を示す化合物であり, 後者の水溶液は一般にクロム酸とよばれているものである. これらの化合物を添加した, 仔牛血清 30% を含む TC-199 培養液を用い, 健常男子の末梢血を小泉⁵⁾の方法によるマイクロ培養を行なって, まず (I) 培養白血球の生存数を, クリスタル・バイオレットによる生染色法を用いて算定し, 次いでこの結果をもとに濃度を設定, (II) 染色体異常の観察を試みた. 染色体所見の記述にあたっては Buckton ら⁶⁾の方法による分類を行ない, break, gap および数の異常について分析した. また, 統計的検定には χ^2 -検定を用い, 部分的に Yates の補正式を併用した. なお (II) においては, 塩化第二クロムでは上記の方法により白血球の 72 時間培養を行なったが, 無水クロム酸ではその強い細胞毒性のゆえに 52 時間培養を行なって観察した. また, 塩化第二クロムについては化合物中の塩素が各濃度において溶液中で, すべて解離すると仮定した場合に相当する塩素を塩化水素として培養液液に加え, 塩素による影響も検討した.

結果ならびに考察 I. 培養白血球の生存数は, 塩化第二クロムおよび無水クロム酸の投与量の増加に従って減少し, Fig. 1, 2 に示すような量-反応関係が見られた. 他方, 塩化水素投与検体では, 5.6 mM より高い, 至適 pH 6.8~7.2 を下回る濃度域で大きく生存数がおちている. なお, 図中で破線の部分は pH 6.8 を下回る域である. これらの結果から, クロム酸および塩化第二クロムは化合物中の金属イオン, もしくは化合物そのもの

Fig. 1. Rate of survival cells in relation to concentrations of chromium trioxide.

Fig. 2. Rate of survival cells in relation to concentrations of chromium chloride and hydrogen chloride.

の毒性によって, 培養細胞の増殖, または生存に何らかの影響を与えていると考えられる. II. 染色体異常の観察結果において, 無水クロム酸では break, gap いずれかの異常を有する細胞の出現率が各濃度で対照に比して有意差を示した (Table 1). 6 µg/ml では溶液の pH が 6.8 をやや下回ったためか, あるいは化合物の細胞毒性のためか, 得られた細胞も少なく対照との間に有意差が得られていないが, break の出現率に有意差を認めたことは注目される点である. いずれかの異常をもつ細胞の出現率は, 2 µg/ml では危険率 $p < 0.05$, 4 µg/ml では危険率 $p < 0.01$ の有意差を示した. なお, クロム酸については 52 時間培養法を用いたため異数性の異常の出現は分裂の際の障害によるというよりも, むしろ実験操作の過程で生ずる可能性はるかに高いと考え記載を省略した. 塩化第二クロムでは, 異数性異常の出現率においては塩化水素投与の検体同様, 有意差は得られていないが, break, gap いずれかをもつ細胞の出現率は $p < 0.01$ の有意差を示した. それぞれの濃度に対応する塩化水素投与の検体では対照との間に有意差が認めら

Table 1. Effects of chromium trioxide on chromosomes of cultured human leucocytes.

Agent concentration	Number of cells studied	Cells with aberration(s) (breaks and/or gaps)		Number of aberrations per cell			
		Number	Percent	Chromatid-type break	Chromatid-type gap	Isochromatid-type break	Isochromatid-type gap
Control	203	7	3.5	0.005	0.015	0.005	0.010
CrO ₃ 2μg/ml	157	13	8.3 ^b	0.019	0.064 ^b	0.000	0.000
CrO ₃ 4μg/ml	154	17	11.0 ^a	0.026	0.071 ^b	0.007	0.026
CrO ₃ 6μg/ml	66	6	9.1	0.061 ^b	0.030	0.015	0.091 ^a

^a significant at $p < 0.01$, ^b significant at $p < 0.05$

Table 2. Effects of chromium chloride and hydrogen chloride on chromosomes of cultured human leucocytes.

