

**X RAY-INDUCED MUTATIONS IN CULTURED HUMAN  
THYROID CELLS**

培養ヒト甲状腺細胞におけるX線誘発突然変異

NORI NAKAMURA, Ph.D. 中村 典

RICHARD C. MILLER, Ph.D.

NOBUO TAKEICHI, M.D. 武市宣雄

RICHARD SPOSTO, Ph.D.



**RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION**

財団法人 放射線影響研究所

**A cooperative Japan - United States Research Organization**

日米共同研究機関

## ACKNOWLEDGMENT

### 謝 辞

The authors wish to thank Hiromi Tagawa and Masumi Enno for their excellent technical assistance, and Michiko Takagi, Mitsue Wakasa and Michiko Kobayashi for manuscript preparation. Drs. Michael N. Gould and Kelly H. Clifton of the University of Wisconsin, Madison, are also acknowledged for their technical assistance in the initial phase of this study.

田川浩美氏及び遠野真澄氏の優れた技術的援助並びに原稿作成における高木迪子氏、若狭光枝氏及び小林美知子氏の協力に対して謝意を表す。また、本研究の初期の段階で技術的援助をいただいた Madison 市 Wisconsin 大学の Dr. Michael N. Gould 及び Dr. Kelly H. Clifton に対しても謝意を表す。

A paper based on this report was accepted for publication by:

本報告に基づく論文は下記の雑誌に受理された。

*Radiation Research*

## RERF TECHNICAL REPORT SERIES

### 放射線影響研究業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is not intended to supplant regular journal publication.

放射線影響研究業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は通例の誌上発表論文に代わるものではない。

---

*The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.*

放射線影響研究所(元ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足したもので、その経費は日米両政府の平等分担により、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって運営されている。

## X RAY-INDUCED MUTATIONS IN CULTURED HUMAN THYROID CELLS

培養ヒト甲状腺細胞における X 線誘発突然変異

NORI NAKAMURA, Ph.D. (中村 典)<sup>1</sup>; RICHARD C. MILLER, Ph.D.\*;  
 NOBUO TAKEICHI, M.D. (武市宣雄)\*\*; RICHARD SPOSTO, Ph.D.<sup>2</sup>

*Departments of Radiobiology<sup>1</sup> and Statistics<sup>2</sup>*

放射線生物学部<sup>1</sup> 及び統計部<sup>2</sup>

### SUMMARY

Cultured human thyroid cells were X-irradiated in vitro and assayed for resistance to 6-thioguanine. The average mutant frequency was  $1.69 \pm 1.34 \times 10^{-5}$  (mean  $\pm$  SD) in controls,  $3.74 \pm 2.21 \times 10^{-5}$  in cells exposed at 1 Gy, and  $7.19 \pm 5.37 \times 10^{-5}$  in cells exposed at 2 Gy. The positive association between mutant frequency and dose was statistically significant. The estimated mutation induction rate was  $2.54 \pm 0.71 \times 10^{-5}$  per gray, which is in close agreement with published results for human skin fibroblasts and mammary epithelial cells. These results confirm earlier reports that mutation induction rates for fibroblasts and epithelial cells after exposure to X rays are similar.

### INTRODUCTION

Carcinogenesis is one of the most important late effects of human exposure to ionizing radiation. Thyroid cancer has long been recognized to be related to radiation exposure as well as leukemia and breast cancer.<sup>1</sup> The mechanism by which radiation exposure leads to frank carcinoma is still not well understood, but experimental data suggest that carcinogenesis is at least a two-step event: initiation and promotion.<sup>2</sup> Animal experiments have

### 要 約

培養ヒト甲状腺細胞を in vitro で X 線照射し、6 チオグアニン耐性について調査した。突然変異頻度は対照群では  $1.69 \pm 1.34 \times 10^{-5}$  (平均値  $\pm$  SD), 1 Gy では  $3.74 \pm 2.21 \times 10^{-5}$ , 2 Gy では  $7.19 \pm 5.37 \times 10^{-5}$  であった。突然変異頻度と線量との間には統計学的に有意な正の相関が認められた。平均誘発率は  $2.54 \pm 0.71 \times 10^{-5}$ /Gy となり、これは従来ヒト皮膚線維芽細胞や乳腺上皮細胞について得られた結果とほぼ一致している。本研究の結果は、線維芽細胞も上皮細胞も X 線照射による突然変異誘発率はよく似ているという以前の報告を確認するものである。

### 緒 言

発癌は、ヒトの電離放射線被曝の最も重要な後影響の一つである。甲状腺癌は、白血病及び乳癌と同様、放射線被曝と関連していることが以前から認められている。<sup>1</sup> 放射線被曝によって発癌に至る機序は依然として十分理解されているわけではないが、実験データによれば、発癌は少なくとも 2 段階の事象、すなわち、イニシエーションとプロモーションから成るものと考えられている。<sup>2</sup> 動物実験によれば、例え

\*Radiobiological Research Laboratory, Department of Radiation Oncology, College of Physicians and Surgeons of Columbia University, New York

コロンビア大学医学部放射線腫瘍学部放射線生物学研究室

\*\*2nd Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine

広島大学医学部第 2 外科学教室

revealed, for example, that thyroid-stimulating hormone (TSH) strongly affects thyroid carcinogenesis by acting as a tumor promoter.<sup>3</sup>

The initiation process of carcinogenesis is thought to occur at the DNA level. Once fixed, promoters can generate tumors in animals even after long intervals between exposure and the application.<sup>4</sup> Examples of DNA damage, e.g., point mutation, partial deletion, and amplification of proto-oncogenes and loss of function of possible anti-oncogenes are well documented.<sup>5</sup> However, these alterations are only detectable in cancer cells, and it is not possible by current techniques to detect such changes quantitatively in carcinogen-treated normal cells.

In the present study, mutation induction for cultured human thyroid cells was examined in an effort to assess the vulnerability of cells to radiation-related initiation. Inactivation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene, which leads cells toward resistance to 6-thioguanine (6TG), was chosen as an indicator of persisting DNA damage.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells.** Primary cultures of thyroid epithelial cells were established from surgically removed tissues of 13 hyperthyroidism patients (males and females, aged 21 to 47 years old). Details of the methods have been described previously.<sup>6</sup> In brief, tissue was minced, digested with collagenase for 2-3 hours at 37°C. Undigested tissue was removed after filtration through a nylon mesh. Cells were washed once by centrifugation and were used for primary culture. Since many cells (more than  $1 \times 10^7$  cells per dose group) were required for the mutagenesis study, cells were subcultured and amplified in number for use at passages 2-3.

