

ヒト培養細胞における TK 変異体の LOH パターン変化の検出

谷田貝文夫

LOH Analysis for TK mutants in Human Cultured Cell

By

Fumio YATAGAI

Abstract: For estimating the genetic effects of space environmental radiation in this research project, we plan to preserve the human cultured cells as frozen status for a long period in International Space Station (ISS), and further incubate and re-freeze in need during such stay. The preparation experiments on the ground can be classified into two types. One of them is to establish the methodologies how to prepare the cell sample, for example, freezing before the flight mission, incubation and re-freezing in ISS. Another is to develop the sensitive mutation-detection system, which is effective for low-dose and low-dose-rate space environmental radiation. Here, we would like to introduce our current progresses in the above experiments, using human lymphoblastoid TK 6 cell and the loss of heterozygosity (LOH) analysis system.

Keywords: ISS, Space Environmental Radiation, TK 6 cell, LOH

概 要

本研究では、宇宙放射線の遺伝的影響を検出するために、ヒト培養細胞を凍結状態で長期間、国際宇宙ステーションに滞在させるとともに、その期間中に細胞を培養し、再凍結することを計画している。その地上準備研究は大別すると、2つに分けられる。ひとつは、細胞の凍結、解凍、培養、再凍結の一連の過程を、実際に国際宇宙ステーションで行える実験系として確立することである。もうひとつは、実際の宇宙空間で予測される低線量かつ低線量率放射線被ばくによる健康影響の推測に有効な遺伝的影響検出系を確立し、模擬実験系で実証していくことである。このような意図のもとに準備研究を進めたところ、ヒトリンパ芽球細胞 TK 6 を用いた LOH (Loss of Heterozygosity : ヘテロ接合性の喪失) 解析システムが、期待通りに有効であることを示唆する実験結果が得られたので、このことを報告する。

はじめに

宇宙空間においては、これまで人類が体験したこともない低線量・低線量率の宇宙環境放射線による被ばくの危険性が考えられる。宇宙環境放射線の直接的な照射効果による染色体 DNA 損傷はもとより、生体の代謝の過程でも起こる自然発生的内在性の DNA 損傷などによって、果たして、宇宙環境下ではどのような遺伝的影響が生ずるのであろうか。宇宙船内およびその周辺での船外における宇宙飛行士の活動を考慮すると、低重力による影響も併せて考慮する必要がある。すなわち、低線量の宇宙放射線だけでなく、微小重力など宇宙環境関連因子なども含めて、細胞レベルでの刺激応答を解析し、その後の遺伝的影響を高感度に検出することは重要な問題といえる。このような問題の解明、とりわけ、遺伝的影響の高感度検出を成し遂げるため、ヒト培養細胞で遺伝解析のできる LOH 変異解析システム (Loss of Heterozygosity : ヘテロ接合性の喪失)

を利用した、国際宇宙ステーションでの実験研究計画を提案した。国際宇宙ステーションなどの軌道上での実験を行うと、地上での模擬微小重力下では得られない、より正確な遺伝的影響に関する情報が得られ、長期間の宇宙滞在による宇宙飛行士などへの健康影響を推測する上で有用であると考え、このような提案に至った。まさに、人類が宇宙環境を今後も積極的にしかも安全に利用していく上で、欠かせない研究テーマと考えている。

宇宙環境下で実験を実施するにあたって、細胞を凍結した状態で保存・運搬し、さらに、ステーション内で培養・再凍結するための一連の手法を確立することが急務であると考え、地上での準備実験を行っている。いっぽう、ヒト培養細胞を利用して地上でも可能な「低線量・低線量率放射線照射条件下」で実験を行い、ここで提案している LOH 解析システムの有効性を実証するための実験も精力的に進めている。

2. 成果の概要

2.1. 国際宇宙ステーション実験のための細胞試料調整法の確立

2.1.1. 材料および方法

細胞	: ヒトリンパ芽球細胞 TK6
培養液組成	: RPMI 1640, 10%馬血清, 1%ペニシリン/ストレプトマイシン, 200 μg/ml ビルビン酸ナトリウム
培養条件	: 37°C, 5%炭酸ガス
培養容器	: 通常はフラスコ (T 25, T 75), 宇宙用は簡易型と専用バッグ (図1参照)
PE 測定	: Plating Efficiency (PE) の測定は Limiting Dilution 法 (1.6 cells/well : 96 wells dish)
変異誘発率測定	: TFT (4 ug/ml) 耐性 (4×10^4 cells/well, 詳細は次章)

2.1.2. 結果

1) 宇宙搭載用バッグ利用によるテスト実験

培養液凍結: -80°C フリーザーを利用

培養部分: 培地 9.75 ml に細胞培養液 (0.25 ml) 封入のための穴を開けておく

DMSO 部分: 培地 10 ml (DMSO 20%)

細胞の凍結: 凍結細胞 (0.25 ml, 2×10^6 /ml 相当) 注入後, BiCell 容器を利用して -80°C 凍結保存)

細胞の解凍: 温度上昇データは JAMSS から別途に報告

サンプル A: 解凍はプログラムフリーザーで約 5 時間

サンプル B: 解凍はプログラムフリーザーで約 2.5 時間

サンプル C: 37°C ホットバスに 5 分浸すことによる解凍

解凍後培養: バッグのまま培養するものを主とし, 一部を T 25 フラスコで培養して細胞濃度変化 (増殖) の経時間変化を測定 (詳細は JAMSS より別途報告) (結果 1)

再凍結: プログラムフリーザーによる培養した細胞の再凍結 (最終的には -80°C 保存)

再培養: 温浴 (上記 C の方法) による速やかな解凍後, 遠心による培地交換を行ってから再培養 (結果 2)

