

## 解説

### トリチウムの生物効果と今後の研究展望

小松賢志

広島大学原爆放射能医学研究所

広島市南区霞 1 - 2 - 3

## Tritium Biological Effects and Perspective of the Biological Study

Kenshi KOMATSU

Research Institute for Radiation Biology and Medicine

Kasumi 1-2-3, Minami-ku, Hiroshima 734

(Received Sept., 4, 1987; accepted March 9, 1988)

### ABSTRACT

Since tritium is an emitter of weak  $\beta$ -rays (5.7keV) and is able to bind to DNA, i.e., the most important genome component, the biological effects should be expected to be more profound than that of X-rays and  $\gamma$ -rays. When carcinogenesis, genetical effects and the detriments for fetus and embryo were used as a biological endpoint, most of tritium RBE (relative biological effectiveness) ranged from 1 to 2. The tritium risk in man could be calculated from these RBEs and  $\gamma$ -ray risk for human exposure, which are obtained mainly from the data on Atomic Bomb survivors. However, the exposure modality from environmental tritium should be a chronic irradiation with ultra low dose rate or a fractionated irradiation. We must estimate the tritium effect in man based on biological experiments alone, due to lack of such epidemiological data. Low dose rate experiment should be always accompanied by the statistical problem of data, since their biological effects are fairly low, and they should involve a possible repair system, such as adaptive response (or hormesis effect) and "Kada effect" observed in bacteria. Here we discuss future works for the tritium assessment in man, such as (1) developing a high radiation sensitive assay system with rodent hybrid cells containing a single human chromosome and also (2) study on mammal DNA repair at molecular levels using a radiosensitive hereditary disease, Nijmegen Breakage Syndrome.

#### 1. はじめに

近年の目覚ましい核融合開発研究は人類の悲願である永遠のエネルギー源核融合炉の近い将来の実現を予想させる。しかしながら、化石燃料や原子力といった大規模なエネルギー開発の歴史は人間環境への大きなインパクトを伴うことを明らかにした。従って、健全な核融合開発には社会に受容される安全性の研究は不可欠である。放射線の社会的

影響として最近ではセラフィールド訴訟やチェルノヴィル原発事故が問題となった。英国セラフィールド核燃料再処理工場で働いていた父親が授精前に体外被曝線量として広島・長崎の原爆被曝線量の1/4程度の線量を受けた場合に、その子供たちの白血病発生のリスクが通常の6倍から8倍に増加することが1990年 Gardner(1990)によって報告された。動物実験では配偶子被曝による子孫への腫瘍発生などの影響が知られていたが、この遺伝的影響は広島・長崎の被曝者の子供達による疫学調査では認められていなかった。この裁判では世界中の放射線生物学および遺伝学の専門家を巻き込んだ論争となったが、放射線の生物効果に関して我々の知らない未解明な重要な問題が存在することを如実に示す結果となった(野村,1993)。放射線障害に関する十分な知識は被曝事故時の対策と被曝者の不安をやわらげるのに有効であると期待される。1986年4月26日旧ソ連チェルノヴィルでの原子力発電所の事故は北半球全域に広がる放射性降下物を招き、周辺地域の住民や作業員に放射線障害をもたらしたのみでなく全地球的な大きな波紋と不安を与えた。放射線の急性障害だけでなく、低レベル放射性降下物による発がん・遺伝的障害に多くの不安を残したが、蓄積された我々の放射線生物学的知識がこの事故対策に活用されたのは承知の通りである。核融合炉燃料として使用されるトリチウムは米国サバンナリバーのトリチウム取扱施設に於いてトリチウムガス(最大数百kCi:3.7PBq)やトリチウム水(最大数10kCi:370TBq)の度々の異常放出例にみられるように、トリチウムは拡散漏洩しやすく取扱いの難しい核種の一つとされる。事故対策としていまだに不明な点が残される放射線障害やトリチウム固有の生物学的効果に関する正確な知識の確立は急務である。

我々の放射線障害の知識は数少ないヒトの疫学資料と限られた動物実験に基づいており、多くの生物学的に解決すべき問題点を抱えている。特に低線量放射線リスクの問題は重要である。ヒトの放射線リスク(発がん)評価は広島・長崎の原爆被曝者の疫学資料に依存してきた。原爆被曝は1回大線量被曝によるもので、放射線防護上重要な低線量および繰り返し被曝の場合の発がんリスクは一定の仮定を設けて被曝者資料から推定されている。国際放射線防護委員会(ICRP)で行っている仮定は統計的に有意な被曝者の発がん頻度が自然発がん頻度まで線量の減少と共に直線的に減少する直線モデルである。しかし、最近の動物実験結果は発がん頻度は自然発生レベルあるいは低レベルのまま一定線量域迄に推移し、そこから線量の上昇と共に増加する一次二次曲線モデル、あるいはしきい線量の存在を示唆している。現在の直線モデルが放射線リスクの過大評価をもたらしているのはほぼ確実である。一方、低線量率あるいは繰り返し被曝の発がんリスクは原爆被曝者のリスクに一定係数を用いて減じてきた(例えばBEIR V Report,1990ではこの減少分としてDose-rate effectiveness factor:DREF=2.1)。最近の研究は微量トリチウムで処理された細胞が適応修復機構により放射線に防御的に作用することが明らかとなった。その生物効果も従来の染色体異常から最近では姉妹染色分体交換、細胞致