**Medium.** Basal medium, consisting of a 1:1 mixture of alpha MEM and F12, was supplemented with antibiotics (100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin), 2.5% fetal calf serum (FCS) and growth additives (10 ng/ml EGF, 0.2  $\mu$ g/ml hydrocortisone, 1  $\mu$ g/ml thyroxine,  $T_4$ ) to produce a 3A-medium. Previously, a complete medium, which contained six growth additives<sup>6</sup> was used, but after further study most of the supplements were found not to support clonal growth in the presence of 2.5% FCS (Nakamura et al, in preparation). Immunohistochemical staining of colonies revealed that more than 90% were stained positively by

ば、甲状腺刺激ホルモン (TSH) は腫瘍促進因子として作用して甲状腺発癌に著しい影響を及ぼすことが判明している。<sup>3</sup>

発癌におけるイニシエーションの過程は DNA レベルで生ずると考えられている。この過程は一度固定されてしまうと、たとえ最初の被曝から長い時間を経た後でも、プロモーターにより腫瘍を生じ得ることが動物実験で認められている。<sup>4</sup> DNA 損傷については、例えば原癌遺伝子の点突然変異、部分欠失、並びに、増幅、あるいは抗発癌遺伝子の機能欠損などが詳細に記述されている。<sup>5</sup> しかし、これらの変化は癌細胞にのみ検出されるもので、発癌物質で処理した正常細胞についてこのような変化を定量的に検出することは現在の技術では不可能である。

本研究では、放射線によるイニシエーションに対する細胞の感受性を評価するため、培養ヒト甲状腺細胞を用いて突然変異誘発に関する調査を行った。細胞の 6 チオグアニン耐性を司るヒポキサンチンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子が不活性化すると、細胞が 6 チオグアニン耐性になるので、これを残存性 DNA 傷害の指標として用いた。

## 材料及び方法

**細胞.** 甲状腺機能亢進症患者 13 名 (男女, 21~47 歳) の外科的切除組織から甲状腺上皮細胞の初代培養を確立した。方法の詳細については既に報告した。<sup>6</sup> その概要は、まず、組織を切り刻み、37°C で 2~3 時間コラゲナーゼで処理した。未消化組織はナイロンメッシュで濾過して除去した。細胞を遠心分離により 1 回洗浄し、初代培養に用いた。突然変異誘発研究では大量の細胞 (各線量群につき  $1 \times 10^7$  個以上) が必要なので、細胞を 2~3 代目まで継代培養して用いた。

**培地.**  $\alpha$ MEM と F12 を 1 対 1 の割合で含む基本培地に、抗生物質 (ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 100  $\mu$ g/ml), 2.5% 牛胎児血清及び増殖因子 (EGF 10 ng/ml, ヒドロコルチゾン 0.2  $\mu$ g/ml, チロキシン 1  $\mu$ g/ml,  $T_4$ ) を添加して 3A 培地を作成した。以前は 6 種類の増殖因子<sup>6</sup> を含む完全培地を用いたが、研究を重ねた結果、これらの増殖因子の大部分は 2.5% FCS 存在下でクローン増殖を促進しないことが判明した (中村ら報告書作成中)。細胞コロニーは免疫組織化学的染色を行うと、その 90% 以上が抗

the anticytokeratin antibody, thus verifying that the cells are of epithelial origin (our unpublished observation).

**Treatment by ethyl methanesulfonate (EMS).** Exponentially growing cells were seeded into 75 cm<sup>2</sup> culture flasks (Corning #25110) at about  $1.5 \times 10^6$  cells/flask and, after overnight incubation, were treated with 10 mM EMS (10 ml per flask) for one hour at 37°C. After treatment, cells were washed twice with Ca<sup>++</sup>- and Mg<sup>++</sup>-free phosphate-buffered saline and were collected by trypsin treatment (0.1% trypsin + 0.01% EDTA).

**X-ray irradiation.** Exponentially growing cells were collected by trypsin and suspended in 3A-medium ( $1 \times 10^6$  cells/ml). Cells were then exposed to X rays in plastic culture tubes (10 ml per dose point). The X-ray apparatus (Shimadzu WSI-250S, Kyoto, Japan) was operated at 220 kVp, 8 mA with a 0.3 mm Cu, 0.5 mm Al filter. The dose rate was calculated at 0.44 Gy/min after exposure dose measurements with a Radcon 500 dosimeter (Victoreen, Inc., Ohio, USA).

**Measurement of mutant frequency.** After treatment with either EMS or X rays, cells were collected and seeded in 90 mm plastic dishes (Falcon #3003) at  $3 \times 10^5$  to  $5 \times 10^5$  cells per dish. Cells were incubated in CO<sub>2</sub> incubators (5% CO<sub>2</sub>, 95% air), and examined daily with an inverted microscope for subculture before confluence by transferring more than  $1 \times 10^7$  cells. After eight days' incubation, cells were collected by trypsinization and plated in a selective medium containing 6TG for mutant selection. From the results using EMS (see Figure 3), it was presumed that maximum cell density for mutant selection is  $5 \times 10^4$  cells/90 mm dish, namely 200 dishes for each dose point are required for the X-ray mutagenesis study to plate  $1 \times 10^7$  cells. Therefore, in the X-ray dose-response study, bulk cell culture vessels (#337, Sterilin Ltd., Feltham, England) were used.<sup>7</sup> The vessels contained a plastic sheet arranged in a spiral and had a surface area equivalent to nearly 196 dishes (90 mm). Then  $1 \times 10^7$  cells were plated in each vessel, incubated overnight at 37°C under slow rotation (six revolutions per hour) for cell attachment as specified for human diploid fibroblasts by Cox et al.<sup>7</sup> After overnight incubation, the vessels were placed in a CO<sub>2</sub> incubator in an upright position for two weeks for colony formation. Concurrently, cells (250 cells/90 mm

cytokeratin 抗体で染色されるので、これらの細胞の大半は上皮細胞由来であることが確認されている(未発表所見).

**エチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理.** 指数関数的に増殖している細胞を 75 cm<sup>2</sup> の培養フラスコ (Corning # 25110) にフラスコ当たり  $1.5 \times 10^6$  個の割合で播種し、一晚培養する。その後、10 mM EMS (10 ml/フラスコ) により 37°C で 1 時間処理した。処理後、細胞を Ca<sup>++</sup> 及び Mg<sup>++</sup> を含まないリン酸緩衝食塩水で 2 回洗浄し、トリプシン処理 (0.1% トリプシン + 0.01% EDTA) により採取した。

**X線照射.** 指数関数的に増殖している細胞をトリプシンにより採取し、3A 培地 ( $1 \times 10^6$  個/ml) に懸濁し、プラスチック試験管内で X 線照射した (各線量当たり 10 ml)。X 線装置 (京都、島津社製 WSI-250S 型) の照射条件は 220 kVp, 8 mA とし、0.3 mm Cu, 0.5 mm Al フィルターを用いた。Radcon 500 型線量計 (米国 Ohio 州 Victoreen 社製) で照射線量を測定した後、線量率を計算したところ 0.44 Gy/分であった。

**突然変異頻度の測定.** EMS 処理又は X 線照射後に細胞を採取し、90 mm プラスチックシャーレ (Falcon # 3003) にシャーレ当たり  $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  個の割合で播種した。CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>, 95% 空気) で細胞を培養し、倒立顕微鏡で毎日観察を行って、細胞が互いに接触して増殖阻止を生じる前にその  $1 \times 10^7$  個以上を継代培養に移した。培養 8 日後にトリプシン処理により細胞を採取し、6TG を含む選抜培地に播種して突然変異細胞を選抜した。EMS を用いた結果により (図 3 参照)、突然変異細胞選抜に必要な最大細胞密度は 90 mm シャーレ当たり  $5 \times 10^4$  個であることが分かった。すなわち、X 線突然変異誘発研究では、各線量ポイントにつき、 $1 \times 10^7$  個の細胞を播種しようとするれば、200 枚ものシャーレが必要となる。そこで X 線線量効果の研究には大容量細胞培養容器 (英国 Feltham 市 Sterilin 社製 # 337) を使用した。<sup>7</sup> この容器には螺旋状のプラスチック・シートが装着され、その表面積はほぼ 196 枚の培養シャーレ (90 mm) に相当する。次に、Cox ら<sup>7</sup> がヒト二倍体線維芽細胞について記述した方法に従って、容器 1 本当たり  $1 \times 10^7$  個の細胞を播種し、ゆっくり回転 (1 時間に 6 回) させながら 37°C で一晚培養し、細胞を付着させた。一晚培養した後、各容器を立てて CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れコロニー形成のため 2 週間培養した。同時に、細胞集団のプレーティング効率 (PE) を調べるため、6TG を含まない培地に細胞

dish × four dishes) were plated in 6TG-free medium for determining plating efficiency (PE) of the cell population. Colonies were stained with 0.25% azur A.<sup>7</sup> The mutant frequency (Mf) was calculated as

$$Mf = \frac{\text{Number of 6TG-resistant colonies}}{\text{6 TG 耐性コロニー数}} \div \frac{\text{Number of cells seeded in 6TG medium} \times PE}{\text{6 TG 培地に播種した細胞数} \times PE}$$

The F12 medium that was used as a basal medium contained hypoxanthine, a substrate of HPRT enzyme. Thus, hypoxanthine-free F12 was prepared for the selective media containing 6TG.

**Statistical methods.** An F test blocked on cell strain with 1 and 15 degrees of freedom using log Mf was computed to test for a linear regression on dose. In the nonparametric test of association used also in this section, since for each cell strain all orderings of the Mfs for control, 1 Gy, and 2 Gy are equally likely under the null hypothesis, the sign of the slope obtained by regressing the ranks of the Mfs on dose can be used as a basis for a sign test.<sup>8</sup> For example, cell strain 8707H has Mfs 2.29, 7.50, and 3.39, with ranks 1, 3, 2, which yield positive slope estimate of 0.5 when regressed on dose. Under the null hypothesis of no dose response, positive and negative slopes among the seven cell strains with all three measurements are equally likely.

## RESULTS

### Conditions for mutant selection

For selection of 6TG-resistant (6TG<sup>r</sup>) mutants, expression time, 6TG concentration, and maximum plating cell density were determined.

Figure 1 shows the results of 6TG<sup>r</sup> Mfs at 0, 4, 8, and 11 days after a one hour treatment of 10 mM EMS. The Mfs remained low for the first four days and then increased to its maximal value at eight days. Similar results were obtained when an established thyroid cell line derived from a patient with undifferentiated thyroid carcinoma was exposed to either 2 or 3 Gy of X rays (data not shown).

Figure 2 shows the Mf for cells exposed to graded concentrations of 6TG. Concentrations of 6TG from 3-7 μg/ml, widely used with many other cells, showed no significant change in the Mf of the

(250個/90 mm シャーレ × 4 枚) を播種して培養した。コロニーは 0.25% azur A で染色した。<sup>7</sup> 突然変異頻度 (Mf) は以下の式を用いて計算した。

基本培地として用いた F12 培地には、HPRT 酵素の基質であるヒポキサンチンが含まれている。したがって、6TG を含む選抜培地として、ヒポキサンチンを含まない F12 培地を調製した。

統計学的方法。対数変換した Mf について、自由度 1 と 15 の F テストを行い、線量に対する直線回帰の検定を行った。線量との相関については非パラメトリック検定も行ったが、この場合は、線量に対する Mf の順位を回帰して得られる勾配の符号を sign test の基本として使用できる。というのも、帰無仮説のもとでは、各細胞株について、対照群、1 Gy 群、2 Gy 群の Mf の順位は同等であると考えられるからである。<sup>8</sup> 例えば、細胞株 8707H の場合、Mf は 2.29, 7.50 及び 3.39, それぞれの順位は 1, 3 及び 2 であり、線量との回帰関係から正の推定勾配 0.5 が求められる。線量反応がないとする帰無仮説の下では、これら三つの測定値が揃っている 7 種の細胞株では、正負いずれの勾配を示す可能性も等しい。