PE 測定と変異誘発測定: 上記再凍結直後と 3 ヶ月保存後に通常の 96 穴マイクロプレートによる測定 (結果 3)

結果 1 はじめの解凍後培養の細胞増殖は, 図 2 に示したように, プログラムフリーザーを用いる (方法 A, B) と, 温



図1 宇宙実験のための細胞調整 (簡易型と専用バッグ)

浴解凍（方法C）の場合よりも開始時点ですでに低濃度になるだけでなく、その後の増殖割合も遅くなる傾向がある。ただし、方法Aと方法Bの違いは明確ではない。また、バッグを用いたことによる影響と思われる立ち上がりまでの遅延は3つの方法に共通してみられる。

結果2 最初の凍結後解凍の場合と同様に、2度目の凍結後培養でも通常の継代培養に比べて増殖は遅れる傾向を示したが、最初の解凍方法の違いによる影響や長期の保存による影響は考えにくいものと推察された。

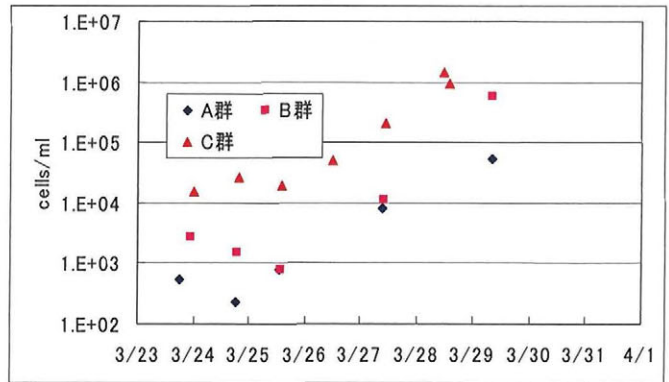


図2 解凍後の細胞数の増加

表1 再培養による細胞の増殖

直後（4日間培養）				約3ヵ月後（5日間培養）			
サンプル	開始濃度 X10(4)	増殖割合	増殖割合 (平均値)	サンプル	開始濃度 X10(4)	増殖割合	増殖割合 (平均値)
A-1	6.1	7.7	4.6	A-4	3.0	6.7	16
A-2	6.0	2.3					
A-3	7.2	3.9					
B-1	6.6	14	13	B-5	2.3	70	61
B-2	6.6	11					
B-3	7.2	13					
C-1	1.9	11	19	C-4	4.7	13	16
C-2	1.9	17					
C-3	2.9	28					

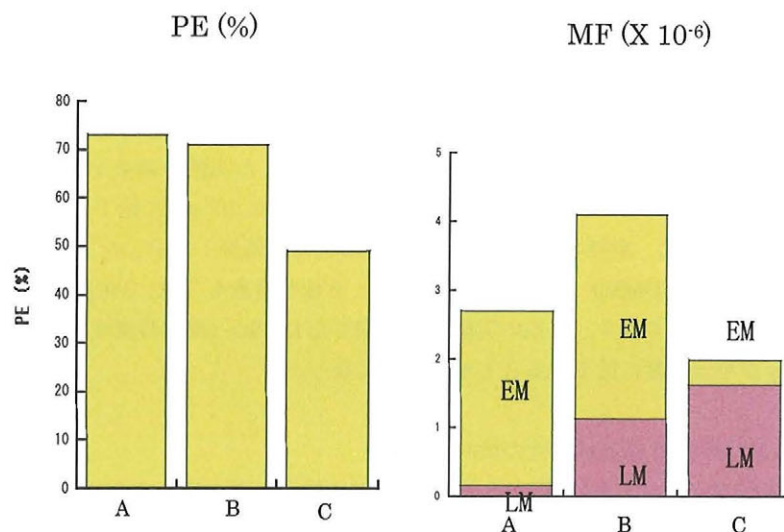


図3 再凍結直後に、再培養した細胞のPEと変異誘発（EM：早期誘発，LM：晚期誘発）

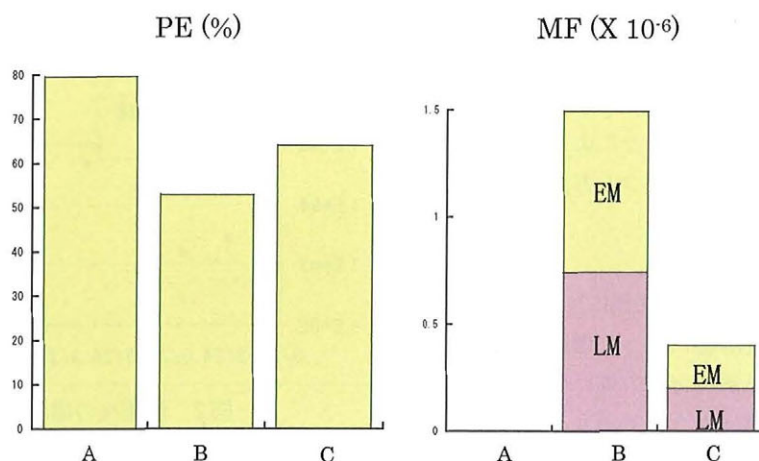


図4 再凍結して3ヶ月保存後に、再培養した細胞のPEと変異誘発 (EM：早期誘発, LM：晚期誘発)

表2 凍結時のDMSO濃度などによる cell viability への影響を調べるための実験条件

サン プル	細胞液量 (ml)	DMSO 入培地 (ml)	DMSO 終濃度 (%)	細胞終濃度 (X10 ⁵ /ml)
A-1,2	6	6 (20%)	10	5
B-1,2	6	6 (10%)	5	5
C-1,2	6	2 (40%)	10	7.5
D-1,2	6	2 (20%)	5	7.5
E-1,2	6.3	0.9 (40%)	5	8.75

