

姉妹染色分体交換 (SCE) 頻度を指標とした チアノーゼ性先天性心疾患発生要因に関する患者 - 対照研究

大中 正光^{1,3)}, 林 美貴子²⁾, 本田 幸子²⁾, 関根 道和³⁾,
鏡森 定信³⁾

福井循環器病院心臓血管外科¹⁾, 富山県衛生研究所がん研究部²⁾,
富山医科薬科大学医学部保健医学³⁾

Key words :

先天性心疾患 (CHD), 姉妹染色分体交換
(SCE), 環境要因によるDNA損傷

Frequency of Sister Chromatid Exchanges as a Factor in Cyanotic Congenital Heart Disease

Masateru Onaka,^{1,3)} Mikiko Hayashi,²⁾ Sachiko Honda,²⁾ Michikazu Sekine,³⁾
and Sadanobu Kagamimori³⁾

¹⁾Fukui Cardiovascular Center, Fukui, ²⁾Toyama Institute of Health,

³⁾Department of Welfare Promotion and Epidemiology, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan

Background: Sister chromatid exchange (SCE) is a well-known method for evaluating actual DNA damage through the observation of chromatin.

Methods: To examine the high susceptibility to DNA damage under certain environmental conditions in patients with cyanotic congenital heart disease (CHD), we cultured peripheral blood lymph cells obtained from two different patient groups. One group consisted of 21 patients with cyanotic CHD who had recently had surgery (CHD patient group), and the other included 22 age- and gender-matched patients without CHD (normal group). The difference in SCE frequency under different environmental conditions was evaluated in the two groups using two-way analysis of variance.

Results: Under 5% O₂, SCE in the patient group was significantly increased compared with that in the normal group after the addition of mitomycin C (MMC). The probability value for the interaction term of the MMC-addition and normal groups was less than 0.01. Under different O₂ concentrations, SCE frequency in the patient group was also significantly increased with increases in O₂ concentration compared with that in the normal groups.

Conclusion: The DNA of cyanotic CHD patients tends to be damaged by environmental factors and high O₂ concentration. The high susceptibility to DNA damage observed in the present study might be related with the incidence of cyanotic CHD.

要 旨

背 景：先天性心疾患 (congenital heart disease : CHD) 発生に対する環境 - 宿主要因の関与の研究において、DNA損傷を間接的に染色体上で観察できる方法である姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange : SCE) 法はしばしば利用されている。

方 法：そこでわれわれは根治的心内修復術施行後数年経過したチアノーゼ性CHD患者および年齢、性をそろえた心疾患の認められない対照者の2群の末梢血液リンパ球を培養し、培養条件としての酸素(O₂)濃度、diethylstilbestrol (DES)添加、mitomycin C (MMC)添加がSCE頻度に及ぼす影響の比較からチアノーゼ性CHD発生におけるDNA損傷の関連を推測した。

結 果：5%O₂下でMMCの添加の有無とSCE頻度との関係を患者・対照群間で二元配置分散分析を用いて比較したところ、両群とも添加後有意にSCE頻度が上昇した。また、添加の有無と患者・対照群との間の交互作用は有意であり、MMCに対する反応性は患者群で有意に高値であった。DES添加培養の影響を検討した結果、5%O₂下と20%O₂下の患者群・対照群のいずれも、DES添加群のSCE頻度はDES無添加群に比較し有意に高く、患者群ではその増加が対照群に比較して高い傾向を示した。

結 論：このことから、チアノーゼ性CHDを有する患者は環境要因によるDNA損傷を起こしやすい状態にあると考

平成15年11月13日受付

別刷請求先：〒910-0833 福井市新保 2-228

平成16年5月17日受付

福井循環器病院心臓血管外科 大中 正光

えられ、また、酸素でさえも高濃度であればチアノーゼ性CHDの発生につながるDNA損傷を起こす一因である可能性も示唆された。

はじめに

先天性心疾患(CHD)患児の発生頻度は、出生1,000人に対し約10人と推定されているが、そのCHDの成因を遺伝と環境の面から分類すると、遺伝子病、染色体異常、催奇形因子や環境要因、多因子遺伝となる。の単一遺伝子病やの染色体異常による遺伝要因が約8%を占め、の、妊娠中に母体が風疹、梅毒などの感染症に罹患した場合、サリドマイドや抗痙攣剤などの催奇形性のある薬剤を服用した場合、あるいは母体の糖尿病やアルコール中毒など、催奇形要因や環境要因によるものが約2%、は胎児側の複数の遺伝子と胎内環境の複合作用によって生ずるもので、今まで体質と言われていたものがこれにあたり、原因不明のCHDの90%はによるものと考えられる¹⁾。

