

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12318

研究課題名（和文）新規高感度検出系を用いた低濃度トリチウム水が誘発する突然変異の線量率依存性の解明

研究課題名（英文）Analysis of mutation induction by low concentration tritiated water

研究代表者

田内 広（Tsuchi, Hiroshi）

茨城大学・理工学研究科（理学野）・教授

研究者番号：70216597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、低線量率トリチウム水被ばくによる体細胞突然変異について、低線量・低線量率による変異の量的・質的变化を明らかにすることを目的とした。代表者が樹立した体細胞突然変異の高感度検出系を元に、低バックグラウンドかつ高感度の新規細胞実験系の樹立を目指すとともに、低濃度トリチウムによる突然変異の詳細な解析実験に取り組んだ。新たな細胞系樹立は完了していないが、複数の候補クローンが得られており、最適なクローンの選抜を進めている。低線量率（低濃度）トリチウム水曝露による突然変異の量的・質的な変化については、詳細な変異体解析を完了し、その成果を査読付き国際学術誌に投稿して論文公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低濃度トリチウム水曝露による確率的影響の解析実験例については、実験可能な施設が限られていることや、取扱いのノウハウを継承している研究室が非常に少ないことから、データがほとんど無いのが現状である。研究代表者はトリチウム実験ノウハウを有する数少ない研究者のひとりであり、本課題の実施によって、低レベルトリチウムによる遺伝子突然変異の原因が、放射線そのものというよりも自然発生事象の増幅である可能性を示した。本課題の成果は、まだまだ未解明な点が多い低線量率放射線の生体影響について、単なる頻度ではなく質的な観点から区分できる可能性を示し、放射線被ばく影響に関する新たな考え方につながる成果である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the research is clarifying the quantitative and qualitative changes in somatic mutations induced by low-dose-rate tritiated water exposure. First, we tried to improve the hyper-sensitive system for somatic mutation induction, which was established by introducing a human X-chromosome to HPRT-deficient hamster cells, by using genome editing technique. In parallel with the cell system improvement, we performed a detailed analysis of mutants that were induced by low-level tritiated water (HTO). Although the cell system improvement is still in progress, multiple candidate clones were obtained. Analysis of HTO-induced mutation was completed, and the work has been published in a peer-reviewed international journal.

研究分野：放射線生物学

キーワード：トリチウム 突然変異 低線量率

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私たちの身体を構成する細胞には、常に多くの DNA 損傷が発生しており、これらが自然発症のがんや遺伝子変化にも関わっている。特に、低線量放射線被ばくの確率的影響(発がんや遺伝子突然変異)の議論では、自然発症頻度にばらつきがあるために、100 mGy(一般には 100 mSv)以下の被ばくによって影響が見られるのかどうかは明確にはなっていない。もちろん、どんなに低線量であっても放射線が遺伝子 DNA に損傷を与えることは間違いない。例えば、放射線が誘発する主要な DNA 損傷である DNA 二重鎖切断(DSB)の検出指標として、リン酸化ヒストン H2X(γ-H2AX)や 53BP1 といった修復タンパク質によるフォーカス(核内でのタンパク質集合体)形成が多用されている。これらタンパク質のフォーカス形成を調べると、数 mGy レベルの被ばくでも DSB の増加が検出できる。しかし、DSB などが生じても、実際に生体への確率的影響につながる可能性は遙かに低く抑えられている。その主要因として、

我々の細胞には複数の DSB 修復機構が備わっており、放射線被ばくで生じた DSB の大半は修復されること、頻度は低いものの、細胞内には生理的あるいは放射線以外の要因による自然誘発 DSB も生成されており、低線量被ばくによる DSB の増加が影響の「上乗せ」として現れるとは限らないこと、生体にはアポトーシスをはじめとした異常細胞を排除する仕組みも備わっており、たとえ DNA 損傷の修復不全が起きたとしても、それらが細胞や組織の異常につながるとは限らないこと、等があげられる。