結果3 サンプル数が少ないために統計的ばらつきが大きいですが、平均のPEと変異誘発率をまとめると、図3, 4のようになり、2度目の凍結後に再培養した細胞も、増殖後は通常培養の場合と同程度の値を示し、3ヶ月保存によるPEの低下や変異の増加などといった悪影響もあらわれないことがわかった。

2) 細胞凍結に用いるDMSOの濃度についての検討

細胞を凍結する際のDMSO濃度及び細胞培養液との混合割合(細胞濃度)について、それぞれの最適条件を探すために、15mlのファルコンチューブによる以下のような予備実験を行った。実際にステーションでの培養後に到達が予測される細胞濃度が 1×10^6 /mlであることを考慮に入れて、表2の各種条件で行った実験の結果が表3にまとめてある。その結果、DMSO濃度5%と10%で殆ど差のないこと、また、細胞濃度が半分の 5×10^5 /mlに低下しても細胞のViabilityに影響のないことが明らかになった。さらに、実際のステーションでの細胞培養は図1に示したようなバッグを利用するため、細胞培養にかかる1週間くらいの間、DMSO(凍結時濃度の2倍)を含む培地も37°Cで保温することになる。その影響を調べた実験結果が表4に示してある。やはり、上述の実験で氷冷却したDMSO(凍結時濃度の2倍)を含む培地を用いた場合に比べて、細胞のViabilityが半分程度に低下することが明らかになった。

3) バッグに封じ込める凍結細胞のDMSO濃度の検討

上述の予備実験で、細胞凍結時のDMSO濃度が5%でも10%の場合と殆ど変わらない細胞viabilityを示したことから、細胞の準備、凍結、培養、再凍結、及びPE測定は1)などについては、1)と同様の条件にして、以下のようなテスト実験を行った(表5参照)。ただし、プログラムフリーザーによる解凍は5時間をかける条件だけを採用した。表5の解凍条件で通常とあるのは37°Cの5分温浴で、これも以前の解凍条件Cと同じである。

表3 凍結時のDMSO濃度などによる cell viability への影響

サン プル	増殖の割合 [A]			PE 値 [B]			[A] X [B]		
	1回目	2回目	平均	1回目	2回目	平均	1回目	2回目	平均
A	4.0	5.7	4.9	0.79	0.98	0.89	3.2	5.6	4.4
B	3.3	8.2	5.8	1.08	0.79	0.94	3.6	6.5	5.6
C	5.8	6.7	6.3	0.73	0.82	0.78	4.2	5.5	4.9
D	3.1	7.2	5.2	1.05	0.63	0.84	3.3	4.5	4.2
E	4.6	7.5	6.1	0.96	0.60	0.78	4.4	4.5	4.5

表4 DMSO長期高温保持効果：細胞培養中（37°C炭酸ガスインキュベータ）で1週間保持

サン プル	増殖の割合 [A]			PE 値 [B]			[A] X [B]		
	1回目	2回目	平均	1回目	2回目	平均	1回目	2回目	平均
A	7.1	5.3	6.2	0.55	0.44	0.50	3.9	2.3	3.1
B	4.5	5.6	5.1	0.41	0.34	0.43	1.8	1.9	1.9
C	6.4	4.9	5.7	0.43	0.33	0.38	2.8	1.6	2.2
D	5.5	5.3	5.4	0.37	0.38	0.38	2.0	2.0	2.0
E	6.3	5.2	5.8	0.42	0.32	0.37	2.6	1.7	2.2

表5 バッグに封じ込めの凍結細胞のDMSO濃度による影響

実験 群	DMSO 濃度 (%)		解凍条件	培養バッグ内 細胞数計測	培養バッグ数
	凍結時	解凍後			
A	10	0.25	CBEF 相 当	0、2、4、7日 目	12（細胞数計測日に3ずつ使 用）
B	10	0.25	通常	0日目	3
C	5	0.125	CBEF 相 当	0、2、4、7日 目	12（細胞数計測日に3ずつ使 用）
D	5	0.125	通常	0日目	3

これらの実験結果に関する詳細報告は、別途に行うため、ここでは以下に簡潔にまとめる。

- ① 解凍時の細胞濃度低下（植え込みからの推測に比べて）は、1) の実験の場合と同程度であった。
- ② 解凍後培養の始めの2日くらいは殆ど細胞増殖がみられないことも、1) と同様であった。
- ③ 培養して7日くらいで細胞濃度が 1×10^6 /ml に到達し、PE が40% くらいを示したことも、やはり、1) の場合と同様であった。
- ④ DMSO 濃度10%の方が5%の場合に比べて、僅かではあるが、ばらつきが少なく、Cell Viability も高い傾向を示した。

4) DMSOに代わる凍結剤を利用する可能性の検討

ここでは、実験方法の細胞調整のところで述べた、簡易型容器（図1）、15 ml ファルコンチューブを用いての予備実験結果を述べる。

- ① 細胞濃度を終濃度で 2.0×10^6 /ml（DMSO 10%）とし1 ml/セラム tube で凍結（Bicellに入れて-80°Cで3 hr 保存後に-80°Cフリーザーへ；B-D 群
- ② 上記濃度の細胞、250 μ l けん濁液を9.75 ml の凍結培地（15 ml ファルコンチューブのホールに封入して①と同様なステップで-80°Cで保存；A-D 群

③ 上記①, ②の操作と同様：相違点はDMSOの代わりにCellvationにけん濁し,室温20分放置後,断熱剤で覆って-80°C2時間放置後,-80°Cで保存：それぞれ,A-C群(ファルコンチューブ)とB-C群(セラム)とする。