## 結果

### 突然変異細胞選抜の条件

6TG 耐性 (6TG<sup>r</sup>) 突然変異細胞を選抜するため、発現期間、6TG の濃度及び細胞の最大播種密度を調べた。

10mM EMS で 1 時間処理後、0, 4, 8 及び 11 日目の 6TG<sup>r</sup> Mf を図 1 に示した。最初の 4 日間は Mf が低く、その後上昇し、8 日目に最高値に達した。未分化型甲状腺癌患者から樹立した甲状腺細胞株に 2 又は 3 Gy の X 線を照射した場合にも同様の結果を得た (本報ではそのデータを示していない)。

図 2 は、種々の濃度の 6TG を含む培地に播種した細胞の Mf を示したものである。他の多くの細胞で広く用いられている 3~7 μg/ml の範囲の 6TG 濃度はヒト甲状腺細胞の Mf に有意な変化を及ぼさな

human thyroid cells. A 6TG concentration of 5  $\mu\text{g/ml}$  was chosen for mutation studies.

なかった。そこで突然変異研究に 6TG 濃度として 5  $\mu\text{g/ml}$  を選んだ。

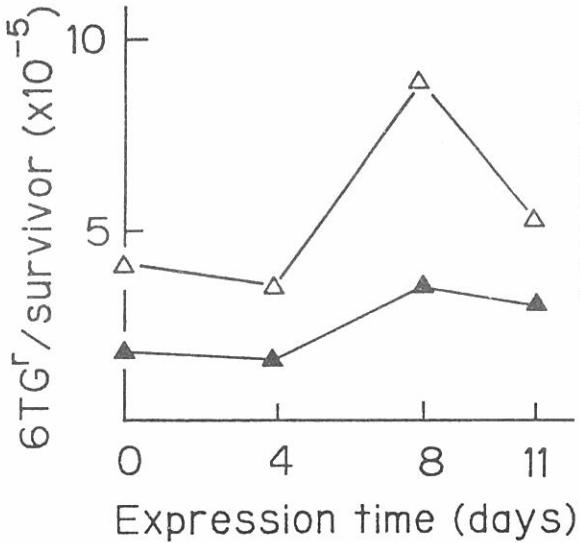


Figure 1. Relationship between mutant cell frequency and expression time after 10 mM EMS treatment for one hour. The 6TG concentration was 5  $\mu\text{g/ml}$ . Results are shown for two cell strains.

図1 10 mM EMS 処理 1 時間後の突然変異細胞頻度と発現期間との関係。6TG の濃度は 5  $\mu\text{g/ml}$ 。2 種類の細胞株について結果を示した。

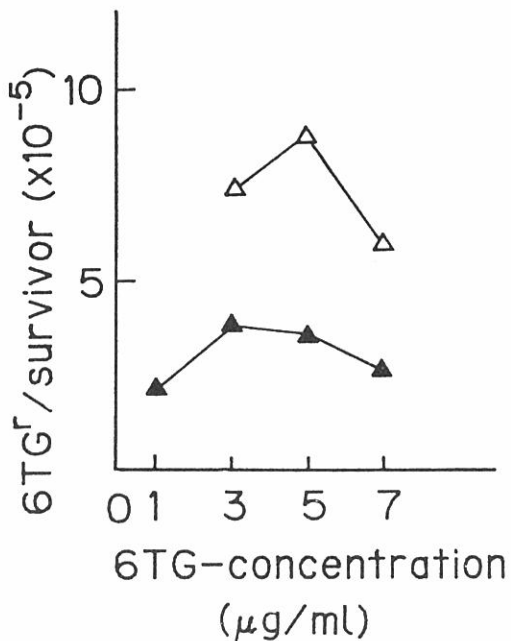


Figure 2. Mutant cell frequency of EMS-treated cells selected with various concentrations of 6TG (Eight-day expression, selection cell density =  $5 \times 10^4$  cells/dish). Results are shown for two cell strains.

図2 EMS 処理細胞を種々の濃度の 6TG で選抜した場合の突然変異細胞頻度 (8 日間の発現期間, 選抜細胞密度はシャーレ当たり  $5 \times 10^4$  個)。2 種類の細胞株について結果を示した。

Using an expression time of eight days and  $5 \mu\text{g/ml}$  of 6TG to select mutants, the effect of cell density on recovered mutants was examined. It is apparent from Figure 3 that the Mf decreased sharply with cell densities above  $5 \times 10^4$  per 90 mm dish. Since bulk cell culture vessels have surface areas equivalent to about 200 dishes,  $1 \times 10^7$  cells per vessel were used for mutant selection. In one experiment using cell strain 8606H,  $1 \times 10^7$  and  $0.75 \times 10^7$  cells from the same population eight days after 2 Gy of X-irradiation were seeded per vessel, and the resulting Mfs were found to be very similar (Table 1). The results support that the cell density used for mutant selection is appropriate in that no cell-to-cell interaction is taking place.

突然変異細胞選抜のための発現期間 8 日, 6TG 濃度  $5 \mu\text{g/ml}$  を使用して, 突然変異細胞回収率に及ぼす細胞密度の影響を調べた. 図 3 から, シャーレ (90 mm) 1 枚当たり  $5 \times 10^4$  個以上の細胞密度では Mf が急速に低下することが明らかである. 大量細胞培養器の表面積は培養シャーレ約 200 枚に相当するので, 1 容器当たり  $1 \times 10^7$  個の細胞を突然変異細胞選抜に用いた. 細胞株 8606H を使用した実験では, 2 Gy の X 線照射後 8 日目に同一の細胞集団から 1 容器当たり  $1 \times 10^7$  個及び  $0.75 \times 10^7$  個の細胞をそれぞれ播種したが, 得られた Mf は極めて類似していた (表 1). この結果は, 突然変異細胞選抜に用いた細胞密度では細胞間の相互作用がなく, 妥当なものであったことを示唆している.