本研究で着目しているトリチウム水(HTO)は、福島第一原発事故で生じた汚染水に含まれ、普通の水(H<sub>2</sub>O)との分離が困難なことから、その処分が大きな社会的課題となり注目を集めている。一方で、トリチウムは自然界にも一定量が存在しており、全てが人工由来というわけではない。トリチウム水の生物影響については、かつて全国的な大型研究プロジェクトにより、高濃度の場合の生体影響を X 線やガンマ線と比較する研究が進められ、生物学的効果比(X 線やガンマ線を基準に、同じ影響を与える線量の比)が 1.1 から 1.7 程度であることが明らかとなっているが、当該プロジェクトが終了した 1990 年代半ばを境にほとんど研究されなくなり、特に低濃度(低線量)曝露の影響を調べた実験データは未だにわずかにとどまるのが現状である。

さて、微量の変異原物質の生体影響を調べるため、ここ十数年あまりの間に行われた実験システム改良研究により、放射線の確率的影響を高感度で検出するいくつかの系が提唱されている。しかしながら、100 mGy を下回る線量でも有効な解析ができる実験系はない。代表者らは、変異原物質によって誘発される突然変異頻度を増幅することで高感度を実現した独自の体細胞突然変異高感度検出系を樹立し、低線量 X 線によって引き起こされる突然変異を解析して、従来よりも低い 150 mGy レベルでも突然変異頻度の有意な上昇を見出せることを示した。本課題は、いまだにデータが不足している低線量、低線量率被ばくの確率的影響にせまるものである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、代表者らが活用している突然変異の高感度検出系細胞をさらに改良すること、および低濃度トリチウム水による突然変異を解析することである。

放射線の主要な標的は DNA であるが、トリチウム水の生物影響は、単なる放射線(低エネルギーベータ線)による DNA 損傷にとどまらず、トリチウム水自身の崩壊や水の電離で生じるラジカルも含めた複合的な作用と考えられる。特に、低線量率(低濃度)では時間あたりの DSB が相当少なくなるため、活性酸素等による DNA の化学修飾による自然発生型変異とベータ線による DSB 型変異のどちらが主体となっているのかは不明である。そこで本研究では、我々が樹立した突然変異の高感度検出系を活用して、低線量率トリチウム水被ばくで生じる変異頻度と変異の質の両方を解析し、低濃度トリチウム水の生体影響の本質を明らかにすることを目指す。特に、1 日 10 mGy 以下の低線量率長期被ばくの過程で生じる体細胞突然変異に着目し、X 線などの照射による高線量被ばくと質的・量的に同じなのかどうかを DSB 修復機構と組み合わせることを目的とした。

代表者らは、誘発突然変異頻度を増幅することで高感度を実現した独自の体細胞突然変異高感度検出系を樹立している。この高感度検出系は、生存に非必須で突然変異の指標遺伝子として利用される *HPRT1*(ヒポキサンチン・グアニン・ホスホトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子)を標的としている。具体的には、*HPRT* の機能不全変異を持つハムスター細胞にヒト X 染色体を導入し、突然変異の標的遺伝子をハムスター細胞が元々持っているハムスター *Hprt1* 遺伝子からヒト X 染色体上に存在するヒト *HPRT1* 遺伝子に変更した細胞系である。標的遺伝子を外来染色体の遺伝子とすることで、細胞の生死と突然変異の誘発を切り離し、従来では死に至っていた大きな欠失なども生存細胞として検出可能にした。実際、この操作により、従来の実験系よりも 50~100 倍の高感度で放射線誘発突然変異が起こることが確認できている。本課題の実施以前に、低線量 X 線による突然変異を解析し、150 mGy レベルでも突然変異頻度の有意な上昇を見出すことを確認でき、さらには DSB に由来する「放射線誘発型変異」と化学修飾や遺伝的不安定性が原因となる「自然発生型変異」を区別できる可能性を見出し、放射線型変異の頻度には明確な線量依存性があることを明らかにしている。

一方で、現在使用している高感度検出系ではバックグラウンドとなる自然誘発突然変異の頻度が従来系よりも 5 倍程度高いという課題があり、そのために 100 mGy 未満の線量では統計的に有意な突然変異の上昇が認められない。100 mGy 未満では有意差がないという事実が解析系の限界によるものなのか、自然事象の本質なのかを解明したいと考えた。そこで本研究では、現在の実験系にゲノム編集に

よりさらなる改良を加え、突然変異の質的な識別力を高めることを目指す。新たな改良系が樹立できれば、トリチウム水で誘発される突然変異について、低線量率での突然変異誘発頻度と質的な変化を解析することも予定した。以上のように、実験系の改良と詳細な分子レベル解析を組み合わせることで、低線量率トリチウム水被ばくによる遺伝子突然変異の誘発機構を解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