死、突然変異にまで広範囲におよび、種々の修復酵素が誘導される普遍的現象であることを示している。この微量放射線による生体防御機構、いわゆるホルミーシス効果もまた低線量放射線リスクの重要な生物学的因子であり、今後発展が期待される分野である。本総説ではこのようなトリチウム生物研究に於ける問題点と今後の展望に重点を置いて解説したい。

## 2. トリチウム生物効果

### 2.1 発がん

トリチウムは他の放射線と同様に動物発がん、および高感受性発がん系としての細胞トランスフォーメーションでの発がん誘発が報告されている。トリチウム線量依存性に関して Sprague-Dawley ラット乳がんを用いた Cahill(1970,1975a,b) および Balb/3T3 細胞トランスフォーメーションを用いた Little(1986) らの実験は線量と共に増加する直線的な発がん率の増加を報告している。大津山(1986)らは、 $\beta$ 線反復照射による ICR マウス皮膚がん、1回線量が2.5Gy以下になるとしきい値モデル様の線量依存性を報告している。これに対応する低線量率および反復トリチウム照射の実験は現在までに行われていないが、Johnson(1986)らによる約5,000匹のCBA/Hマウス白血病を指標としたトリチウム低線量発がん実験を続行中でありその最終結果が待たれる。一方、横路(1990)らはC57BLマウスにトリチウム水1回投与(7.4Gy)と同量のトリチウム水を4週間に亘っての分割投与条件での発がん率の比較を行った。結果は1回投与のリンパ腫発生が約20%なのに対して分割投与では予想に反して約4倍に増加した。最近、Kadhimら(1992)は*in vitro*実験系での $\alpha$ 線誘発のマウス骨髄細胞の染色体異常が子孫細胞にも高頻度で維持されることを報告した。この遺伝するゲノム不安定性はLET依存性で、 $\gamma$ 線(0.24keV/ $\mu$ m)と $\alpha$ 線(175keV/ $\mu$ m)の中間LET値のトリチウム(6keV/ $\mu$ m)でも生じている可能性が高く、横路らの実験と対応しているかもしれない。

このようにトリチウム発がんの線量率依存性は重要である。我々は線量率の異なるトリチウム $\beta$ 線によるC3H10T1/2細胞の癌化誘発頻度を測定した。C3H10T1/2細胞は自然発生の頻度は幾分高いが放射線誘発のトランスフォーメーションが高感受性である特徴がある。結果は、トリチウム $\beta$ 線の線量率が2.0cGy/minから0.26cGy/minに低下するとトランスフォーメーション頻度も減少した。しかし、この線量率効果は $\gamma$ 線でも同程度にみられるために、誘発頻度 $5 \times 10^{-4}$ レベルで求められたRBEに結果的に線量率による顕著な違いがみられなかった。線量率2.0cGy/minで1.45、線量率0.26cGy/minで1.52であった。この結果は中性子のRBEと対照的である。中性子によるトランスフォーメーション誘発率は用いた線量率0.12cGy/minと1.50cGy/minで違いがなかった(Komatsu,1993)。 $\gamma$ 線では誘発率に線量率効果がみられるために、線量率2.0cGy/minで中性子RBEは3.3、線量率0.25cGy/minで5.1とRBEの線量率依存性がみられ、トリチウムRBEの線

量率依存性と対照的な結果となった(小松,1990)。

Tumor	Radiation source	RBE	Reference
C57BL mouse ovary tumor, leukemia	HTO, $\gamma$ rays	1.2 - 1.7	Yokoro(1990)
Oncogenic transformation of primary hamster cells	HTO, $\gamma$ rays	0.9 - 1.4	Nikaido(1990)
Oncogenic transformation of m5S mouse cells	HTO, $\gamma$ rays	1.45 $\pm$ 0.3	Komatsu(1990)
Mammary tumor in S-D rats	HTO, X rays	1.2 $\pm$ 0.3	Gragtmanns(1984)
Leukemia in CBA/H mouse	HTO, X rays	1.2 $\pm$ 0.3	Myers(1991)
Oncogenic transformation of C3H10T1/2	HTO, X rays	1 - 2	Little(1986)

