

A-4 紫外線の増加が人の健康に及ぼす影響に関する疫学的視点を中心とした研究

(5) 人の紫外線曝露に対する遺伝的感受性決定要因の解明に関する実験的研究

① 紫外線のDNA傷害作用を修飾する要因の解明に関する実験的研究

研究代表者

国立環境研究所環境健康部

青木康展

環境庁国立環境研究所

環境健康部

部長

遠山千春

生体機構研究室

藤巻秀和

病態機構研究室

青木康展

(委託先)

京都大学医学部

野田 亮

紫外線の健康リスク評価を行うに当たり、実験的に波長-作用相関性(アクションスペクトル)を求めることは重要である。これまで、哺乳動物細胞のゲノムDNA上で紫外線により発生する遺伝的変異のアクションスペクトルは明らかにされてこなかった。本研究では、HSV-tk遺伝子を導入したラット線維芽細胞を用いて、UV-AおよびUV-Bの作用によりHSV-tk遺伝子上に発生した変異のアクションスペクトルを求めた。その結果、320 nmよりも長波長の領域においては、紫外線の細胞障害性と変異原性ともにそのスペクトルは、DNAの紫外線吸収スペクトルよりも相対的に高い値を示した。300 nmと320 nmの紫外線照射によるHSV-tk遺伝子の変異を比較した結果、(1) ccダイマーあるいはcオリゴマーが両波長の主な標的である、(2) 比較的大きな欠損は300 nmで照射量に依存して増加している、(3) タンデムな二重変異は両波長で照射量に依存して増加していたが、多様な変異のクラスターは320 nmで増加している事が明らかとなった。このことは、UV-B領域よりも長波長側で発生する変異は、紫外線照射の直接的な作用によるものばかりではなく、活性酸素種的作用など間接的な作用によっても引き起こされることを示唆している。また、これまで紫外線照射による変異は比較的高線量率の条件下で調べられてきている。そこで実際の人への照射条件を想定し、比較的低線量の照射条件下での300 nm及び320 nm UVBが示す変異原性を検討した。その結果、低線量率/長時間の照射の方が、高線量率/短時間の照射よりも変異原性が高いという結果を得た。また、300 nmの紫外線照射の際には低線量率の場合に、小さい変異の発生頻度が高くなっていた。これらの結果は、弱い紫外線に長時間当たる方が、強い紫外線に短時間当たるよりも変異を発生する可能性が高い事を示唆している。

培養細胞を用いた実験と並んで、動物個体に発生する変異を定量的に測定する事もリスク評価には必要である。UVBが魚の胚発生に与える影響を調べ、さらに変異原性を調べるためのモニター遺伝子を遺伝子導入した魚の胚を用いて動物個体のゲノムDNA上で発生する変異の検出を進めた。

[キーワード] HSV-tk遺伝子、変異原性、線量率、形態形成異常、アクションスペクトル

(UVBの変異原性・線量率効果と変異原性に関する研究)

1. はじめに

紫外線のうちでB波領域（UV-B, 280–320 nm）の波長が、非メラノーマ皮膚がん形成と白内障の形成に深く関わっていることは今や明白である。環境汚染物質による成層圏オゾン層破壊はUVBの地表面への照射量増加を招き、そのため、この波長域の人間（生体）への健康影響について詳細に研究することが重要になってきた。

我々は最近、培養哺乳動物細胞での紫外線などの影響による突然変異とゲノム不安定性を研究するため、レトロウィルスを導入した新しい細胞株（LTK15/CREF）を開発した¹⁾。このレトロウィルスは、以下の2つの選択マーカーをもつ。第1がポジティブ選択のマーカーneo遺伝子であり、第2がacyclovir(ACV)のような抗ヘルペス薬でネガティブ選択を行うためのherpes simplex（単純疱疹）thymidine kinase遺伝子（HSV-tk）である。1細胞当たり1コピーのプロウィルスが組み込まれた細胞集団が確立されると、HSV-tkコーディング領域内の小突然変異がACV/G418二重耐性コロニーとして検出され、染色体消失を含む大きな欠損がACV耐性、G418感受性コロニーとして検出される。本研究ではまずLTK15/CREF細胞を用いて、300–320nmの紫外線により特異的に引き起こされる細胞毒性と突然変異誘発性を調べた²⁾。さらに紫外線の健康リスクアセスメントに資するために、細胞毒性と突然変異誘発性について波長-作用関係（アクションスペクトル）をUVA領域をも含めて測定した。また、これまで紫外線による変異原性を調べる場合、線量率はほとんど考慮されてこなかった。紫外線照射の人への健康影響を考えると、実生活で受ける線量率の紫外線照射による変異の発生を明らかにする必要がある。そこで、同一照射線量の元で線量率を変えた場合の変異原性の変化を調べた。