胎内環境要因として、天然物質から人工生産物まであらゆるものが考えられるが、そのなかで、最も一般的であり身近な環境要因物質の一つとして、自然界に存在する酸素がある。大気中で約20%を占める酸素は多くの生物にとって必要不可欠であるが、その濃度の変化もまた生物に大きな作用を及ぼすと考えられる。一般に*in vitro*での染色体異常試験などをはじめとする組織培養における培養室中の空気は、大気に炭酸ガス濃度5%を混合し平衡を保ったものを使用している。しかし、ヒト末梢血液中の酸素濃度は約5%、炭酸ガス濃度も約5%である²⁾ことから考えると、細胞が直に存在する組織培養中の酸素濃度は高すぎるのではないかと考えられる。実際、培養室中の酸素濃度を40~60%とさらに高く設定することにより、染色体異常や姉妹染色分体交換(SCE)がより高頻度に出現することが報告されている^{3,4)}。以前林らが行った培養酸素ガス濃度を40%とした実験では、哺乳類培養細胞(CHL)およびヒトリンパ球におけるSCE頻度が20%O₂下よりも高くなることを確認し、さらに末梢血液中と同じ5%と低濃度にした実験ではSCE頻度が低くなることを、実際にヒト由来細胞を使用して初めて明らかにした。また、われわれは60%O₂下のヒトリンパ球培養では染色体分裂像が観察されなかったことから、このような高濃度酸素は細胞毒性が高いことを確認した⁵⁻⁷⁾。さらに、卵巣周辺の組織における活性酸素の研究から、血中の酸素濃度や活性酸素が持つ細胞毒性や催奇形性についても注目されている⁸⁾。また、ヒトリンパ球培養にmitomycin C(MMC, Sigma Aldrich社)やdiethylstilbestrol(DES, Sigma Aldrich

社)の添加によってSCEが高頻度にみられることも報告されている^{9,10)}。

一般にSCE法は環境変異原性物質が引き起こしたDNA損傷の鋭敏な指標、あるいはBloom症候群の確定診断などとして用いられているが、この原理はDNA損傷をDNA修復結果の形で検出しており、DNA損傷を間接的に染色体上で観察できる方法としてよく知られている。また、他の突然変異原性物質検出法よりも低濃度でDNA損傷を検出できる場合が多いことから、より敏感な優れた方法として突然変異原性物質のスクリーニング検査法としても用いられている¹¹⁾。CHDとの関連では、CHD患者におけるSCE発生頻度が、健常対照者と比較し、有意に高い結果をMakinoら¹²⁾は報告している。そこで、われわれはチアノーゼ性CHD患者は体質的にSCEを発生しやすいのかどうかを評価するため、チアノーゼ性CHD患者および健常対照者の培養末梢血液リンパ球における各種誘発物質によるSCE発生頻度を比較し、チアノーゼ性CHD患者のDNA-染色体レベルにおける突然変異原性物質に対する脆弱性を検討してみた。

材料および方法

1. 対象

手術施行後数年経過したチアノーゼ性CHD患者およびそれに原則として年齢、性をそろえた心疾患の認められない対照者を対象とし、それぞれ患者群(group P)、および対照群(group C)とした。患者群の先天性心奇形はTable 1に示したが、CATCH22等の染色体異常や心臓以外の遺伝病は含まれていない。また、絶対数の少ない疾患のほうがその特異性を評価しやすいと考え、今回はまずチアノーゼ性CHDのみを対象とした。患者群は男性13人(4~32歳)と女性8人(7~27歳)の21人、対照群は男性10人(0~38歳)と女性12人(0~22歳)の22人を対象とした。

2. 培養

患者群および対照群から、末梢血液をヘパリン採血した。培養液は15%牛胎仔血清(GIBCO社)加RPMI1640(日水製薬社)を用い、培養液9mlに対し、phytohemagglutinin(PHA, Difco社)を0.1ml、末梢血液を1ml添加した。5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU, Sigma Aldrich社)は最終濃度が20μg/mlとなるように培養開始時より添加した。陽性対照のMMCは最終濃度 1×10^{-8} M、DESはdim-

ethylsulfoxide (DMSO, Merck社)に溶解し、最終濃度 $2 \times 10^{-5}M$ にし、培養開始時より添加した。その濃度はいずれも予備実験により決定した。また、DESの培養対照として、DMSOを用いた。添加後、各培養ガス室(37°C)の光を遮り暗下にて3日間培養した。各条件により、MMC無添加の溶媒対照群、MMC添加群、DES無添加の溶媒対照群、およびDES添加群とした。

3. 培養酸素濃度

培養酸素濃度は過去にSCE頻度の変化を研究した文献^{2,5)}で報告がみられる5, 20, 40%とし、いずれも炭酸ガス濃度5%, 窒素バランスとした(日本酸素社)。

