

# 重粒子線低密度照射による突然変異誘発効果の遺伝的不安定性の誘導

放医研 鈴木雅雄

## Genomic instability in mutation induction induced by low-fluence particle radiations

Masao Suzuki

National Institute of Radiological Sciences, Inage, Chiba 263-8555

E-Mail: m\_suzuki@nirs.go.jp

**Abstract:** We have studied biological effects in normal human fibroblasts induced by low-fluence high-LET ions to examine what kinds of radiation species induce genomic instability. Cells were pre-treated with low-fluence ions (~1mGy/7-8h) of either carbon or helium before following irradiation with X-ray challenging dose (1.5Gy). There observed no difference in cell-killing effect in pre-treatment with either carbon or helium, when comparing to the pre-treatment with low-dose <sup>137</sup>Cs gamma rays. In mutation induction there was no difference in induced mutation frequency at 1.5Gy of X-ray challenging dose between un-pretreated and gamma-ray pre-treated cells. On the other hand, it was around 4.0 times higher in carbon-ion pre-treated cells and 1.9 times higher in helium-ion pre-treated cells than in un-pretreated cells. There is evidence that genomic instability in mutation induction induced by the pre-treatment of low-fluence ions depends upon both LET and ion species.

**Key words;** low-fluence heavy ions, genomic instability, bystander effect

### 1. はじめに

より現実化する人類の宇宙空間への進出にともなう問題となる宇宙放射線に対する宇宙環境や高高度飛行における宇宙船・航空機内での人体影響は、地球環境科学や宇宙環境科学の分野において大きな関心事の一つである。このような放射線源に対する生物影響研究で特に問題となってくるのは、低線量・低線量率の照射効果であり、特に宇宙放射線による生物影響を考える時、全放射線に対する存在比で約90%を占める陽子線と、存在比では約10%であるが生物学的効果比(RBE)が大きな陽子線以外の粒子放射線の低密度・低線量率被曝による生物影響を明らかにしなければならない。この様な放射線被曝条件下では、時間的・空間的に直接放射線被曝した細胞と被曝していない細胞との混合集団であることは間違いなく、それを一つの細胞集団として解析した時は正確な放射線被曝の人体リスク評価を行うことは不可能である。すなわちより正確な放射線影響リスク評価を行うためには、粒子放射線低密度照射に対して、

- ① 直接被曝した細胞への直接的な生物効果
- ② 被曝した細胞の近傍に存在する被曝していない細胞への間接的な生物効果
- ③ さらに被曝した細胞としていない細胞との相互作用機序の解明

が、必要不可欠になると考える。

この研究では、スペースシャトルや宇宙ステーション

で被曝する可能性の高い高LET粒子放射線の人体影響を明らかにするために必要不可欠な生物学的基礎実験データを集積する目的で、高LET粒子放射線うち重荷電粒子成分と中性子線成分をそれぞれ単独で低密度照射された時の生物影響に関して、ヒト由来正常細胞に対する粒子放射線低密度照射の細胞応答を、低密度照射を前処理された細胞に引き続きX線を急性照射した時の細胞致死と突然変異に与える影響に焦点を絞り実験を行った。

### 2. 研究方法

細胞は、理化学研究所細胞銀行より供与されたヒト皮膚由来正常線維芽細胞を用いた。

高LET粒子放射線であるヘリウムおよび炭素イオンビームの低密度照射は、放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置(HIMAC)を利用して、7-8時間掛けて1mGy相当のイオン数を底面12.5cm<sup>2</sup>の組織培養フラスコに付着させたヒト正常細胞に照射した。中性子線成分の低線量率照射は、放射線医学総合研究所病院附属中性子線源室に設置されている<sup>241</sup>Am-Be線源を用いて、線源からの距離によって、1mSv/8hとなる照射点および線質係数を仮定したときの吸収線量Gy換算での1mGy/8hとなる照射点を設定し、8時間掛けて1mSvまたは1mGy相当の中性子線をヘリウム・炭素イオン同様の方法で照射した。その後上記低密度前照射された細胞に改めて200kV X線を急性照射(1.5Gy)して、細胞致死効果と突然変

異誘発効果に与える変化を調べた。細胞致死はコロニー形成法による細胞の増殖死を指標とした。突然変異誘発頻度は *hprt* 遺伝子座を標的として6チオグアニン耐性クローンの出現頻度より計算した。