2. 実験材料および方法

（1）細胞毒性、突然変異誘発性の定量

LTK15/CREFの樹立及び維持については文献¹⁾を参照。変異頻度は、以下のように算出した。但し幾つかの実験では、変異細胞の選択にはacyclovir（100 mM）に換えて、より活性の強いganciclovir（GCV, 20 mM）を用いた。

$$\frac{\text{100mmdish当たりの薬物耐性コロニーの平均値}}{\text{60mmdish当たりの生存コロニーの平均値}} \times 10^3$$

本法におけるバックグラウンドは、 3.5 ± 2.3 （平均値 $\pm$ SD, M=21）/ 10^5 cellsと算定され、全バックグラウンドコロニーはHSV-tk遺伝子の破壊による比較的大きな欠損に依るものであった。なお、ACV-G418選択コロニーを位相差顕微鏡下で計数する際には、固定せずステンレスシリンダーで分離した後、DNA解析に用いた。

（2）紫外線照射

標準殺菌用ランプGL-15（254 nm UVランプ、東芝）にアルミホイルを巻き、その中央部に穴をあけて（直径9.5 cm）用いた。この際、細胞には直接光が当たるようにし、一時的に培地を抜き、ディッシュのふたも外した。そしてすぐに保温した培地を加え培養した。ランプとディッシュの距離は60 cm、 450 mW/m^2 となるようにUVX放射計（ラジオメーター、Ultra-violet Products Inc, San Gabriel, CA, USA）を用いて測定し照射した。単波長照射（モノクロメーター、Biotronic Vilber Loumant, France）にはそれぞれのフィルター（Barr Assoc, Westford, MA, USA）をかけ、説明書の指示通りに、290、300、320 nmの単波長（波長幅10 nm）の紫外線が照射されるように行った。UVAの照射に際しては、中央波長350 nm（波長幅60 nm）のフィルターを用いた。また、こ

の際照射中はメデュームをPBS (2 ml/60 mmディッシュ、5 ml/100 mmディッシュ) に換え、ディッシュのふたをとって照射し、その後PBSを除き再び培地中で培養した。本稿におけるUV量はすべて上述の条件下における細胞に到達する紫外線の実際量である。また、照射は室温、暗室下で行った。

線量率効果は次のよう調べた。(1) 320 nm; 光源より三段階の距離に底面が来るようにシャーレを設置し、一定照射線量 (576 J/m^2) が達成されるまで照射を行った。この場合、照射時間は各々31、16.5、10分、線量率は310、580、960 mW/m^2 となった。また、最高線量率 (最短距離) において、2分間の照射を13分間隔で5回繰り返す、間歇的照射も試みた。(2) 300 nm; 線量率70 及び420 mW/m^2 の二段階 (所要時間は各々46分及び8分) で、あるいは1,500、3,000及び8,000 mW/m^2 の三段階 (所要時間は各々36分、18分及び7分) で200 J/m^2 まで照射した。GCV及びG418を含む培液の中で生じたコロニー (即ち微小変異体) については、PCR-direct sequencing法によるHSV-tk遺伝子の塩基配列解析²⁾を行った。

3. 結果

(1) UV-Bが引き起こす変異の性質

300、320 nmそれぞれの波長で発生した変異の結果を図1に示す。300 nmでは照射後大きな欠損の有意な増加が観察されたのに対し、320 nmではこのような傾向は観察されなかった。

ACV/G418二重耐性のクローンが小さな変異をおこしているかどうか、また、これらの変異の詳細な性質を調べるため、これらのコロニーのHSV-tk遺伝子の全コーディング領域の増幅し、その配列をPCRを用いたダイレクトシーケンス法により決定した。300及び320 nmに対する変異の結果をTable 1に示す。1つのディッシュから得られた複数のクローンから同じ変異が検出されたが (54のクローンとシーケンスした結果6つが同じ)、これは以下の解析では1つと数えた。

300 nmに関しては100 J/m^2 における5サンプル中の1つ、250 J/m^2 における5サンプル中の4つのHSV-tkコーディング領域の全長は増幅させることができなかった。neo遺伝子の全長が入っていることはPCRで確認したが、このことは、これらのクローンでは連結したneo遺伝子は正常であるが、HSV-tk遺伝子は比較的大きな欠損によって壊されていることが示唆する。また、この結果は300nmの照射では、比較的大きな欠損の頻度が高くなるという証拠にもなる。原因は明らかではないが両方の波長(300, 320 nm)に関して今までの報告に比べてタンデムな二重変異のおこる頻度が極めて高いことが示唆された。さらに、複合変異の頻度が300 nmより320 nmの方が高いという結果は興味深い。ここでの複合変異とはクラスターになった多様な置換 (クローンN0. 30, 33, 46)、または、置換やフレームシフトのようないくつかが明らかに重なっておこったと思われる場合 (クローンN0. 35) をいう。しかし、波長、変異のタイプに関わらず、標的となっている部位のほとんどは (47中43)、diまたはoligopyrimidine sequenceと関連がある。さらに、dicytidine配列の3'サイトが置換の最適のサイトであることがわかる。センス鎖 (コーディング)、アンチセンス鎖 (ノン・コーディング) 間でのばらつきは、全サイトから見て、それほど逸脱してはいないが、320 nmにおけるCTの配列については明らかにセンス鎖の方が多い。