セラムチューブで細胞を凍結する条件(通常の実験室での細胞保存)ではCellvationでもDMSOでも解凍2日後には通常の生育を示し(表6),Cell viabilityやバックグラウンドの変異誘発率にも大きな差がでないことがわかった(データ省略)。いっぽう,宇宙バッグと同一条件下(凍結細胞と細胞培養液)で行ったファルコンチューブでの実験結果は,Cellvationの場合は,4日間で到達する細胞濃度が平均で $1.2 \times 10^6/\text{ml}$ で,DMSOの場合の6日間での平均細胞濃度 $1.3 \times 10^6/\text{ml}$ に比べてかなり早い増殖を示した(表6)。また,生育した細胞のCell viabilityやバックグラウンドの変異誘発率にも大きな差がでないことがわかった(表7)。

2.2. 低線量,低線量率放射線の遺伝的影響の検出：LOH解析

2.2.1. 材料および方法

細胞,培養液組成,培養条件,培養容器などは前項の2.1実験と全く同様であり,ここでは省略する。以下にチミジンキナーゼ(TK)変異細胞の選択とその遺伝解析(LOH解析)を述べる。図5には凍結細胞に対して10cGyという低線量の炭素イオンを照射したあとのTK変異誘発を調べる手法の概略を,図6には,低線量率 γ 線照射と適応応答実験での照射の概略を示してある。なお,図6での照射後の手法は,図5と全く同じなので省略した。

2.2.2. 結果

1) 凍結細胞を用いた変異の検出

低線量放射線の遺伝的影響を検討する系として,ヒトリンパ芽球細胞TK6細胞を利用した,チミジンキナーゼ(TK)遺伝子のヘテロ接合性の喪失(LOH)を指標とする高感度検出システムの有効性を主張してきた[1, 2]。重イオンなどを含む宇宙放射線によって生じたDNA2本鎖切断(DSB)が原因となって引き起こす可能性のあるLOH誘発を鋭敏に検出できる可能性を,加速炭素イオン線などによる地上の照射実験ですでに証明した[3]。ここでは,炭素イオンによる照射実験に狙いを絞って,国際宇宙ステーションでの実験を想定して,凍結した細胞に低線量(10cGy)を照射した。このようなCell Viabilityには影響を与えない低線量領域でも,浮遊状態での通常照射の場合と同様に,変異を高感度に検出することが可能で,しかも,照射後に細胞を凍結した状態でおおよそ1ヶ月冷凍保存(-80°C)した後にアッセイしても,直後のアッセイと同程度の感度を示すことが明らかになった[4]。浮遊状態の照射ではバックグラウンドの3倍くらいに変異が上昇したが,このような凍結細胞では2倍程度の上昇であることから,検出感度は浮遊細胞に比べると,ある程度は低下する。

表6 細胞増殖(B群は2日培養後,A-C群は4日培養後,A-D群は6日培養後に測定)

細胞群	細胞濃度 ($10^6/\text{ml}$)	細胞群	細胞濃度 ($10^6/\text{ml}$)
B-C-1	1.3	B-D-1	2.0
B-C-2	1.4	B-D-2	2.1
B-C-3	1.2	B-D-3	2.0
A-C-1	1.2	A-D-1	1.1
A-C-2	1.2	A-D-2	1.3
A-C-3	1.2	A-D-3	1.4

表7 増殖した細胞のPEと変異誘発率(EM,は早期誘発変異で96well中の生育well数)

細胞群	PE (%)	EM ($\times 10^{-6}$)	細胞群	PE (%)	EM ($\times 10^{-6}$)
A-C-1	63/96, 57/96	3/96, 0/96	A-D-1	61/96, 56/96	0/96, 2/96
A-C-2	61/96, 60/96	1/96, 1/96	A-D-2	68/96, 57/96	4/96, 4/96
A-C-3	54/96,	1/96, 1/96	A-D-3	65/96, 50/96	0/96, 0/96
Average	59/96 (60%)	1.2/96 (0.52)	Average	58 (58%)	1.7/96 (0.77)

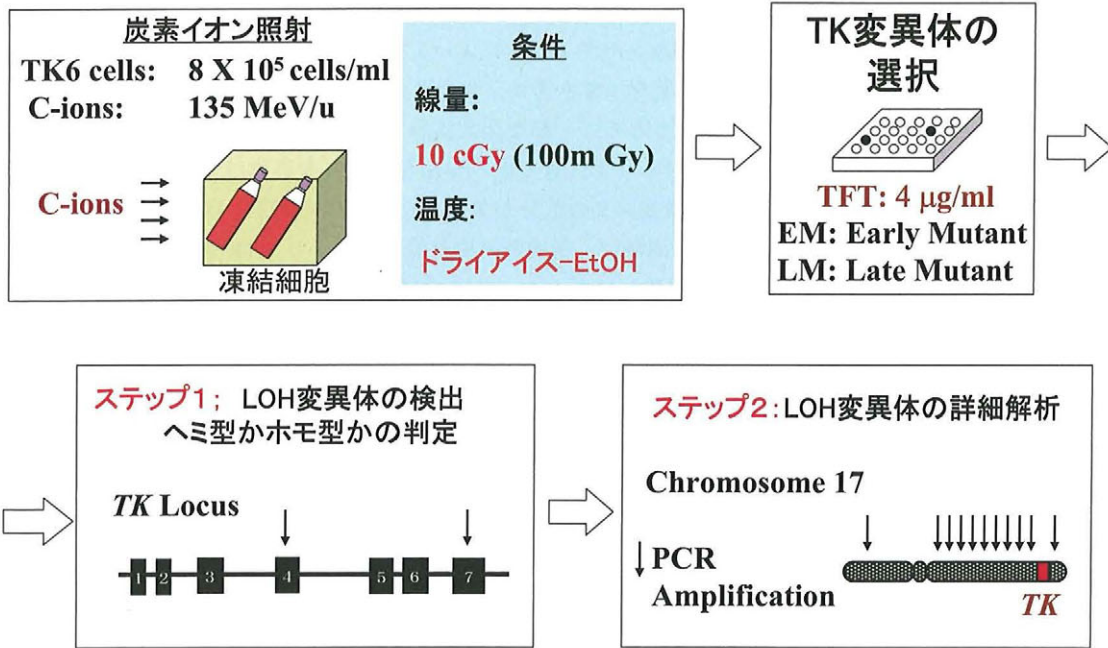


図5 凍結細胞に対する低線量放射線照射の実験手法の概略 (TK 変異の選択とその LOH 解析)