### 3. 研究成果

#### 3-1 粒子放射線（ヘリウム、炭素）低密度（1mGy/7-8h）照射システム

重荷電粒子放射線成分であるヘリウムおよび炭素イオンビームの低密度照射は、放射線医学総合研究所 HIMAC を利用して、ビーム強度を通常行われている生物照射実験やがん治療で用いられているものの1/1000以下に落として（faint beam mode）、7-8時間掛けて1mGy相当のイオン数を底面25cm<sup>2</sup>の組織培養フラスコに付着させたヒト正常細胞に照射した。線量測定・評価は、シンチレーションカウンターを用いて行った。用いるイオン種とそのエネルギーから、ヘリウムイオン（核子あたりのエネルギーは150MeV）の場合は厚さ3mmのシンチレーター（面積100cm<sup>2</sup>）を、炭素イオン（核子あたりのエネルギーは290MeV）の場合は厚さ0.2mmのシンチレーター（面積100cm<sup>2</sup>）をそれぞれ用いた。細胞照射面でのイオン種のLETは、前もって行ったイオンビームの線量-深度分布から、ヘリウムイオンが2.27keV/μm、炭素イオンが13.3keV/μmと計算されたことから、1mGy相当の照射に必要なイオン数（面積100cm<sup>2</sup>のシンチレーションカウンターに対して）は、ヘリウムイオンで $2.75 \times 10^7$ 、炭素イオンでは $4.70 \times 10^6$ とそれぞれ算出した。これらの数のイオンを7-8時間掛けて照射するように加速器本体でイオン強度調整を行い、照射途中必要に応じて強度調整を行いながら、細胞照射と同時に進んでいるモニター計数が前述の値に到達した段階でイオンビームを落とすことによって目的とする線量の照射を実行した。

#### 3-2 中性子線低線量率（1mGy/7-8h）照射システム

中性子線成分の低線量率照射は、放射線医学総合研究所病院附属中性子線源室に設置されている<sup>241</sup>Am-Be線源を用いて行った。線源からの距離によって、1mSv/8hとなる様な線量測定点を求めた。この線源より放出される中性子線のエネルギー（最大エネルギー11.5MeV、平均エネルギー5.0MeV）に対する線質係数を10と仮定したときの吸収線量Gy換算での1mGy/8hの照射距離を計算し、二種類の照射点を設定した。各照射点での線量測定の結果、ガンマ線のコンタミは、1mSv/8hとなる点で総線量に対して12.5%、1mGy/8hとなる点で10.8%であった。

#### 3-3 細胞致死効果

<sup>137</sup>Cs ガンマ線、中性子線（1mSv、1mGy）、ヘリウムイオン、炭素イオンそれぞれ低線量/低密度前照射

した後X線を急性照射（1.5Gy）したときの細胞致死効果は、X線急性照射単独で1.5Gy照射した時の細胞生存率に比べて、細胞集団のX線致死感受性に有意な差は現れなかった。

#### 3-4 突然変異誘発効果

突然変異誘発効果は、ガンマ線低線量前処理をした場合は、X線急性照射単独の場合と比べて変化はなかったが、ヘリウムイオン低密度照射前処理を行った場合は対照群に比べて1.9倍、炭素イオン低密度照射前処理の場合は4.0倍高頻度に突然変異誘発が増強されることが判った。しかしながら、中性子線低線量率前処理では誘発頻度は非照射コントロールと同等で全く誘発されず、逆にX線照射単独で誘発突然変異が抑制される結果を得た。

以上の得られた実験結果から、粒子放射線の低密度照射前処理によって、それに引き続くX線急性照射に対する突然変異誘発の増強効果は、ヘリウムイオンと炭素イオンが同等の効果をもたらすことが明らかになった。しかし突然変異誘発頻度そのものは、ヘリウムイオンよりも炭素イオンの方が約2倍高頻度に増強されるという事実から、X線誘発突然変異に観察された粒子放射線低密度照射の増強効果には、粒子線の核種またはエネルギー（LET）依存性が存在することが示唆される。一方、中性子線低線量（率）前処理を受けた細胞集団については、それに引き続くX線照射に対する突然変異誘発を抑制するような、一般的に言われておりような適応応答が細胞集団に誘導されている事が示唆され、電磁波放射線、中性子線、イオンビーム、それぞれの低線量率/低密度照射が及ぼす細胞応答に放射線の線質が強く依存する可能性を推測することが出来る。