本課題では、低線量率トリチウム水被ばくによる確率的影響の代表として体細胞突然変異を指標とし、線量および線量率が突然変異に対して量的・質的な変化を与えるのかどうかを明らかにすることを目的としている。そのため、これまで代表者が樹立して活用してきた体細胞突然変異の高感度検出系を元にして、さらに低バックグラウンドかつ高感度の新規細胞実験系を樹立するとともに、低濃度トリチウム水の生体影響を明らかにする解析実験に取り組むことを計画し、以下の2つの項目について研究を実施した。

(1)すでに樹立している高感度細胞系をゲノム編集により改良し、より高感度な新規の突然変異検出系を樹立して、さらに低い線量および線量率での解析を可能とする。

この研究では、これまで使用してきた高感度検出系の細胞に対してゲノム編集を行い、できるだけ多くのクローンを手にいれる。それらのクローンの中から、自然突然変異がこれまでよりも遥かに低く、なおかつ変異原物質によって突然変異が高頻度で誘発されるクローンを選抜するというアプローチで取り組んだ。

(2)既存の高感度検出系を活用した低濃度トリチウム水の生体影響解析では、1日10mGy以下の線量率での被ばくによって誘発される確率的影響について、高い線量率の場合と比較して質的・量的な違いがあるかどうかを解析した。

この研究では、突然変異の高感度検出系であるGM06318-10細胞株に、総線量0.2Gyで4.9mGy/dayから192mGy/dayの線量率でトリチウム水(HT0)からのベータ線照射処理を行った。放射線照射は、コンフレント(G0/G1期)の細胞にトリチウム水を添加した培地を投与し、線量率に応じて1日から40日間培養することで実施した。なお、培養期間が5日以上になる濃度では、4日ないし5日ごとにトリチウム水を含む培地を交換して細胞を維持した。線量が0.2Gyに到達したら、細胞をトリチウム水を含まない新鮮培地で5回以上、うち1~2回は30分以上のインキュベーションを経て洗浄することでトリチウム水を除去した。その後、トリチウム水を含まない通常の培地で9日間継代培養して突然変異を固定させた後に、HPRT欠損変異体の選択薬剤である6-チオグアニンを含む培地を用いてHPRT欠損突然変異体を選抜しながらコロニー形成させた。コロニーが視認できるまで培養したら一部の6-チオグアニン耐性クローンを分離した、残りのシャーレは固定染色してトリチウム水処理により誘発された突然変異の頻度を調べた。分離した突然変異体クローンからはゲノムDNAを抽出し、導入されているヒトX染色体の存在状況をPCRで調べることにより、突然変異体の変異パターンを解析した。

### 4. 研究成果

それぞれの項目についての研究成果は以下の通りである。

(1)ゲノム編集による高感度検出系の改良

既存の高感度検出系細胞の改良については、課題終了時点で最終的な細胞系の確立は完了していないが、樹立の目的は立ってきている。令和元年度、令和2年度の研究では、ゲノム編集酵素と組換えコンストラクトによるアプローチで取り組んだが、ゲノム変換効率が非常に低く、有効なクローンが得られなかった。得られた千近いクローンを解析したが、うまく編集できていないものが大半で、編集できたと思われるクローンは1クローンのみであった。なお、このクローンについて、突然変異頻度の解析をおこなったがバックグラウンド頻度の低下は認められなかった。当初2年の取り組みで見出された問題点を踏まえ、令和3年度には新たなゲノム編集アプローチ(Obligare法)に変更し、既存の高感度検出系細胞の改良に取り組んだ。その結果、当初の2年間を上回る組換え細胞クローンが得られ、複数のクローンでゲノム編集ができていることが確認できた。これらの候補クローンについては、引き続きバックグラウンドの突然変異頻度とX線による突然変異頻度を調べ、最適なクローンの選抜を進めている。

(2)既存の実験系を用いた低濃度トリチウム水曝露の影響解析

低濃度トリチウム水曝露による遺伝子突然変異の量的・質的な変化については、令和元年度から、頻度解析と合わせてヒトX染色体の解析マーカーをさらに増やした解析を続けて実施した。その結果、以下のような事実が明らかとなった。