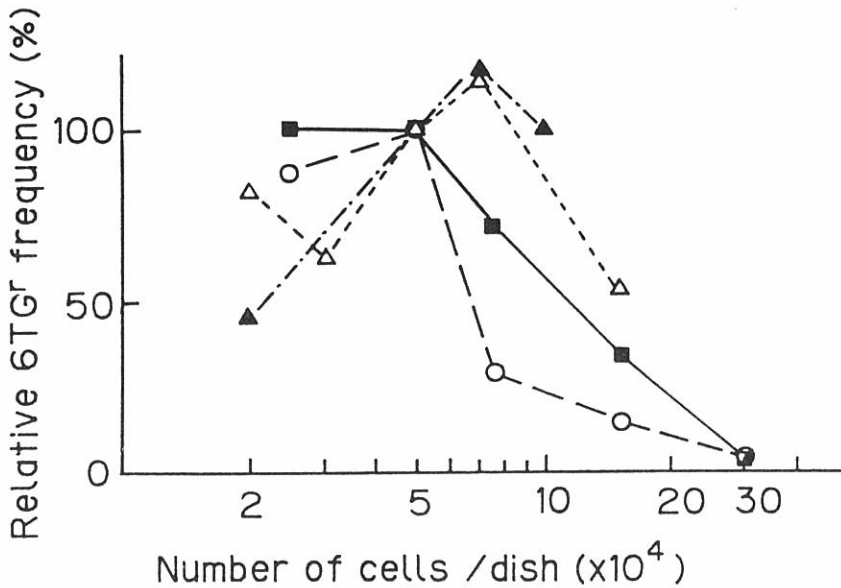


Figure 3. Effects of cell density on mutant cell frequency. Frequency is expressed as the percentage of the frequency for  $5 \times 10^4$  cells/dish. Each symbol represents a different experiment using a different cell strain (eight-day expression,  $5 \mu\text{g/ml}$  6TG).

図 3 細胞密度が突然変異細胞頻度に及ぼす影響. 頻度はシャーレ当たり  $5 \times 10^4$  細胞の条件で得られた値に対する相対値として示した. 異なる細胞株を使用した実験はそれぞれ異なる印で表した (8 日間の発現期間,  $5 \mu\text{g/ml}$  6TG).



TABLE 1 SUMMARY OF MUTAGENESIS EXPERIMENTS FOR CULTURED HUMAN THYROID CELLS

表1 培養ヒト甲状腺細胞に関する突然変異誘発実験の要約

Cell Strain	Number of mutants/PE* (mutant frequency $\times 10^{-5}$ )		
	Control	1 Gy	2 Gy
8606H	87/0.36(2.42)	131/0.23(5.70)	98/0.15(6.53) 76/0.15(6.76)**
8607H	71/0.31(2.29)	210/0.28(7.50)	78/0.23(3.39)
8609H	6/0.20(0.30)	45/0.14(3.21)	25/0.16(1.56)
8525H	62/0.14(4.43)	44/0.16(2.75)	112/0.089(12.58)
8619H	26/0.16(1.63)	22/0.15(1.47)	185/0.10(18.50)
8529H	4/0.32(0.13)		231/0.32(7.22)
8620H	18/0.30(0.60)		67/0.18(3.72)
8621H	75/0.34(2.20)	52/0.13(4.00)	65/0.083(7.83)
8623H	50/0.40(1.25)	66/0.42(1.57)	128/0.38(3.37)
Average Mf $\pm$ SD ( $\times 10^{-5}$ )	1.69 $\pm$ 1.34	3.74 $\pm$ 2.21	7.19 $\pm$ 5.37

\*Cells replated eight days after irradiation.

X線照射後8日目に求めたもの。

\*\* $0.75 \times 10^7$  cells were simultaneously plated in a bulk cell culture vessel.同時に、 $0.75 \times 10^7$  個の細胞を大量細胞培養器に播種した。

### X-ray dose-response relationship

The results for X-ray mutagenesis are presented in Table 1. The Mfs in the controls varied between  $0.13 \times 10^{-5}$  and  $4.43 \times 10^{-5}$ , depending on the cell strain (average  $1.69 \times 10^{-5}$ ). The F test of dose relationship yielded  $F=20.21$  on 1 and 15 degrees of freedom for a p-value of  $<.001$ . A nonparametric test of the association between Mf and dose using all measurement in the seven strains with data at all three dose levels was significant with  $p=.008$ . These results imply that the Mf was significantly higher at higher doses (please see "Statistical methods" section).

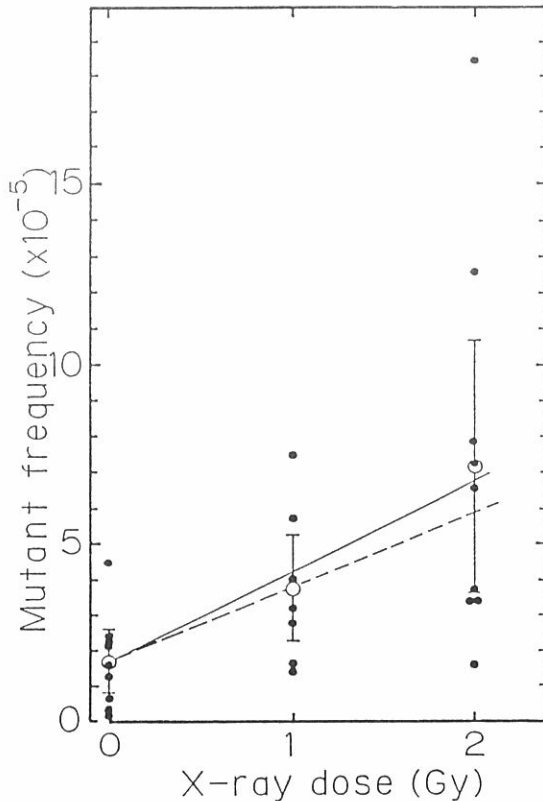
Under the assumption that all cell strains have the same zero-dose Mf and the same linear response with dose, the mutation induction rate was estimated by weighted-least squares to be  $2.54 \pm 0.71 \times 10^{-5}$  per Gy. The Mf of 18.5 at 2 Gy for strain 8619H appeared to be an outlier in this model. The estimated mutation induction rate with this observation excluded was  $2.04 \pm 0.58 \times 10^{-5}$  per Gy, which is within precision bounds of the