4. 染色体標本作製

培養終了2時間前にcolcemid (GIBCO社)を $0.1\mu g/ml$ になるように添加し、培養終了後、通常の染色体分析方法に従い、低張処理、固定を行い、染色体標本作製した。

5. SCEの分染法

染色体標本を $50\mu g/ml$ のHoechst 33258で20分間染色、水洗後、pH8.0リン酸緩衝液で封入、60°Cホットプレート上にて10分間紫外線照射、水洗後、5%ギムザ液で5分間染色し、水洗した。これは森本¹³⁾の方法におおむね従った。

6. SCE頻度の計測および統計検定法

SCEの計測方法は広瀬ら¹⁴⁾の方法により、中期分裂1細胞ごとのSCE個数を計測し、「SCE/cell」を各条件下20細胞以上観察し、その平均値をSCE頻度として比較した。値は平均 \pm 標準誤差で表し、統計検定法はSPSS 7.5.1Jを用いて分散分析法によった。有意水準5%とした。

結 果

患者群および対照群の各条件下のSCE頻度はTable 2, 3に示した通りである。そのSCE頻度には患者群内、対照群内における男女間、年齢による有意な差はみられなかったため、患者群、対照群とも一群として分散分析法による検定を行った。

1. 培養酸素濃度が及ぼす影響

患者群の培養酸素濃度間の比較のためMMC無添加の場合について分散分析法による検定を行ったところ、高酸素濃度下では有意にSCE頻度が高かった($p < 0.001$) (Fig. 1)。うち、5% O_2 下(4.3 ± 0.2)と40% O_2 下(5.7 ± 0.5)

Table 1 Patient characteristics

Case	Sex	Age	CHD
1	M	4	TOF
2	M	7	TOF
3	M	8	SV, PS
4	M	8	TA, PS
5	M	9	DORV, PS
6	M	13	DORV, PLSVC
7	M	13	TGA (I)
8	M	13	TOF
9	M	14	TOF
10	M	15	PPA
11	M	17	TOF
12	M	17	PA, VSD, SA
13	M	32	TOF
14	F	7	TA, PA
15	F	7	DCRV
16	F	8	PA
17	F	17	TOF
18	F	17	TOF
19	F	17	TGA (I)
20	F	22	TGA (III)
21	F	27	TOF

CHD: congenital heart disease, TOF: tetralogy of Fallot, SV: single ventricle, PS: pulmonary stenosis, TA: tricuspid atresia, DORV: double-outlet right ventricle, PLSVC: persistent left superior vena cava, TGA: transposition of great arteries, PPA: pure pulmonary atresia, PA: pulmonary atresia, VSD: ventricular septal defect, SA: single atrium, DCRV: double-chambered right ventricle

間、20% O_2 下(4.7 ± 0.3)と40% O_2 下(5.7 ± 0.5)間は、各 $p < 0.005$, $p < 0.01$ であった。対照群内でも同様に検定したところ、高酸素濃度下では有意にSCE頻度が高かった($p < 0.001$)。うち、5% O_2 下(3.9 ± 0.2)と20% O_2 下(4.6 ± 0.3)間、5% O_2 下(3.9 ± 0.2)と40% O_2 下(5.1 ± 0.3)間は、各 $p < 0.05$, $p < 0.001$ であり、20% O_2 下と40% O_2 下間では $p = 0.061$ であった。この傾向はDES無添加の場合も同様の結果であった。

2. MMCが及ぼす影響

陽性対照としたMMC($1 \times 10^{-8}M$)添加培養では、患者群の5% O_2 下(MMC-群 4.3 ± 0.2 , MMC+群 7.6 ± 0.4)、20% O_2 下(MMC-群 4.7 ± 0.3 , MMC+群 7.5 ± 0.5)ともにMMC+群のSCE頻度の有意な上昇が認められた($p < 0.01$)。同様に対照群の5% O_2 下(MMC-群 3.9 ± 0.2 , MMC+群 6.6 ± 0.3)、20% O_2 下(MMC-群 4.6 ± 0.3 , MMC+群 7.2 ± 0.4)ともにMMC+群のSCE頻度の有意な上昇が認められた($p < 0.01$)。