トリチウム水誘発突然変異の頻度は、11.0mGy/day以下の線量率と21.8mGy/day以上の線量率の間で大きく変化し、11.0mGy/day以下の線量率では、突然変異頻度が自然発生突然変異頻度にかかなり近い値にまで低下した(図1)。また、突然変異体の変異スペクトル解析として、変異体におけるヒトX染色体の残存範囲を解析した結果、21.8mGy/day以上の線量率では1つ以上のDSBに起因する「放射線誘発型」が顕著に見られたのに対し、11.0mGy/day以下の線量率ではヒトX染色体の脱落に起因する「自然発生型」が大幅に増加し、非照射コントロールとの差が見られなくなった(図2)。これらの結果から、トリチウム水被ばくにおい

では、11mGy/day と 21mGy/day の間に突然変異誘発イベントの質的な転換点が存在し、11mGy/day を下回る線量率では自然発生型のイベントによって突然変異が起きていることが強く示唆された。この成果は論文にまとめて投稿し、査読付き国際学術誌に掲載された（論文2）。

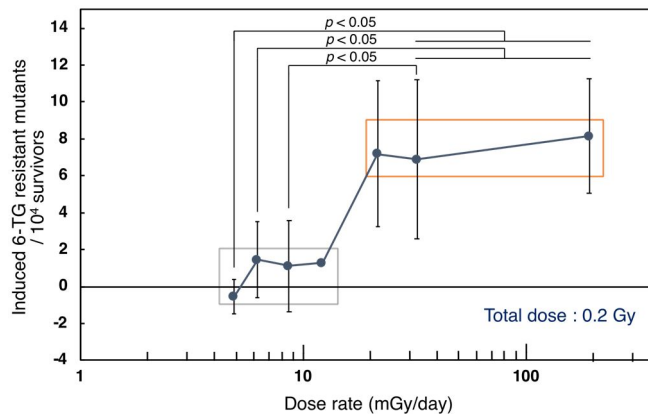


図1 トリチウム水に誘発された体細胞突然変異の線量率依存性（論文2より引用）

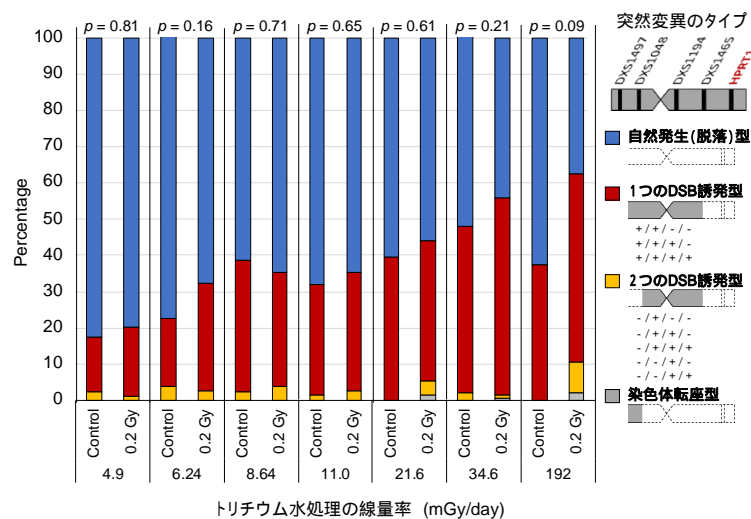


図2 トリチウム水で誘発された突然変異体における変異スペクトル解析結果（論文2より引用して改変）

### (3) その他の成果

前述したトリチウム水の影響に関する2つの研究に加えて、突然変異の誘発に大きく関わるDNA損傷修復に関する解析も行った。具体的には、DNA損傷修復のうち、精度の高い修復であるとされる相同組換え修復について、これまで十分解明がされていなかった細胞周期依存性に関する解析を行い、従来は修復が行われないと考えられてきた細胞分裂期においても組換え型の修復が起きていることを証明した。この成果も国際学術誌に公表している（論文1）。また、トリチウムの生体影響に関する背景や基本的事項を広く世界に発信するために、国内のトリチウム生体影響研究者と共に英語総説を執筆し、同じく国際学術誌に発表した（論文3）。さらに、本課題以前には低線量域についてのみ解析を実施していたX線による突然変異誘発について、線量範囲を高線量域にまで広げた実験と突然変異体解析を行い、当初に提唱した「放射線型の突然変異（1つ以上のDSBによる突然変異）」が、高線量域でより明確になることを示した。この成果は令和3年度に開催された国際会議の招待講演において発表するとともに、発表に関連する内容を国際学術誌に論文を投稿し、本課題終了時まで論文掲載決定の通知が届いている（論文4）。