図6 低線量γ線照射と適応応答実験でのX線照射の概略

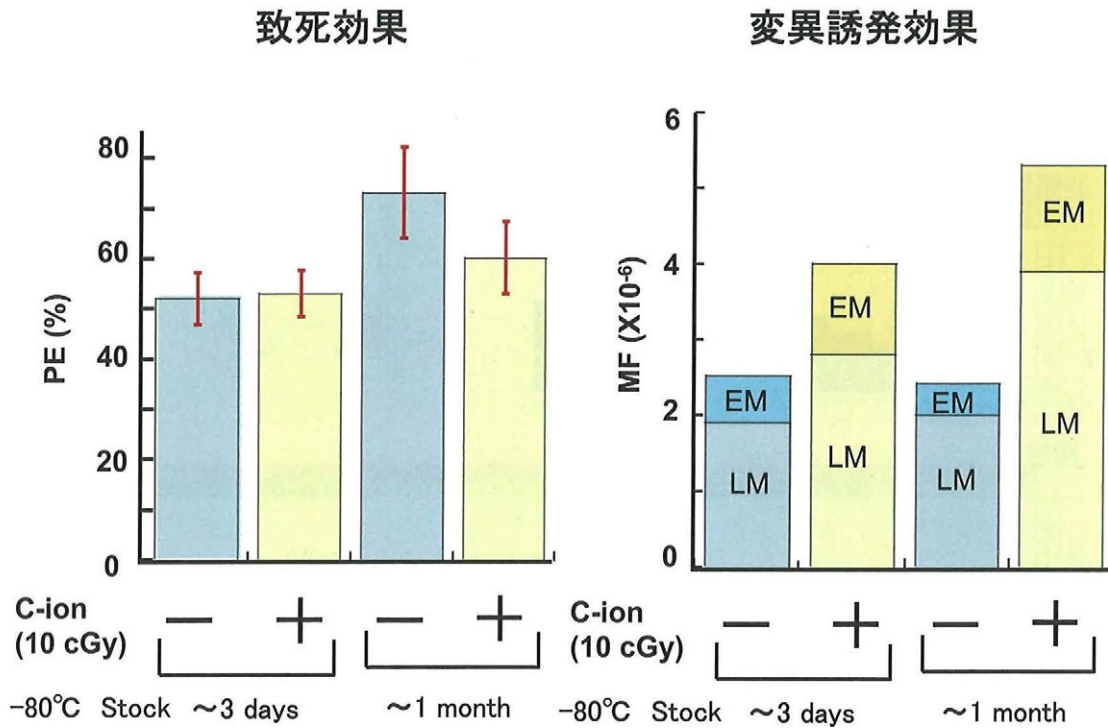


図7 凍結細胞の10 cGy炭素イオン線照射による致死効果と変異誘発

次に図5に概略を示した手法に従って、選択したTK変異細胞から染色体DNAを抽出し、染色体DNAの特定領域の蛍光標識プライマーによるPCRを行い、その産物をDNAシーケンサーによって解析した。TK遺伝子座内のエクソン4とエクソン7領域のPCR増幅の結果から突然変異がLOH型を示すか否か、またそのLOHがホモ型かヘミ型かを判定した。LOHの拡がりを染色体マッピングで調べた解析結果も加えて、一部を図8に示した。ここで白抜きになっている変異体は非LOH型（塩基置換などの点突然変異が主と考えられる）で、青で塗りつぶしてある変異体は青の部分が相同組換えを起こした変異体で、ピンクで塗りつぶしてある変異体はピンクの部分が欠失した変異体である。図8からわかるように、このような凍結細胞の系でも浮遊状態で照射した場合と同様に、低線量の放射線照射により、TK遺伝子座領域を含む広域欠損型のヘミ型LOH（タイプ2）が誘発されることが明らかになった。このLOH解析結果も、上述したように、1ヶ月冷凍保存後も直後の解析とほとんど変わらない傾向を支持している。なお、TK遺伝子座領域を含む限定領域欠損型のヘミ型LOHが、凍結を伴わない浮遊状態の細胞でのアッセイの場合よりも高頻度に誘発されるが、放射線の照射効果をマスクすることはない。これらの結果から、浮遊状態の通常の照射の場合と同様に高感度で、放射線によると考えられるLOHの誘発を検出することに成功したものと結論付けられる[4]。実際のステーションでの実験でも変異を検出できる可能性を強く示唆している。