Table 2 SCE frequency in patient group

Experimental condition			5%				20%				40%
Case	Sex	Age	MMC-	MMC+	DES-	DES+	MMC-	MMC+	DES-	DES+	MMC-
1	M	4	3.4±1.9	-	-	5.8±2.0	4.5±1.9	-	-	-	-
2	M	7	3.8±1.7	8.7±3.7	4.5±3.2	5.5±2.8	5.7±2.3	10.8±2.4	5.7±2.6	7.1±3.0	-
3	M	8	4.7±2.2	10.1±3.3	5.2±2.2	7.8±2.9	5.7±2.2	12.5±2.9	6.2±1.8	9.2±3.9	8.2±3.4
4	M	8	4.0±1.4	6.2±3.0	4.0±1.7	6.3±3.7	3.4±1.8	6.5±2.9	5.2±2.5	6.7±1.8	5.2±2.4
5	M	9	5.0±2.2	10.6±4.8	3.7±2.9	6.3±3.4	4.8±2.0	10.5±4.9	4.8±2.8	5.8±2.3	-
6	M	13	4.2±1.7	7.8±3.8	4.4±2.1	6.3±3.4	3.6±1.9	7.0±3.1	4.5±2.5	8.2±3.2	-
7	M	13	3.1±1.3	4.2±1.1	3.1±1.4	4.6±2.0	3.0±1.5	4.6±1.9	3.3±1.6	4.1±1.6	3.5±1.6
8	M	13	3.7±2.1	5.1±2.5	2.6±1.3	4.1±2.2	3.3±1.8	5.5±1.9	4.2±2.1	4.5±1.9	4.3±2.1
9	M	14	5.4±2.2	8.0±2.4	5.0±2.8	7.3±3.3	6.1±2.1	10.4±3.2	5.8±2.5	7.2±2.2	6.9±2.4
10	M	15	4.5±1.4	9.2±2.4	4.8±2.8	5.1±1.6	4.3±2.1	6.8±2.1	3.4±1.7	5.1±1.9	-
11	M	17	4.2±1.8	10.0±3.8	5.2±2.5	7.5±3.6	5.7±1.9	9.7±2.3	5.2±3.3	5.8±2.8	-
12	M	17	5.0±2.5	7.9±3.0	4.0±1.8	-	-	-	-	-	5.2±2.3
13	M	32	4.7±2.2	6.6±3.3	4.9±2.0	6.1±2.8	4.0±1.7	6.0±2.7	5.0±2.3	5.2±1.6	5.0±2.0
14	F	7	4.3±1.9	9.0±3.2	5.0±2.2	7.1±2.5	5.4±2.6	9.1±2.8	5.4±2.6	8.7±2.9	5.9±1.7
15	F	7	2.7±0.9	5.3±2.8	-	-	3.3±1.2	4.1±1.5	-	-	3.2±1.5
16	F	8	4.6±1.6	7.4±2.5	5.2±2.6	-	4.6±2.1	7.9±3.0	6.0±3.0	-	6.2±3.2
17	F	17	4.3±2.8	8.2±3.8	3.3±1.5	6.1±3.1	5.3±2.0	6.3±2.6	5.0±2.8	6.6±3.1	-
18	F	17	4.6±2.3	8.0±3.0	3.6±2.0	-	-	-	-	-	-
19	F	17	4.6±1.9	7.1±7.2	3.9±1.4	7.6±2.3	4.1±1.8	-	4.3±1.9	-	8.6±3.0
20	F	22	4.8±3.3	7.2±1.7	5.2±2.7	-	7.7±3.2	7.0±3.4	4.9±1.9	-	7.0±2.9
21	F	27	2.8±1.2	5.9±1.9	3.6±1.9	4.6±1.6	3.5±1.1	5.9±2.2	3.0±1.1	6.0±3.2	5.3±2.4
Mean			4.3±0.2	7.6±0.4	4.3±0.2	6.1±0.3	4.7±0.3	7.5±0.5	4.8±0.2	6.3±0.4	5.7±0.5

SCE: sister chromatid exchange, MMC: mitomycin C, DES: diethylstilbestrol

3. DESが及ぼす影響

DES ($2 \times 10^{-5}M$) 添加培養により, 患者群の 5%O₂下 (DES-群 4.3 ± 0.2 , DES+群 6.1 ± 0.3), 20%O₂下 (DES-群 4.8 ± 0.2 , DES+群 6.3 ± 0.4) とともに DES+群の SCE 頻度の有意な上昇が認められた ($p < 0.01$) (Fig. 2). さらに, 男女別に分析しても同様であった. 同様に対照群の 5%O₂下 (DES-群 4.4 ± 0.2 , DES+群 5.8 ± 0.3), 20%O₂下 (DES-群 4.7 ± 0.3 , DES+群 6.2 ± 0.3) とともに DES+群の SCE 頻度の有意な上昇が認められた ($p < 0.01$). さらに, 男女別に分析しても同様であった.