Table 1. Tritium RBE for tumor induction

さらに、我々はm5Sトランスフォーメーション系でも同様にトリチウムRBE( Relative Biological Effectiveness) は1.3程度であることを示した。一方、動物に関するトリチウムRBEのデータは限られている(小松,1995)。明らかなのはSprague-Dawley ratの乳癌(Gragtmanns,1984)とCBA/Hマウスの骨髄性白血病(Myers and Jhonson,1991)誘発のRBEである。両研究とも標準放射線として緩照射250kVX線を使用している。発癌のRBEは従来、トリチウム $\beta$ 線以外の放射線について求められてきた。最も多いのは中性子RBEで、それは発癌組織と使用した動物種によって大きく変わることが知られている(Sinclair,1985;Straume,1988);この時のRBEは約2から200の大きな範囲にわたる。このため、現在迄得られている非常に限られた腫瘍あるいは動物のデータが発癌に関するトリチウムRBEを代表しているとは思われていない。表1に示したように、標準放射線をX線あるいは $\gamma$ 線とした時のこれらのトリチウムRBEは1~2の範囲である。

## 2.2 遺伝的影響

被曝した親マウスの子孫に放射線障害が現れる遺伝的影響がトリチウム水でも報告されている。Russell(1982)らはPT系マウスの6種類の特定座位を指標として、トリチウム水被曝した雄マウスでは $1.5 \times 10^{-7}$ /遺伝子座/cGyとX線や $\gamma$ 線の遺伝的影響より2.2倍高率であることを報告した。また、野村(1989)らは独自に開発した同系のマウス(PH-HT)F1胎仔に現れる体色変化の突然変異検出系を用いて、トリチウム水の突然変異能は前述のRussellの結果と良く一致して $\gamma$ 線の2.7倍高率であることを報告した。同様に栗下(1990)らもマウスの催奇形突然変異法を用いてトリチウム水の突然変異能が $\gamma$ 線の2.3倍高いことを報告している。従来、ICRPなどではトリチウムはX線や $\gamma$ 線と

同程度のリスクとみなしていたがこれらの結果はいずれもトリチウムの障害が予想よりも高いことを示している。

我々は培養細胞を用いた特定遺伝子に於ける突然変異率を求めた。m5S細胞を用いたトリチウムβ線によるHPRT座位での突然変異率は、線量率が2.0cGy/minから0.26cGy/minに低下するに従って誘発頻度が減少する。このように遺伝的影響の線量率効果は顕著であるが、前述のトランスフォーメーションと同じ理由により、γ線生物効果との比較ではRBEの大きな線量率依存性はみられない。つまり、2.0cGy/minでRBE 1.30そして0.26cGy/minで1.31となる(小松,1990)。他の研究者によるトリチウム水RBEは用いた実験系により1~3の範囲である(表2)。但し、化学型の異なるDNA結合型トリチウムRBEはこれより約2倍高い。

Tritium and standard		
Assay	Tritium and standard	RBE
HPRT(L5178Y)	HTO, γ rays	2.9(Ueno,et.al,1982)
"	3H アミノ酸, γ rays	2.6 "
"	3H-Tdr, γ rays	5.9 "
HPRT(m5S)	HTO, γ rays	1.3(Komatsu,1990)
Chromosome abberation for human sperm	HTO, X rays	3.0(Kamiguchi,1990)
Chromosome abberation for mouse lymphocyte	HTO, X rays	1.1(Chopra,1988)
Spermatogonia mutation in Drosophia	HTO, γ rays	2.7(Byrne,1989)
Specific locus mutation in mice	HTO, γ rays	2.7(Nomura,1989)
Domonant lethal in mice	HTO, γ rays	1-2(Carsten,1976)

Table 2. Tritium RBE for genetic effect

一方、野村ら(1982)はN5系マウスの親を精原細胞の段階で1回急照射した場合、仔マウス(F<sub>1</sub>)での急性リンパ性白血病の頻度は非照射群の約10倍に増加すること、また次の世代でも高い白血病発生率が持続することを報告した。発がんは被曝当時者の放射線影響として扱われるが、この結果は遺伝的影響としてその子孫の発がんリスクも考慮する必要があることを意味している。同様に、トリチウム水照射の場合にも数世代にわたって少量投与を受けたC57BLマウスの子孫に小腸がんが多発することがMewissen(1987a,b)によってすでに報告されている。しかし、その定量的検討は今後の課題である。

### 2.3 胎内被曝による発生・発育障害

広島・長崎の妊娠8週から15週の間被曝した集団の子供達に精神遅滞の発育障害が0.25Gyのしきい値を持って線量依存性に増加することが報告された(大竹,1983)。動物実験を用いた母体のトリチウム水被曝でも、その胎児に心・大血管系・四肢の催奇形性や小頭症などの発生異常が佐藤(1989)らによって報告されている。これらの発生異常は $\gamma$ 線と比較して1.8~2.6倍高率であった。一方、トリチウム水を数世代にわたって投与を受けたラットの脳重量の減少(Laskey,1973)やDNA・蛋白の減少(Zamenhof,1987)がICRP勧告トリチウム最大許容濃度のわずかに20倍濃度で観測された。同濃度トリチウム水の限定された妊娠期間を通じての投与では発生異常が認められないことから、これらの結果は長期間トリチウム水被曝時の独自のリスク推定確立の必要性を示唆している。