2) 低線量率 γ 線照射による変異誘発効果

低線量かつ低線量率放射線被ばくによる染色体異常などの遺伝的影響を究明することは、地上のみならず宇宙環境下でもヒトへの健康影響を推測する上で極めて重要と考えられる。ここでは、上述した、放射線影響を高感度に検出できるヒトリンパ芽球細胞LOH（Loss of Heterozygosity：ヘテロ接合性の喪失）解析システムを利用することにした。TK6細胞に放射線医学総合研究所の低線量率 γ 線照射装置により、30 mGy（1.2 mGy/hr）を照射する（図6）と、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子座における変異のうち早期に誘発されるもの（EM）は、非照射の場合に比べて、およそ1.9倍高い誘発頻度（ $p=0.058$ ）を示した（図9）。ここでは得られたデータの一部を紹介しているが、現在までのところ得られたEMのうち、LOHを示すものは γ 線照射の場合に限って観察され、その殆どがTK遺伝子座近傍の限定領域欠損型のヘミ型LOH（タイプ2）であった。一方、遅延型のTK変異体（LM）の誘発頻度は非照射の30%程度増加したが、こちらは統計的有意差（ $p=0.55$ ）は認められなかった（図9）。また、照射、非照射にかかわらず得られたLMはほとんどがLOHを示し、その染色体上での欠失範囲や分布も同様なものであった。 γ 線照射の場合に観察されたヘミ型LOHは、照射によって起こるDNA二重鎖切断が直接関与して、あるいは、間接的にDNA損傷修復系、シグナル伝達系、チェックポイント応答系などが関わって、非相同末端結合を介して誘発されたものかについては今後の詳細検討を必要とする。なお、これらの実験結果については現在、論文投稿の準備を進めている[5]。

