

博士学位論文

高感度検出系を用いた
低濃度トリチウム水による
体細胞突然変異に関する研究

令和3年6月

茨城大学大学院理工学研究科
量子線科学専攻

長島 明輝

要旨

福島第一原子力発電所事故を契機に、低線量の放射線被曝による健康影響が一般公衆の関心事になっている。とりわけ、施設内で発生する放射性同位元素を含む汚染水については、多核種除去設備（ALPS）などによりその中に含まれる大部分の放射性同位元素が除去されるが、トリチウム（トリチウム水：HTO）は除去することができない。将来的に ALPS 処理水を処分する際に HTO による人体や環境に与える影響や社会的な風評が懸念されている。そのため、低濃度 HTO 曝露による生物影響を明らかにすることが喫緊の課題となっている。

低線量被曝においては発がんや遺伝子変異といった確率的影響に対する評価が特に重要である。しかしながら、一般的に確率的影響として生じる事象は自然発生でも起こり得るため、低線量、低線量率の放射線被曝ではそれが自然発生によるものか、放射線に誘発されて生じたものかを区別することが困難となる。本研究では、低濃度 HTO による体細胞突然変異の線量率依存性を調べるため、体細胞突然変異の高感度検出系（GM06318-10 細胞）を用いた研究を行った。GM06318-10 細胞は内在性の *Hprt1* 遺伝子が欠損したハムスター細胞に正常なヒト X 染色体を導入し、ヒト X 染色体上の *HPRT1* 遺伝子を突然変異の標的とした細胞系である。この細胞系において細胞の生存はヒト X 染色体で起こる突然変異イベントとは独立しており、加えてげっ歯類細胞に導入されたヒト染色体の不安定性という特徴と合わせて、内在性の *Hprt1* 遺伝子を標的とした従来の検出系と比較して約 50~100 倍の高頻度で突然変異を検出できる。

これまでに、GM06318-10 細胞に低線量 X 線を照射した際の突然変異体頻度解析の結果、X 線誘発突然変異体頻度は線量依存的に増加し、0.15 Gy 以上の線量で非照射群に対し統計的に有意であったことを明らかにした。また、GM06318-10 細胞系では突然変異体の変異スペクトルを解析することにより放射線誘発による変異と自然発生による変異を区別できる可能性があることを報告した。

本研究では、コンフルエントの GM06318-10 細胞に低濃度 HTO 処理を行い、突然変異体頻度と突然変異スペクトルの線量率依存性を調べ、低濃度 HTO による突然変異影響を明らかにすることを目的とした。細胞への HTO 曝露は 4.9 mGy/day から 192 mGy/day までの線量率で、総線量が 0.2 Gy に達するまで HTO を含む培地で培養することで行った。その結果、HTO 誘発突然変異体頻

度は 21.6 mGy/day 以上の線量率で非照射の Control に対して有意に増加したのに対し、11.0 mGy /day 以下の線量率では Control とほぼ同程度の値となり、線量率の低下による顕著な傾向の変化が見られた。また、HTO 誘発 HPRT 欠損突然変異体について、ヒト X 染色体特有の 4 座の STS マーカーを指標とした PCR 解析により変異スペクトルを調べたところ、実験で用いた線量率のうち、高い線量率の HTO 曝露では放射線による DSB によりヒト X 染色体が欠失することで形成された変異体が明確に増加する傾向が認められたのに対し、低い線量率の HTO 曝露ではこの細胞系の特徴であるヒト X 染色体の脱落によって形成された変異体が高頻度となった。さらに、各 STS マーカーごとの欠失割合を比較すると、ヒト X 染色体長腕のセントロメア近傍における欠失割合の変化が誘発突然変異体頻度の変曲点と一致することがわかった。

本研究をまとめると、HTO 誘発突然変異体頻度と変異スペクトルの両方において 11.0 mGy /day から 21.6 mGy/day の間の線量率に明確な傾向の変化が起こり、低線量率側では突然変異が自然発生イベントに移行することを発見した。本研究の結果とマウスに HTO を経口投与し腫瘍発生を調べた Yamamoto ら (1995、1998) の実験結果を合わせると、HTO によって誘発される確率的影響においては 11.0 mGy /day から 21.6 mGy/day の間に線量率のしきい値が存在する可能性が示唆される。

Abstract

Tritium (^3H) is a low energy beta emitter and is discharged into the aquatic environment primarily in the form of tritiated water (HTO) from nuclear power plants or from nuclear fuel reprocessing plants. Although the biological effects of HTO exposure at significant radiation doses or dose rates have been extensively studied, there are few reports concerning the biological effects of HTO exposure at very low dose rates.

In the present study using a hyper-sensitive assay system, we investigated the dose rate effect of HTO on the induction of somatic mutations. A hyper-sensitive assay system uses a Hprt-deficient hamster cell line carrying a normal human X-chromosome. The human *HPRT1* gene, which is located on the human X-chromosome, is used as a target of mutation induction. In the cell system, any mutation event occurring on the human X-chromosome will not be associated with cell viability, thus, mutations can occur about 50-fold higher than that with a conventional cell system.

In a previous study, mutant frequencies induced by low dose X-rays were statistically significant at doses over 0.15 Gy when it was compared with the spontaneous mutant frequency. It was also found that this cell system may permit us to distinguish radiation-induced events from spontaneous events by examining the mutation spectrum.

Confluent cell populations of the hyper-sensitive system were exposed to HTO for a total dose of 0.2 Gy at dose rates between 4.9 mGy/day and 192 mGy/day by incubating cells in medium containing HTO. Then, HTO-induced mutant frequencies and mutation spectra were investigated. A significant inflection point for both the mutant frequency and mutant spectra was found between 11 mGy/day and 21.6 mGy/day. Mutation spectra analysis by PCR revealed that a mechanistic change in the nature of the mutation events occurred around 11 mGy/day. Putting together the present observations and published experimental results by Yamamoto *et al.* (1995,1998), in which they investigated the tumor development by oral administration of HTO to mice, suggest that a threshold dose-rate for HTO exposure might exist between 11 mGy/day and 21.6 mGy/day. Further analysis suggested that the nature of the mutation events induced by HTO becomes similar to those seen in spontaneous events.

目次

要旨	i-iii
第 1 章 序論	2
第 2 章 材料と方法.....	16
2-1 GM06318-10 細胞の継代培養	17
2-2 トリチウム水 (HTO) 処理	17
2-3 HPRT 欠損突然変異アッセイ	18
2-4 細胞周期解析.....	19
2-5 細胞の固定・染色、数値の算出方法	19
2-6 突然変異体のゲノム DNA の抽出	20
2-7 PCR による HPRT 欠損変異体の変異スペクトル解析	21
2-8 数値データの統計処理	24
第 3 章 結果	25
3-1 低線量率 HTO 処理による細胞生存率と突然変異体頻度.....	26
3-2 HPRT 欠損突然変異体の変異スペクトル解析	31
第 4 章 考察	37
参考文献.....	44
謝辞.....	48

第 1 章

序論

2011年3月の福島第一原子力発電所事故による放射性核種拡散を契機に、低線量の放射線被曝による健康影響が一般公衆の関心事になっている。とりわけ、燃料デブリの冷却や流入する地下水や雨水のために施設内に蓄積する放射性同位体元素を含む汚染水の処理については国際的にも大きな問題である。汚染水に含まれる放射性同位体元素の大部分は多核種除去設備「Advanced Liquid Processing System (ALPS)」などを用いて除去できるが、トリチウム（トリチウム水：HTO）は除去することができず、集積時期にもよるがいまだ処理水中に0.2～2 kBq/mlの濃度で残存している [1]。将来的にはHTOを含む処理水は環境中に排出する以外の処分方法がない。そのため、低濃度トリチウムの環境およびヒトの健康に対する影響を明らかにすることが求められている。

放射線による生物影響は確定的影響と確率的影響の二つに分類され、それらはしきい線量の有無により特徴づけられている (図1) [2]。白内障や不妊といった確定的影響には明確なしきい線量が存在する一方で、発がんなどの確率的影響はしきい線量はないと仮定され、被曝線量の増加によって影響の発生頻度が増加すると考えられている。発がん原因のひとつとされる細胞の突然変異は、放射線が引き起こすDNA損傷によって生じる。リン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX) や 53BP1 などの DNA 損傷マーカーを用いたいくつかの報告は、数 mGy であっても DNA 二重鎖切断 (double strand break : DSB) が検出され、放射線による DNA 損傷の収量が線量依存的に増加することを示している [3-5]。そのため、DSB 修復の結果に依存して極めて低い線量、線量率の被曝であっても確率的影響が現れる可能性がある。

国際放射線防護委員会 (International Commission on Radiological Protection: ICRP) は、国際連合教育科学文化機関 (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization : UNESCO) が唱える「予防原則」 [6] の観点からも、確率的影響は低線量であってもバックグラウンド線量を超えた放射線量の増加に比例するという「直線しきい値なしの (Linear-non-threshold: LNT)」モデルを放射線防護と規制のための妥当なモデルであるとしている [7]。原子放射線の影響に関する国連科学委員会 (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation : UNSCEAR) の放射線リスク評価や ICRP の放射線防護基準に関する勧告の科学的根拠である主要な疫学的情報のひとつとして、広島・長崎の原爆被曝の生存者を対象とした継続的な寿命

調査研究 (Life span study : LSS) がある [8]。2012 年に報告された第 14 報の LSS は、1950 年に追跡を開始した寿命調査集団を 2003 年まで追跡し、寿命調査集団約 12 万人のうち直接被曝者で個人線量の推定されている 86,611 人を対象とした研究である。そのなかで、総固形がん死亡の過剰相対リスク (excess relative risk : ERR) が被曝放射線量に対して直線的な線量反応関係を示し、200 mGy 以上の線量域でリスクが有意であったことを報告している (図 2)。LNT モデルを支持する線量依存的な線形応答が報告されている研究として他にも国際がん研究機関が実施した 15 개국調査 [9] やロシアのマヤーク核施設の労働者 [10]、マヤーク核施設付近にあるテチャ川の下流域の住人 [11] を対象にした研究などがあるが、いずれにおいても 100 mGy 未満の線量においては統計的な根拠を示せていない。また、細胞の突然変異は自然に生じ得るが、放射線被曝と質的な差がないため、特に低線量、低線量率の放射線被曝の場合には自然発生によるものか、放射線に誘発されて生じたものかを区別することが困難である。また、細胞は DSB だけでも classical non-homologous end joining (NHEJ) や homologous recombination (HR)、alternative end joining (a-EJ)、single-strand annealing (SSA) といった複数の DNA 損傷修復システムを有しているため (図 3)、特に低線量域では、生じた DNA 損傷の修復により DNA 損傷の収量と細胞の生存率や突然変異体頻度は直接相関しない [12-14]。したがって、低線量、低線量率の放射線の確率的影響を評価するためには、DNA 損傷修復完了後の遺伝的変化やエピジェネティックな変化を検出するほかないのが現状である。

低線量、低線量率の放射線被曝による確率的影響を解析するために、ヒト大腸腺腫症 (Adenomatous Polyposis Coli : APC) のモデルマウスとして開発された *Apc^{min/+}* マウスや放射線への感受性が極めて高い T リンパ球の T 細胞抗原受容体 (TCR) を標的とした突然変異検出系など、高感度な検出系が考案されている [15-17]。これらの系は、感受性を高めることで影響の有無が分からない範囲を狭めることにより、通常系よりも低い線量における影響の有無が解析できるように設計されている (図 4)。本研究で用いた体細胞突然変異の高感度検出系である GM06318-10 細胞も同様の視点に立っており、内在性の *Hprt1* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase1) 遺伝子が欠損したハムスター細胞に正常なヒト X 染色体を導入し、ヒト X 染色体上の *HPRT1* 遺伝子

を突然変異の標的としている（図 5） [18, 19] 。内在する *Hprt1* 遺伝子を突然変異の標的とした従来の検出系では、*Hprt1* 遺伝子が存在する X 染色体上に細胞の生存に必須の遺伝子が存在するため、*Hprt1* 遺伝子を含む大規模な欠失が起こった場合には細胞は致死となり突然変異として検出することができなかった。一方、本研究で用いた GM06318-10 細胞における正常ヒト X 染色体は、ハムスター細胞で欠損した *Hprt1* 遺伝子を補完するためだけに導入されており、ヒト X 染色体上で起こる変異イベントは細胞の生存に影響を及ぼすことがない。これにより *HPRT1* 遺伝子を含む大規模な欠失が生じた場合であっても突然変異として検出することができ、高頻度な突然変異の検出が可能となっている。また、げっ歯類細胞に導入したヒト染色体は不安定であることが知られており [20-22] 、結果として従来の細胞系よりも約 50~100 倍の高頻度で突然変異を検出できることが確認されている（図 6） [18, 19] 。

