

C3H/Heマウスの放射線誘発骨髓性白血病と
染色体異常との関係についての研究

伴 信彦

C3H/Heマウスの放射線誘発骨髓性白血病と
染色体異常との関係についての研究

伴 信 彦

目 次

1. 研究目的	1
2. 研究方法	3
2-1. 全身照射マウスの骨髄細胞における初期染色体異常の解析	3
2-1-1. 実験動物および飼育条件	3
2-1-2. 放射線照射	3
2-1-3. 染色体標本の作成	4
2-1-4. 核型分析	5
2-1-5. 染色体ペインティング	6
(1) ペインティング・プローブ	6
(2) ハイブリダイゼーションおよび洗浄	6
(3) シグナルの検出	7
(4) 観察	7
2-2. インビボ実験による急性骨髄性白血病誘発と染色体異常の観察	7
2-2-1. 実験動物および飼育条件	7
2-2-2. 放射線照射および化学物質投与	8
2-2-3. 病理・組織学的観察	8
2-2-4. 染色体異常の観察	8
(1) 単離核標本の作成	9
(2) FISH	9
2-3. データの統計処理	11
2-3-1. 染色体異常の解析	11
2-3-2. 白血病誘発実験	12

3. 研究結果	13
3-1. 放射線による骨髓細胞の初期染色体異常	13
3-1-1. 核型分析による解析結果	13
(1) 2番染色体の放射線感受性	13
(2) 染色体切断点の分布	21
(3) 2番染色体の初期異常の種類	21
3-1-2. 染色体ペインティングによる解析結果	26
(1) 検出された異常の種類	26
(2) 線量-反応関係	26
(3) 染色体異常の頻度に関する個体差	33
3-2. 放射線による急性骨髓性白血病の誘発	33
3-2-1. 急性骨髓性白血病の誘発率	33
3-2-2. 急性骨髓性白血病マウスにおける2番染色体の異常	37
4. 考察	43
4-1. 放射線による急性骨髓性白血病の標的細胞とイニシエーション	43
4-2. 放射線による初期損傷としての骨髓細胞の染色体異常の特徴	44
4-2-1. 2番染色体の放射線感受性と個体差	44
4-2-2. 放射線による染色体切断点と染色体脆弱部位との関連	45
4-2-3. 2番染色体の初期異常の線量-反応関係	46
4-3. 急性骨髓性白血病マウスに見られる染色体異常と放射線による初期染色体異常	47
4-3-1. 急性骨髓性白血病のイニシエーションとしての2番染色体の異常	47
4-3-2. 急性骨髓性白血病誘発率と2番染色体異常の頻度	48
4-3-3. AMLマーカー染色体における欠損遺伝子	49
4-4. 動物実験をヒトへ外挿する際の問題点	50
4-4-1. マウスとヒトの造血機能の相違	51
4-4-2. マウス白血病とヒト白血病の相違	51

5. 結論	53
-------------	----

謝辭	55
----------	----

参考文献	56
------------	----

付録	64
----------	----

1. 研究目的

放射線による健康影響は、確定的影響と確率的影响に大別される。確定的影響には、いわゆるしきい線量（閾値）があり、比較的高い線量の被ばくをしない限り生じない¹⁾。したがって、通常の放射線利用で問題となるのは、確率的影响、すなわち発がんや遺伝的影響である。とくに、前者については、疫学調査の結果、数百mSv以上の放射線被ばくによってヒトにがんが誘発されるという直接的な証拠が得られている²⁾。

広島・長崎の原爆被爆者をはじめとする疫学調査は、放射線誘発がんの線量-反応関係や潜伏期間について、これまでに数多くの情報を提供し、安全基準を策定する上で主要な情報源となってきた。しかし、疫学調査では、高線量・高線量率被ばくでのみ統計的に有意な発がん率の増加が認められ、通常の防護で問題となるような低線量・低線量率については、発がんの有無を疫学調査から証明することができない。この点を明らかにするためには、動物実験等によって、放射線誘発がんの機構を解明することが不可欠である。