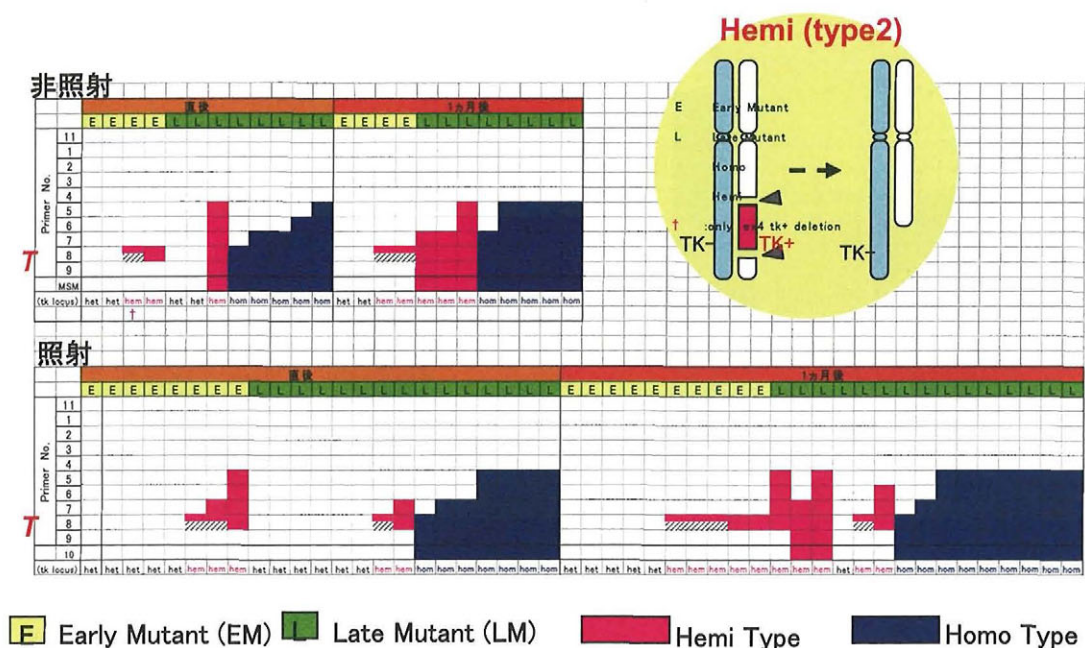


図8 凍結細胞の10 cGy炭素イオン線照射により選択したTK変異体のLOH解析

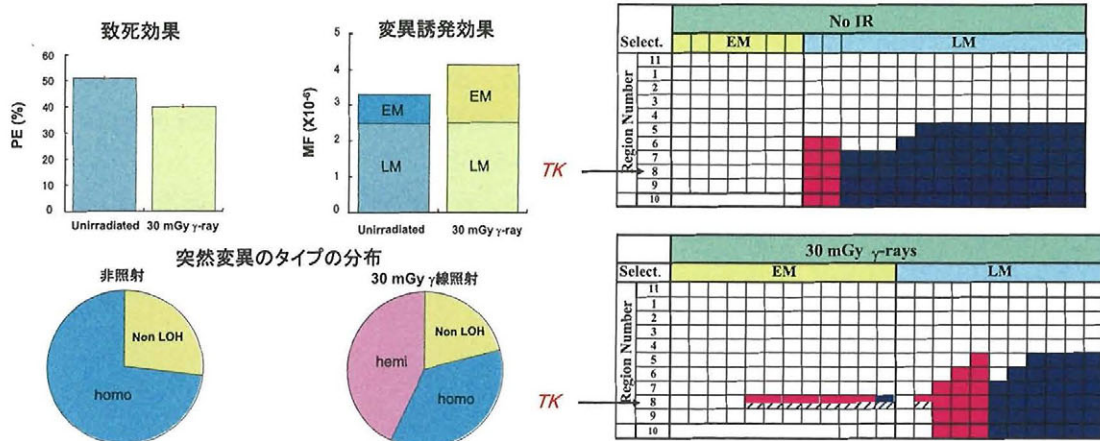


図9 低線量率 γ 線照射によるTK変異の誘発とLOH解析

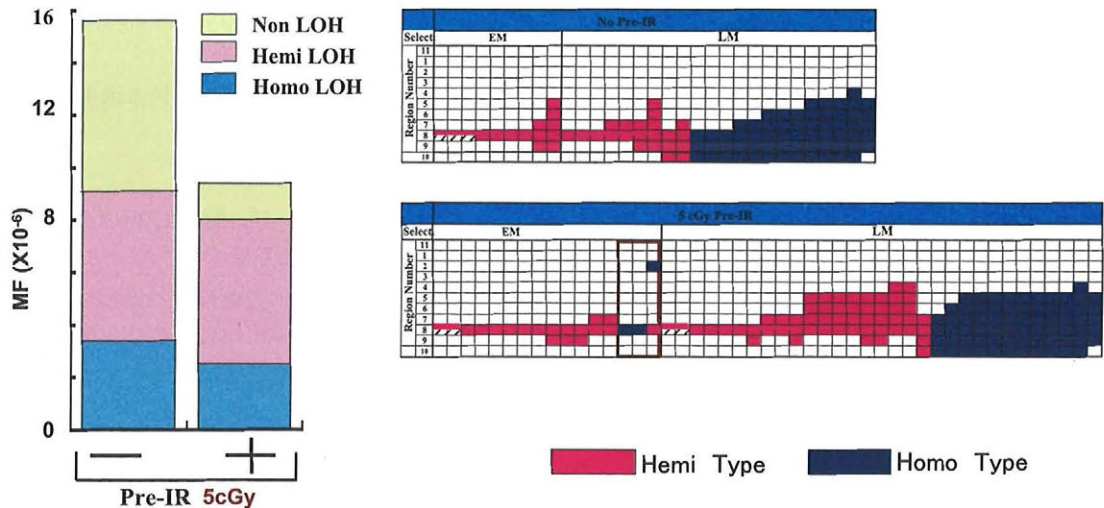


図10 線照射を利用した適応応答によるTK変異の誘発とLOH解析

ここでは、実験施設の制約上、 γ 線を利用しているが、宇宙放射線の重要成分である重イオン放射線を利用して同様の結果が得られるか否かについても興味もたれる。

3) 適応応答による変異誘発の抑制

このTK6細胞LOH検出系を利用して、低線量放射線の影響を適応応答効果として染色体レベルで検出できるか否か、すなわち、適応応答の有無、さらに、有る場合はその最適条件を明らかにするための研究を原子力基盤クロスオーバーの一環として行っている。また、この研究は、宇宙放射線の遺伝的影響を検討するための地上実験研究としても進めている。まず始めに、予め低線量X線照射が本格的なX線照射によるTK変異誘発に及ぼす影響を調べている。予め低線量を2.5, 5, 10 cGyと変え、本格的照射の線量は2 Gyに固定し、予備照射と本格照射のインターバルも1.5, 3, 6, 9, 12 hrと変えてTK変異体の誘発率を測定した。実験データは省略するが、変異誘発率の低下には6時間前の5 cGyあるいは10 cGy予備的低線量照射が最適条件と考えられたので、予備低線量照射を本照射の6時間前に設定して、5 cGy予備照射の場合について詳細に実験を進めた。その結果、予備照射をしないときのTK変異誘発を半分程度まで抑制することが明らかになった(図10)[6]。

このような適応応答検出の最適と考えられる条件で選択した、TK変異細胞から染色体DNAを抽出し、やはり、同様の手法で遺伝解析結果した結果、上述の予備照射による変異誘発の抑制が非LOH型変異の誘発抑制で説明がつくという結果を示した。なお、これらの変異細胞からのcDNA作成の結果、ここでの非LOH型変異の大部分あるいは全てが点突然変異

と考えるとよいことが明らかになった[6]。現在、DNA塩基配列レベルでシーケンスを決定している。当初は、他の関連実験報告などから、適応応答はLOH型のタイプやその染色体上での拡がり分布などにも影響を及ぼすものと予想していたが、全く覆す結果となった(図10)。また、極めて低頻度で観測された、DNA相同組換えを介して発生したと考えられる、染色体の局所的な組み換え変異体(ホモ型LOH)(図10)は、上述の低線量率 γ 線照射後にも観測されており(図9)、このようなタイプのLOH発生についても注目して、今後の研究を進めることにしている。

これらの実験結果から、細胞の宇宙空間(ISS)での長期滞在による放射線被ばくを、適応応答のトリガー(予備照射)と考えると、地上に細胞を回収してから本格的刺激(電離放射線照射や細胞内の染色体部位特異的切断の導入などの処理)による変異誘発の特異性を調べるといった実験が、遺伝的影響を調べる上で有効であることが強く示唆された。

3. ま と め

1) 細胞バッグを利用したステーション内での培養に向けての準備

- ① 培養前の解凍操作によるViableな細胞の濃度低下はあまり問題にしなくてもよい。
- ② 培養によって十分に細胞濃度を高めることが大切で、Cellvationを利用して低濃度から増殖させることがより適切であると考えられるので、現在バッグを用いてこの可能性を追求するための実験を行っている。ここでのポイントは、地上準備実験としては不可能な低重力下での細胞培養(1週間くらい)も併せて計画しており、このような低重力の影響を見る上でも、低濃度からの増殖が望ましい。
- ③ 実験結果のところでは省略したが、バッグから回収した細胞でもLOH解析まで進められ、通常培養あるいはセラムチューブで凍結した細胞の解凍後と同様に解析ができることをすでに確認している。

2) 変異誘発検出に関する実験

- ① 凍結細胞の地上予備実験で、 2×10^6 細胞を含むセラムチューブ10本を解析すれば、特定LOH(タイプ2型のヘミ型で欠失範囲の大きいもの)として検出できることがわかった。この種の実験は細胞を宇宙ステーション内で培養しないため、DMSO入り培地が不要なため、現在の準備段階では20mlのバッグの使用が可能と思われる。単純計算では、ステーションで解凍しないサンプルを細胞濃度 2×10^6 /mlで20mlのバッグに準備すれば1個で賄えることが推測される。従って、5個を準備する現在の計画では、宇宙放射線の線量が10cGyに到達しなくても、変異誘発の検出が可能と見込める。また、この種のバッグをさらに5個準備すれば、その分を適応応答アッセイに利用することも可能なので、こちらの計画も推進したい。
- ② 現在、限られた条件下でしかも γ 線を利用して低線量率照射実験を行っているだけであるが、実際の宇宙ステーション内での細胞培養中での宇宙放射線照射による影響をLOH誘発(例えば、 γ 線照射の場合と同様な領域限定型のLOH)として検出できる可能性は十分にある。地上実験でも、宇宙放射線をできる限り模倣できるような、重イオンや中性子線を含む混合放射線を照射できる環境を実現させ、上記の特定LOHの検出を試みることは意義深いと考えている。