同様のトリチウム高感受性が幼若卵母細胞でも報告されている。Dobson(1982)らはリスザル雌の妊娠初日から新生児迄トリチウム水を一定濃度にしたときの新生児卵巣中の卵母細胞のLD50はトリチウム水最大許容濃度のわずかに10倍に相当する0.5  $\mu$  Ci/mlと報告した。このような卵・胎内被曝の予想外のトリチウム高感受性はリスク評価の最重要課題であり、今後種差および被曝時期などの検討も必要である。

緩照射 $\gamma$ 線を標準とした発生異常に関するトリチウム水のRBEは1-2.6で、低線量で大きくなる傾向がある。組織結合型トリチウムの場合にもそのRBEはトリチウム水より多少高値であるがほぼ同程度とみなして良い。これは培養細胞の致死率を比較した、 $^3\text{H-Tdr}$ ではトリチウム水の約2倍のRBEであるがトリチウムアミノ酸のRBEはトリチウム水と同程度であった結果と良く一致している。(Ueno et al.1982)。

これとは対照的に、トリチウムアミノ酸のようなトリチウム化合物が投与放射能濃度で表示された効果比では、その選択的な取り込みにより生物影響はトリチウム水よりもっと効果的であることがある。例えば、胚の初期発生で2細胞の段階から胚盤胞あるいは内部細胞塊(ICM)への50%減少はトリチウム水で4370kBq/mlで観察されるが $^3\text{H-Tdr}$ ではわずか1.1kBq/mlでその差は約4000倍である(Yamada,1982)。これはin vitroの実験ではあるが(動物の代謝はこの比を変える可能性がある)、内部被曝の防護では細胞核の吸収線量よりも体内への摂取量が実際的であるのでこのような比較は重要である。そのため、トリチウムの障害を評価するには細胞への吸収線量と同時に摂取トリチウム量当りの生物学的効果比も考えねばならない。有機結合型トリチウムの場合にはトリチウム水との照射線量の比は4-20倍の範囲内にある。この生物効果を指標とする限り、有機結合型トリチウムのRBEは依然として大きいことがわかる(Yamada and Ohyama,1989)。有機結合型トリチウムのマイクロドシメトリーは難しいので、将来この吸収線量はもっと正確に評価される可能性がある。しかし、初期胚のそのものは放射線障害として重要な新生児の発生異常や遺伝的効果に影響を与えるものではない。

### 3. トリチウム RBE とヒトへの障害

トリチウム生物効果の最終的な研究目的はヒトでのトリチウムβ線障害リスクを推定することである。しかしながら、トリチウムによるヒト障害例は非常に少なく、1960年代に起こったスイスの夜光塗料を作っているダイアルペインター2名の死亡例が報告されているだけである。この時の1名の被曝線量は5Gyでもう1名は10Gy以下と推定されており、いずれも骨髄のトリチウム障害で死亡している。このため、トリチウムによるヒト障害のリスク推定には間接的な手法がとられている。つまり、γ線によるヒト障害に関しては広島・長崎の原爆生存者や医療被曝からの豊富な資料が存在している。このγ線の生物効果に対するトリチウムβ線の効果の程度(RBE)を生物実験により求め、ヒト障害リスクの推定を行う方法である。現在、ICRPはトリチウムβ線のRBE(正確にはQ因子)を1としており(伊藤,1995)、その時の予想されるヒトでのトリチウム障害を表3に示した(Martin, 1982)。

Intake	Dose equiva	Radiation effect and risk for carcinogenesis
$2.8 \times 10^{11}$ Bq(7.5Ci)	5Sv(500rem)	LD50(Without dose rate effect)
$5.5 \times 10^{10}$ Bq(1.5Ci)	1Sv(100rem)	Mild radiation hazards(vormiting, temporal sterisation, peripheral blood cell in reduction)
$2.8 \times 10^9$ Bq(75mCi)	5mSv(5rem)	Carcinogenic risk $10^{-3}$
$2.8 \times 10^8$ Bq(7.5mCi)	5mSv(500mrem)	Carcinogenic risk $10^{-4}$

Table 3. Tritium intake in human and their radiation effects

それでは実験により求められるトリチウム RBE はどの程度であるのか。ストローメ等 (Straume,1993) はトリチウムの RBE に関する 21 論文を引用して、その算術平均値は X 線を用いた RBE で 1.8、γ 線を用いた RBE で 2.3 と報告している。標準放射線 X 線を用いた 12 研究の RBE 分布は 1-2 範囲内に大部分が納まるゆがんだ分布をしているが、対照的に γ 線を用いた 21 研究では RBE2~3 に納まる正規分布をしている。