一般に、放射線防護上は放射線誘発がんにはしきい線量がなく、低線量においてもその発生確率はゼロではないと考えられている。これは、放射線損傷の標的がDNAであり、単一の細胞における突然変異から腫瘍が生じるという生物学的根拠に基づいている^{3,4)}。一方、近年の分子生物学の発展により、腫瘍細胞のゲノムDNAには特有な変化が生じていることが分かってきた^{5,6)}。とくに白血病については、病型特異的な染色体異常が数多く報告されており、異常部位に存在する白血病の原因遺伝子が明らかになってきている^{5,9)}。これらの遺伝子変化のうちいくつかは、発がんの初期に生じている可能性が指摘されており、特定の遺伝子に変化をもたらすようなゲノムDNAの損傷が、発がんの初発事象、すなわちイニシエーションに関連していると考えられる^{10,11)}。したがって、放射線がこのような遺伝子変化を生成し得るかどうかは、放射線誘発がんの機構を解明する上で重要なポイントとなる¹²⁾。

この問題に取り組む上で、マウスの急性骨髄性白血病（AML）は有用なモデルとなる。マウスでは、RFM, CBA, SJL/J, C3H/He等の系統で、放射線によってAMLが誘発され¹³⁻¹⁹⁾、AMLを発症したマウスの90%以上に、特有な2番染色体の異常が観察されている²⁰⁻²⁸⁾。また、放射線照射後のマウス骨髄細胞においては、AML発症よりかなり前の時期から、2番染色体の異常が比較的高頻度に認められることが報告されている²⁹⁻³⁴⁾。これらの事実は、放射線による染色体異常の生成が、AMLのイニシエーションに関係していることを示唆するものである。しかし、照射後最初の分裂像における染色体異常に着目した研究はほとんどなく^{34,35)}、AMLに特有な2番染色体の異常が、放射線照射後のきわめて早い時期に生成されるという実験的証拠は得られていない。

そこで本研究では、全身照射したC3H/Heマウスの骨髄細胞を用いて、照射24時間後の染色体異常の種類・頻度を系統的に解析した。また、インビボ実験によってAMLを誘発し、AMLマウスにおける2番染色体の異常についても解析した。これらの実験によって得られたデータに基づき、放射線による2番染色体の異常の生成とAML誘発との関係について検討した。

2. 研究方法

2-1. 全身照射マウスの骨髓細胞における初期染色体異常の解析

放射線照射後、最初の分裂像には、不安定型の異常を含め、様々な異常が存在している。そのため、分染法による核型分析では、複雑な異常を持つ一部の細胞について、異常染色体および染色体切断部位をすべて同定することができない。判定不能ということで、このような異常を除外してしまうと、染色体異常の線量-反応関係等に関する定量的解析を正確に行うことはできない。この問題を解決するために、本研究では核型分析と染色体ペインティングを併用した。核型分析によって、染色体間の放射線に対する相対的感受性と異常の種類に関する解析を行い、染色体ペインティングによって、2番染色体の異常の頻度に関する定量的解析を行った。

2-1-1. 実験動物および飼育条件

実験動物には、近交系のC3H/Heマウスを使用した。日本チャールス・リバー社においてSPF/VAFとして生産された8週齢のC3H/HeNCrj雄マウスを、日本生物材料センターを通じて購入し、コンベンショナルな条件の下で飼育した。飼育室は、10:00am~10:00pmを明期としてライトコントロールし、室温を $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度を60~65%に維持した。固形飼料（CMF：オリエンタル酵母工業）および水は自由に摂取させた。

2-1-2. 放射線照射

出生後 57 ± 1 日のマウスをプラスチック製の照射用ケージに入れ、東京大学原子力研究総合センターの生物照射装置を用いて、 ^{137}Cs γ 線を全身照射した。線源強度は、1994年12月の実験開始当時75.4TBqであった。核型分析用のマウスには3.0Gyを照射し、染色体ペインティング用のマウスには、1.0~3.0Gyの照射を行った。各群のマウスの匹数は、

先行研究^{29,36)}を参考に、Table 2-1に示すように設定した。いずれの照射においても、線量率は0.2Gy/minに設定した。

Table 2-1. Radiation doses and the number of mice used in this study.