成 果 発 表

論文発表

- [1] Yatagai, F. "Mutation Induced by Heavy Charged Particles", *Biol. Sci. Space.*, 18, 224-234 (2005).
- [2] Ando, K., Koike, S., Oohira, C., Ogiu, T., and Yatagai, F., "Tumor induction in mice locally irradiated with carbon ions: A retrospective analysis", *J. Radiat. Res.*, 46, 185-190 (2005).
- [3] Mehnati, P., Morimoto, S., Yatagai, F., Furusawa, Y., Kobayashi, Y., Wada, S., Kanai, T., Hanaoka, F., Sasaki, H., "Exploration of 'over kill effect' of high-LET Ar- and Fe-ions by evaluating the fraction of non-hit cell and interphase death", *J. Radiat. Res.*, 46, 343-350 (2005).
- [4] Umabayashi, Y., Honma, M., Abe, T., Ryuto, H., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., and Yatagai, F., "Mutation induction after low-dose carbon ion beam irradiation", accepted by *Biol. Sc. Space* (2006).
- [5] Suzuki, M., Tsuruoka, C., Kanai, T., Kato, T., Yatagai, F., and Watanabe, M., "Cellular and molecular effects for mutation induction in normal human cells irradiated with accelerated neon ions". *Mutat., Res.*, 594, 86-92 (2006).

口頭発表

- [1] Masumura, K., Hoshino, M., Yatagai, F., Ochiai, M., Nakagama, H., and Nohmi, T. Non-homologous End-joining in X-ray-irradiated Scid/Gpt Delta Transgenic Mouse”, The 9 th International Conference on Environmental Mutagens & 36 th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society, Sep., 2005, San-Francisco, USA.
- [2] 谷田貝文夫, 梅林志浩, 本間正充, 鈴木雅雄, 石岡憲昭, 嶋津 徹, 岩木正哉, “低線量・低線量率放射線による LOH 誘発”, 日本宇宙生物学会, 第 19 回大会, 2005 年 9 月, 東京
- [3] 梅林志浩, 本間正充, 阿部知子, 岩木正哉, 谷田貝文夫, “凍結ヒト培養細胞の低線量炭素イオン照射による変異誘発”, 日本宇宙生物学会, 第 19 回大会, 2005 年 9 月, 東京.
- [4] 谷田貝文夫, 梅林志浩, 本間正充, 岩木正哉, “適応応答の LOH 解析による検出は可能か?”, 日本放射線影響学会第 48 回大会/第 1 回アジア放射線研究会議, 2005 年 11 月, 広島.
- [5] 梅林志浩, 本間正充, 鈴木雅雄, 岩木正哉, 谷田貝文夫, “低線量率 γ 線照射による変異誘発の検出: ヒト培養細胞での LOH 解析”, 日本放射線影響学会第 48 回大会/第 1 回アジア放射線研究会議, 2005 年 11 月, 広島.
- [6] 谷田貝文夫, 梅林志浩, 石岡憲昭, 菅澤 薫, 花岡文雄, 嶋津 徹, 鈴木ひろみ, 岩木正哉. “宇宙環境放射線影響を検出するために適応応答は利用できるか?”, 第 22 回宇宙利用シンポジウム, 2006 年, 1 月, 東京.
- [7] 谷田貝文夫, “重イオン線は凍結細胞でも変異誘発の高感度検出を可能にする”, 理研シンポジウム「重イオンビーム育種の現状・将来」, 2006 年, 1 月, 和光.

参 考 文 献

- [1] Yatagai, F., Morimoto, S., Kato, T. and Honma, M. Further characterization of loss of heterozygosity enhanced by p53 abrogation in human lymphoblastoid TK 6 cells: disappearance of endpoint hotspots. *Mutat.Res.*, 560, 133-145 (2004).
- [2] Morimoto, S., Kato, T., Honma, M., Hayashi, M., Hanaoka, F., and Yatagai, F.: Detection of genetic alterations induced by low-dose X-rays; analysis of loss of heterozygosity for TK mutation in human lymphoblastoid cells., *Radiat. Res.*, 157, 533-538 (2002).
- [3] Morimoto, S., Honma, M., and Yatagai, F.: Sensitive detection of LOH events in a human cell line after C-ion beam exposure, *J. Radiat. Res.*, 43 Suppl., 163 (2002).
- [4] Umebayashi, Y., Honma, M., Abe, T., Ryuto, H., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., and Yatagai, F.: Mutation induction after low-dose carbon ion beam irradiation, accepted by *Biol. Sc. Space* (2006).
- [5] Umebayashi, Y., Honma, M., Suzuki, M., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., and Yatagai, F.: Mutation induction after low-dose and low-dose rate gamma-ray irradiation of human cultured cells: Detection by LOH Analysis, in preparation (2006).
- [6] Umebayashi, Y., Sugasawa, K., Honma, M., Suzuki, M., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., Hanaoka, F., and Yatagai, F.: Adaptive response after low-dose X-ray pre-irradiation of human cultured cells: Detection by LOH Analysis, in preparation (2006).