本研究で突然変異の標的としているヒト *HPRT1* 遺伝子は、Xq26.2-26.3 に座位する全長 47.8 kbp の細胞の生存には非必須な遺伝子で、プリンヌクレオチド代謝に関わる酵素 HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase) をコードしている [23] 。プリンヌクレオチドの代謝経路は、新生合成経路と細胞内に存在する塩基を再利用するサルベージ経路の 2 つの経路が存在し、HPRT はサルベージ経路で guanine から guanosine monophosphate (GMP) を、hypoxanthine から inosine monophosphate (IMP) を合成する際に機能している（図 7）。aminopterin はプリンヌクレオチド合成の新生合成経路の阻害剤であり、hypoxanthine と aminopterin、thymidine の混合薬剤である HAT のもとでは細胞のプリンヌクレオチド代謝はサルベージ経路に限定される。*HPRT1* 遺伝子に変異をもつ細胞はサルベージ経路が機能しないため、HAT 存在下では *HPRT1* 遺伝子に変異をもつ細胞は致死になり、正常な細胞のみが生存できる。一方で、guanine の類似体である 6-thioguanine (6-TG) は細胞中で HPRT による代謝を受け 6-thioguanosine monophosphate (6-TGMP) となるが、6-TGMP は DNA、RNA の合成異常を起こし致死となる。そのため 6-TG 条件下では *HPRT1* 遺伝子に変異をもつ細胞のみが生存できる。この性質を利用することで、薬剤により *HPRT1* 遺伝子が正常な細胞あるいは変異を起こした細胞の選択的な培養が可能である。

これまでに、GM06318-10 細胞に低線量 X 線を照射した際の突然変異体頻度

解析の結果を報告した [24]。GM06318-10 細胞に低線量の X 線 (0.46 mGy/min) を照射し、誘発された突然変異を調べたところ、誘発突然変異体頻度は線量依存的に増加し、0.15 Gy 以上の線量で非照射群に対し統計的に有意であった (図 8A)。また、ヒト X 染色体に特異的な配列の sequence tagged site (STS) マーカーである DXS1048 (Xp11.22) と DXS1194 (Xq11.12) を用いて HPRT 欠損突然変異体の変異スペクトルを解析したところ、DXS1048 と DXS1194 の両方のマーカーを失った変異体の割合は X 線の線量とは無関係に一定割合で出現するのに対し、両方のマーカーが存在する変異体の割合は 0.2 Gy 以上の線量で誘発突然変異体頻度と同様の傾きで増加傾向を示すことが明らかになった (図 8B)。これらのことから、GM06318-10 細胞系では突然変異体の変異スペクトルを解析することにより放射線誘発型の変異と自然発生型の変異を区別できる可能性が示唆された (図 9)。

本研究では、コンフルエント (94%が G0 / G1 期) の GM06318-10 細胞における低濃度 HTO 処理後の突然変異体頻度と突然変異スペクトルの線量率依存性を調べ、低濃度 HTO による突然変異影響を明らかにすることを目的とした。細胞への HTO 曝露は総線量が 0.2 Gy に達するまで、HTO を含む培地で培養することで行った。また、突然変異体頻度と突然変異スペクトルを分析して、低濃度の HTO 存在下での培養条件でも低線量 X 線照射で見られたような変異型の割合に変化が見られるか、主要な突然変異イベントが放射線型突然変異であるかどうかを解析した。その結果、11.0 mGy/day から 21.6 mGy/day の間の線量率において、誘発突然変異体頻度と変異スペクトルの両方で明確な傾向の変化があることを発見した。

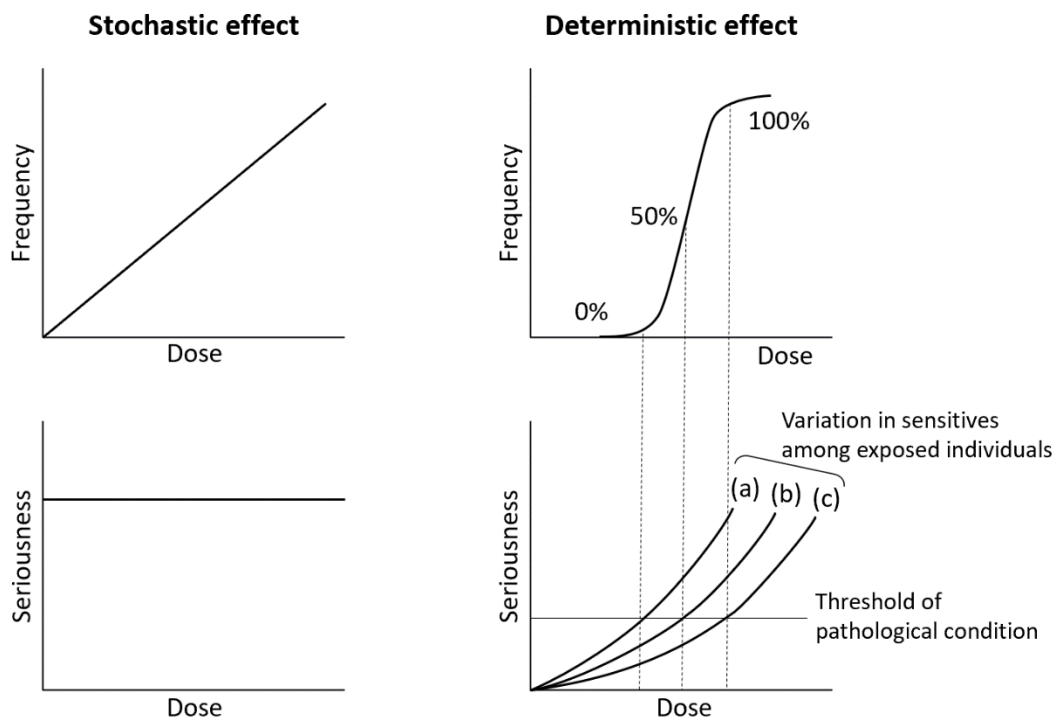


図 1 確率的影響と確定的影響の特徴

確率的影響は線量の増加に伴って影響の発生頻度が増加するが、影響の重篤度は線量の大きさによらず一定である。一方、確定的影響はしきい線量を超えて放射線被曝を受けると影響が現れ始め、より大きな線量を被曝すると影響の重篤度が上昇する。

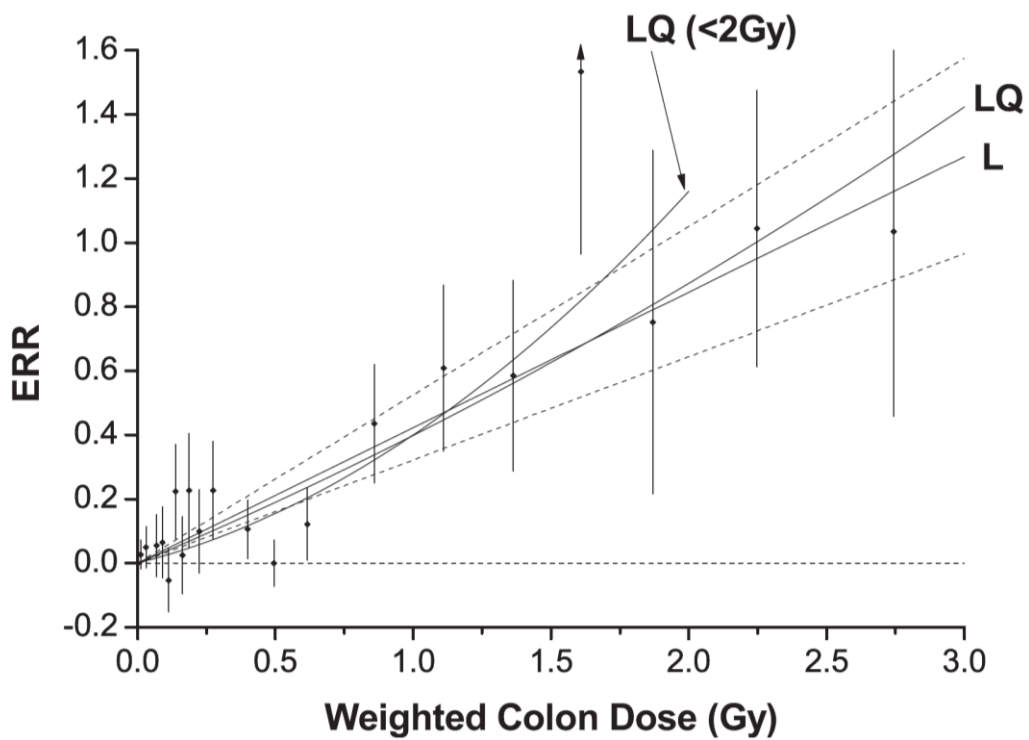


図 2 LSS による総固形がん死亡に対する放射線の ERR の線量反応関係 [8]
 ERR の線量反応関係は全線量域では直線モデル (L) が最もよく適合するが、2 Gy 未満の線量域では線形二次モデル (LQ) が最もよく適合した。図中の点は線量ごとの点推定値、縦線は各点の 95%信頼区間を示している。点線は線形モデル (L) の 95%信頼区間を示している。図は文献 [8] から引用した。

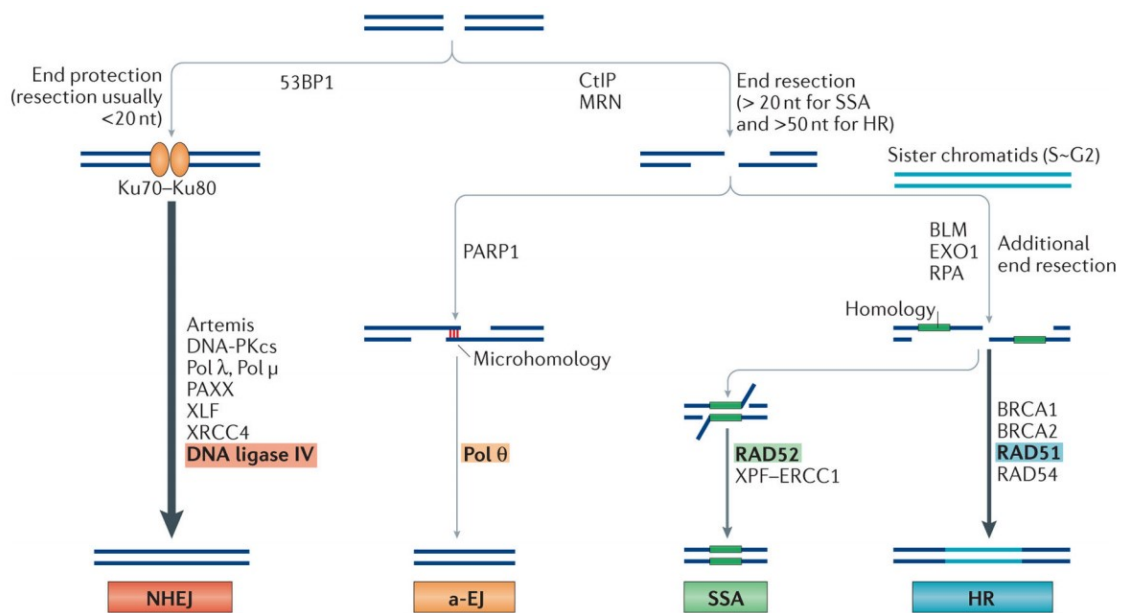


図3 二重鎖切断 (DSB) の修復経路

放射線により発生した DSB は、主に classical non-homologous end joining (NHEJ) と homologous recombination (HR) の経路によって再結合する。また、代替経路としてマイクロホモロジーを利用した alternative end joining (a-EJ) や single-strand annealing (SSA) の経路が知られている。修復のミスは細胞死や突然変異の要因になる。図は文献 [14] から引用した。

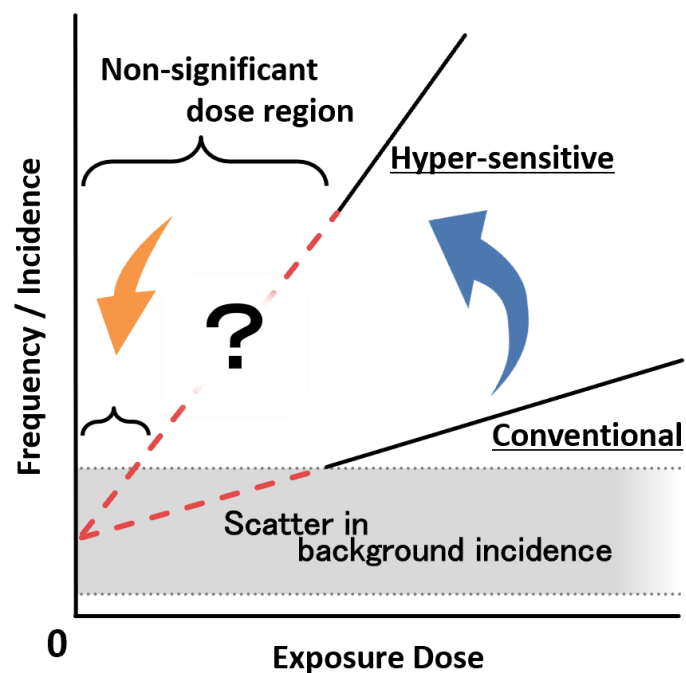


図 4 高感度検出系のコンセプト

自然に起こる突然変異イベントを完全に抑制することは困難である。そのため、従来の検出系では低線量域における発生頻度が自然発生頻度の変動の中に埋もれてしまうので、影響の有無の判定が困難となる。低線量影響を検出するためのひとつのアプローチとして、放射線誘発イベントの頻度を高めることで影響の有無が分からない範囲を狭くする考えがある。