### X線線量反応関係

X線突然変異誘発に関する実験結果を表1に示した。対照群におけるMfは細胞株によって $0.13 \times 10^{-5}$ から $4.43 \times 10^{-5}$ の範囲で変動した(平均は $1.69 \times 10^{-5}$ )。線量に対する反応は、自由度1と15のFテストの結果、 $F=20.21$ となりp値は $<.001$ であった。用いた3種類の線量すべてについてのデータが揃っている7種の細胞株におけるすべての測定値を用いると、Mfと線量との関連性に関するノンパラメトリック検定は有意であり、 $p=.008$ であった。これらの結果は、Mfが線量と共に増加することを示唆している(「統計学的方法」の節を参照)。

すべての細胞株は非照射群のMfが同一であり、線量に対して同一の線形反応を示すと仮定すると、加重最小自乗法に基づく推定突然変異誘発率は $2.54 \pm 0.71 \times 10^{-5}/\text{Gy}$ となる。細胞株8619Hが2 Gyにおいて示した18.5というMfは、本モデルでは極端に偏った値と言える。これを除外して得られた推定突然変異誘発率は $2.04 \pm 0.58 \times 10^{-5}/\text{Gy}$ であり、これは先の推定値の精度限界内である。観察例数が

previous estimate. The small number of observation precluded our testing the assumptions of linearity or equality of zero-dose Mf between cell strains. The predicted Mfs and individual observations are shown in Figure 4.



少ないため、非照射群 Mf の細胞株間における同等性あるいは反応の直線性に関する仮定を検証することはできなかった。Mf の予測値及び個々の観察結果を図 4 に示した。

Figure 4. Dose response of mutation induction of human thyroid cells after exposure to either 1 or 2 Gy of X rays. Closed circles represent individual experiments, open circles are the calculated means, and vertical error bars represent 95% confidence limits of the means. The lines were fitted using least squares method assuming a linear dose response. The upper line is based on all the data points and the lower one was made by precluding one outlying highest value at 2 Gy. These lines are expressed by equations  $y = 1.66 + 2.54D$  and  $y = 1.70 + 2.04D$ , respectively, where  $y$  is mutation frequency ( $\times 10^{-5}$ ) and  $D$  is dose in gray.

図 4 1 Gy 又は 2 Gy の X 線照射後におけるヒト甲状腺細胞の突然変異誘発の線量反応。黒丸は各実験結果を示し、白丸は計算で求めた平均値を示す。また、垂直の線は平均値の 95% 信頼限界を示す。線形の線量反応を仮定し、最小自乗法により直線を当てはめた。上の直線はすべての実験値に基づいたもの、下の直線は 2 Gy における極端に高い一つの値を除外して得られたものである。これらの直線は、それぞれ、 $y = 1.66 + 2.54D$  及び  $y = 1.70 + 2.04D$  の式で表される。ここに、 $y$  は突然変異頻度 ( $\times 10^{-5}$ )、 $D$  は gray を単位とする線量である。

## DISCUSSION

Previous studies have shown that cultured thyroid cells are similar in sensitivity to human skin fibroblasts for radiation-induced cell killing.<sup>9-11</sup> In the present study, mutagenesis experiments were undertaken to evaluate the radiosensitivity for induction of DNA damage, which appears to be involved in the initiation phase of carcinogenesis. As shown in Figure 4, the estimated induction rate was about  $2.54 \times 10^{-5}/\text{Gy}$  at doses of up to 2 Gy. Comparison of the results with those obtained for other normal cells of human origin are summarized in Table 2. Most of the studies were conducted using skin fibroblasts with values

## 考 察

以前の研究では、培養甲状腺細胞の放射線誘発細胞致死効果に対する感受性は、ヒト皮膚線維芽細胞の場合と同様であった。<sup>9-11</sup> 本研究では、突然変異誘発実験を行い、発癌のイニシエーション段階に関与すると思われる DNA 傷害の誘発に対する感受性を評価した。図 4 に示したように、2 Gy までの線量では推定誘発率は約  $2.54 \times 10^{-5}/\text{Gy}$  であった。この結果とヒト由来の他の正常細胞から得たものとを比較し、表 2 にその結果を要約した。ほとんどの研究は皮膚線維芽細胞を使用して行われており、

ranging from  $2.1 \times 10^{-5}$  to  $3.5 \times 10^{-5}/\text{Gy}$  (average  $2.7 \times 10^{-5}/\text{Gy}$ ). The results for human mammary epithelial cells<sup>17</sup> showed the induction rate to range from  $2.2 \times 10^{-5}$  to  $2.4 \times 10^{-5}/\text{Gy}$ . Our results with human thyroid cells are in close agreement ( $2.5 \times 10^{-5}/\text{Gy}$ ). These values are also quite similar to those seen for irradiated fibroblasts. Hence, it appears that thyroid epithelial cells are not uniquely sensitive to radiation-induced mutations.

得られた値は  $2.1 \times 10^{-5}$  から  $3.5 \times 10^{-5}/\text{Gy}$  (平均  $2.7 \times 10^{-5}/\text{Gy}$ ) までの範囲である。ヒト乳腺上皮細胞<sup>17</sup>では、誘発率は  $2.2 \times 10^{-5}$  から  $2.4 \times 10^{-5}/\text{Gy}$  までの範囲であった。ヒト甲状腺細胞に関する我々の研究結果はこれらのデータと非常に近い ( $2.5 \times 10^{-5}/\text{Gy}$ )。また、放射線照射線維芽細胞の値にも極めて類似している。したがって、甲状腺上皮細胞が放射線誘発突然変異に対して感受性が特に高いことはないと思われる。

TABLE 2 SUMMARY OF INDUCTION RATE OF 6TG-RESISTANT MUTATION IN CULTURED NORMAL CELLS OF HUMAN ORIGIN

表2 ヒト由来培養正常細胞における6TG耐性突然変異誘発率の要約

Cell Type	Mutation Rate ( $\times 10^{-5}/\text{Gy}$ )	Radiation	Reference
Skin fibroblasts	3.1	250 kVp X rays	12
	2.4-3.5	250 kVp X rays	13
	~2	<sup>60</sup> Co gamma rays	14
	2.1	150 kVp X rays	15
Lung fibroblasts	3.1	250 kVp X rays	16
Mammary epithelial	2.2-2.4	<sup>137</sup> Cs gamma rays	17
Thyroid epithelial	2.5	220 kVp X rays	Present results