成果の引用論文（いずれも査読有り、corresponding author に下線）

1. Sakamoto, Y., Kokuta, T., Teshigahara, A., Iijima, K., Kitao, H., Takata, M., Tauchi, H., Mitotic cells can repair DNA double strand breaks via a homology-directed

pathway. *Journal of Radiation Research* 62, 25-33, 2021. DOI: 10.1093/jrr/rraa095

2. Nagashima, H., Hayashi, Y., Sakamoto, Y., Komatsu, K., Tauchi, H.: Induction of somatic mutations by low concentrations of tritiated water (HTO): evidence for the possible existence of a dose-rate threshold. *Journal of Radiation Research*, 62, 582-589, 2021. DOI: 10.1093/jrr/rrab022
3. Matsumoto, H., Shimada, Y., Nakamura, A.J., Usami, N., Ojima, M., Kakinuma, S., Shimada, M., Sunaoshi, M., Hirayama, R., Tauchi, H.: Health Effects Triggered by Tritium: How do we get public understanding based on scientifically supported evidence? *Journal of Radiation Research*, 62, 557-563, 2021. DOI: 10.1093/jrr/rrab029
4. Nagashima, H., Hayashi, Y., Tanimoto, S., Tauchi, H.: Dose and dose-rate dependence of DSB-type mutants induced by X-rays or tritium beta-rays: An approach using a hyper-sensitive system. *Radiation Protection Dosimetry*, in press. 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakamoto Yuki, Kokuta Tetsuya, Teshigahara Ai, Iijima Kenta, Kitao Hiroyuki, Takata Minoru, Tauchi Hiroshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Mitotic cells can repair DNA double-strand breaks via a homology-directed pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 25 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rraa095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagashima, H., Hayashi, Y., Sakamoto, Y., Komatsu, K., Tauchi, H	4. 巻 62
2. 論文標題 Induction of somatic mutations by low concentrations of tritiated water (HTO): evidence for the possible existence of a dose-rate threshold.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 582-589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrab022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto, H., Shimada, Y., Nakamura, A.J., Usami, N., Ojima, M., Kakinuma, S., Shimada, M., Sunaoshi, M., Hirayama, R., Tauchi, H.	4. 巻 62
2. 論文標題 Health Effects Triggered by Tritium: How do we get public understanding based on scientifically supported evidence?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 557-563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrab02	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 長島明輝、林雄樹、細江一稀、白石久美子、大川沙織、小松賢志、立花 章、田内 広
2. 発表標題 低濃度トリチウム水による体細胞突然変異体の変異スペクトル解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長島 明輝、林 雄樹、細江一稀、白石久美子、大川沙織、小松賢志、立花 章、田内 広
2. 発表標題 高感度検出系を用いたトリチウム水による体細胞突然変異体の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長島明輝、林 雄樹、谷本早紀、白石久美子、小松賢志、田内 広
2. 発表標題 ヒト染色体移入ハムスター細胞を用いた放射線誘発体細胞突然変異の線量・線量率依存性解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会（茨城、Web）ワークショップ「放射線分子シグネチャーから探るトラック構造」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagashima H., Hayashi Y., Tanimoto S., Shiraishi K., Sakamoto Y., Tauchi H.
2. 発表標題 Analysis of Dose and Dose-rate dependence of Radiation-Type mutation induced by tritiated water: An approach using a hyper-sensitive cell system.
3. 学会等名 IES International Symposium on “Environmental Dynamics of Radionuclides and Biological Effects of Low Dose-Rate Radiation” （招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagashima H., Hayashi Y., Tanimoto S., Shiraishi K., Sakamoto Y., Tauchi H
2. 発表標題 Dose and Dose-rate dependence of radiation-induced mutation: An approach using a hyper-sensitive cell system.
3. 学会等名 The 6th International Symposium of the Network-type Joint Usage/ Research Center for Radiation Disaster Medical Science（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

田内研究室  
<http://tauchi lab.sci.ibaraki.ac.jp>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------