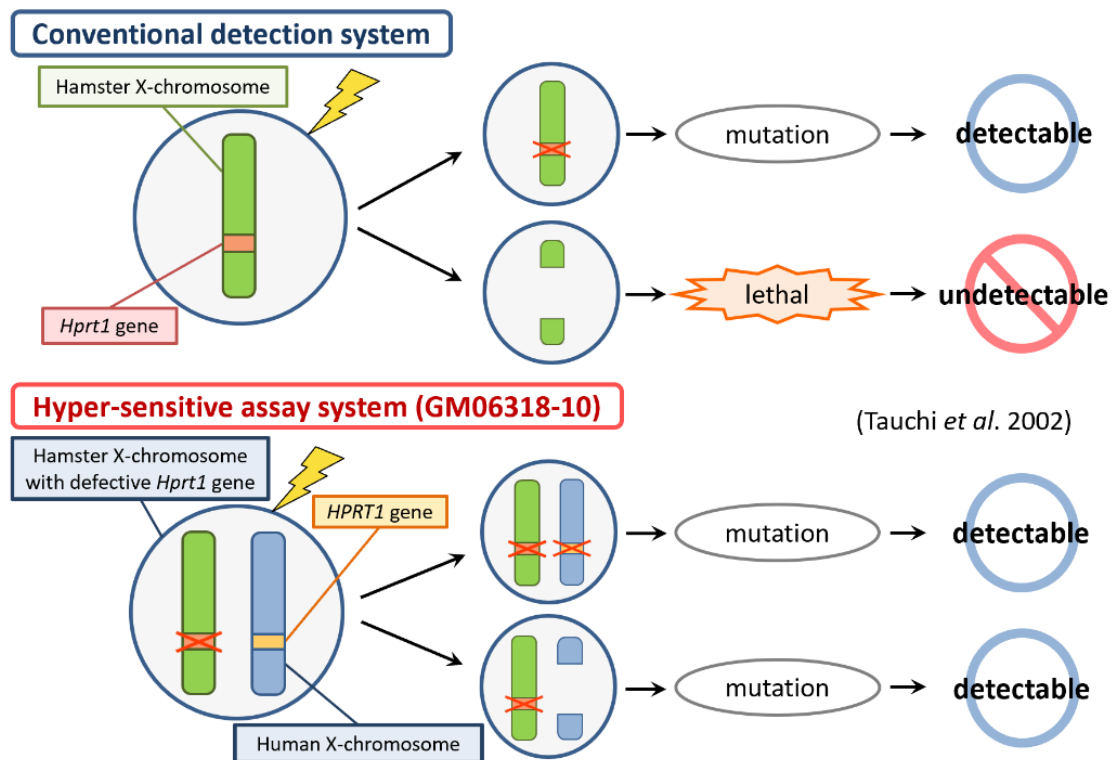


図5 体細胞突然変異の高感度検出系 GM06318-10 細胞

Hprt1 遺伝子を標的とした従来の検出系では、*Hprt1* 遺伝子を含む大規模な欠失が起こった場合には細胞は致死となり、突然変異として検出できない。GM06318-10 細胞では欠損した *Hprt1* 遺伝子の機能を補完するためだけにヒト X 染色体が導入され、突然変異の検出と細胞の生存は切り離されているため、*HPRT1* 遺伝子を含む大規模な欠失が生じた場合であっても突然変異として検出することが可能となっている。

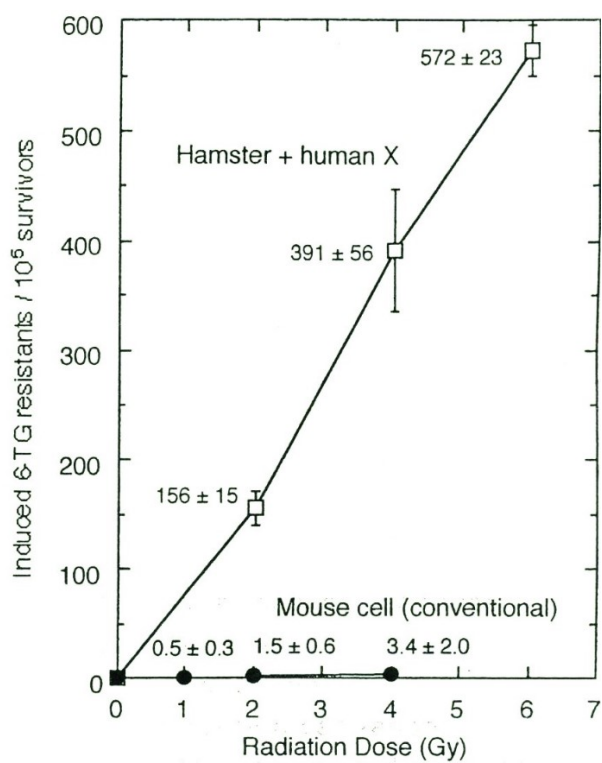


図 6 従来の検出系と高感度検出系における 6-thioguanine 耐性変異体頻度の比較 [18]

体細胞突然変異の高感度検出系である GM06318-10 細胞は、従来のマウス細胞などを用いた検出系より 50~100 倍の高感度で突然変異を起こす。

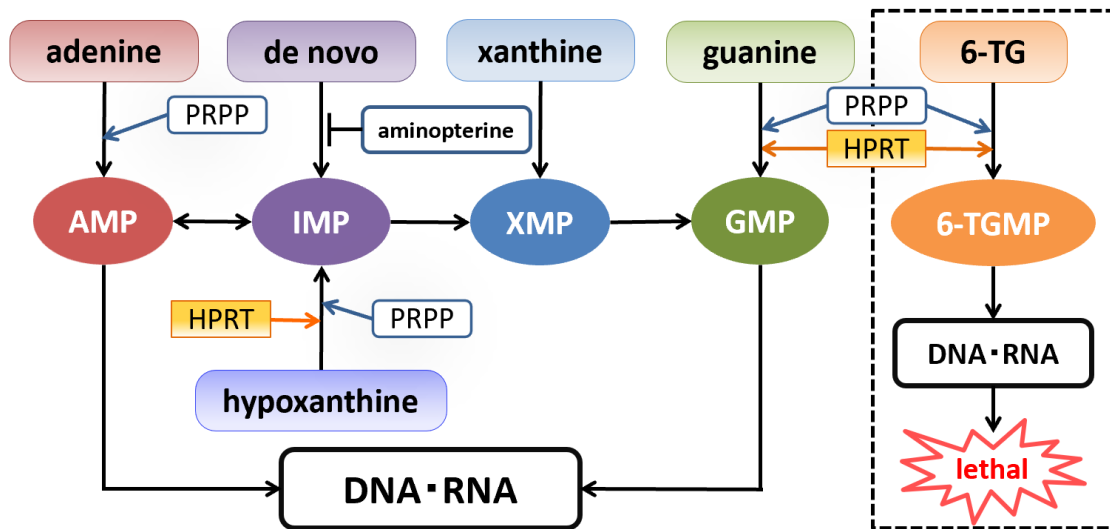


図 7 プリンヌクレオチド代謝経路と HPRT 活性の役割

PRPP : Phosphoribosyl pyrophosphate, AMP : Adenosine monophosphate, IMP : Inosine monophosphate, XMP : Xanthosine monophosphate, GMP : Guanosine monophosphate, 6-TG : 6-thioguanine, 6-TGMP : 6-thioguanosine monophosphate ; *HPRT1* 遺伝子に変異をもつ細胞は、正常細胞が代謝することにより致死となる 6-TG に対する耐性を得る一方で、hypoxanthine、aminopterin、thymidine の混合物である HAT 存在下では致死となる。この性質を利用することで、*HPRT1* 遺伝子に変異をもつ細胞あるいは正常細胞の選択的な培養を行うことができる。

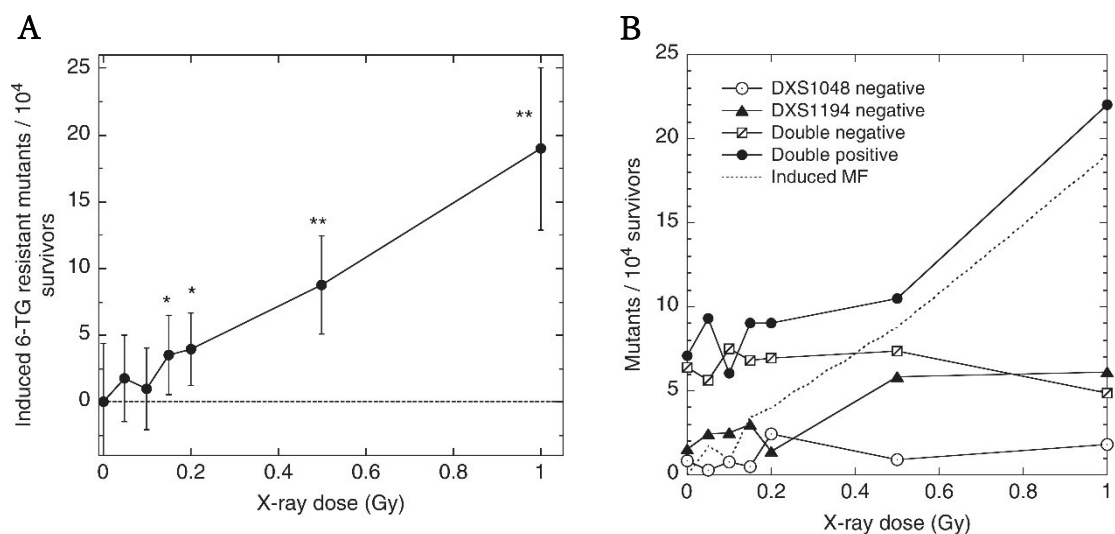


図 8 X線誘発突然変異体頻度と変異スペクトルの線量依存性 [24]

A) X線誘発突然変異体頻度は線量依存的に増加し、0.15 Gy以上の線量で非照射の Control に対し統計的に有意となった。各ポイントは少なくとも15回の独立した実験の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示している

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)。 B) X線に誘発された HPRT 欠損突然変異体における X染色体上の2つの STS マーカーについて、各欠失パターンの変異型の頻度 ($\times 10^{-4}$) を示した。0.2 Gy以上の線量において両方の STS マーカーを保持した変異体 (Double positive) の頻度が、誘発突然変異体頻度と同様の増加傾向を示した一方で、両方を欠失する変異体 (Double negative) は Control と同じ頻度で一定となった。

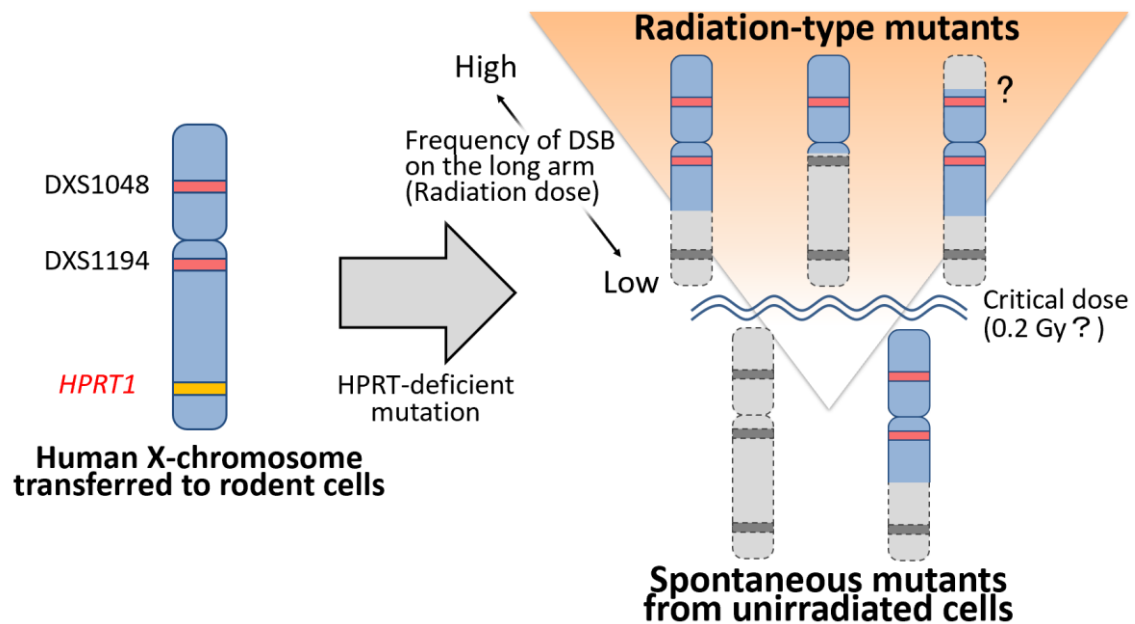


図9 GM6318-10 細胞の低線量放射線による HPRT 欠損変異導入のモデル [24]