4. 患者群・対照群間の SCE 頻度の比較

各条件下における患者群と対照群との SCE 頻度の比較を行った結果, 5%O₂下で MMC 添加の作用を検討したところ二元配置分散分析にて, 疾患の有無と MMC 添加に交互作用項が有意であり ($p < 0.01$), MMC 添加群において SCE 頻度を増加させる方向へ作用していた ($p < 0.01$) (Fig. 3). つまり, 5%O₂下 MMC 添加による患者群の SCE 頻度 (7.6 ± 0.4) は対照群 (6.6 ± 0.3) に比較し, MMC に

対する反応性が有意に高かった. さらに, 培養酸素濃度が及ぼす影響について MMC 無添加の場合の比較を行った結果, 5%O₂下 (患者群 4.3 ± 0.2 , 対照群 3.9 ± 0.2), 20%O₂下 (患者群 4.7 ± 0.3 , 対照群 4.6 ± 0.2), 40%O₂下 (患者群 5.7 ± 0.5 , 対照群 5.1 ± 0.3) で, 二元配置分散分析にて, 疾患の有無と酸素濃度 (%) との間に交互作用項の検討で患者群の SCE 誘発性が高い傾向を示した ($p = 0.08$) (Fig. 1). また, 5%O₂下で DES 添加の作用を検討すると, 患者群の SCE 頻度 (6.1 ± 0.3) は対照群 (5.8 ± 0.3) に比較して, DES に対する反応性が高い傾向を示した ($p = 0.087$) (Fig. 3).

考 察

SCE は 1 本の染色分体を構成する 1 対の染色分体 (姉妹染色分体) が互いにその相同部分を交換する現象であり, BrdU 標識による SCE の検出は, 細胞を BrdU 存在下に 2 細胞周期培養すると 1 本鎖のみ BrdU で置換された染色分体と 2 本鎖とも BrdU で置換された染色分体が形成され, その染色性に差が生じ, 両者が識別可能にな

Table 3 SCE frequency in control group

Experimental condition			5%				20%				40%
Case	Sex	Age	MMC-	MMC+	DES-	DES+	MMC-	MMC+	DES-	DES+	MMC-
1	M	0	2.6±1.3	5.5±1.2	4.1±1.7	4.3±1.5	2.9±1.4	5.6±1.4	3.0±1.2	5.0±2.0	4.7±1.3
2	M	1	4.0±1.7	9.4±2.4	5.2±2.4	7.0±2.6	4.3±2.1	9.3±4.1	4.8±1.3	8.3±3.6	5.3±1.9
3	M	3	3.1±1.2	8.3±2.6	4.0±1.7	5.4±1.9	3.2±1.5	7.4±2.3	4.2±2.5	5.4±2.1	3.5±1.9
4	M	4	3.2±0.9	5.3±1.8	4.1±1.3	4.7±1.4	3.5±1.6	-	3.5±1.7	4.0±2.5	4.7±2.1
5	M	7	3.7±1.7	7.6±2.7	3.3±1.1	5.7±1.7	-	-	-	-	-
6	M	20	3.0±1.2	6.1±2.4	4.7±2.3	6.0±1.7	4.4±1.9	4.6±2.2	4.6±1.5	6.4±3.2	3.5±2.0
7	M	22	3.8±1.3	5.9±2.0	4.4±2.0	6.3±2.1	4.2±2.2	6.9±1.9	4.4±1.7	6.8±3.2	5.9±2.4
8	M	24	4.2±1.4	7.4±2.6	4.0±1.5	7.5±3.7	4.2±2.2	5.2±2.5	4.6±2.9	5.4±2.5	5.0±2.4
9	M	36	5.9±2.8	7.3±2.8	5.4±3.6	6.4±2.1	5.2±1.5	6.2±1.6	5.1±2.3	6.8±2.6	5.4±1.9
10	M	38	3.4±1.6	5.7±2.8	4.3±1.7	4.9±1.8	5.1±2.3	5.2±2.2	4.7±0.9	4.7±0.9	4.5±2.1
11	F	0	3.2±1.4	5.8±2.2	3.2±1.2	4.8±1.9	4.7±2.1	7.9±2.2	4.3±1.5	5.0±2.8	-
12	F	1	3.5±2.1	5.4±1.7	4.4±1.9	3.6±2.6	4.2±1.9	5.5±2.0	3.4±2.1	-	-
13	F	1	2.9±1.0	6.0±2.3	3.2±1.5	3.8±2.3	3.7±1.1	6.3±2.6	4.1±1.8	4.9±1.8	3.5±1.6
14	F	3	3.4±1.9	5.7±2.0	5.5±3.8	7.1±2.5	4.9±1.9	9.8±4.5	5.1±1.8	5.7±2.9	-
15	F	5	-	-	-	5.6±1.9	-	-	-	-	-
16	F	9	-	-	3.7±1.3	-	5.0±2.4	7.7±2.7	4.0±1.4	-	-
17	F	19	4.5±2.2	5.8±2.4	3.8±1.6	6.3±2.7	5.9±2.4	7.5±3.3	6.5±2.6	6.1±3.1	5.5±2.3
18	F	19	4.2±2.5	5.8±2.4	3.9±1.9	5.9±2.8	4.3±2.0	7.4±3.7	4.3±2.0	6.6±3.7	4.4±1.5
19	F	19	5.1±2.0	8.1±2.5	6.0±2.7	8.0±2.8	6.7±3.8	10.2±3.4	7.1±2.2	8.3±3.8	-
20	F	21	3.9±2.0	7.8±2.8	4.1±1.9	6.0±2.6	-	7.6±3.7	-	-	7.9±3.3
21	F	22	6.0±1.9	8.1±2.9	6.0±2.4	6.6±2.5	7.0±2.5	9.5±2.7	6.6±1.9	8.1±2.5	7.8±3.0
22	F	22	4.1±1.7	5.4±1.9	4.1±1.7	-	4.3±1.7	7.6±2.4	-	5.5±2.4	4.8±1.7
Mean			3.9±0.2	6.6±0.3	4.4±0.2	5.8±0.3	4.6±0.3	7.2±0.4	4.7±0.3	6.2±0.3	5.1±0.3