Both thyroid and breast tissues are well documented as being radiation sensitive. Absolute risks are estimated to be 4 excess cases per  $10^4$  person-year-Gy (PYGy) for the thyroid and from 6 to 22 excess cases per  $10^4$  PYGy for breast carcinomas.<sup>1</sup> In contrast, skin and lung cancers are estimated at 0.4 and 1 per  $10^4$  PYGy,<sup>1</sup> respectively. Additionally, most skin cancers are either squamous or basal cell carcinomas, while the incidence of fibrosarcomas is a factor of 10 lower.<sup>1</sup> Similarly, lung cancer, in which more than 80% of the cases consist of epidermoid carcinoma, small cell carcinoma, and adenocarcinoma, only a small fraction of tumors are of fibroblast cell origin.<sup>18</sup> Thus, the risk of malignant transformation of fibroblasts is far lower than for thyroid or mammary epithelial cells. Such a wide variation would be probably due to differences in promotion process(es) among the tissues, e.g., differences in the number of steps required to attain final malignant transformation or differences in the tissue kinetics. The quantitative difference in the number of cells at risk may be less important since the radiation risk of liver cancer, e.g., has been estimated to be quite small,<sup>1</sup> despite the liver's large size when compared to the thyroid gland. Although it has generally been thought that epithelial cells

甲状腺及び乳腺組織が放射線に対して高い感受性を示すことについては多くの報告がある。絶対リスクは、 $10^4$  人年 Gy (PYGy) 当たりの過剰発生が甲状腺癌で4例、乳癌で6~22例と推定されている。<sup>1</sup> これに対して、皮膚癌及び肺癌の場合は、それぞれ  $10^4$  PYGy 当たり 0.4 及び 1 と推定されている。<sup>1</sup> これに加えて、多くの皮膚癌は扁平上皮癌又は基底細胞癌であり、線維肉腫の発生率はその1/10である。<sup>1</sup> 同様に、肺癌でも80%以上が類表皮癌、小細胞癌及び腺癌で占められており、線維芽細胞由来の腫瘍は大変少ない。<sup>18</sup> したがって、線維芽細胞の悪性転換のリスクは甲状腺又は乳腺上皮細胞に比べてはるかに低い。このように組織間で大きな違いがあるのは、恐らく、プロモーション過程の差異、例えば、最終的な悪性転換に至るまでに必要な段階の数の差、あるいは組織動力学的差によるものと思われる。標的細胞数の量的差異は余り重要でないと考えられる。というのも、例えば肝臓は甲状腺よりはるかに大きいにもかかわらず、肝臓癌の放射線リスクは極めて低いと推定されているからである。<sup>1</sup> 動物の成熟組織における上皮細胞は、正常な状態ではほとんど

in adult tissues of animals hardly proliferate under normal conditions, a recent study revealed that as much as 10% of mouse thyroid epithelial cells were labeled by  $^3\text{H}$ -thymidine after three weeks.<sup>19</sup> Unfortunately, little is known about such long-term tissue kinetics for other organs in mice nor for any human tissues. If such information becomes available in future, organ-specific risks of radiation carcinogenesis may be better understood.

From a comparable study of mutagenesis for human diploid fibroblasts and Chinese hamster V79 cells, Thacker and Cox<sup>12</sup> presented the hypothesis that, although radiosensitivity may vary among cell lines, the relationship between Mf and the log of the surviving fraction may be expressed by a single straight line (Figure 5). The induced Mf for human thyroid and mammary epithelial cells supports this hypothesis. This would imply that radiation-induced Mf for cells (with a few exceptions<sup>22-24</sup>) may be estimated from cell survival curves.

ど増殖しないと一般的に考えられているが、最近の研究では、3週間の間に、マウスの甲状腺上皮細胞の10%が $^3\text{H}$ -チミジンで標識されることが判明した。<sup>19</sup> 残念ながら、マウスの他の臓器及びヒトの組織については、このような長期間の組織動力学に関してはほとんど何も知られていない。将来このような情報が得られれば、放射線発癌の臓器別リスクがもっとよく理解できるようになるかもしれない。

Thacker 及び Cox<sup>12</sup> はヒト二倍体線維芽細胞及びチャイニーズハムスター V79 細胞を用いて同様の突然変異誘発研究を行い、細胞株間で放射線感受性は異なっても、Mf と対数にとった生存率との関係は一本の直線で表されとの仮説を提唱した(図5)。ヒト甲状腺及び乳腺上皮細胞について認められた誘発 Mf はこの仮説を支持している。このことは、(若干の例外<sup>22-24</sup>はあるが)細胞生存曲線から細胞の放射線誘発 Mf を推定できることを示唆するものである。

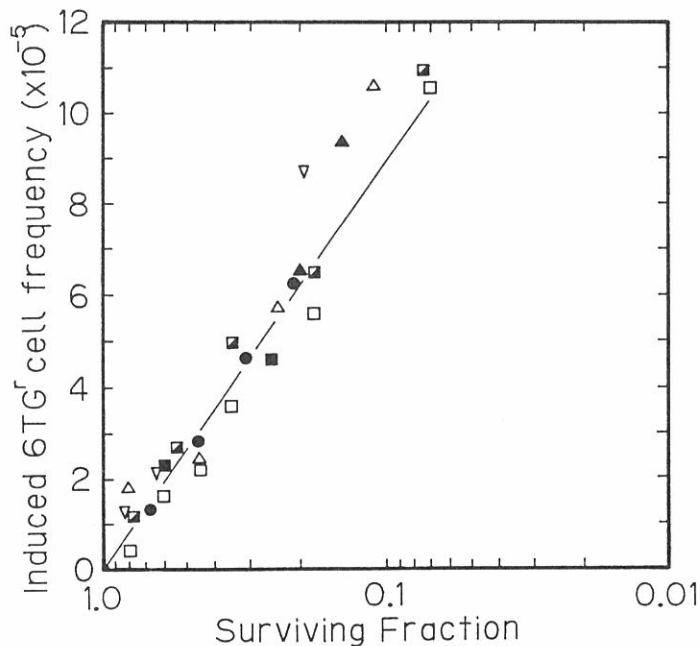


Figure 5. Relationship between X- or gamma ray-induced mutant frequency and surviving fraction. The latter was determined immediately after irradiation. The line was reproduced from Thacker and Cox.<sup>12</sup> Symbols are defined as follows: □ mouse lymphoma L5178y cells,<sup>20</sup> ▲ human mammary epithelial cells,<sup>17</sup> △ human skin fibroblasts,<sup>13</sup> ● human skin fibroblasts,<sup>16</sup> ■ human thyroid epithelial cells (present results), ▽ unstimulated human peripheral lymphocytes,<sup>23</sup> and ■ Chinese hamster V79 cells.<sup>21</sup>