GM6318-10 細胞において、自然発生で起こる突然変異 (Spontaneous mutants) はげっ歯類細胞に導入したヒト染色体の不安定性という特徴によりヒト X 染色体の脱落あるいは、自然発生の偶発的な DSB による欠失で変異体が出現する。一方で、放射線照射によりヒト X 染色体への DSB 導入頻度が高くなると、DXS1048 と DXS1194 の両マーカーが維持されたような変異体 (Radiation-type mutants) が明確に増加し、この変化はおよそ 0.2 Gy を境に生じていると考えられる。より高い線量の放射線が照射された場合には、*HPRT1* 遺伝子が存在する長腕だけでなく、短腕側にも欠失をもつ変異体が増加すると推測される。

第 2 章

材料と方法

2-1 GM06318-10 細胞の継代培養

細胞は *Hprt1* 遺伝子を欠損したハムスター細胞に正常なヒト X 染色体を細胞工学的に導入した GM06318-10 細胞を用いた [18, 19]。D-MEM 培地 (ThermoFischer, 11965-092) に牛胎児血清 (fetal bovine serum (FBS), HyClone, Characterized) を終濃度 5%、ゲンタマイシン硫酸塩溶液 (SIGMA) を終濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ 、1×HAT supplement (Thermo-Fischer) を加えたものを継代用培養液 (1×HAT 培地) として用いた。細胞は 37°C で十分に加湿した CO₂ 濃度 5% のインキュベーター (エスペック) で培養し、サブコンフルエントの細胞を 2~3 日間隔で継代した。あらかじめ凍結保存しておいた細胞を解凍し、1×HAT 培地で 2 週間程度培養することで *HPRT1* 遺伝子に変異をもつ細胞を除き、*HPRT1* 遺伝子が正常な細胞群を実験に用いた。

2-2 トリチウム水 (HTO) 処理

トリチウム β 線の照射は、培地に HTO (Water [H3], American Radiolabeled Chemicals) を添加することによって行った。照射開始日の 4 日前に 1×HAT 培地を 7 ml 加えた T25 フラスコ (NUNC) に 2×10^5 個の細胞を播き、照射開始日にコンフルエントになるように培養した。照射開始時には目的の線量率になるように HTO を添加した CO₂ 不要培地 (ThermoFischer, 18045-088, FBS を終濃度 0.2% で添加) で T25 フラスコの培地交換を行い、T25 フラスコをパラフィルムで密栓し、37°C のインキュベーター (アステック) で培養した。線量率によって照射処理時間が異なるため、各線量率ごとに非照射 Control を用意した。各線量率の非照射 Control は HTO を加えていない CO₂ 不要培地で培養すること以外は HTO 処理群と全く同じ操作を行った。培地は 4~6 日ごとに新鮮な培地に交換し、総線量が 0.2 Gy に達するまで培養した。線量率ごとのトリチウムの放射能濃度と照射処理時間を表 1 に示す。なお、HTO を添加した CO₂ 不要培地の放射能濃度は、調製した培地の一部を滅菌水で 50 倍に希釈し、Ultima Gold (PerkinElmer) を用いて液体シンチレーションカウンタ (Parkin Elmer, Tri-Carb 3110TR) で測定して確認した。総線量が 0.2 Gy に達した後、細胞を HTO を含まない CO₂ 不要培地で 1 回洗浄して 30 分インキュベートした後、さらに 5 回洗浄して培地中の HTO を完全に除いた。HTO 処理の線量率は、以下の計算

式で算出した [25]。

$$D \text{ (cGy/h)} = C \text{ (MBq/ml)} \times 0.329 \times 0.8 \text{ (含水率)}$$

$$(0.329 = 1 \times 10^6 \text{ 壊変/s} \cdot \text{MBq} \times 3600 \text{ s/h} \times 5.7 \times 10^3 \text{ eV 壊変}$$

$$\times 1.602 \times 10^{-19} \text{ J/eV} \times 10^6 \text{ mGy} \cdot \text{g/J})$$

表 1 各線量率におけるトリチウム水濃度と照射処理時間

線量率 (mGy/day)	HTOの放射能濃度 (MBq/ml)	照射処理時間
4.90	0.078	980 h (40 days 20 h)
6.24	0.099	768 h (32 days)
8.64	0.137	556 h (23 days 4 h)
11.0	0.174	436 h (18 days 4 h)
21.6	0.342	222 h (9 days 6 h)
32.4	0.548	148 h (6 days 4 h)
192	3.04	25 h (1 day 1 h)

2-3 HPRT 欠損突然変異アッセイ

照射処理後、T25 フラスコの細胞を 0.25%トリプシン (Thermo Fisher) 処理によつてはがし、細胞数をコールターカウンタ (BECKMAN COULTER, Z1 Coulter Particle Counter) で計数した。コロニー形成法により生存率を算出するために、基本培地 (D-MEM 培地に終濃度 5%の FBS, 終濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ のゲンタマイシン硫酸塩溶液を添加) を 4 ml 加えた 60 mm dish に 1500 個の細胞を播いた。また、突然変異体頻度を算出するために基本培地を 7 ml 加えた 100 mm dish に残りの細胞を播き、3 日間隔で 1×10^6 個を継代した。生存率算出用の dish は 37°C で十分に加湿した CO₂ 濃度 5% のインキュベーターで 2 週間培養し、コロニーを形成させた。突然変異体頻度算出のために継代を行った細胞は、9 日後に 6-thioguanine (6-TG, 和光純薬) による HPRT 欠損突然変異体のセレクションを行った。細胞を 0.25%トリプシン処理によつて剥がし、コールターカウンタで細胞を計数した。適当な希釈操作をし、コロニー形成効率 (Plating

Efficiency : PE) 比率算出用として基本培地を 4 ml 入れた 60 mm dish に 500 個の細胞を、突然変異体頻度算出用として 6-TG を 5 μ g/ml で加えた基本培地 (6-TG 培地) を 7 ml 入れた 100 mm dish に 1×10^4 個の細胞を播いた。それぞれ 37°C で十分に加湿した CO₂ 濃度 5% のインキュベーター内で 2 週間培養し、コロニーを形成させた。6-TG セレクションにより形成されたコロニーは、別クローンであることを明確にするために dish 1 枚につき 1 つのコロニーをクロニングし、変異スペクトル解析に用いた。

2-4 細胞周期解析

細胞の細胞周期を解析するためにヨウ化プロピジウム (PI) 染色による細胞周期解析を行った。0.25% トリプシン処理により遊離した細胞を 15 ml 遠心チューブに移し、卓上遠心機 (KOKUSAN, H-19FM) で 1,000 rpm で 5 分遠心した。遠心後、細胞の培地を除去して PBS (-) で再懸濁した。再び 1,000 rpm で 5 分遠心し、遠心後に PBS (-) を除去した。

-20°C に冷やした 70% エタノールをゆっくりと 1 ml 滴下し、-20°C で一晩静置し細胞を固定した。細胞の固定後、細胞を 4°C、1,000 rpm で 5 分遠心した。遠心後、エタノールを除去して PBS (-) に再懸濁し、4°C、1,000 rpm で 10 分遠心した後、PBS (-) を除去した。PI 染色液 (PBS (-) に 0.1% TritonX-100, 0.2 mg/ml RNaseA, 20 μ g/ml PI) を 5×10^6 細胞/ml で加えて懸濁し、室温の暗所で 30 分間インキュベートした後、Tali Image-Based Cytometer (Thermo Fisher) を用いて測定した。

2-5 細胞の固定・染色、数値の算出方法

コロニーが形成された dish は 99% エタノール (日本アルコール販売) により固定し、3% に希釈したギムザ染色液 (Merck) によって染色を行った。まず、dish から培地を除き、生理食塩水でリンスした後、完全に風乾し、99% エタノールを 60 mm dish には 1 枚当たり 2 ml、100 mm dish 1 枚当たり 4 ml 加え、30 分間静置した。30 分後、99% エタノールを除いて、風乾した。適量の 3% ギ

ムザ染色液を加えて 30 分静置し細胞を染色した後、染色液を除いて水道水ですすぎ、dish を風乾した。実体顕微鏡（OLYMPUS、SZ61）を用いて細胞 50 個以上からなるコロニーをカウントした。PE、生存率、突然変異体頻度、誘発突然変異体頻度は次の算出方法によって求めた。

$$\text{PE (\%)} = \frac{\text{(形成されたコロニー数)}}{\text{(播いた細胞数)}} \times 100$$

$$\text{生存率} = \frac{\text{(照射した細胞の PE)}}{\text{(非照射の細胞の PE)}} \times 100$$

$$\text{PE 比率} = \frac{\text{(照射した細胞の PE)}}{\text{(非照射の細胞の PE)}}$$

$$\text{突然変異体頻度} = \frac{\text{(6-TG 耐性コロニー数)}}{\text{(PE 比率} \times \text{播いた細胞数)}}$$

誘発突然変異体頻度 =

$$\text{(照射細胞の突然変異体頻度)} - \text{(非照射細胞の突然変異体頻度)}$$

2-6 突然変異体のゲノム DNA の抽出

2-3 でクローニングした細胞が十分に増殖したことを確認できたら、ゲノム DNA を抽出した。培地を除き、TNE buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) で細胞をリンスした。37°C に温めた HMW buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS) + Proteinase K (100 µg/ml, 和光純薬) を 400 µl 加えて細胞を溶解し、全量を 1.5 ml マイクロチューブに移し、37°C で一晩以上インキュベートした。インキュベート後、TE 飽和フェノール (ニッポンジーン) : クロロホルム (和光純薬) (1 : 1) を 400

μl 加え、ローテーター（東京理化、MBS-1B）で 30 分間リバースマックスした後、微量高速冷却遠心機（トミー精工、MX301）を用いて 4°C、10,000 rpm で 15 分間遠心した。遠心後、上層を新しいマイクロチューブへ移し、-20°C に冷やした 99.5% エタノール（和光純薬）を 1,000 μl 加え、リバースマックスにより DNA を析出させた。再び微量高速冷却遠心機を用いて 4°C、12,000 rpm で 10 分間遠心し、DNA を沈殿させた後、99.5% エタノールを除き、70% エタノールを 200 μl 加えて、4°C、12,000 rpm で 10 分間遠心した。70% エタノールを除いて風乾した後、TE buffer（10 mM Tris-HCl（pH7.5）、1 mM EDTA）+ RNase A（25 μg/ml）を 50 μl 加えて DNA を溶解し、冷蔵保存した。

2-7 PCR による HPRT 欠損変異体の変異スペクトル解析

ヒト X 染色体に特有な配列の STS マーカーを PCR により増幅し、その有無をアガロースゲル電気泳動で確認することにより、ヒト X 染色体の変異スペクトル解析を行った（図 10）。本研究では STS マーカーとして DXS1497（Xp22.31）、DXS1048（Xp11.22）、DXS1194（Xq11.12）、DXS1465（Xq21.33）、DXS86（Xq26）を用いた。まず、得られたすべての HPRT 欠損突然変異体に対し DXS1497、DXS1048、DXS1194、DXS1465 の有無を解析し、DXS1194 および DXS1465 が残存する HPRT 欠損突然変異体に対して DXS86 を試験した。使用したプライマーは北海道システムサイエンスにて受託合成したもので、その配列を表 2 に示した。PCR 反応液には TaKaRa Ex Taq Hot Start Version（TaKaRa, RR006A）を用いた。1 試料あたり 10×Ex Taq buffer 1.5 μl、2.5 mM dNTP mix 1.2 μl、Forward と Reverse のプライマー溶液（20 nM）が各 0.3 μl、Ex Taq Polymerase（5 U/μl）0.1 μl に、抽出したゲノム DNA（～250 ng）を加え、総量が 15 μl になるように滅菌水で調整した。PCR 反応は表 3 の通りに実施した。PCR 産物の有無は 1.5%アガロース（ニッポンジーン）ゲルを用いた電気泳動で確認した。

表 2 各 STS マーカーに対するプライマーセットの配列

STS marker	Primer Sequence
DXS1497	5'- CTTGATAGGGGAAGATAAGG-3' 5'- GAATGGTAGAGAGGAAGTTG-3'
DXS1048	5'-TGGGTGTACATTGTGACTTTTA-3' 5'-TAAAATGTTGAGATGGACTTTG-3'
DXS1194	5'-CACCTCTGCCTTCCTCTCTATG-3' 5'-TGGAAAAGGAACAATCAGAGTG-3'
DXS1465	5'-GCAATCAACCAAGATGGTTAC-3' 5'-AACCTCTATAAAAGCAGGAAAATG-3'
DXS86	5'-CAATATTTACCTCCTCTGACAC-3' 5'-ATGTTGAAAATGAAGATAAGGA-3'

表 3 各 STS マーカーの PCR 条件

STS marker	Product size	PCR condition
DXS1497	139 bp	95°C 40 sec 95°C 2 min → 57°C 30 sec 72°C 1 min 30 cycles → 72°C 5 min → 10°C keep
DXS1465	212 bp	95°C 40 sec 95°C 2 min → 60°C 30 sec 72°C 40 sec 30 cycles → 72°C 5 min → 10°C keep
DXS1048	330 bp	95°C 40 sec
DXS1194	274 bp	95°C 2 min → 56°C 30 sec
DXS86	582 bp	72°C 1 min 30 cycles → 72°C 5 min → 10°C keep