SCE: sister chromatid exchange, MMC: mitomycin C, DES: diethylstilbestrol

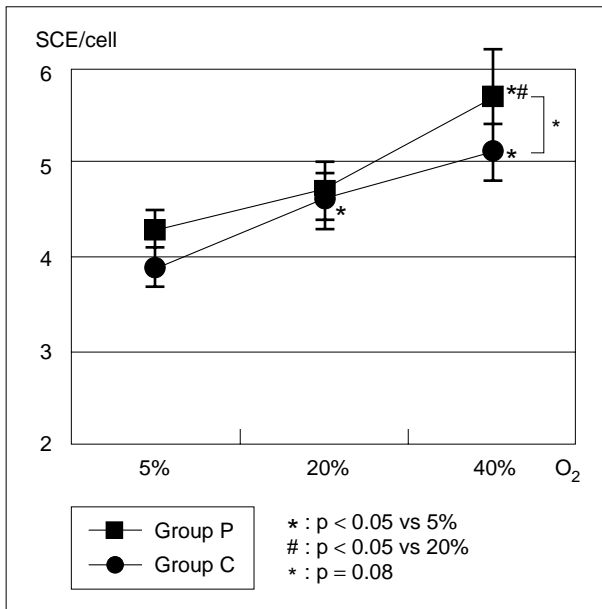


Fig. 1 Comparison of SCE frequency without MMC. Under 40% O₂, SCE frequency in the patient group was increased more than that in the control group. SCE: sister chromatid exchange, MMC: mitomycin C

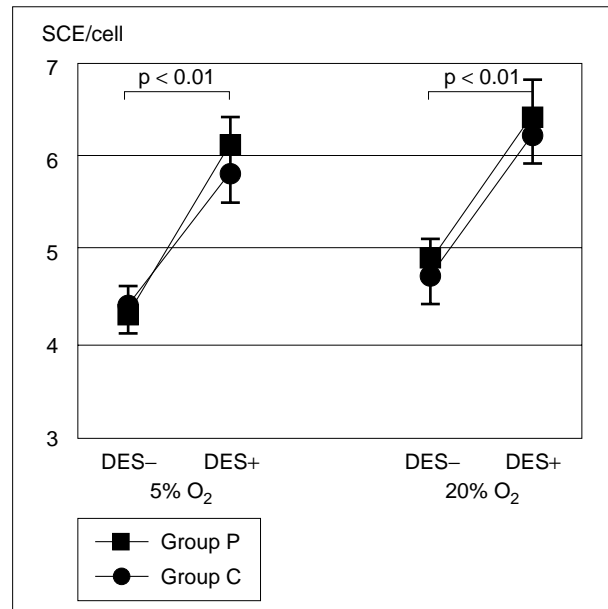


Fig. 2 Comparison of SCE frequency with DES. Under 5% and 20% O₂, SCE frequency in both groups was significantly increased with DES. SCE: sister chromatid exchange, DES: diethylstilbestrol

るとい原理に基づいている．SCEはDNAの損傷に対する修復の結果と言われており，低濃度の突然変異原性物質の曝露により誘発される場合が多いことから，化学物質の変異原性の指標として用いられている．その他，工場労働者の環境汚染物質等へのモニタリング調査，ある疾患患者などでのhost側のDNA・染色体レベルでの脆弱性を検出する目的でも用いられている．