今回の低密度前照射に利用したヘリウムイオンおよび炭素イオンの細胞への直接ヒット個数は以下のように推定することが出来る。ここで使用したヒト皮膚由来正常細胞は、培養フラスコ内できれいにcontact inhibitionのかかる細胞で、フラスコ内で単層に一面を覆うような状態で照射されていると考えられる。この細胞の細胞核の断面積は、172μm<sup>2</sup>と測定され(1)、細胞核と細胞質の割合から細胞の断面積は344μm<sup>2</sup>程度であると推定される。この情報を基にイオンビームの細胞へのヒットがポアソン分布に従うものとして、ヘリウム、炭素それぞれのイオンの1mGy相当の約7時間の照射が細胞に直接ヒットする確率を計算すると、

ヘリウムイオン：61%

炭素イオン：15%

となる。これらの数値からヘリウムで約40%、炭素で約85%の細胞がイオンビームの直接ヒットを受けない非照射の状態が存在していることが推測するこ

とが出来る。このような状態の細胞集団がその後のX線照射によって高い突然変異誘発を示す理由は、

- イオンビームの直接ヒットを受けた細胞のX線誘発突然変異頻度が非常に高く、非照射細胞に現れる通常のX線誘発頻度との重みを掛けた算術平均で細胞集団全体の誘発頻度が高くなる。
- イオンビームの直接ヒットを受けた細胞の周囲に存在する非照射細胞（バイスタンダー細胞）へ何らかのメカニズムによって照射細胞と同様の高突然変異を現す状態に陥り、細胞集団全体として平均して高いX線誘発突然変異を示す（バイスタンダー効果）。
- 照射後行う突然変異の発現期間内の数回の細胞分裂を経て、前述のバイスタンダー効果によって照射細胞が受けた放射線損傷の記憶が、周囲のバイスタンダー細胞に浸透し高い突然変異誘発を現すような不安定な状態を発現し、結果として高いX線誘発突然変異を示す（genomic instability）。

などが考えられる。この研究で用いている細胞照射法では、細胞同士が contact inhibition によって密に接触している状態であり、このうち2)と3)に係わるバイスタンダー効果のメカニズムのうち gap junction を介した細胞間情報伝達が重要なカギを握っているものと考えられることから、細胞間情報伝達機構を介したバイスタンダー効果の関与を確かめるために、gap junction の特異的阻害剤である  $\gamma$ -isomer of hexachloro-cyclohexane (Lindane) を併用する実験を行った。現段階で得られている実験結果は、ヘリウムイオンあるいは炭素イオン低密度前処理中に Lindane を併用することで、X線誘発突然変異頻度が対照群と同レベルまで押さえられることを明確に示すものであった。以上の実験結果から以下の事柄が結論出来る。

- 1) 宇宙放射線の中に含まれる粒子放射線成分のうち重荷粒子がたとえ低密度で人体に照射されたとしても、細胞間の情報伝達機構によるバイスタンダー効果によって、直接粒子線のヒットを受けていない細胞にも同様の放射線照射効果が現れ、それ以後の体内・外からのストレスに対して細胞集団全体として遺伝的に不安定な状態に陥る。
- 2) この効果は、照射される粒子放射線の核種あるいはエネルギー(LET)に依存する。
- 3) 粒子放射線であっても、非電離放射線である中性子線では、重荷電粒子の場合とは正対な細胞応答(適応応答)を誘導する可能性がある。
- 4) 宇宙空間での放射線被曝は、上記の粒子放射線に加えて電磁波放射線を含めた様々な種類の放射線の混合放射線の被曝環境であり、それぞれの放射線の生物応答が相互に作用したときに最終的にどのような効果として現れるのかを明らかにすることが今後重要な課題である。

重荷電粒子放射線に関しても、宇宙空間で比較的高い存在率を示す鉄イオンなどの実験データはほとんど無く、粒子放射線に対する生物応答の核種・エネルギー依存性を明らかにする研究は端緒を開いた状況に過ぎないが、この研究をさらに進めることによって、宇宙空間で被曝する恐れのある放射線場において、引き起こされる放射線生物影響のメカニズムに礎をおいてその影響を防護するための方策、たとえば防護薬剤の開発、に結びつく可能性があると考えられる。

#### 4. 参考文献

- (1) M. Suzuki *et al.*, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 48, 241-250, 2000.