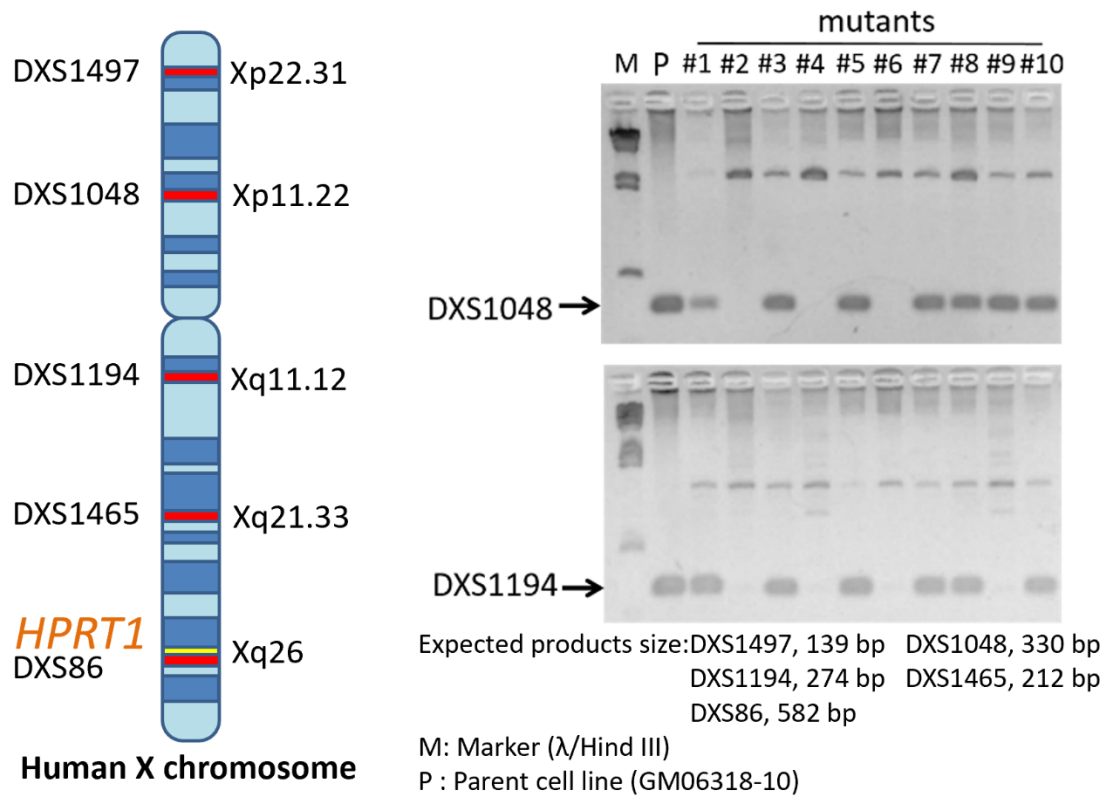


図 10 ヒト X 染色体の模式図と STS マーカーを用いた欠失解析の例

本研究で調べた STS マーカーおよび *HPRT1* 遺伝子の位置を左に示す。右図には DXS1048 と DXS1194 における欠失解析の例を示した。STS マーカーが残存していれば、positive control である parent の GM06318-10 細胞から抽出したゲノム DNA と同じ位置にバンドが現れる。

2-8 数値データの統計処理

すべての統計解析には EZR [26] を使用した。EZR は R および R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアである。すべての実験データは少なくとも 3 回の独立した実験から得た。生存率および誘発突然変異頻度については、各線量率間の平均に関して有意差があるかを調べるために、Tukey-Kramer 法による多重比較解析を行った。変異スペクトル解析による欠失パターンの違いについては、各線量率ごとに Control と HTO 処理群との間で Fisher の正確検定あるいはカイ二乗検定による解析を行った。いずれの検定についても、有意水準は 5%とした。また、培養日数と Radiation type の割合の関係性を調べるために線形回帰分析を行った。

第 3 章

結果

3-1 低線量率 HTO 処理による細胞生存率と突然変異体頻度

先行研究において、GM06318-10 細胞に 21 mGy/day 以上の線量率でトリチウム β 線照射を行ったときの突然変異体頻度の線量率依存性が調べられている [19]。それによると、総線量を 0.2 Gy、0.3 Gy、1 Gy とした場合に HTO 誘発突然変異体頻度は総線量に依存して増加する一方、線量率に依存した変化は見られていない。一方で、生涯にわたってマウスに HTO を継続飲水させた実験では、12 mGy/day が放射線誘発がんに対する線量率のしきい値となることが報告されている [27, 28]。このマウス実験の結果を踏まえると、より低い線量率の HTO 曝露で調べると、体細胞突然変異に対しても線量率しきい値が見つかる可能性が推測された。加えて、GM06318-10 細胞に低線量の X 線（線量率 0.46 mGy/h）を照射した実験により、0.15 Gy 以上の線量で非照射に対して誘発突然変異体頻度の有意な増加を検出できることを報告した [24]。そこで本研究では、確率的影響である体細胞突然変異に線量率しきい値が存在するかどうかを調べることを目的に、GM06318-10 細胞に総線量 0.2 Gy で、4.9 mGy/day から 192 mGy/day までのさまざまな線量率で HTO 処理を行い、生存率および HTO 誘発突然変異体頻度の線量率依存性を調べた。

T25 フラスコに細胞がコンフルエントの状態でも HTO 処理を行った。そのため、接触阻止によりほとんどの細胞は G0/G1 期にあると考えられたが、このことを確認するために Tali Image-Based Cytometer (Thermo Fisher) を用いた細胞周期解析を行った (図 11)。サブコンフルエントの GM06318-10 細胞では S 期の細胞が 23.3%、G2/M 期の細胞が 5.7%であったのに対し、コンフルエントの状態でも培地交換のみを行い 10 日間保った細胞では S 期が 5.4%、G2/M 期が 0.75%に減少しており、接触阻止による細胞周期停止が起こっていることが確認された。

図 12 には各線量率の HTO 処理による 0.2 Gy 照射後における細胞生存率を示した。生存率は総線量が 0.2 Gy であるためほぼ 100%であり、線量率の違いによる影響も認められなかった。

図 13 はさまざまな線量率の HTO 処理による誘発突然変異体頻度を示した。HTO 誘発突然変異体頻度は、11.0 mGy/day と 21.6 mGy/day の間で傾向が大きく変化することがわかった。21.6 mGy/day 以上の線量率では誘発突然変異体頻度はおよそ 7.4×10^{-4} (21.6 mGy/day 以上の線量率の平均) であるのに対し、11.0 mGy/day 以下の線量率では有意に低下し、 0.83×10^{-4} (11.0 mGy/day 以下

の線量率の平均) となり、その値は自然発生による突然変異頻度とほぼ同程度であった。このことは、細胞の体細胞突然変異においても線量率のしきい値が存在し、その値は 11.0 mGy/day から 21.6 mGy/day の間にある可能性を強く示唆するものであった。

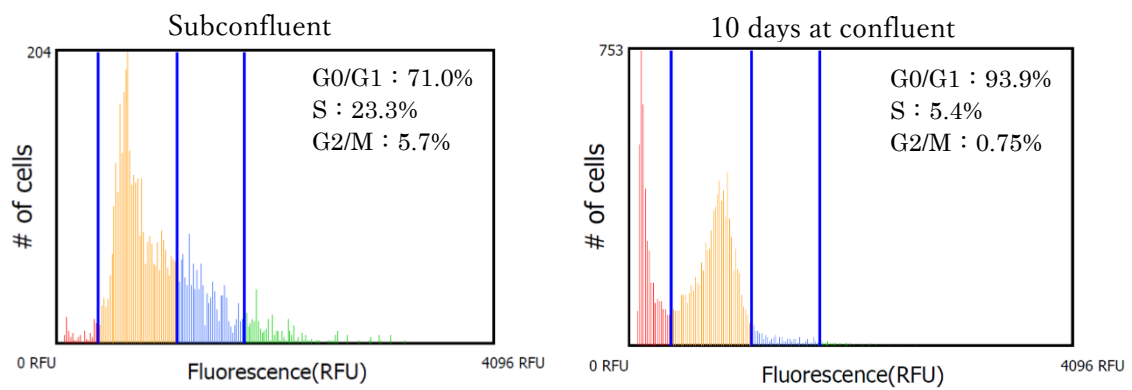


図 11 長期培養による細胞周期の変化

左側はサブコンフルエント、右側はコンフルエントで 10 日間保った細胞集団である。それぞれについて G0/G1、S、G2/M 期の割合を解析した結果を示した。解析は Tali Image-Based Cytometer (Thermo Fisher) で行った。

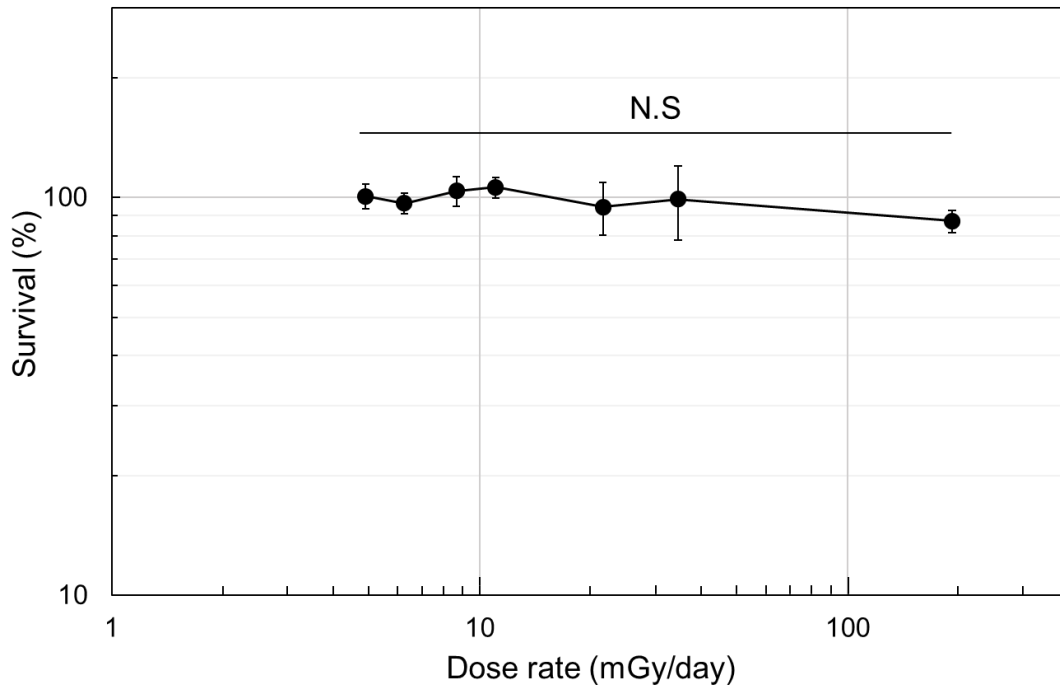


図 12 0.2 Gy 照射における HTO 処理の線量率と細胞生存率

横軸に HTO 処理の線量率 (mGy/day) を、縦軸に生存率 (%) を対数軸で示した。各プロットは 3 回以上の独立した実験により得られた平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較により行い、すべての群の間に統計的有意差はなかった (N.S)。

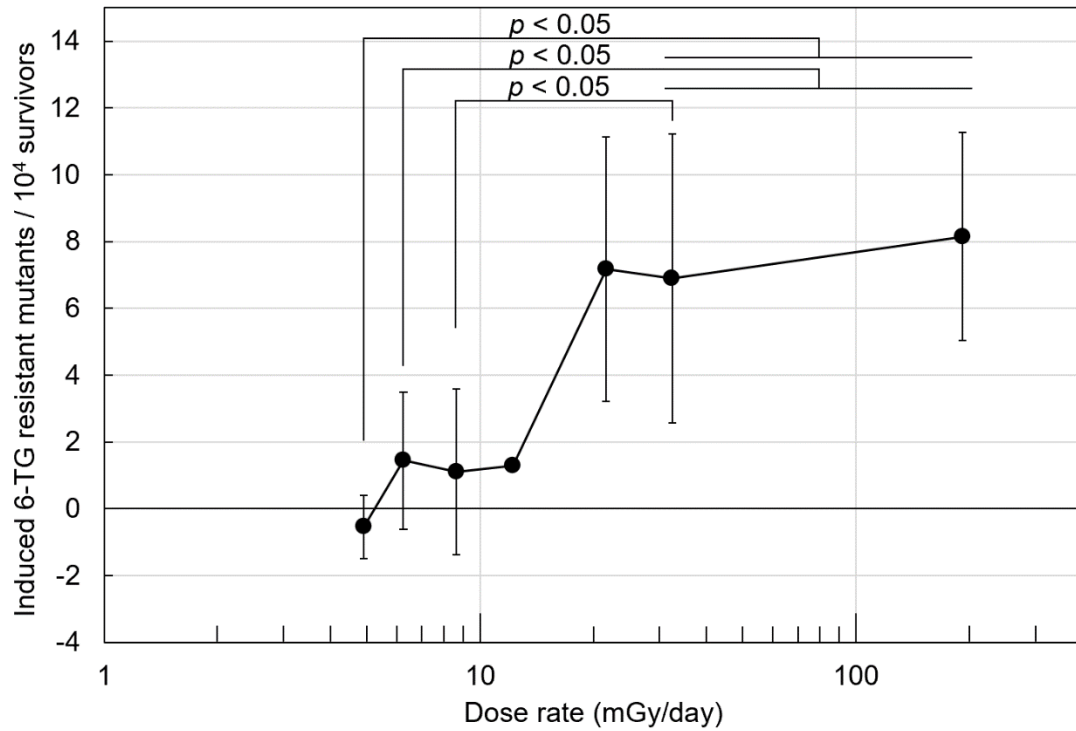


図 13 0.2 Gy 照射における HTO 処理の線量率と誘発突然変異体頻度
 横軸に HTO の線量率 (mGy/day) を対数軸で、縦軸に HTO 誘発突然変異体頻度 ($\times 10^{-4}$) を示す。各プロットは 3 回以上の独立した実験により得られた平均値を示し、エラーバーは標準偏差である。統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較により行い、有意差があった群間には p 値を示した。

