



Title	Genotoxic Effects of $\alpha$ -Endosulfan and $\beta$ -Endosulfan on Human HepG2 Cells
Author(s)	呂, 玉泉
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42649">https://hdl.handle.net/11094/42649</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	呂玉泉
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15755号
学位授与年月日	平成12年10月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科社会系専攻
学位論文名	Genotoxic Effects of $\alpha$ -Endosulfan and $\beta$ -Endosulfan on Human HepG2 Cells ( $\alpha$ -エンドスルファンと $\beta$ -エンドスルファンのHepG2細胞における遺伝毒性)
論文審査委員	(主査) 教授 森本 兼曩
	(副査) 教授 野村 大成 教授 奥山 明彦

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

エンドスルファン(endosulfan)は世界的によく使われる有機塩素系農薬であり、内分泌搅乱物質であることがよく知られている。この内分泌搅乱物質の遺伝毒性に関する報告は少数見られるが、異性体である $\alpha$ -エンドスルファン( $\alpha$ -endosulfan)と $\beta$ -エンドスルファン( $\beta$ -endosulfan)のそれぞれの遺伝毒性については、これまで報告は見られない。この二つの異性体の遺伝毒性の違い、あるいはendosulfan分子の立体構造と遺伝毒性の関連の有無についてまだ不明な点が多く残っている。これを解明するため、本研究はヒト肝癌細胞であるHepG2細胞を用い、*in vitro*で $1 \times 10^{-12}$  M~ $1 \times 10^{-3}$  Mまでの濃度範囲で $\alpha$ -endosulfanと $\beta$ -endosulfanのそれぞれの遺伝毒性をSCE, MN及びSCG法を指標として検討した。

#### 【方法】

##### 1. 姉妹染色分体交換(sister chromatid exchange, SCE)

HepG2細胞を継代後、48時間培養により安定化して、様々な濃度の $\alpha$ -endosulfanと $\beta$ -endosulfanを添加後、37°C、48時間培養し、colcemidにより細胞分裂をM期にて停止させ、Fluorescence-plus-Giemsa(FPG)法にてM期細胞の染色体を分染して、姉妹染色分体交換頻度(SCE数/染色体)を顕微鏡下で測定した。

##### 2. 小核(micronucleus, MN) :

HepG2細胞を継代後、48時間培養により安定化して、様々な濃度の $\alpha$ -endosulfanと $\beta$ -endosulfanを添加後、37°C、48時間培養し、カルノア液で固定した後、acridine orangeにて染色し、間期細胞の中の小核を有する細胞の頻度(MNを有する細胞数/2000観察細胞数)を測定した。

##### 3. SCG(single cell gel electrophoresis; 或いはComet assay)法:

HepG2細胞を継代後、48時間培養により安定化して、様々な濃度の $\alpha$ -endosulfanと $\beta$ -endosulfanを添加後、37°C、1時間培養した。電気泳動用低ゲル化温度アガロースにて細胞をスライドグラスの上に固定した後、アルカリ液にて細胞を溶解し、DNAを変性させて、電気泳動を行った。切断型損傷により生じたDNA断片はその長さに応じた距離だけ移動する。従って、ethidium bromide染色後、Comet tail様の像として検出される。このtailの長さ(tail length)はDNA損傷程度と相關するため、本実験では細胞のtail length(μm)によりDNA損傷程度を表した。

## [結果]

$\beta$ -Endosulfan を48時間で HepG2細胞に負荷した後、SCE ( $1 \times 10^{-7}$  M~ $1 \times 10^{-5}$  M) 及び MN ( $5 \times 10^{-5}$  M~ $1 \times 10^{-3}$  M) の頻度は有意に増加した。しかし、同様の実験条件にて、 $\alpha$ -endosulfan は SCE 頻度に影響を与えたかった。 $\alpha$ -endosulfan は MN の頻度を上昇させたが、有意差は見られなかった。二つの異性体を HepG2細胞にそれぞれ1時間負荷した後、SCG 法にて DNA 損傷を測定した結果、 $\beta$ -endosulfan は  $1 \times 10^{-3}$  M の濃度で有意に DNA 損傷を誘発したが、 $\alpha$ -endosulfan はそれよりも低い濃度 ( $2 \times 10^{-4}$  M) にて有意に DNA 損傷を誘発した。

## [総括]

1. HepG2細胞において、 $\beta$ -endosulfan は SCE 頻度を有意に増加させ、 $\alpha$ -endosulfan は SCE 頻度に有意な影響を与えないことを初めて明らかにした。
2. HepG2細胞において、 $\beta$ -endosulfan は MN 頻度を有意に増加させ、 $\alpha$ -endosulfan は MN 頻度に有意な影響を与えないことを初めて明らかにした。
3.  $\alpha$ -endosulfan 及び  $\beta$ -endosulfan は HepG2細胞において切断型 DNA 損傷を有意に増加させることを初めて明らかにした。このアッセイ系においては  $\alpha$ -endosulfan のほうが  $\beta$ -endosulfan よりも毒性が強いことを示唆されました。
4. 以上の結果から見ると、 $\alpha$ -endosulfan 及び  $\beta$ -endosulfan は HepG2細胞に対する遺伝毒性を有しているが、遺伝毒性の特徴及び作用濃度は異なることが判った。 $\beta$ -endosulfan は比較的低濃度 ( $\leq 5 \times 10^{-5}$  M) でヒト細胞の SCE や MN の頻度を上昇させていることから、特にヒトへの健康影響に対する注意が必要と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

内分泌搅乱物質の健康影響は、重要な研究課題になっているが、その遺伝子 DNA への影響（遺伝毒性）については、ほとんど知見が得られていない。本研究では、最も多く使用されている内分泌搅乱作用を有する有機塩素系農薬である endosulfan の遺伝毒性について、異性体構造との関連性を含め詳細な検討を行った。エストロジエンレセプターを発現しているヒト肝癌由来細胞（HepG2細胞）を用い、異性体  $\alpha$ -endosulfan 及び  $\beta$ -endosulfan のそれぞれの遺伝毒性について、姉妹染色分体交換（SCE）頻度、小核（MN）形成及び単細胞 DNA 電気泳動度（SCG）を指標にして定量的に解析した。その結果、異性体  $\beta$ -endosulfan は  $1 \times 10^{-7}$  M の低濃度でそれぞれ SCE 誘発および小核形成に有意な影響を及ぼしたが、 $\alpha$ -endosulfan は高濃度でもこれらの毒性を示さなかった。SCG 法でみた DNA 鎮切断の誘発では、逆に、 $\alpha$ -endosulfan が  $\beta$ -endosulfan よりも 5 分の 1 低濃度で有意な影響をもつことが明らかとなった。これらの結果は、これまでほとんど知られていない内分泌搅乱物質の遺伝毒性についての重要な社会医学上の知見であり、学位授与に値すると考えられる。