(2) アクションスペクトル

本研究でに用いたUV光源の発光スペクトルを図2に示す。これらの光源および254 nm光源の示す細胞障害活性及び変異誘発活性を、LTK15/CREF細胞を用いて測定し、エネルギーを対数横軸と

してプロットした（図3）。予想どおり、ほとんどの波長において、短い波長の光ほど生物活性が強いという結果が得られているが、290nmでは例外的に、変異誘導活性がほとんど検出されなかった。我々の結果では、変異誘導活性を示す線の傾きが、長波長側で次第に緩やかになって来る傾向が見られる。その原因の一部として、用いた光源のエネルギーが弱いために、高い照射線量を得るためには、長時間（最長72分）にわたって照射する必要がある、この間に細胞の状態が変化してくること等も考えられる。また、350nmの光源の場合、波長の幅が大きい、様々な波長の光の効果が混合して現われている可能性も考えられる。これまでに得られたデータから、各波長において50%の生存率を与えるエネルギーを読み取り、これを元に細胞障害活性のアクションスペクトルを作成した（図4）。320nmより長波長側では、アクションスペクトルはDNAの吸収スペクトルから大きくずれ、曲線の肩が認められる。一方、正確な変異のアクションスペクトルを得る事は現時点では困難である。即ち、上で述べた、変異曲線の傾きの変化により、採用する変異率の値によって、エネルギー値が大きく変動してくるからである。今、仮に変異率 5×10^{-5} を採用すると（図2bの破線）、変異のアクションスペクトルは細胞障害活性のアクションスペクトルとほとんど重なった（図4）。この場合、DNAの吸収スペクトルからのずれが細胞障害の曲線よりもさらに大きくなっているように見える。しかし、より高い変異率を採用するならば、曲線の肩はより緩やかになるであろう。正確な値を得るためには、よりエネルギーの高い照射装置が必要である。

（3）線量率効果

i) 320 nmにおける線量率の効果

線量率の増大に伴って細胞障害活性が高まる傾向が見られたが（図5a）、一定生存細胞数当たりの変異体数に関しては、逆に減少する傾向が見られた（図5b, solid bar）。このため、始めに蒔いた細胞数当たりの変異率を算出すると、より大きな差が生ずることになる（図5c）。間歇的照射では、低線量率で長時間照射した場合に近い傾向が見られた（図5右端のbar）。興味深いことに、高線量率では、大型欠失が起こりにくいという結果が得られた（図5b, striped bar）。

ii) 300 nmにおける線量率の効果

320 nmと同様に、高い線量率で短時間照射した場合により強い細胞障害効果が見られることが分かった（図6a）。一方、生存細胞当たりの変異率に関しては、線量率の違いによる大きな影響は見られなかったが、興味深いことに、高い線量率で短時間照射した場合には大規模な変異の比率が高く、逆に低い線量率で長時間照射した場合には小規模な変異の比率が高いという結果が得られた（図6b）。これは、線量率の変化によってDNA損傷に質的な差異が生ずる事を示唆している。これら二つの値（即ち、生存率及び生存細胞一定数当たりの変異率）より、最初に照射した細胞一定数当たりの変異率を計算する事ができる。実際に生物の体表が照射される場面を考えると、このような変異率の求め方がより適当と考えられる。我々の結果は、この値が線量率によって大きく変動することを示している（図6c）。

4. 考察

哺乳動物細胞、または動物に紫外線を照射したこれまでの研究は、315 nmまでについて行ったものがほとんどである。我々は、細胞毒性和突然変異誘発率をおこす作用スペクトルをHSV-tk遺伝子により測定した。突然変異誘発率のスペクトルがDNA吸収スペクトルよりかけ離れている現象

はおそらくDNAの直接の光吸収とは別のメカニズムの存在を示唆するものであろう。我々は、300, 320 nmでのタンデムな二重変異が高く、これらの変異ではcytidine repeatが標的となる選択性が高いことから、これらの変異には酵素のフリーラジカルか、またはそれと関連した分子種が関与していると考えている。