3-2 HPRT 欠損突然変異体の変異スペクトル解析

HTO 処理によって得られた HPRT 欠損突然変異体についてヒト X 染色体の STS マーカーを PCR で増幅し、有無を確認することにより変異スペクトル解析を行った。STS マーカーとして、DXS1497 (Xp22.31)、DXS1048 (Xp11.22)、DXS1194 (Xq11.12)、DXS1465 (Xq21.33) の 4 座を主に用いた。突然変異体の X 染色体に STS マーカーが存在する場合、DXS1497 では 139 bp、DXS1048 では 330 bp、DXS1194 では 274 bp、DXS1465 では 212 bp の位置にバンドが現れる。変異体ごとの STS マーカーの有無を対応付けることにより、その変異体で起こっているおおよその欠失範囲を見積もることができる。以前の研究で GM06318-10 に低線量 X 線を照射した場合に、自然発生で生じた 6-TG 耐性突然変異体の 95% で *HPRT1* 遺伝子の近傍に位置する DXS86 (Xq26) が欠失していることが明らかになっている [24] ため、本研究では上記 4 座の STS マーカーで PCR 解析を行った後に、ヒト X 染色体長腕側に位置する DXS1194 および DXS1465 が存在する変異体に対して DXS86 の PCR 解析を行って、長腕末端の欠失による HPRT 欠損突然変異であるのかを確認した。各線量率ごとの Control 群および HTO 処理群で得られた突然変異体の欠失パターンと得られたクローン数、各処理群における欠失パターンの割合を表 4 にまとめた。なお、長腕の STS マーカーが存在したすべての変異体で DXS86 は存在していなかった。欠失パターンのうち、HTO 処理の有無に関わらず最も高頻度に現れたのは、すべてのマーカーが存在しない All negative (—/—/—/—) のパターンであり、その頻度は線量率が高くなるほど低くなる傾向が認められた。All negative 型の突然変異体は、げっ歯類細胞に導入したヒト X 染色体の不安定性 [20-22] による細胞からのヒト X 染色体の脱落によるものと考えた。X 線照射の場合にも All negative 型突然変異は放射線曝露とは無関係に生じる突然変異であったことから [24]、All negative 型突然変異を“Spontaneous type”と分類することにした。4.9 mGy/day の線量率では総線量が 0.2 Gy に達するまでに 40 日以上を要する。培養期間が約 6 日の 34.6 mGy/day と 4.9 mGy/day における Spontaneous type の頻度を比較すると、Control 群間および HTO 処理群間のいずれの比較でも 34.6 mGy/day の方が有意に低かった (カイ二乗検定で $p < 0.01$)。この知見は GM06318-10 細胞において HAT の存在しない培地条件では培養期間の長期化に依存してヒト X 染色体の脱落頻度が上昇することを示唆する。

得られた HPRT 欠損突然変異体の変異スペクトル型から Spontaneous type の変異体を除き、線量率ごとに各 STS マーカーの欠失割合を算出して図 14 に示した。短腕に位置する DXS1497 と DXS1048 の欠失割合は最も高い 192 mGy/day の線量率による HTO 処理群でわずかに上昇する傾向があったが、線量率に依存する明瞭な傾向は見られなかった。一方、長腕に位置する DXS1194 の欠失割合は 4.9 mGy/day から 11.0 mGy/day までの線量率では Control 群と HTO 処理群でほとんど変化は見られなかったものの、21.6 mGy/day 以上の線量率では Control 群に対して HTO 群で明らかに欠失割合の上昇が認められ、34.6 mGy/day では Control 群と HTO 処理群の間に統計的有意差が認められた ($p < 0.043$)。DXS1194 における欠失割合が変化する線量率は、HTO 誘発突然変異体頻度の変曲点と一致している。DXS1194 と同じく長腕に位置する DXS1465 の欠失割合は Control 群、HTO 処理群ともに線量率の増加に伴って上昇する傾向があった。ここで、それぞれの欠失パターンについて、そのパターンが形成されるために必要な最小の DSB 数にもとづいて 4 つに分類した。すべての STS マーカーを失った All negative 型突然変異体を Spontaneous type、*HPRT1* 遺伝子を含む長腕側で欠失が起こったパターン (+/+ / +/+、+ / + / + / -、+ / + / - / -) を One-DSB type、*HPRT1* 遺伝子を含む長腕と短腕の一部でも欠失がおこったパターン (- / + / - / -、- / + / + / -、- / + / + / +、- / - / + / -、- / - / + / +) を Two-DSBs type、セントロメアを失い細胞集団中で維持されるために他の染色体に転座したと考えられる + / - / - / - を Translocation type とした。この分類にもとづいて HTO 処理群の変異スペクトルを分析すると、特に低い方の線量率においては Control 群のスペクトルとよく類似し、192 mGy/day などの高い方の線量率においては HTO 処理群で明確に Spontaneous type が減少して、Two-DSBs type や Translocation type が増加した (図 15)。放射線の特徴である DSB が関わる One-DSB type、Two-DSB type、Translocation type を “Radiation type” と定義してまとめてみると、Radiation type の割合は培養期間の長さに依存して減少し、Control 群と HTO 処理群でそれぞれ回帰直線をとると、直線の傾きは HTO 処理群の方が急であり、培養期間が 40 日あたりで直線は重なった (図 16)。このことは、線量率が低くなるにつれて、突然変異体の変異スペクトルが自然発生で起こる突然変異スペクトルに収束することを示唆している。

表 4 HTO 曝露による 6-thioguanine 耐性突然変異体の変異スペクトル

Dose rate (mGy/day)	Number of mutant clones analyzed	DXS1497 (Xp22.31)/DXS1048 (Xp11.22)/DXS1194 (Xq11.12)/DXS1465 (Xq21.33)										
		-/-/-/-	+/+/-/-	+/+/+/-	+/++/+	-/+/-/-	-/+/+/-	-/++/+	-/-/+/-	-/-+/+	+/-/-/-	
		Number of clones (%)	Number of clones (%)	Number of clones (%)	Number of clones (%)	Number of clones (%)	Number of clones (%)	Number of clones (%)	Number of clones (%)	Number of clones (%)	Number of clones (%)	
4.9	Control	40	33 (82.5)	3 (7.5)	1 (2.5)	2 (5.0)	0 (0)	1 (2.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	0.2 Gy	79	63 (79.7)	5 (6.3)	9 (11.4)	1 (1.3)	0 (0)	1 (1.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6.2	Control	75	59 (78.7)	5 (6.7)	8 (10.7)	1 (1.3)	1 (1.3)	0 (0)	0 (0)	1 (1.3)	1 (1.3)	0 (0)
	0.2 Gy	152	103 (67.8)	7 (4.6)	26 (17.1)	12 (7.9)	1 (0.7)	1 (0.7)	0 (0)	2 (1.3)	0 (0)	0 (0)
8.6	Control	44	27 (61.4)	5 (11.4)	7 (15.9)	4 (9.1)	0 (0)	0 (0)	1 (2.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	0.2 Gy	99	64 (64.6)	4 (4.0)	19 (19.2)	8 (8.1)	0 (0)	2 (2.0)	0 (0)	2 (2.0)	0 (0)	0 (0)
11.0	Control	72	49 (68.1)	7 (9.7)	15 (20.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.4)	0 (0)	0 (0)
	0.2 Gy	144	93 (64.6)	7 (4.7)	30 (20.8)	10 (6.9)	2 (1.4)	0 (0)	0 (0)	2 (1.4)	0 (0)	0 (0)
21.6	Control	48	29 (60.4)	3 (6.3)	12 (25.0)	4 (8.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	0.2 Gy	127	71 (55.9)	19 (15.0)	21 (16.5)	9 (7.1)	2 (1.6)	3 (2.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.6)
34.6	Control	98	52 (53.1)	10 (10.2)	29 (29.6)	6 (6.1)	0 (0)	1 (1.0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.0)	0 (0)
	0.2 Gy	183	81 (44.3)	35 (19.1)	49 (26.8)	15 (8.2)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	1 (0.5)
192	Control	16	10 (62.5)	2 (12.5)	4 (25.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	0.2 Gy	48	18 (37.5)	9 (18.8)	14 (29.2)	2 (4.2)	0 (0)	2 (4.2)	1 (2.1)	1 (2.1)	0 (0)	1 (2.1)

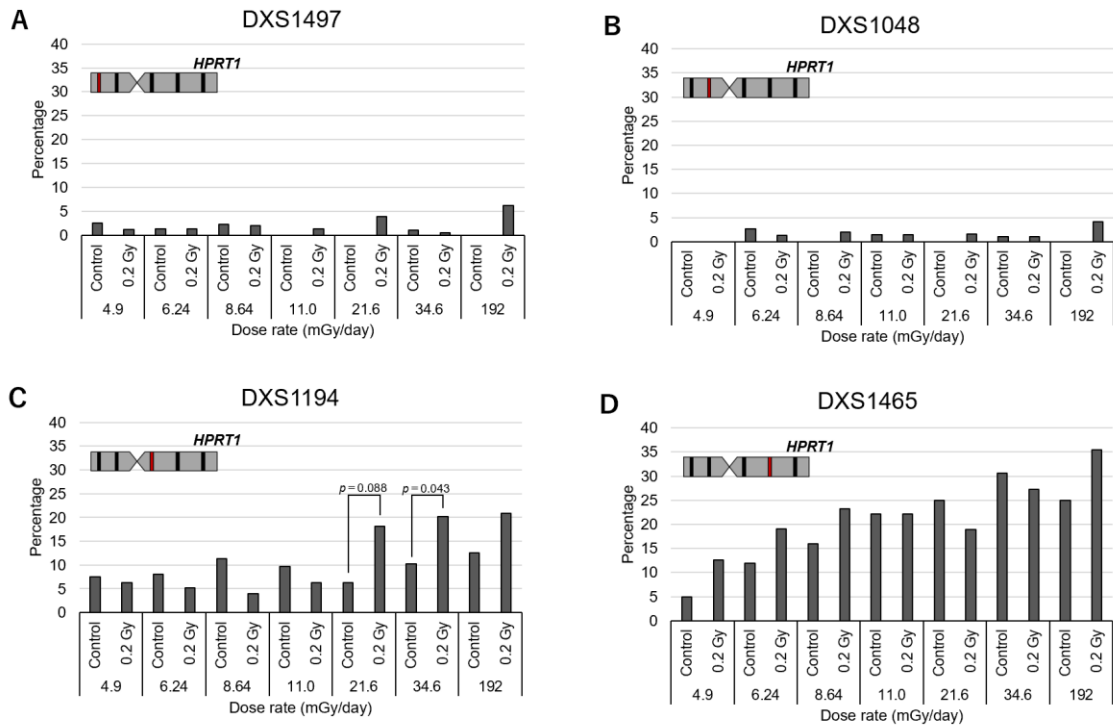


図 14 Spontaneous type を除く 6-thioguanine 耐性突然変異体の各 STS マーカーの欠失割合

Spontaneous type の変異体を除いた変異体について欠失部位の割合を示した。A) DXS1497 (Xp22.31) の欠失 (-/+/-/-、-/+ +/+/-、-/+ +/+ +/+ の合計) B) DXS1048 (Xp11.22) の欠失 (-/-/+/-、-/-/+ +/+ の合計) C) DXS1194 (Xq11.12) の欠失 (+/+/-/-、-/+/-/- の合計) D) DXS1465 (Xq21.33) の欠失 (+/+ +/+/-、-/+ +/+/-、-/-/+ +/+ の合計)。 *p* 値はフィッシャー正確検定によって得た。