図5 X線又はガンマ線誘発突然変異頻度と細胞生存率との関係。後者は照射直後に求めたものである。直線は Thacker 及び Cox<sup>12</sup> から再掲したもの。印は次のとおりである。□マウスリンパ腫 L5178y 細胞,<sup>20</sup> ▲ヒト乳腺上皮細胞,<sup>17</sup> △ヒト皮膚線維芽細胞,<sup>13</sup> ●ヒト皮膚線維芽細胞,<sup>16</sup> ■ヒト甲状腺上皮細胞(今回の結果), ▽非刺激ヒト末梢リンパ球,<sup>23</sup> ■チャイニーズハムスター V79 細胞。<sup>21</sup>

## REFERENCES

## 参考文献

1. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES-NATIONAL RESEARCH COUNCIL: The effects on populations of exposure to low levels of ionizing radiation. Report of the Advisory Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiations (BEIR Report). Washington, DC, NAS-NRC, 1980
2. WALBURG IIE Jr: Experimental radiation carcinogenesis. *Adv Radiat Biol* 4:209-54, 1976
3. DONIACH I: Carcinogenic effect of 100, 250 and 500 rad X-rays on the rat thyroid gland. *Br J Cancer* 30:487-95, 1974
4. YOKORO K, NAKANO M, ITO A, NAGAO K, KODAMA Y, HAMADA K: Role of prolactin in rat mammary carcinogenesis: Detection of carcinogenicity of low-dose carcinogens and of persisting dormant cancer cells. *J Natl Cancer Inst USA* 58:1777-83, 1977
5. BISIHOOP JM: The molecular genetics of cancer. *Science* 235:305-11, 1987
6. MILLER RC, HIRAOKA T, NAKAMURA N, TENOU H, KOPECKY KJ, JONES MP, GOULD MN: In vitro culture of human thyroid cells; methods and application to radiation biology. *J Radiat Res (Tokyo)* 26:269-82, 1985 (RERF TR 10-84)
7. COX R, MASSON WK, BANCE DA: An alternative to petri dishes in quantitative mutation experiments with cultured mammalian cells. *Mutat Res* 35:173-8, 1976
8. DIXON WJ, MASSEY FJ: Introduction to statistical analysis. Third Edition. New York, McGraw-Hill Book Company, 1969
9. HIRAOKA T, MILLER RC, GOULD MN, KOPECKY KJ, EZAKI H, TAKEICHI N, ITO T, JONES MP, CLIFTON KH: Survival of human normal thyroid cells after X-ray irradiation. *Int J Radiat Biol* 47:299-307, 1985 (RERF TR 13-84)
10. MILLER RC, HIRAOKA T, KOPECKY KJ, NAKAMURA N, JONES MP, ITO T, CLIFTON KH: Sensitivity to radiation of human normal, hyperthyroid and neoplastic thyroid epithelial cells in primary culture. *Radiat Res* 111:81-91, 1987 (RERF TR 2-86)
11. MILLER RC, ENNO M, YAMANE M, NISHIKI M: Recovery from X-ray induced damage in primary culture of human skin fibroblast cells. *J Radiat Res (Tokyo)* 26:339-45, 1985 (RERF TR 1-85)
12. THACKER J, COX R: Mutation induction and inactivation in mammalian cells exposed to ionizing radiation. *Nature* 258:429-31, 1975
13. CHEN DJ, STRINSTE GF, TOKITA N: The genotoxicity of alpha particles in human embryonic skin fibroblasts. *Radiat Res* 100:321-7, 1984
14. WANG Y, PARKS WC, WIGLE JC, MAHER VM, McCORMICK JJ: Fibroblasts from patients with inherited predisposition to retinoblastoma exhibit normal sensitivity to the mutagenic effects of ionizing radiation. *Mutat Res* 175:107-14, 1986
15. de RUIJTER YCEM, SIMONS JWIM: Determination of the expression time and the dose-response relationship for mutations at the HGPRT (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase) locus induced by X-irradiation in human diploid skin fibroblasts. *Mutat Res* 69:325-32, 1980
16. COX R, MASSON WK: X-ray-induced mutation to 6-thioguanine resistance in cultured human diploid fibroblasts. *Mutat Res* 37:125-36, 1976
17. GOULD MN: Radiation-induced specific locus mutations in human mammary epithelial cells. *Int J Radiat Biol* 47:387-91, 1985

18. YAMAMOTO T, NISHIMORI I, TAHARA E, SEKINE I: Malignant tumors in atomic bomb survivors with special reference to the pathology of stomach and lung cancer. *Gann Monogr Cancer Res* 32:143-54, 1986
19. SMEDS S, PETER HJ, JORTSO E, GERBER H, STUDER H: Naturally occurring clones of cells with high intrinsic proliferation potential within the follicular epithelium of mouse thyroids. *Cancer Res* 47:1646-51, 1987
20. NAKAMURA N, SUZUKI S, ITO A, OKADA S: Mutations induced by gamma-rays and fast neutrons in cultured mammalian cells. Differences in dose response and RBE with methotrexate and 6-thioguanine-resistant systems. *Mutat Res* 104:383-7, 1982
21. THACKER J, STRETCH A, GOODHEAD DT: The mutagenicity of alpha particles from plutonium-238. *Radiat Res* 92:343-52, 1982
22. CORN BW, LIBER HL, LITTLE JB: Differential effects of radical scavengers on X-ray-induced mutation and cytotoxicity in human cells. *Radiat Res* 109:100-8, 1987
23. SANDERSON BJS, DEMPSEY JL, MORLEY AA: Mutations in human lymphocytes: Effects of X- and UV-irradiation. *Mutat Res* 140:223-7, 1984
24. BEER JZ, JACOBSON ED, EVANS HH, SZUMIEL I: X-ray and UV mutagenesis in two L5178y cell strains differing in tumorigenicity, radiosensitivity and DNA repair. *Br J Cancer* 49 (Suppl VI):107-11, 1984