タンデムな二重変異は、紫外線が誘導する変異の特徴であり、dipyrimidineの3'サイトのトランジション型一塩基置換もまた紫外線による変異ではよく見られる。本実験でも、diまたはoligopyrimidine配列に関連している標的サイトがほとんどであり、dicytidine配列の3'サイトが置換の最優先サイトとなっている。この結果は、(6-4)光反応生成物の関与を示している。この光反応生成物は多くの場合CC, TC配列で形成されており、3'塩基はこのコンフォメーションでは、正しく対合できなくなる。いくつかC→Tトランジション変異がみられたが(21中6列)、これはCpG配列と関連しており、(methyl-)cytosine脱アミノ化反応として説明できるかもしれない。

この共通して観察される変異に加えて、我々の系では300 nmで比較的大きな欠損が検出された。320 nmでは、複合変異の頻度が増加していた。このうちのいくつか (Table 1におけるN0, 30, 46)の場合については、バクテリアのerror-prone DNA合成に類似した機構によって説明できるかもしれない。他の例については、いくつかの独立か、または関連性のある現象が重なって起こったことによるのかもしれない。このような複合変異が長波長側の紫外線に特異的なものであるかどうかという問題が残っているが、この疑問が解決されることは非常に重要なことである。

従来、紫外線の生物活性を記述する際に線量率の違いを問題にしている例は稀である。今回の結果は、同じ照射量であっても、線量率によって、量的・質的に生物活性に大きな差が生ず得る事を示している。従って、特に異なる研究者による結果を比較する場合には、この点を考慮に入れる事が重要である。これまでの我々の実験は、低線量率/長時間の照射の方が、高線量率/短時間の照射よりも変異原性が高いという結果を与えている。例えば、300 nmの照射の実験から、弱いUVBによって長時間照射した場合には、強いUVBによって短時間照射した場合よりも細胞死が起きにくく、その結果、変異細胞の出現率が顕著に増大するという大変興味深い結果が得られた。これは、人間の日焼けや発がんを考える上で重要な知見と思われる。

また、今回の実験で低線量率群の線量率は、我が国における夏期日中における線量率にほぼ匹敵している。さらなる検討が必要である

5. まとめ

今回の実験で我々が確立した検出系が、紫外線による突然変異を検出する系として有用であることが確認された。これまでに、哺乳類の正常細胞を用いた検出系の検討はほとんど行われおらず、当細胞系は突然変異誘発性や発がん性、さらには紫外線のリスクアセスメントを行う上で有効であろう。

変異誘発の線量率効果を検討したところ、弱いUVBによって長時間照射した場合には、強いUVBによって短時間照射した場合よりも細胞死が起きにくく、その結果、変異細胞の出現率が顕著に増大するという大変興味深い結果が得られた。これは、人間の日焼けや発がんを考える上で重要な知見と思われる。

(UVBが胚発生に与える影響)

1. はじめに

UVBが動物個体レベルで引き起こす変異の定量はこれまでほとんど行われていない。これを行うに先立ち、胚発生のプロセスがよく調べられているゼブラフィッシュの胚にUVBを照射し、UVBが胚発生に与える影響を調べた。さらに、変異を検出するためのモニター遺伝子（大腸菌rpsL遺伝子）を遺伝子導入したゼブラフィッシュの胚に紫外線を照射し、紫外線に特異的な変異が発生するか否かを調べた。

2. 実験材料および方法

LTK15/CREF細胞と同様に300nm紫外線単色光を受精後24時間の胚に照射し、さらに、受精後3あるいは4日後に稚魚の形態の観察、および変異の検出を前報⁴⁾の原理に従って行った。

3. 結果・考察

1,000 J/m²のUVB照射の結果、80%の稚魚に尾が曲がるなどのなんらかの形態異常が発生していた（図7）。また、400 J/m²のUVBをrpsL遺伝子導入ゼブラフィッシュ胚に照射した結果、紫外線に特異的な変異（ピリミジンダイマー上の変異）が発生していた。野生型およびrpsL遺伝子導入ゼブラフィッシュは紫外線の影響を検出する上で有効な動物であると考えられる。今後更なる検討が必要である。

引用文献

- 1) Murata, S., Matsuzaki, T., Takai, S., Yaoita, H. and Noda M. (1995) A new retro-viral vector for detecting mutations and chromosomal instability in mammalian cells. *Mutat. Res.*, 344, 375-383
- 2) Akiyama, N., Alexander, D., Aoki, Y. and Noda, M. (1996) Characterization of mutations induced by 300 and 320nm UV radiation in a rat fibroblast cell line. *Mutat. Res.*, 372, 119-131
- 3) Peak, M.J., Peak, J.G., Moehring, M.P. and Webb, R.B. (1984) Ultraviolet action spectra for DNA dimer induction, lethality, and mutagenesis in *Escherichia coli* with emphasis on the UVB region. *Photochem. Photobiol.*, 40, 613-620
- 4) 天沼喜美子、青木康展 (1996) 変異原物質検出用トランスジェニックゼブラフィッシュの開発 水環境学会誌 19, 780-784