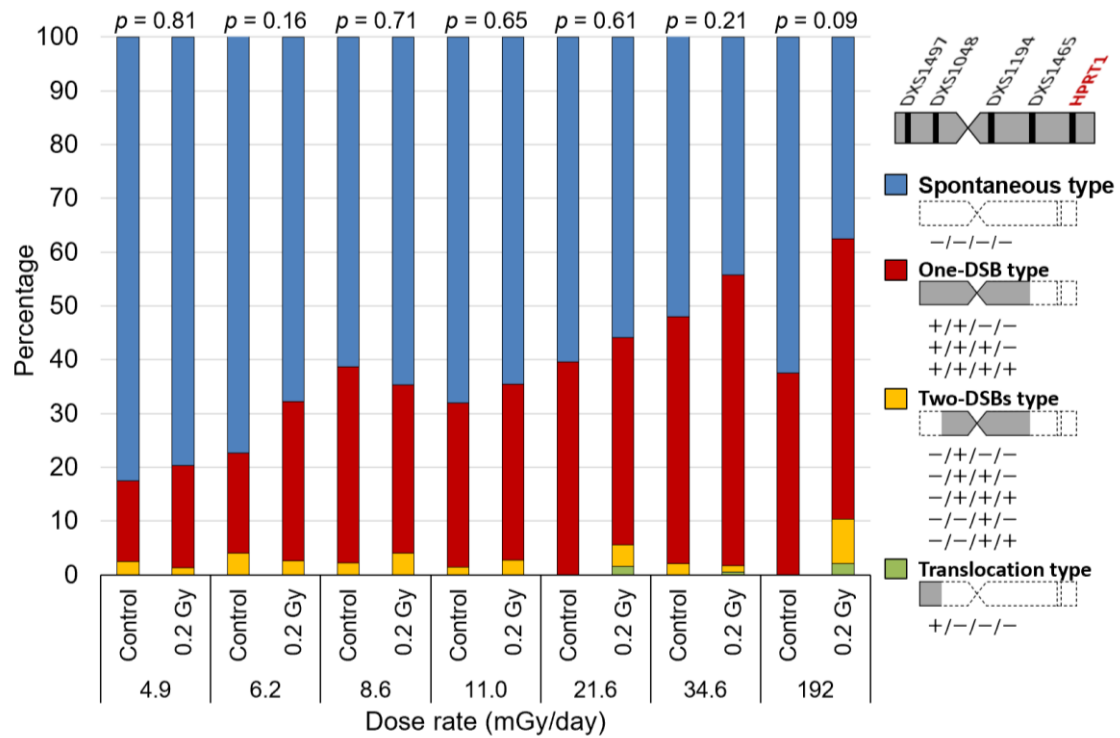


図 15 HTO 誘発 6-thioguanine 耐性突然変異体の変異スペクトル

突然変異体が形成されるために必要な最小の DSB 数にもとづいて突然変異体を 4 つに分類した。変異スペクトルは DXS1497/DXS1048/DXS1194/DXS1465 の有無を示し、「+」はその STS マーカーが存在することを、「-」はその STS マーカーが存在しないことを意味する。各線量率のクローン数は表 3 に示してある。 p 値は Control 群と 0.2 Gy 群間の Radiation type (One-DSB type、Two-DSB type、Translocation type) の頻度をカイ二乗検定により比較したものである。

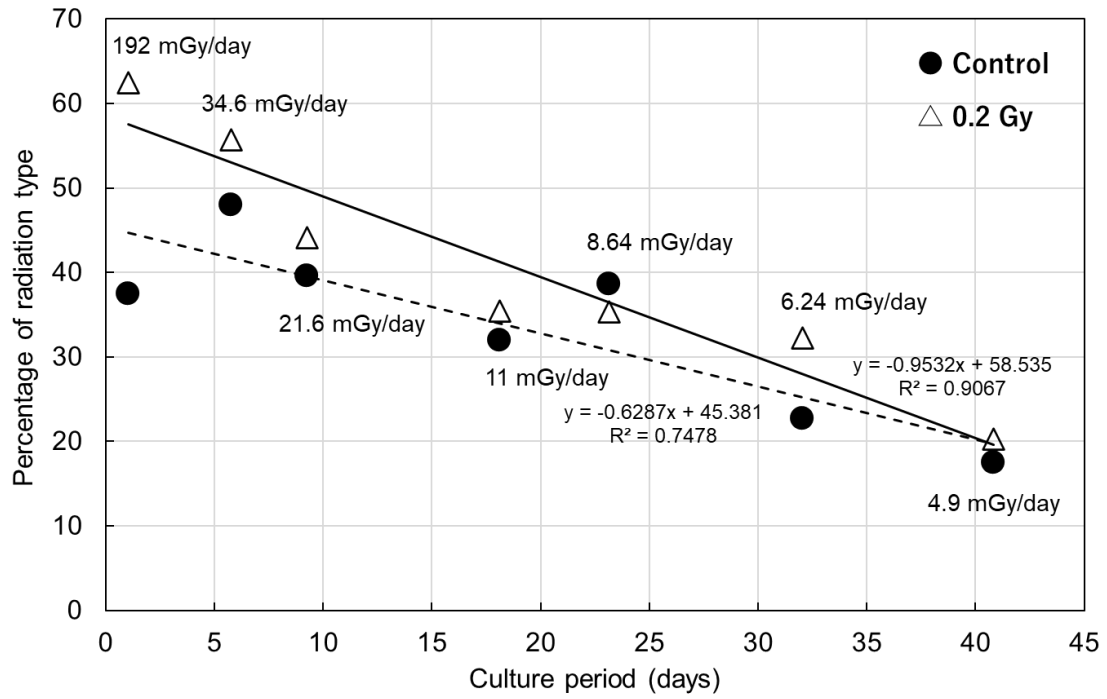


図 16 Radiation type の突然変異体の培養期間依存性

実線は 0.2 Gy の回帰直線を示し、点線は Control の回帰直線を示している。図中には回帰式と決定係数 (R^2) を示した。

第 4 章 考察

福島第一原子力発電所事故に伴う放射性物質を含む汚染水は、いまだ一日あたり 140 m³ (2020 年平均) もの量で発生し続けている [29]。発生した汚染水は多核種除去装置「ALPS」などを通すことによって、ほとんどの放射性核種を国の排出基準値以下まで除去できるが、トリチウム (トリチウム水 : HTO) は残存したままの状態で敷地内のタンクに保管されている。政府は福島復興に向けた原発の廃炉作業では ALPS で処理した HTO を含む水 (ALPS 処理水) の処分が必須であるとしていることから、処分方法について様々な議論が行われているが [30, 31]、2021 年 3 月現在、いかなる方法によっても実施には至っていない。ALPS 処理水の処分が行われる際には HTO が人体や環境に与える懸念への対応、社会的な風評への対策は避けられない。健康リスクへの懸念や風評は、特に低線量、低線量率における HTO 曝露による生体影響が十分に明らかになっていないということが要因のひとつとなっている。したがって、低線量、低線量率の HTO 曝露による生物影響を明らかにし、健康リスクへの影響の有無についての確固たる証拠を提供できる研究が必要である。

低線量、低線量率の放射線影響を議論する際には確定的影響よりも確率的影響に着目する必要がある。確定的影響は組織や臓器の一定数の細胞死や機能不全にもとづいているため、確定的影響が起こるためにはある程度の線量を必要とする。一方で確率的影響は細胞の突然変異にもとづく影響であり、DSB に局在する γ H2AX や 53BP1 などを用いた放射線誘発フォーカスの研究により、数 mGy の低線量放射線であっても DSB を生じさせることが複数の研究により明らかにされていることから [3-5]、低線量、低線量率の放射線であっても確率的影響が生じる可能性はゼロではない。当然、DNA に生じた DSB は細胞の損傷修復システムによって修復されるため [12-14]、低線量、低線量率放射線による確率的影響を評価するためには修復後に残存した変化を高感度に検出できる実験系が必要になる。

本研究は、発がんの前事象のひとつと考えられる体細胞突然変異を高感度に検出できる細胞系 [18, 19] を用いて、低線量、低線量率の HTO 曝露が *HPRT1* 遺伝子の変異事象に対し及ぼす影響について調べた。細胞培地へ添加する HTO の濃度を調節することにより 4.9 mGy/day から 192 mGy/day までの線量率で、総線量が 0.2 Gy に達するまで培養し、コロニー形成法により細胞生存率および突然変異体頻度を算出した。HTO 曝露による細胞の生存率は、線量率間の比較において有意な差は確認されなかった (図 12)。一方で、非照射 Control 群の突然変異体頻度は $(54.5 \pm 48.3) \times 10^{-4}$ と、培養日数や実験回によって大きくばら

ついた。そのため、突然変異体頻度については各線量率ごとに HTO 処理群と Control 群の差をとった HTO 誘発突然変異体頻度を用いて比較解析した。その結果、誘発突然変異体頻度は 11.0 mGy/day 以下の線量率と 21.6 mGy/day 以上の線量率で傾向が顕著に変化することがわかった (図 13)。すなわち、21.6 mGy/day 以上の線量率では Control に対して顕著に増加しているのに対して 11.0 mGy/day 以下の線量率では誘発突然変異体頻度は 21.6 mGy/day 以上と比較して有意に低くなり、Control 群の頻度とほぼ同程度の値となった。

この発見は、HTO 曝露によって誘導される体細胞突然変異において、11.0 mGy/day から 21.6 mGy/day の間で線量率のしきい値が存在する可能性を強く示唆している。Yamamoto ら (1995, 1998) はマウスに 10 mGy/day から 240 mGy/day までの線量率で様々な濃度の HTO を含む飲料水を生涯にわたって投与し、マウスの死因と腫瘍発生頻度を詳細に調べている [27, 28]。その研究によると、24 mGy/day 以上の線量率ではマウスの主な死因が胸腺リンパ腫であったのに対し、24 mGy/day 以下の線量率では胸腺リンパ腫は減少して他の腫瘍が見られるようになり、腫瘍の種類と頻度は非投与 Control と同様となった。この事実から Yamamoto らは、用いたマウス系統における主要な放射線誘発がんである胸腺リンパ腫に関する線量率のしきい値が 12.0 mGy/day 付近にあると提案している。本研究の結果はそれを支持する結果となっており、HTO による遺伝子変異や発がんといった確率的影響が、動物モデルと細胞モデルの両方において同程度の線量率がしきい値となりうる共通性は非常に興味深い。Yamamoto らの研究は生涯にわたってマウスに HTO の投与を行っているのに対し、本研究は総線量を 0.2 Gy と区切っているため、両研究で見られた線量率のしきい値の共通性は、12 mGy/day 以上の線量率による突然変異の発生と、その蓄積の結果として発がんが生じている可能性が考えられるが、今後のより詳細な検討が必要である。

次に、得られた HTO 誘発 HPRT 欠損突然変異体の変異スペクトル解析を行った。変異スペクトルの指標としてヒト X 染色体の短腕側に 2 座 (DXS1497、DXS1048)、長腕側に 2 座 (DXS1194、DXS1465) の STS マーカーを設定し、得られたすべての HPRT 欠損突然変異体について 4 座のマーカーの有無を PCR によって調べた。PCR 解析で得られた HPRT 欠損突然変異体の変異スペクトルは、そのパターンが形成されるために必要となる最小の DSB 数を基準に 4 型に

分類した。具体的には、すべての STS マーカーが存在せず、細胞からヒト X 染色体が脱落したと考えられる *Spontaneous type*、*HPRT1* 遺伝子を含むようにヒト X 染色体の長腕側で欠失が起こった *One-DSB type*、長腕側での欠失に加え短腕側でも欠失が起こった *Two-DSBs type*、さらに短腕の端部 (DXS1497) のみが存在しセントロメアを失っていることから転座と考えられる *Translocation type* の 4 型である。なお、ヒト X 染色体長腕の DXS1194 と DXS1465 の両方が存在する変異体は *HPRT1* 遺伝子の点突然変異などによる変異体の可能性が考えられるため、*HPRT1* 遺伝子近傍に位置する DXS86 も解析したが、すべての変異体で DXS86 は存在しなかった。この結果から、すべての変異体は少なくとも *HPRT1* 遺伝子領域を欠失することによって生じていると考えられたため、4 つの STS マーカーをもつ +/+ +/+ は *One-DSB type* として、短腕に欠失をもつ -/+ +/+ や -/- +/+ は *Two-DSBs type* として分類した。

突然変異スペクトル解析の結果、線量率および照射の有無に関わらず、最も高頻度に見られた型はヒト X 染色体の脱落による *Spontaneous type* であった。これはげっ歯類細胞に導入されたヒト染色体の不安定性によるものと考えられる [20-22]。実験で用いた高い方の線量率である 34.6 mGy/day や 192 mGy/day において、HTO 処理による染色体の一部欠失による変異型 (*One-DSB type*, *Two-DSBs type*, *Translocation type*) の割合が上昇する傾向があった。これまでの X 線照射による研究から、GM06318-10 細胞系では、自然発生で起こる突然変異はヒト X 染色体の脱落によるものであり、放射線誘発突然変異は DSB の発生によるヒト X 染色体の部分欠失となることがわかっている [24]。そこで DSB による 3 つの型の変異を *Radiation type* として 1 群にまとめてスペクトルを見直すと、0.2 Gy の HTO 曝露において、実験で用いた低い方の線量率では HTO 処理群と非照射群ともに *Spontaneous type* が高頻度となる類似した変異スペクトルを示したのに対し、高い方の線量率では HTO 処理群の *Radiation type* 変異が明らかに増加する傾向が認められ、線量率があるレベルを上回ると突然変異の型が *Spontaneous type* 主体から *Radiation type* 主体へと移行することが示唆される。

それぞれの STS マーカーごとに欠失割合を比べてみると、ヒト X 染色体短腕の DXS1497 と DXS1048 の欠失割合は、照射の有無に関わらず非常に低かった