トリチウム RBE の測定値はマイクロシメトリーで計算された値と良く一致している。ターゲットサイズを  $1 \mu m$  とした時のトリチウムの最大 RBE(Linear quadratic モデルの  $\alpha$  係数が主となるような低線量および低線量率での生物効果) は標準放射線 X 線に対して 1.5、 $60 \text{ Co } \gamma$  線に対して 3.8 となる (Ellett and Braby,1972)。有機結合型トリチウムの RBE のデータは限られているが、アミノ酸に結合したトリチウムの RBE は

トリチウム水と同程度、そしてチミジンのような DNA 塩基結合型トリチウムの RBE はそれらの約 2 倍である。

しかし、Straume に取り上げられた RBE の値は放射線作業従事者や一般公衆が受ける予想される線量や線量率よりもかなり高いので、ヒトリスク推定に適切な実際の RBE については次に述べるような更なる検討が必要である。

#### 4. トリチウムの低線量(率)効果

中性子照射の線量率を低下した時に、線量当たりの発がん率が予想に反して増加する逆線量率効果が動物実験、トランスフォーメーション(試験管内発がん)で報告されている(Miller,1988)。しかし、低線量の $\gamma$ 線を分割したときの発がん率については Little(1979)らによりトランスフォーメーションが減少すること(正規線量率効果)が報告されている。これらの一見相反する $\gamma$ 線と中性子線の結果は細胞増殖、照射線量の条件および DNA 損傷の違いを反映していると思われる。発がんのしきい線量についても分割照射の線量に依存することが大津山(1996)らによって報告されている。このように、低線量および低線量率の発がん率は未解決な要因によって結果が大きく左右されることが知られている。特に、ここでは未解決の重要な問題であるホルミーシス効果と賀田効果について述べる。

細胞の修復系には構成的なもの他に適応的に誘導されるものが大腸菌などで従来から知られていた。近年電離放射線に対する適応修復がヒトや哺乳動物細胞でも起こることが示された。すなわち、低線量のトリチウム $\beta$ 線に前もって被曝した哺乳動物細胞は、その後の X 線や $\gamma$ 線による染色体異常の誘発に対して抵抗性になることが見出された(Wolff,1988)。適応修復の発現は DNA 修復に関与するポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの阻害剤であるアミノベンズアミド(生島, 1995)、蛋白合成の阻害剤であるシクロヘキシミド(Youngblom,1989)あるいはプロテインキナーゼ C の阻害剤である H7(佐々木,1994)により阻害される。このことは、最近進展した放射線応答の分子機構と適応修復が深く関わっていることを示唆する。適応修復は染色体異常のみならず突然変異(Sanderson,1986)や優性致死(Cai, 1990)でも見られることから放射線損傷の修復に普遍的な現象であるらしい。それだけに、微量放射線のホルミーシス効果とも関連して、未解明な低線量放射線リスクを考える上で重要な問題を提起していると考えられる。我々もマウス白血病細胞 L5178Y の HPRT 突然変異を指標として、微量トリチウム水によるホルミーシス効果を検討した。トリチウム水で 5cGy 前処理 4 時間あるいは 7 時間後に、 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線 4Gy 照射した時の突然変異率はそれぞれ  $6.72 \pm 1.65$ ,  $4.55 \pm 1.89$  であった。これは $\gamma$ 線 4Gy 単独照射した時の突然変異率  $7.44 \pm 1.85$  よりいずれも低下している。しかし、この防護効果は統計的に有意なものではなかった(未発表データ)。ホルミーシス効果は極低線量の問題であるので、微小な生物効果をどのように効率よく検出するかが今後の研究進展の



大きな課題である。

一方、1981年に賀田らは<sup>3</sup>H-グリセロールによって照射されたDNAを枯草菌に取り込ませ、その形質転換能を指標とした生物効果を調べる中で、線量率が低い程照射効果が増大するという、従来考えられている線量率効果とは逆の現象を報告した。その後、<sup>3</sup>H-グリセロールの代わりにトリチウム水を用いても、また枯草菌の代わりに大腸菌を用いても同様の効果が存在することから、これらをまとめて賀田効果(Kada effect)と呼んでいる(高倉,1995)。現在では、水溶液中で照射されたDNA一本鎖切断を指標とした場合や、<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 線照射でもみられることが報告されている。低線量率あるいは分割照射により障害が大きくなることからホルミーシス効果とは逆の現象であるが、トリチウムのリスク推定の重要な因子であると思われる。しかし、この現象は下等生物に限られておりヒトを含む哺乳動物では報告されていない。哺乳類動物と下等動物ではDNA修復機構が大きく異なることに原因すると思われるが、その両者の発生機序の違いの詳細は不明である。