[研究発表の状況]

(1) 口頭発表

- (i) 野田 亮、秋山暢丈、青木康展、オゾン層破壊のインパクト：300 nm及び320 nm UV-B単色光による動物細胞遺伝子変異の特異性、第55回日本癌学会総会（1997）横浜
- (ii) Noda, M., Aoki, Y. and Akiyama, N. Cytotoxicity and mutagenicity of monochromatic UVB assessed using cultured rat fibroblast. *International Workshop on the Health Effects of Ultraviolet Radiation* (1999) Tokyo

(iii) Aoki, Y. and Amanuma, K. Development of a transgenic zebrafish for detecting environmental mutagens and its application for UV-B detection International Workshop on the Health Effects of Ultraviolet Radiation (1999) Tokyo

(2) 論文発表

(i) Akiyama, N., Alexander, D., Aoki, Y. and Noda, M. (1996) Characterization of mutations induced by 300 and 320nm UV radiation in a rat fibroblast cell line. Mutat. Res., 372, 119-131

図1 300 nm (a) 及び 320 nm (b) 紫外線の照射による小さな変異 (solid bar) と大きな欠損の発生 (striped bar)

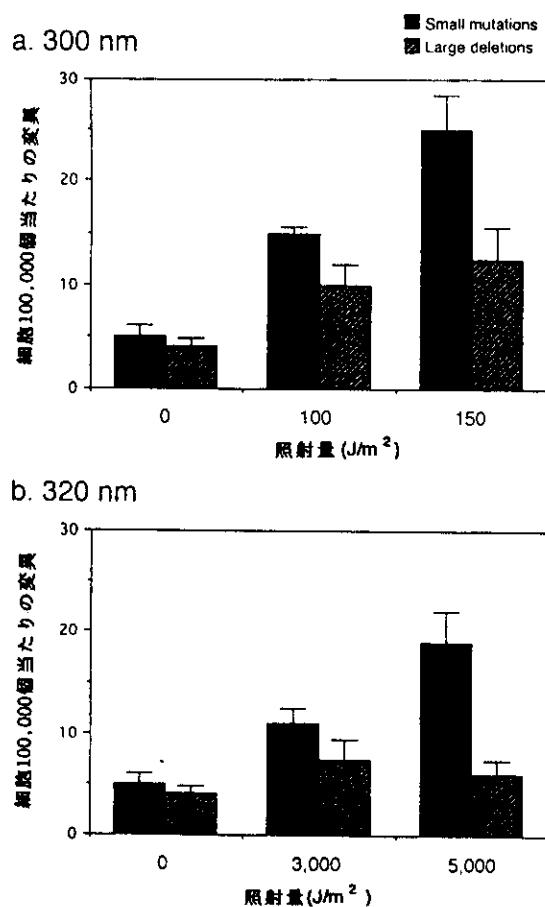


図2 各種光源の発光スペクトル

(1) 290nm、(2) 300nm、(3) 320nm、(4) 350nm。これらは全て、国立環境研究所に設置されている、フランスVilber Loumat社製のBiotronic monochromaterに、アメリカBarr Assoc. 社製のフィルターを装着して発生させたものである。

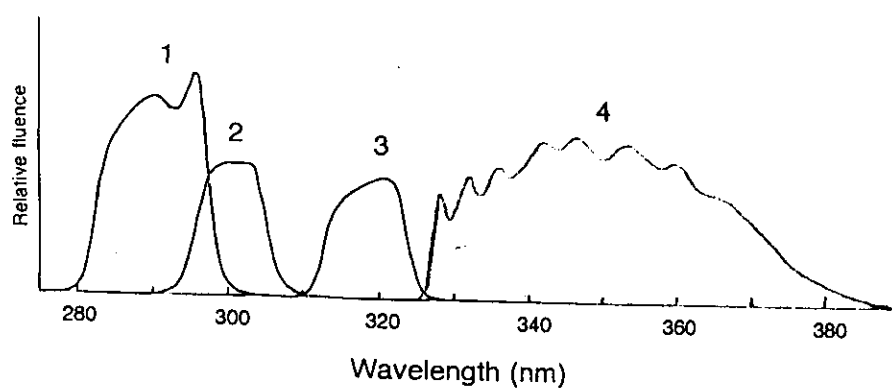


図3 各種光源による細胞傷害(a)及び変異誘発(b)