Agent concentration	Number of cells studied	Numerical cell distribution						Cells with aberration(s) (breaks and/or gaps)	Number of aberrations per cell			
		≤ 45		46		47 ≤			Chromatid-type break	Chromatid-type gap	Isochromatid-type break	Isochromatid-type gap
Control	208	6	2.9	199	3	1.4	14	6.7	0.024	0.039	0.010	0.005
CrCl ₃ ·6H ₂ O 400ug/ml	128	4	1.9	122	2	1.6	26	20.3 ^a	0.055	0.078	0.039	0.039 ^b
CrCl ₃ ·6H ₂ O 600ug/ml	149	6	3.6	141	3	2.0	27	18.1 ^a	0.047	0.074	0.034	0.027
Control	207	5	2.4	200	2	1.0	11	5.3	0.024	0.029	0.005	0.000
HCl 4.5×10 ⁻⁶ mM	124	4	3.2	118	2	1.6	5	4.0	0.008	0.032	0.000	0.000
HCl 6.8×10 ⁻⁶ mM	121	3	2.5	116	2	1.7	8	6.6	0.017	0.033	0.008	0.017

^a significant at $p < 0.01$, ^b significant at $p < 0.05$

れない。したがってこのような結果は塩化第二クロムもしくは3価クロムイオンの、細胞への作用に基づくものと考えられる。

クロム発がんにおいて3価、6価いずれのクロム化合物が主要な発がん物質であるかについてはさまざまな見解があるが^{7,8)}、生体内では酸化、還元反応による相互の移行が示唆されており^{4,9)}、現在では3価、6価双方のクロムが発がん機構に関与すると考えられている。染色体異常の観察という観点から *in vitro* で行なった本実験では、塩化第二クロム(3価)、無水クロム酸(6価)において、break, gap-type の染色体異常をもつ細胞の出現率に有意差を認め、またその濃度域が前者は後者の10²倍高いことが示された。今後さらに検討が必要であると思われる。

この研究を行なうにあたり、ご指導いただいた小泉明教授、実験を行なうにあたって多くのご教示をいただいた橘定功技官、土橋ゆり子博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Machle, W. and Gregorious, F.: Cancer of respiratory system the United States chromate-producing industry, Public Health Rep., 63: 1114—1127, 1948. 2) Beatjer, A. M.: Pulmonary carcinoma in chromate workers 1., Arch. Ind.

Hyg. Occup. Med., 2: 487—504, 1950. 3) Hueper, W. C. and Payne, W. W.: Experimental studies in metal carcinogenesis chromium, nickel, iron, arsenic, Arch. Environ. Health, 5: 445—462, 1962. 4) Hueper, W. C.: Experimental studies in metal carcinogenesis, Carcinogenic effect of chromate ore roast deposited in muscle tissue and pleural cavity of rats, Arch. Ind. Health, 18: 284—291, 1958. 5) 小泉 明ほか: 産業医学および公衆衛生学の分野における染色体異常研究手技についての一知見, 産業医学, 13: 485—459, 1971. 6) Buckton, K. E. et al.: A study of the chromosome damage persisting after X-ray therapy for alkylating spondylitis, Lancet, 2: 676—682, 1962. 7) Beatjer, A. M.: The distribution and retention of chromium in men and animals, Arch. Ind. Health, 20: 136—150, 1959. 8) Goldblatt, H. W. et al.: Chromium, in Merewether, E. R. A. (Ed.): Industrial Medicine and Hygiene, Vol. 3, 188—196, Butterworths, London, 1956. 9) Herman, H. and Speck, L. B.: Interaction of chromate with nucleic acid in tissue (Communication to the editor), Science, 19: 221, 1954.

金子哲也

東京大学医学部保健学科人類生態学教室

Tetsuya KANEKO

Department of Human Ecology, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, 113 Japan

昭和50年8月27日受付

通信先: 金子あて, Reprint requests to T. Kaneko