## 5. 今後の展望

トリチウムからのヒト放射線障害で予想される被曝様式は低線量の繰り返し被曝あるいは低線量率被曝である。しかしながら、ヒトでの低線量率被曝での信頼できる報告例はない。前述のようにもっとも重要な疫学資料である原爆生存者の被曝は1回大線量照射によってもたらされたものである。このため、低線量率でのトリチウム生物効果については従来のRBEを用いた考えにとらわれない独自の手法が必要である。低線量率照射では生物効果が小さいために、ホルミーシス効果や賀田効果のアッセイにはいずれも高感度検出系が必要である。一方、下等生物とヒトを含めた哺乳動物では放射線の修復機構が大きく異なることが知られている。前者では相同組換え機構によりDNAが修復されることが知られているが、後者の機構は残念ながら現在でも不明である。トリチウム低線量生物効果のための放射線高感受性検出系開発やヒトDNA修復機構解明のための我々の研究の一端を次に紹介したい。

**放射線感受性検出系開発：**ホルミーシス効果のような微弱な放射線による遺伝的影響研究には高感度突然変異検出系が必要である。しかしながら、放射線で誘発される突然変異の大部分はDNA欠失型突然変異であるので、目的遺伝子の変異/欠失と同時に、その箇所近傍に存在する生存に重要な遺伝子も失われる可能性がある。つまり、突然変異と同時に細胞死が起こるために結果として突然変異が検出できなくなる。このことはX染色体上のHPRT遺伝子でも同様である。細胞内で機能しているX染色体は通常1コピーであるのでHPRT遺伝子近傍の重要遺伝子の放射線による欠落は細胞死につながる。我々はこの仮説を実証するために、HPRTのハムスター細胞にヒト正常X染色体を外から導入したハイブリット細胞による実験を行った。このハイブリット細胞では、例え

HPRT 遺伝子領域が大きく欠失しても移入 X 染色体自体が生存に必須でないために細胞が生存可能である。従って、高頻度の突然変異が期待される。実際に 4Gy 照射した時の誘発頻度は  $360 \times 10^{-5}$  であった。これは以前に我々がマウス培養細胞 m5S を使った時の頻度  $4 \times 10^{-5}$  に比較して約 100 倍高感受性である (未発表データ)。この結果は、同様にヒト 11 番染色体をハムスターに移入した AL 細胞での S1 突然変異が HPRT 突然変異より 1Gy 照射で約 70 倍高頻度であるのと一致している (Zhu, et. al., 1996)。このように我々の結果は低線量放射線による突然変異の低頻度誘発の機構を明らかにすると同時に、今後の高感度検出系開発を実験的に証明できる可能性を示した。

**ヒト DNA 修復機構研究:** ナイミーヘン染色体不安定症候群 (Nijmegen Breakage Syndrome; NBS) は常染色体劣性の遺伝形式を示す疾患でオランダの Nijmegen 大学で初めてその症例が報告されて以来、東ヨーロッパ (特にポーランド) を中心に 27 家系 47 症例が報告されている。NBS は免疫学的及び細胞遺伝学的に我が国でも患者の多い毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia Telangiectasia; AT) に類似しており、AT のバリエーションに分類されている。NBS の臨床症状には、顕著な小頭症が認められ、ほぼ全ての患者は生後約 1 ヶ月で重度の小頭症に至る。AT の特徴的所見である小脳性運動失調症 (Ataxia) や毛細血管拡張 (Telangiectasia)、血清  $\alpha$ -フェトプロテインの上昇は認められないが、いずれの疾患も臨床的に免疫不全と高発癌性が認められ、細胞レベルでも放射線高感受性と染色体不安定性、放射線抵抗性 DNA 合成 (RDS) の性質を共有し、その発症機構は互いに類似すると考えられている。

我々は最近、微小核細胞移入法で単一ヒト染色体を NBS 細胞へ移入し、得られたハイブリッドクローンの放射線高感受性の回復の有無を指標として、原因染色体のマッピングを試みた。さらに原因遺伝子候補領域を狭めるため、ラディエーションハイブリッドクローンを新たに作製し、失欠した染色体を NBS-V2 細胞に移入した。得られたクローンについて放射線感受性の回復の有無を検討し、原因遺伝子の候補領域を限局した。