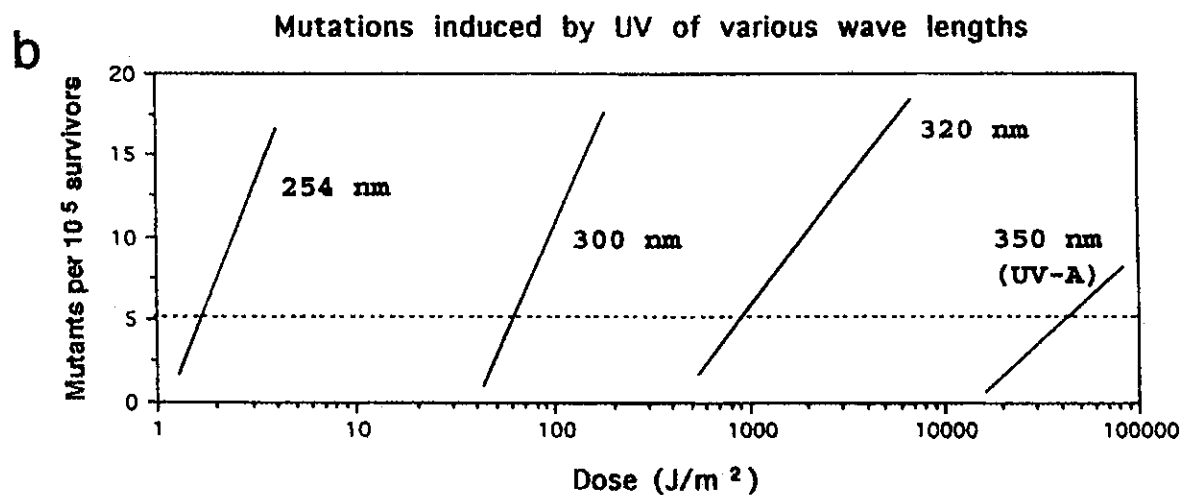
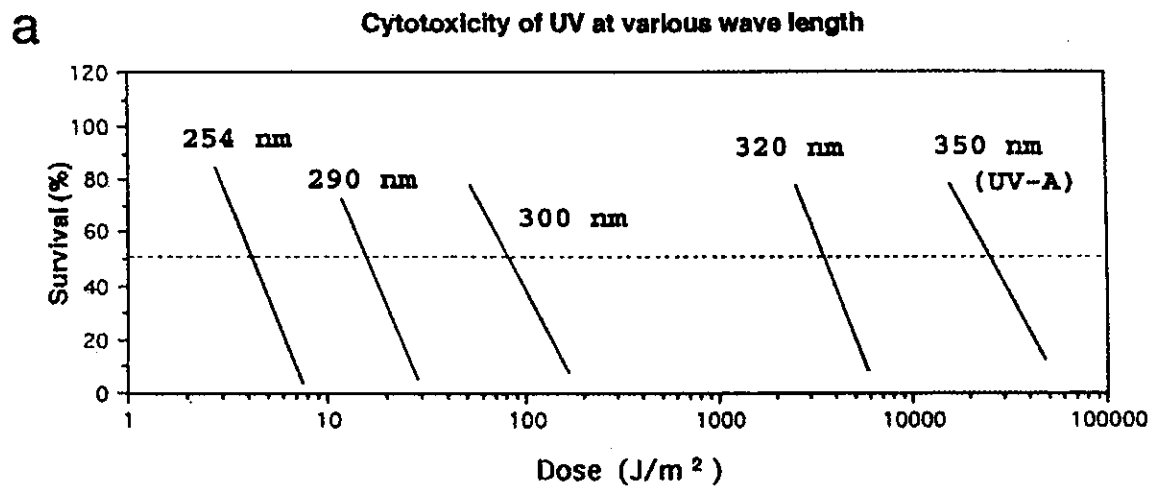
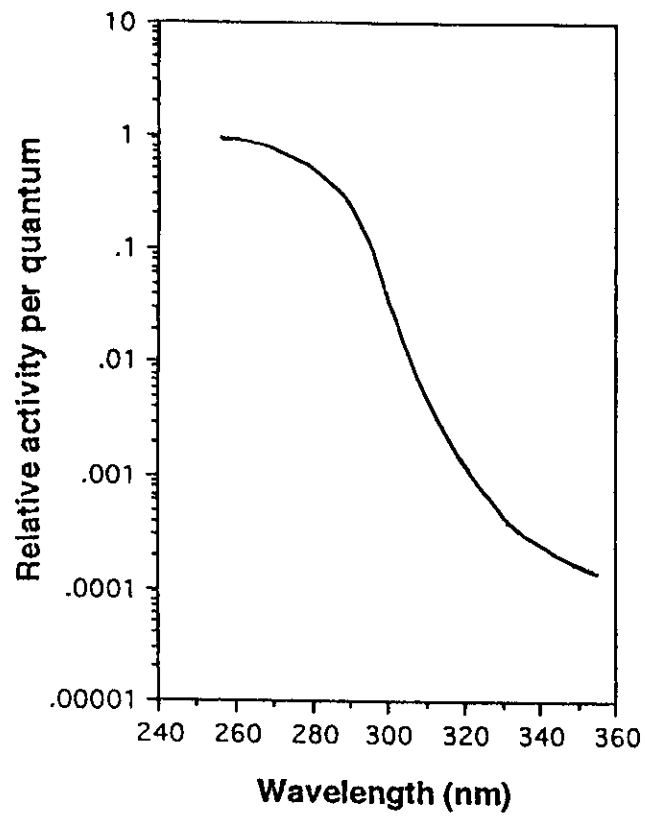


