

## II-600

### 水道水に含まれる有機塩素化合物のヒト細胞に対するDNA損傷性

京大工学部附属環境微量汚染制御実験施設 川西優喜、松田知成、松井三郎  
京大医学部放射能基礎医学教室 八木孝司、武部啓

#### 1 はじめに

水道法第4条に基づく水道水質基準が、平成4年12月21日公布、平成5年12月1日施行の省令により改正された。今回の改正で新たに13種類の有機塩素化合物が健康に関連する項目として追加された。これらの有機塩素化合物に関しては実験動物に対する発癌性が確認されているものの、人体にどのような影響を及ぼすのかと言うことは、データが乏しくあまりよく解っていない。そこで我々は、今回の水道水質基準の改正にともない新たに健康に関する項目に追加された有機塩素化合物のDNA損傷性を、ヒトの細胞を対象として、主としてDNA鎖切断を検出することによって調べた。DNA鎖切断の検出にはアルカリ巻戻し法の1つであるFADU (Fluorometric Analysis of DNA Unwinding) 法を用いた。

#### 2 実験方法

##### 1) 試験の対象とした有機塩素化合物

Bromodichloromethane, Bromoform, Carbon tetrachloride, Chlorodibromomethane, Chloroform, 1,2-Dichloroethane, cis-1,2-Dichloroethylene, 1,3-Dichloropropene, Tetrachloroethylene, 1,1,2-Trichloroethane, Trichloroethylene

##### 2) 細胞株

ヒト繊維芽細胞(human fibroblast) WI-38-VA13

SV40で形質転換したヒト繊維芽細胞株 WI-38-VA13を用いた。親株である WI-38は白人の3カ月胚の肺組織由来であり、形質転換により永続継代可能となった系統がWI-38-VA13である。DNA修復能は正常で、紫外線照射後の不定期DNA合成能も正常である。細胞は、Dulbecco改変MEM培養液に仔牛血清を10%(v/v)加えた培養液中で培養した。

##### 3) 試料の作成

各種の有機塩素化合物をDMSO (dimethyl sulfoxide) に溶解し、各濃度の有機塩素化合物DMSO溶液を作成した。次にこのDMSO溶液を無血清MEM培養液またはS-9mixに、DMSO溶液が1%(v/v)となるように溶解し試料とした。

##### 4) 試料の曝露

前日にガラスシャーレ(φ60mm)に $1.1 \times 10^6$ 個ずつ細胞を撒き、10%血清入りのMEM培養液で一晩培養した。有機塩素化合物の曝露は、3)で作成した試料5mlで細胞を37°Cで1時間処理することによって行った。曝露中はガラスシャーレをフィルム(パラフィルム(American National Can))で密閉し、有機塩素化合物の揮発防止に努めた。有機塩素化合物で処理した細胞は、処理後すぐにPBSで洗浄後アラビノシド、ヒト時シメアを含む培養液を加え、37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で3時間培養した。続いてPBSで一回洗い、トリプシン-EDTAでシャーレから細胞をはがした後、遠沈して細胞を集め、1.5mlのPBS-EDTA液に再浮遊し、できるだけ速やかにFADUを行った。

#### 3 実験結果

今回の水道水質基準の改正で新たに健康に関する項目に追加された13種類の有機塩素化合物のうち、Dichloromethaneと1,1-Dichloroethyleneを除く11種類の有機塩素化合物がヒト繊維芽細胞(WI-38-VA13)でDNA鎖切断を誘起するかどうかを調べた。Dichloromethaneと1,1-Dichloroethyleneの2物質については沸点が低く取扱が困難だったため実験に供していない。

ヒト繊維芽細胞(WI-38-VA13)を11種類の有機塩素化合物にそれぞれ1時間曝露、araC-HU 培養液中で3

時間培養した後、トリプシン-EDTAで細胞を回収し、FADU法でDNA鎖切断数を定量した。試料曝露時の有機塩素化合物の濃度は水に溶けうる最高濃度とし、またその濃度では細胞毒性が強く、細胞が死滅してしまうため細胞回収が不可能でFADU法を適用できなかった場合には、その10分の1濃度で細胞を処理することとした。