微小核細胞移入法により、neo 遺伝子などの優性選択遺伝子で標識されたヒト単一染色体ライブラリーを NBS 細胞に移入した後、染色体移入クローンを薬剤で選択し、9 番染色体を除く全てのヒト染色体について染色体移入クローンが得られた。これらの移入クローンに 4Gy の  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  線を照射し、コロニー形成法でその生存率を求めた結果、ヒト 8 番染色体を移入したクローンは NBS 新細胞と比べて約 10 倍程度の生存率の回復が認められた。この結果は、NBS 原因遺伝子が 8 番染色体上に存在することを示唆している。さらに原因遺伝子の候補領域を狭めるため、ヒト 8 番染色体をもつマウス雑種細胞 (A9(neo8)) から精製した微小核に、5 または 10Gy の放射線を照射し、再びマウス A9 細胞との融合を行い、断片化したヒト 8 番染色体を有するマウス A9 ハイブリッド細胞ライブラリーを作製した。得られたクローンから DNA を抽出し、PCR (Polymerase chain reaction) 法で STS マーカーの残存パターンを確認して、ヒト 8 番染色体に欠失がある

種々のハイブリッドクローンを単離した。このうち、比較的大きな欠失があった Rm15, Rm33, Rm33-1, Rm43N-1, Rm46 の 5 クローンを微小核細胞移入法で NBS 細胞に移入し、機能的相補性試験を行った。その結果、Rm15, Rm33, Rm33-1, Rm46 の 4 クローンの移入では放射線感受性が回復した。一方、Rm43N-1 クローンの移入では感受性の変化が見られなかった。このことから NBS 候補領域は D8S273 から D8S556 までの領域に限局することができ、NBS 原因遺伝子が 8q21.12-8q24.13 の約 23cM にマップされた (Komatsu,et.al.,1996; Matsuura,et.al.,1997)。

一方、この遺伝子は放射線による DNA 損傷を認識して、下流のがん抑制遺伝子 p53 に伝達する機能を有すること、また AT の原因遺伝子 ATM とは並列に作用して両者はお互いに相補的役割を担っていることが示唆されている (Matsuura,et.al., 1997)。p53 は発がんや細胞の自爆死の原因となる因子であり、放射線発がんや細胞死との関連で注目される。また、NBS 原因遺伝子と損傷 DNA の相互作用を解析することによりヒト DNA 修復機構も近い将来明らかになると確信する。

## 6. 文献

- Beir V., Low dose epidemiological studies, In "Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizingradiation", National Academy Press.Washington: 1990
- Byrne, B. J. and Lee,W.R., Radiat.Res., 117, 469- 479; 1989
- Cahill, D. F. and Yuile, C. L., Radiat.Res., 44, 727 - 737; 1970
- Cahill, D. F., Wright, J. F., Godbold, J. H., Ward, J. M., Laskey, J. W. and Tompkins, E. A., J. National Cancer Inst., 55, 371 - 374; 1975a
- Cahill, D. F., Wright, J. F., Godbold, J. H., Ward, J. M., Laskey, J. W. and Tompkins, E. A. , J. National Cancer Inst., 55, 1165 - 1169; 1975b
- Cai, L. and Liu, S. Z., Int. J. Radiat. Biol., 58, 187 ;1990
- Carsten, A. L. and Commerford, S. L., Radiat Res., 66, 609 - 614; 1976
- Carsten, A. L., Commerford, S. L. and Cronkite, E. P., Curr. Topics Radiat. Res. Q., 12, 212-224; 1977
- Chopra, C. and Heddle, J. A., Atomic Energy Control Board; Report number INFO-0287, Ottawa, Canada; 1988
- Dobson, R. L., Straume, T. and Kwan,T.C., Environ. Mutagen, 9(suppl.8), 29 - 30; 1987 , Science Reviews Ltd.; 1982
- Ellett, W. E. and Braby, L. A., Radiat. Res., 51, 229 - 243;1972
- Gardner, M. J., Snee, M. P., Hall, A. J., Powell, C. A., Downes, S. and Terrell,J. D., Br. Med. J., 300, 423 - 429; 1990