図4 細胞障害活性及び変異誘導活性のアクションスペクトル

殺菌灯 (254nm) の活性を1とし、これと同等の効果を得るために要するエネルギーの逆数の比 (即ち、エネルギー当たりの活性の比) をプロットした。波長は、光源スペクトルの中心に近い値を採用した。



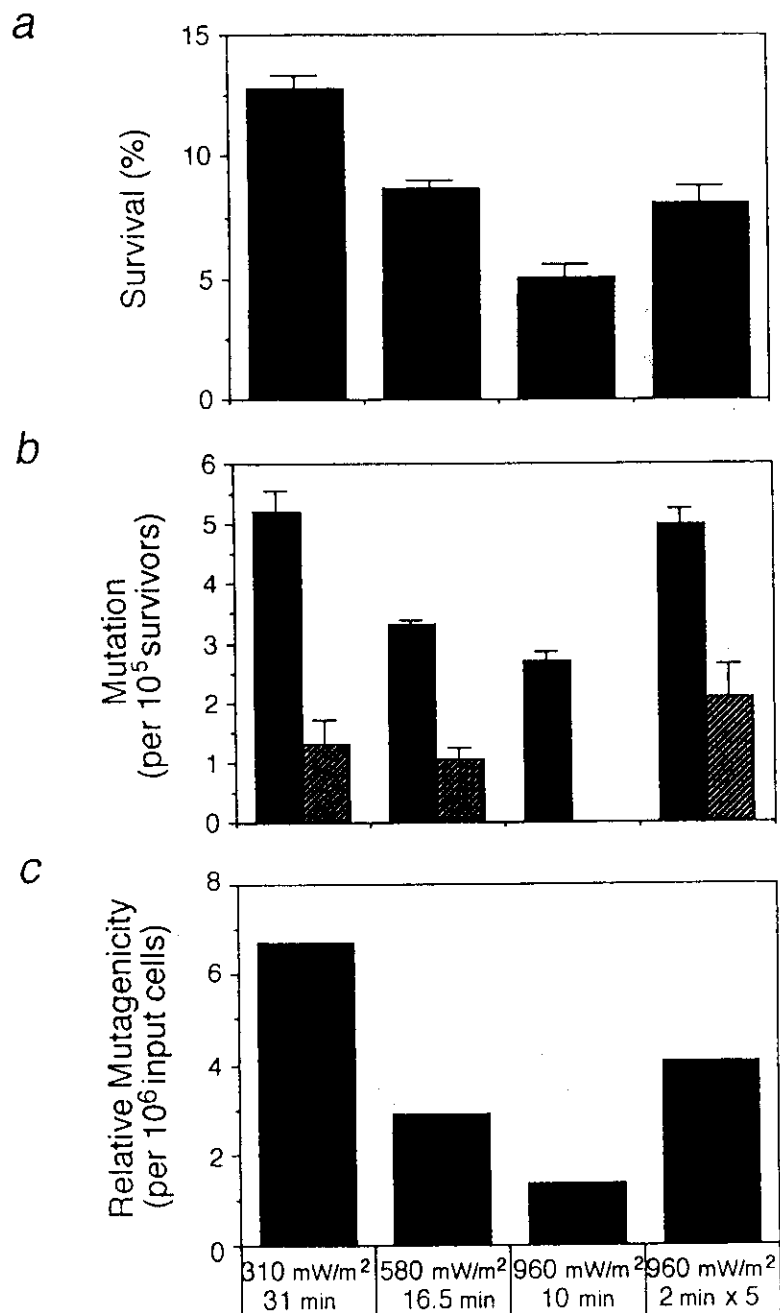


図5 320 nm紫外線の細胞障害活性と変異誘導活性

- LTK-15/CREF細胞を三種の線量率の320 nm UVBで一定線量 (576 J/m²) 照射した後のコロニー形成効率を、非照射細胞を対照とした百分率で示した。3枚のシャーレからの値 (mean±SE) を示した。
- 同様に照射した細胞を6日間培養した後、GCV (solid bar)、又はGCVとG418 (striped bar) 含有培養液中に蒔き、生じたコロニー数より算出した生存細胞10⁵個当たりの変異頻度。3枚のシャーレからの値 (mean±SE) を示した。
- a、bのデータの平均値より、照射前の細胞10⁶個当たりの変異頻度を算出した。