GilleらはHeLa細胞¹⁵⁾，およびチャイニーズハムスター細胞(CHO細胞⁹⁾)を用い，高酸素圧下でのSCE頻度の増加を報告しているが，林らはチャイニーズハムスター細胞(CHL細胞)とヒトリンパ球を用い，低酸素圧(5%)下でSCE頻度が減少することを初めて明らかにし，さらに，高酸素圧(40%)下でSCE頻度の増加を確認した^{5,6)}．しかし，酸素濃度5%下と20%下との比較では，女性リンパ球では有意な差が存在したが男性リンパ球では差が認められなかった⁷⁾．そのため，酸素に対する感受性に対して性差の存在が疑われたが，今回，5%下と40%下との比較では，男女ともに40%下ではSCE頻度の有意な上昇が観察され，高酸素条件下では男女の差はなく，酸素の影響によるDNA損傷の存在があると考えられた．

MakinoらはCHD患児の手術前の末梢血液リンパ球を培養し，SCE頻度が同年齢対照児に比較し有意に高いと報告している¹⁰⁾．今回，われわれは心内修復術後数年を経て常時の服薬もない予後観察中のチアノーゼ性CHD患者(染色体異常者は除外)を対象に末梢血液リンパ球の培養を行い，培養酸素濃度の変化，DES添加，MMC添加がSCE頻度に及ぼす影響を調査した．その結果，5% O₂下でのMMCおよびDESの添加，無添加それぞれの各条件下において，交互作用項の検定では反応パターンの異なりが認められ，MMCに対する反応性が患者群では有意に高いと認められた．さらに，培養酸素濃度の違い(5%，20%，40%)を指標としても，同じく反応パターンの違いから，患者群の反応性が有意に大きい傾向が認められた．これはMakinoらの報告を支持するとともに，新たに負荷的条件に対する患者群のDNAの脆弱性をうかがわせる結果を得たと考えられた．

DES添加培養の影響を検討した結果，5% O₂下と20% O₂下の患者群・対照群のいずれも，DES添加群のSCE頻度はDES無添加群に比較し常に有意に高かった．この結果は過去のわれわれの報告⁷⁾と矛盾しない．また，陽性対照とした低濃度MMC添加培養でも有意な差が認められたため，得られた成績は信頼できるものと考えられた．

この研究で，チアノーゼ性CHD患者の環境要因によるSCE頻度の高い反応性，つまりDNA損傷を起こしや

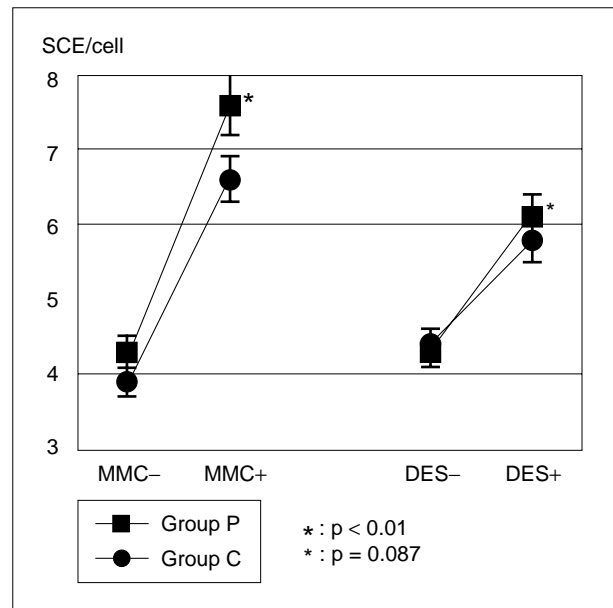


Fig. 3 Comparison of SCE frequency under 5% O₂. Under 5% O₂, SCE frequency in the patient group was significantly increased compared with that in the control group, with MMC ($p < 0.01$). Under 5% O₂, SCE frequency in the patient group was increased compared with that in the control group, with DES ($p = 0.087$). SCE: sister chromatid exchange, MMC: mitomycin C, DES: diethylstilbestrol

すい可能性を示したが，その脆弱性についてはCHDの原因なのか，それとも結果なのか，現段階で結論づけることは不可能である．仮に，生後の治療過程で各種の要因に曝露された結果であるならば，発症後にCHDと同じような要因に曝露されるCHDでない患者群(例えば川崎病など)で同様の検討をすることも今後の課題となる．また，非チアノーゼ性CHDへ対象を広げての確認も必要となる．しかし，CHDが発生した時点でDNA-染色体レベルの脆弱性が得られるのであれば，人工的にCHDを発生させることができない限り，原因が結果かを明確にはできないであろう．また，出生児のCHD発生率は約1%と言われるが，22週以上の死産で10%，さらに流産胎児をも含めれば受精卵の心異常発生率は50%以上とも言われている¹⁶⁾．流産胎児の多くは心拍動が得られる4週前後の心臓形成の失敗によるものと考えられるが，出生し得た心奇形は受精卵の心臓形成失敗を含めたすべてのCHDのなかでは少数派であり軽症である．今後はさらに発生過程を遡った研究を重ねる必要があり，今回の結果はまだCHDの発生要因のごく一部しかみていないかもしれない．