- Gragtmans, N. J., Myers, D. K., Johnson, J. R., Jones, A. R. and Johnson, L. D., *Radiat. Res.*, 99, 636 - 650; 1984
- 生島隆治, "核融合研究 II", 名古屋大学出版会, 774-779; 1995
- 伊藤 彬, "核融合研究 II", 名古屋大学出版会, 788 - 791; 1995
- Johunson, J. R., Myers, D. K. and Grangtmans, N. J., *Radiation Prot. Dos.*, 16, 161 - 169; 1986
- Kadhim, M. A., MacDonald, D. A., Goodhead, D. T., Lorimore, S. A., Marsden, S. J. and Wright, E. J., *Nature*, 355, 738 - 740; 1992
- Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K., *Mutant. Res.*, 228, 125 - 131; 1990
- 栗下照弘, "平成元年度文部省科費報告書 (核融合特別研究)", 100 - 104; 1990
- 小松賢志, "平成元年度文部省科費報告書 (核融合特別研究)", 21 - 32; 1990
- 小松賢志, "核融合研究 II", 名古屋大学出版会, 756 - 761 ; 1995
- Komatsu, K., Sawada, S., Takeoka, S., Kodama, S. and Okumura, Y., *Int. J. Radiat. Biol.* 63, 469 - 474; 1993
- Komatus, K., Matsuura, S., Tauchi, H., Endo, S., Kodama, S., Smeets, D., Weemaes, C. and Oshimura, M., *Am. J. Hum. Genet.*, 58, 885 - 888; 1996
- Laskey, J. W., Parrish, J. L. and Cahill, D .F., *Radiat. Res.*, 56, 171 - 179; 1973
- Little, J. B., *Radiat. Res.*, 107, 225 - 233; 1986
- Martin, E. B. M., "Health Physics Aspects of The Use of Tritium"
- Matsuura, K. T. Balmukhanov, H. Tauchi, C. Weemaes, D. Smeets, K. Chrzanowska, S. Sakamoto, S. Matsuura and K. Komatsu, *Cancer Res.* , Submitted : 1997
- Matsuura, S., Weemaes, C., Smeets, D., Takami, H., Kondo, N., Sakamoto, S., Yano, N., Nakamura, A., Tauchi, H., Endo, S., Oshimura, M. and Komatsu, K., *Am. J. Hum. Genet.*, 60, 1487-1494 ; 1997
- Mewissen, D. J. , Rust, J. H. , Rust, J., *C. R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.*, 439 - 444; 1987a
- Mewissen, D. J., Ugarte, A. S. and Rust, J. H., Philadelphia, PA: Radiation Research Society; 1987b
- Miller, R. C., D. J. Brenner, C. R. Geard, Komatsu K., Marino S. A. and Hall, E. J., *Radiation Res.*, 114, 589 - 598; 1988
- Myers, D. K. and Johnson, J. R., Atomic Energy Control Board, Ottawa, Canada; 1991
- 二階堂修, "平成元年度文部省科費 報告書 (核融合特別研究)", 7 - 20; 1990
- 野村大成, "英国核施設従業員の子供における白血病発生 - 要約と最近の動向 -", 28, 10 - 19; 1993
- Nomura, T., *Nature*, 296, 575 - 577; 1982

- Nomura, T. and Yamamoto, O., "Proceedings of the third Japan- US workshop on tritium radiobiology and health physics, Nagoya, Japan, Institute of Plasma Physics, Nagoya University", IPPJ - REV - 3, 230 - 233; 1989
- Otake, M. and Schull, W. J., RERF Technical Report No.1 - 83 (Radiation Effects Research Foundation); 1983
- 大津山彰, 放射線生物研究, 31, 107 - 119; 1996
- Russell, W. L. and Kelly, E. M., Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 542 - 544; 1982a
- Russell, W. L. and Kelly, E. M., Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 539 - 541; 1982b
- Sanderson, B. J. S. and Morley, A. A., Mutation Res., 164, 347; 1986
- 佐々木正夫, "ヒト・マウス・ゲノム解析研究と放射線生物学", 堀 雅明 編, 放医研シンポジウムシリーズ, NIRS-M-97: 56 - 60; 1994
- Satow, Y., Lee, J. and Sawada, S., "Proceedings of the third Japan-U.S. workshop on tritium radiobiology and health physics, Nagoya, Japan, Institute of Plasma Physics, Nagoya University", IPPJ-REV-3, 280 - 286; 1989
- Sinclair, W. K., "Proceedings of 20th annual meeting of the National Council on Radiation Protection and Measurements, Bethesda, MD", NCRP : 223 - 237; 1985
- Straume, T. and Carsten, A. L., Health Physics, 65, 657 - 672; 1993
- Straume, T. A., Rroctect. Dosim., 23, 57 - 61; 1988
- 高倉かほる ; "核融合研究 II", 名古屋大学出版会, 768 - 773; 1995
- Ueno, A. M., Furuno - Fukushi, I. and Matsudaira, H., Radiat. Res., 91, 447 - 456; 1982
- Wolff, S., Int. J. Radiat. Biol., 53, 39 - ; 1988
- Yamada, T. and Ohyama, H., "Proceeding of the third Japan - U. S. Workshop on tritium radiobiology and health physics Nagoya University", IPPJ - REV -3, 274 - 279; 1989
- Yamada, T., Yukawa, O., Asami, K. and Nakazawa, T., Radiat. Res., 93, 359 - 369; 1982
- Yokoro, K., Yamamoto, O., Seyama, T., Nitta, Y. and Niwa, O., "Proceeding of the Third Japan-U.S. Workshop, Nagoya, Japan, Insitute of Plasma Physics, Nagoya University", IPPJ - REV - 3, 233 - 228 ; 1989
- Youngblm, J. H., Wiencle J. K. and Wolff, S., Radiat. Res., 85, 292 - 301; 1981
- Zhu, L. X., Waldren, C. A., Vannais D. and Hei, T. K., Radiation Res., 145, 251 - 259; 1996