図6 300nm 紫外線の線量率効果

300nmを3つの異なる距離から、全照射量が $200\text{J}/\text{m}^2$ となる時間だけ照射した場合の生存率 (a)、生存細胞 10^5 個当たりの変異率 (b)、及びこれらの値から算出した照射細胞 10^5 個当たりの変異率 (c) を示した。照射時間は、 $8\text{W}/\text{m}^2$ の時は約7分、 $3\text{W}/\text{m}^2$ の時は約18分、 $1.5\text{W}/\text{m}^2$ の時は約36分だった。bでは小規模な変異と大規模な変異とを分けて、また、cでは両方を含めた値を示した。

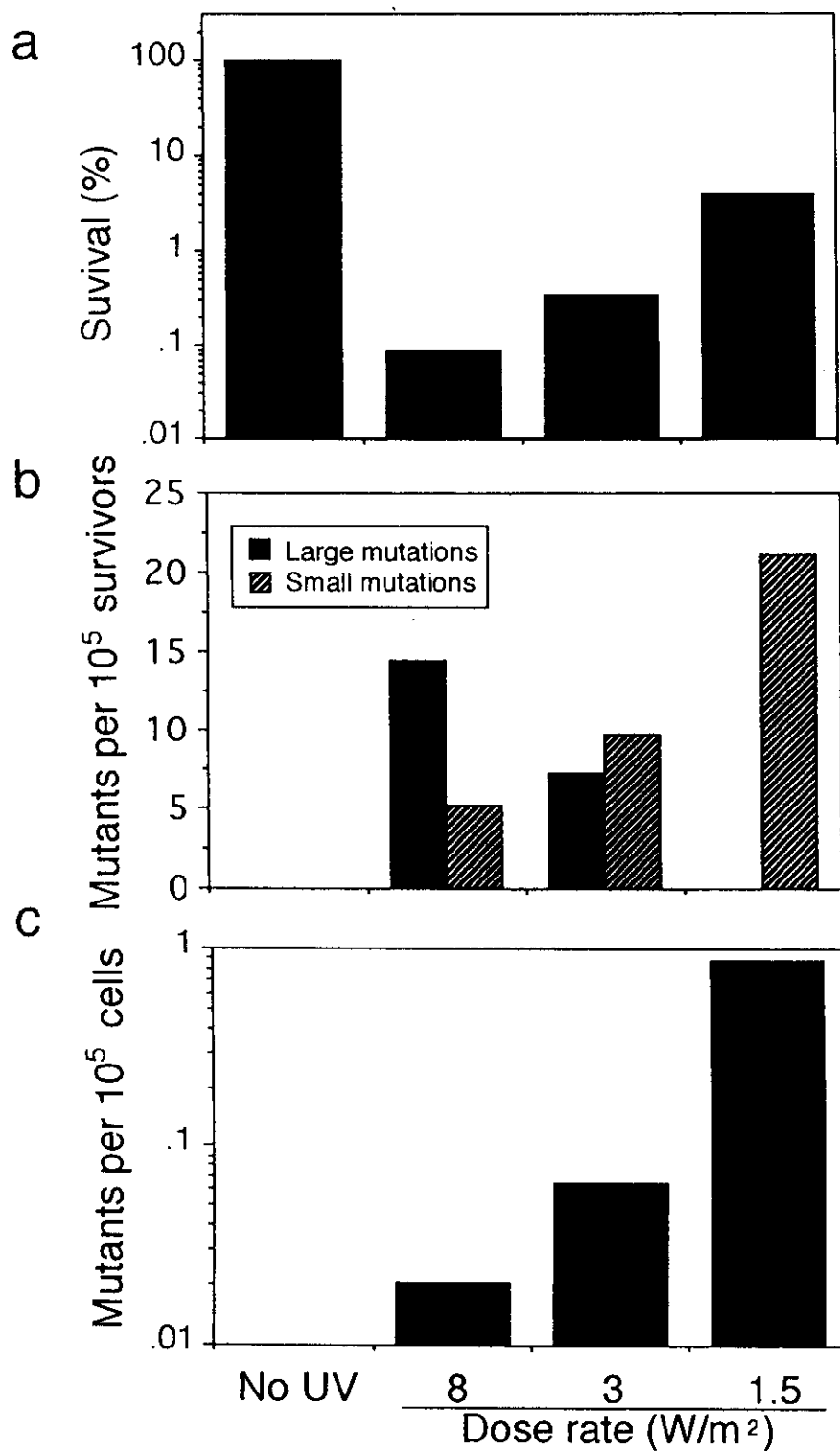


図7 300 nm UV-B照射がゼブラフィッシュ胚の形態形成に与える影響