しかしながら，それが原因であれ結果であれ，患者群がDNAの脆弱性を持っていることは確かであり，それは

次世代に遺伝，発生する可能性があることは，今回対象としたチアノーゼ性CHD術後患者の結婚，妊娠および出産を考えるうえで重要なことであると思われる。

まとめ

われわれは心内修復術後数年を経て遠隔期観察中のチアノーゼ性CHD患者を対象に末梢血液リンパ球の培養を行い，培養酸素濃度の変化，MMCおよびDES添加がSCE頻度に及ぼす影響を検討した。その結果，5%O₂下では，MMCに対する反応性が患者群では有意に高いと認められ，また，DES添加群でもDES無添加群に比較し有意に高く，患者群ではその増加が対照群に比較して有意傾向を示した。さらに，培養酸素濃度を变化させた実験でも，患者群で高濃度酸素により敏感に反応する傾向が示された。これらのことより，チアノーゼ性CHD患者は環境要因によるDNA障害を起こしやすい状態にあると考えられた。

追記

この研究は平成15年厚生労働省告示第255号「臨床研究に関する倫理指針」が施行された平成15年7月30日より以前に行われたもので，研究開始時当施設には倫理委員会はなく，そのため倫理委員会には諮られていない。同指針には細則として，同指針が施行される前にすでに着手された臨床研究に対しては適用しない，とされている。患児等からの血液採取にあたっては被採血者ならびにその保護者に目的や意義を説明し，了解を得たもののみ検体として利用させていただいた。このように多くの方々にご協力をいただいたことを報告するとともに感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Nora JJ: Update on the etiology of congenital heart disease and genetic counseling, in Van Praagh R, Takao A (eds): Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease. New York, Futura, 1980, pp21-39
- 2) 林 秀生：肺と組織の間のガス運搬．松田幸次郎等共著：医科生理学展望，東京，丸善，1980，pp552-559
- 3) Gille JJP, Mullaart E, Vijg J, et al: Chromosomal instability in an oxygen-tolerant variant of Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 1989; 219: 17-28
- 4) Joenje H, Oostra AB: Oxygen-induced cytogenetic instability in normal human lymphocytes. *Hum Genet* 1986; 74: 438-440
- 5) 林美貴子，本田幸子，鏡森定信，ほか：姉妹染色分体交換に及ぼす培養酸素濃度の影響 1. CHL細胞について．富山衛研年報 1993; 16: 44-55
- 6) Hayashi M, Honda S, Shinagawa Y, et al: Effect of oxygen concentration in culture on the frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes and CHL cells. *Mutat Res* 1989; 292: 266
- 7) 林美貴子，大中正光，鏡森定信，ほか：反復流産夫婦のリンパ球姉妹染色分体交換発生と女性ホルモン及び培養酸素濃度に関する実験的影響．北陸公衛誌 1995; 22: 35-41
- 8) Graham JA, Menzel DB, Miller FJ, et al: Influence of ozone on pentobarbital-induced sleeping time in mice, rats, and hamsters. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 61: 64-73
- 9) Hill A, Wolff S: Increased induction of sister chromatid exchange by diethylstilbestrol in lymphocytes from pregnant and premenopausal woman. *Cancer Res* 1982; 42: 893-896
- 10) Latt SA: Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: Detection by fluorescence and induction of mitomycin C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 3162-3166
- 11) Perry P, Wolff S: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; 251: 156-158
- 12) Makino T, Kagamimori S, Watanabe M, et al: Sister chromatid exchange in children with congenital heart disease. *Jpn J Exp Med* 1988; 58: 51-53
- 13) 森本 兼：ヒトリンパ球培養と化学物質誘発姉妹染色分体交換．組織培養 1984; 10: 260-265
- 14) 広瀬三智子，鏡森定信，牧野哲也，ほか：染色体損傷スクリーニングとしての姉妹染色分体交換検査におけるComparabilityの検討．北陸公衛誌 1984; 11: 33-39
- 15) Gille JJP, Joenje H: Chromosomal instability and progressive loss of chromosomes in HeLa cells during adaptation to hyperoxic growth conditions. *Mutat Res* 1989; 219: 225-230
- 16) Ursell PC, Byrne JM, Strobino BA: Significance of cardiac defects in the developing fetus: A study of spontaneous abortuses. *Circulation* 1985; 72: 1232-1236