有機塩素化合物への細胞の曝露はS-9mix存在下、あるいは非存在下の2つの条件でそれぞれ行った。結果を表-1に示す。有機塩素化合物に曝露した細胞のDNA鎖切断量が対照群（DMSOのみに曝露した細胞）のDNA鎖切断量に比し2倍以上であった物質についてはさらに暴露濃度-DNA鎖切断数の関係を調べ、濃度依存的にDNA鎖切断数の上昇が認められた物質を陽性と判定し、それ以外の物質は陰性と判定した。図-1に1,3-Dichloropropeneと1,2-Dichloroethaneの濃度-DNA鎖切断曲線を示す。1,3-Dichloropropeneでは濃度依存的なDNA鎖切断が観察されS-9mix添加による影響はあまりみられなかった。

1,2-DichloroethaneはS-9mixの添加によりDNA鎖切断誘起能が高くなった。

#### 4 結論

1) 今回の水道水質基準改正で健康に関する項目として新たに加えられた13種類の有機塩素化合物のうち、Dichloromethaneと1,1-Dichloroethyleneを除く11種類の有機塩素化合物がヒト繊維芽細胞（WI-38-VA13）にin vitroでDNA鎖切断を誘起するか否かをFADU法を用いて調べた。その結果1,2-Dichloroethane、1,3-Dichloropropeneの2物質がDNA鎖切断を引き起こすことがわかった。

2) 1,2-Dichloroethane、1,3-Dichloropropeneはヒト繊維芽細胞に濃度依存的なDNA鎖切断を誘起した。

また1,2-DichloroethaneをS-9mixとともに細胞に曝露すると顕著なDNA鎖切断が検出されたが、

1,3-Dichloropropeneの誘起するDNA鎖切断についてはS-9mix添加の影響はみられなかった。

1,2-Dichloroethaneは代謝によって強いDNA鎖切断誘起能を獲得することがわかった。

表-1 実験結果

| 物質名                      | 濃度<br>(ppm) | 判定<br>S-9mix |   |
|--------------------------|-------------|--------------|---|
|                          |             | 無            | 有 |
| Bromodichloromethane     | 1000        | -            | - |
| Bromoform                | 100         | -            | - |
| Carbon tetrachloride     | 100         | -            | - |
| Chlorodibromomethane     | 100         | -            | - |
| Chloroform               | 1000        | -            | - |
| 1,2-Dichloroethane       | 1000        | +            | + |
| cis-1,2-Dichloroethylene | 1000        | -            | - |
| 1,3-Dichloropropene      | 100         | +            | + |
| Tetrachloroethylene      | 100         | -            | - |
| 1,1,2-Trichloroethane    | 100         | -            | - |
| Trichloroethylene        | 100         | -            | - |

表に示した濃度において、検出されたDNA鎖切断数が対照の2倍を越え、かつDNA鎖切断に濃度依存性が認められた物質は陽性(+)と判定し、それ以外の物質は陰性(-)と判定した。

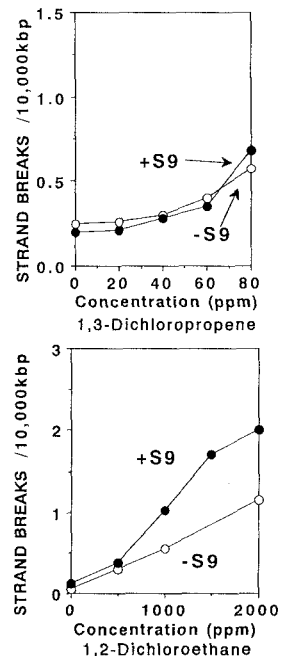


図-1 DNA鎖切断の濃度依存性