ことから、ヒト X 染色体短腕の欠失は線量率に依存した変異スペクトルの変化にはほとんど影響していないと考えられた。一方、長腕側の DXS1194 の欠失割合は誘発突然変異体頻度の変曲点に一致するような変化が見られた。すなわち、11.0 mGy/day 以下の線量率では非照射 Control 群と HTO 処理群で欠失割合は同程度であるが、21.6 mGy/day 以上の線量率では Control 群の欠失割合は 11.0 mGy/day 以下の線量率と変わらないにも関わらず、HTO 処理群では明瞭に上昇する傾向が観察された。このことから、11.0 mGy/day 以下の線量率ではヒト X 染色体の長腕の大半を失うような DSB 導入はあまり起こらないが、21.6 mGy/day 以上の線量率では長腕に DSB による欠失をもつ型の変異が生じやすい傾向にあることが示唆される。なお、有意差はやや不明瞭ながら DXS1465 の欠失割合も線量率の増加に伴って上昇する傾向があった。

線量率に依存したゲノム欠失構造の変化は Russel と Hunsicker (2012) によって報告されている [32]。彼らはマウスの放射線誘発による特定の遺伝子座位における突然変異の過去の研究データを分析し、“large lesion” (大規模な欠失) が線量率に依存し、0.8 R/min (~10 mGy/min) 以上の線量率で顕著に増加することを報告している。彼らの結果は本研究とは線量率のレベルが大きく異なるが、放射線の線量率に依存した欠失イベントの転換を支持するものであり本研究の結果を裏付ける情報のひとつとなると考えられる。

実験における高い線量率の HTO 曝露によってヒト X 染色体の Radiation type の変異が増加するメカニズムとしては、いくつかの可能性が考えられる。第 1 は 21.6 mGy/day 以上の線量率において DXS1194 欠失の割合が高くなったことから、放射線による DSB 誘導のホットスポットがヒト X 染色体長腕のセントロメア近傍に存在する可能性である。この仮説の実証には、より詳細な STS マーカー解析が必要になるが、Xiao と Natarajan (1999) によりハムスター細胞の X 染色体長腕のセントロメア近傍 (Xq21) に放射線曝露による不安定部位が存在することが報告されていること [33] から、ヒト X 染色体においても確認すべき点といえる。第 2 に、線量率が増加することによって単位時間あたりに細胞核へ誘導される DSB 数は増加することから、DSB がヒト X 染色体長腕に誘導される確率も高くなることが考えられる。第 3 に、単位時間あたりの損傷が少ない (すなわち、線量率が低い) 場合には、DNA 損傷修復のクオリティが高くなることが考えられる。これらの視点から本研究の結果を鑑みると、高い線量率

では単位曝露時間あたりの損傷が増加し、Radiation type の突然変異が起これやすくなるが、細胞の培養期間が長くなると図 16 に示したように Radiation type 変異の頻度自体が減少し、HTO 処理群における Radiation type の頻度も Control 群に近づいたという結果は、GM06318-10 細胞の培養期間が長期化すると細胞からのヒト X 染色体の脱落機会が増加していることを示唆する。つまり、低線量率 HTO 処理の場合に DNA 損傷で誘発された Radiation type 変異イベントの一部がヒト X 染色体の脱落によって隠されてしまい Spontaneous type となった可能性は否定しきれないため、今後の詳細な解析で解明すべき課題として残っている。

なぜ、誘発突然変異体頻度と変異スペクトルの変曲点が 11.0 mGy/day と 21.6 mGy/day の間にあるのかについては現段階では説明することができないが、ヒントとなる研究として、Arcanjo らの研究があげられる [34, 35]。彼らはゼブラフィッシュの受精卵を 0.4 mGy/h (9.6 mGy/day) あるいは 4 mGy/h (96 mGy/day) の線量率の HTO 存在下で発生させ、発生段階ごとに遺伝子発現の変化を解析している。それによると、受精後 24 時間時点における筋収縮やイオン輸送、眼の発達に関連する遺伝子発現制御が 0.4 mGy/h 曝露と 4 mGy/h 曝露の間で正反対の応答を示し、4 mGy/h では *h2afx* や *bcl2l*、*xrcc1* などいくつかの DNA 損傷修復関連遺伝子の発現が上昇した一方で、0.4 mGy/h では酸化ストレス応答やアポトーシス関連遺伝子の発現上昇が起こった。このことは、本研究で用いた線量率の範囲で遺伝子発現レベルでの細胞応答の変化が起こる可能性を示唆する。トリチウム β 線も含めた低 LET 放射線による DNA 損傷では、水の放射線分解などで生じた活性酸素種による間接作用の寄与が 7~8 割に上り [36]、継続的な低線量率放射線照射は慢性的な酸化ストレスを増加させ細胞の早期老化を誘導すると報告されている [37, 38]。そのことを踏まえれば、本研究における突然変異生成に関しても特に低濃度においては HTO による酸化ストレスの影響割合が大きくなることは十分に考えられる。線量率に依存した酸化ストレス応答を含む遺伝子発現の変化や、それが突然変異形成に与える寄与割合については、今後の研究でさらなる検討を進める必要がある。

本研究で用いた高感度検出系は、内在性の *Hprt1* 遺伝子を用いた従来の検出系よりも 50~100 倍高い頻度で突然変異の検出をすることができる一方で、特に長期間の HTO 曝露後の際に観察されたように、ヒト X 染色体の脱落による

自然発生型 (Spontaneous type) の突然変異が高頻度に生じる特徴をもつ。この特徴は、本細胞系の突然変異体頻度を高める要因として寄与する一方、突然変異体頻度のばらつきを大きくする要因にもなっている。特に低線量率被曝による変異スペクトル解析においては自然発生頻度の上昇は不都合な性質であり、低線量、低線量率放射線による突然変異をより詳細に解析するためには、自然突然変異を抑制できるような新規の細胞系を確立する必要がある。本研究で分類した Spontaneous type の突然変異を抑制できる細胞系を樹立できれば、より低レベルの HTO 曝露によって遺伝的変異影響が生じるのか否かを明確に解析ができることが期待される。

参考文献

1. Tokyo Electric Power Company (TEPCO). Tritiated water portal site. Radiation concentration estimates for each tank area (https://www.tepco.co.jp/en/decommission/progress/watertreatment/images/tankarea_en.pdf). (15 March 2021, date last accessed).
2. E.J. Hall, A.J. Giaccia. Radiobiology for the radiologist, Sevens edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2012.
3. MacPhail SH, Banáth JP, Yu TY *et al*. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol* 2003; 79: 351–358.
4. Suzuki K, Okada H, Yamauchi M *et al*. Qualitative and quantitative analysis of phosphorylated ATM foci induced by low-dose ionizing radiation. *Radiat Res* 2006; 165: 499–504.
5. Marková E, Schultz N, Belyaev IY. Kinetics and dose–response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int J Radiat Biol* 2007; 83: 319–329.
6. UNESCO. The Precautionary Principle. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Paris, France. 2005.
7. ICRP. Low-dose extrapolation of radiation-related cancer risk. ICRP Publication 99. *Ann ICRP* 2005;35(4).
8. Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, Kasagi *et al*. Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950-2003: An overview of cancer and noncancer diseases. *Radiat Res* 2012; 177: 229-243.
9. Cardis E, Vrijheid M, Blettner M *et al*. The 15-country collaborative study of cancer risk among radiation workers in the nuclear industry: estimates of radiation-related cancer risks. *Radiat Res* 2007; 167: 396-416.

10. Hunter N, Kuznetsova IS, Labutina EV *et al.* Solid cancer incidence other than lung, liver and bone in Mayak workers: 1948-2004. *Br J Cancer* 2013; 109: 1989-1996.
11. Davis FG, Yu KL, Preston D *et al.* Solid cancer incidence in the Techa River Incidence Cohort: 1956-2007. *Radiat Res* 2015; 184: 56-65.
12. Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K *et al.* Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res* 2008; 49: 93-103.
13. Iijima K, Ohara M, Seki R *et al.* Dancing on damaged chromatin: functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage. *J Radiat Res* 2008; 49: 451-464.
14. Howard HYC, Nicholas RP, Noritaka A *et al.* Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18 : 495-506.
15. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC, *Hum. Mol. Genet* 2001; 10: 721-733.
16. McCart AE, Vickaryous NK, Silver A. Apc mice: models, modifiers and mutants, *Pathol Res Pract* 2008; 204: 479-490.
17. Umeki S, Suzuki T, Kusunoki Y *et al.* Development of a mouse model for studying in vivo T-cell receptor mutations, *Mutat Res* 1997; 393: 37-46.
18. Tauchi H, Ichimasa M, Ichimasa Y *et al.* Studies of mutagenesis caused by low dose rate tritium radiation using a novel hypersensitive detection system. *Fusion Sci Technol* 2002; 41: 413-416.
19. Tauchi H, Imamura H, Inoue M *et al.* Assessment of biological effect of tritiated water by using hypersensitive system. *Fusion Sci Technol* 2011; 60: 1173-1178.

20. Westerveld A, Visser RP, Meera Khan P *et al.* Loss of human genetic markers in man–Chinese hamster somatic cell hybrids. *Nat New Biol* 1971; 234: 20–24.
21. Norum RA, Migeon BR. Non-random loss of human markers from man–mouse somatic cell hybrids. *Nature* 1974; 251: 72–74.
22. Waldren C, Martin J, Sutherland J *et al.* Use of somatic cell hybrids for quantitation of mutagenesis: reduction in background mutants by fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Cytometry* 1984; 5: 584–588.
23. OMIN (Online Mendelian Inheritance in Man). www.ncbi.nlm.nih.gov/omim (15 March 2021, date last accessed).
24. Nagashima H, Shiraishi K, Ohkawa S *et al.* Induction of somatic mutations by low-dose X-rays: the challenge in recognizing radiation-induced events. *J Radiat Res* 2018; 59: 11–17.
25. Nakamura N. RBE of tritium beta-rays for cell killing of normal human cells in vitro. Proc. the 3rd Japan-US Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, p.159-163, IPPJ-Rev-3, Nagoya 1989.
26. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 452-8.
27. Yamamoto O, Seyama T, Jo T *et al.* Oral administration of tritiated water (HTO) in mouse. II: Tumour development. *Int J Radiat Biol* 1995; 68: 47-54.
28. Yamamoto O, Seyama T, Itoh A *et al.* Oral administration of tritiated water (HTO) in mouse. III: low dose-rate irradiation and threshold dose-rate for radiation risk. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 535–541.
29. 東京電力ホールディングス（TEPCO）. 処理水ポータルサイト. 建屋周辺の地下水位、汚染水発生の状況（https://www.tepco.co.jp/decommission/information/committee/roadmap_progress/pdf/2021/d210128_06-j.pdf#page=3）.（最終アクセス 2021/4/7）.

30. トリチウム水タスクフォース. トリチウム水タスクフォース報告書. 2016.
31. 多核種除去設備等処理水の取扱いに関する小委員会. 多核種除去設備等処理水の取扱いに関する小委員会報告書. 2020.
32. Russell LB, Hunsicker PR. The effect of dose rate on the frequency of specific-locus mutations induced in mouse spermatogonia is restricted to larger lesions; a retrospective analysis of historical data. *Radiat Res* 2012; 177: 555–564.
33. Xiao Y, Natarajan AT. Heterogeneity of Chinese hamster X chromosomes in X-ray-induced chromosomal aberrations. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 419-427.
34. Arcanjo C, Armant O, Floriani M *et al.* Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces misregulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages. *Aquat Toxicol* 2018; 200: 114-126.
35. Arcanjo C, Adam-Guillermin C, Murat El Houdigui S *et al.* Effects of tritiated water on locomotion of zebrafish larvae: a new insight in tritium toxic effects on a vertebrate model species. *Aquat Toxicol* 2020; 219: 105384.
36. Hirayama R, Ito A, Noguchi M *et al.* OH radicals from the indirect action of X-rays induce cell lethality and mediate the majority of the oxygen enhancement effect. *Radiat Res* 2013; 180: 514-523.
37. Yentrapalli R, Azimzadeh O, Barjaktarovic Z *et al.* Quantitative proteomic analysis reveals induction of premature senescence in human umbilical vein endothelial cells exposed to chronic low-dose rate gamma radiation. *Proteomics* 2013; 13 (7): 1096-1107.
38. Shakeri MS, Sangsuwan T, Pour KA *et al.* MTH1, an 8-oxo-2' deoxyguanosine triphosphatase, and MYH, a DNA glycosylase, cooperate to inhibit mutations induced by chronic exposure to oxidative stress of ionising radiation. *Mutagenesis* 2017; 32 (3): 389-396.

謝辞

学生生活および本研究、博士論文作成において、御指導いただいた田内広教授に心から感謝致します。また本研究に対して多くの御助言をいただきました立花章教授、中村麻子教授に深く感謝致します。

また、実験の御指導および議論を通じて様々な知識や示唆をいただいた坂本裕樹さんはじめ多くの皆様に深く感謝致します。

本研究において御指導、御協力を賜りました皆様に対し、ここに重ねて厚く謝意を表し、謝辞といたします。