Experiment	Dose (Gy)	Number of mice
Karyotyping analysis	0 (control)	5
	3.0	5
Chromosome painting analysis	1.0	10
	2.0	10
	3.0	15

2-1-3. 染色体標本の作成

照射終了24時間後にマウスを頸椎脱臼により屠殺し、速やかに大腿骨を摘出した。37℃のPBS(-)で洗浄した後、大腿骨の両端を切断して、37℃のRPMI1640 (Bio Whittaker) を注射器で注入し骨髓細胞をシャーレに取り出した。骨髓細胞を含んだ液をステンレスメッシュ (メッシュサイズ: 70 μ m径) に通してからガラス製遠沈管に移し、パスツールピペットでピペッティングを繰り返して、細胞塊をできるだけ細かくした。細胞浮遊液には、培養操作や人工的な増殖刺激を加えることなく、そのまま染色体標本の作成に使用した。すなわち、浮遊液を1000rpmで5分間遠心して細胞を集め、0.075M KClで30分間低張処理を行った後、メタノール/酢酸 (3:1 v/v) で細胞を固定した。遠心と固定液の交換を数回繰り返してから、適当量の固定液に細胞を再浮遊させ、洗浄・氷冷したスライドガラス上に滴下し、蒸気乾燥法³⁷⁾により展開した。スライドガラス上に展開した標本は、核型分析あるいは染色体ペインティングに使用するまで、-30℃で保存した。

2-1-4. 核型分析

照射後早期の分裂中期像には、複雑な染色体異常像が含まれているため、核型分析を行う上で、高品質な染色体分染像を安定して得られることが重要になる。本研究では、このような要求を満たす分染法として、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) とアクチノマイシンDによる二重染色法を採用した。この分染法では、染色体DNA中のA-T塩基対に結合する蛍光色素DAPIに対して、G-C塩基対に結合するアクチノマイシンDが蛍光吸収剤として作用するため、コントラストのよいQバンドパターンを得ることができる³⁹⁾。

2-1-3の方法で作成した染色体標本を0.6 μ g/mlのDAPI (McIlvaine緩衝液, pH7に溶解) で20分間染色し、蒸留水で軽くすすいだ後、0.3mg/mlのアクチノマイシンD (0.01Mリン酸緩衝液/1mMEDTA, pH7に溶解) で20分間対染色した。染色終了後、標本を蒸留水で再度すすぎ、McIlvaine緩衝液 (pH7) でマウントして、カバーガラスの周囲をネイルラッカーでシールした。

二重染色法を施した標本の観察は、落射蛍光顕微鏡オブチフォト2 (X2F-EFD2: ニコン) にUV-2Aフィルタカセット (励起: 330~380nm, 吸収: 420nm) を装着して行った。分染像をミニコピーフィルム (富士写真フィルム) 上に写真撮影し、そのネガをフィルムスキャナScanMaker 35t (MICROTEK) でパソコン (Macintosh Centris 650: アップルコンピュータ) に取り込んだ。画像処理ソフトPhotoshop (Adobe) を用いて、取り込んだ画像の明るさ、シャープネスを補正した後、画面上で核型分析を行った。二倍性細胞について、染色体型の異常をISCN方式 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) に従って記録し、マウスの標準バンドパターンに基づいて染色体切断部位を同定した^{39, 40)}。

観察に際しては、染色体の短縮が少なく、染色体同士の重なりのない、良好な分染像のみを対象とした。骨髓細胞を培養せずに染色体標本を作成したため、mitotic indexは総じて低く、このような分染像を多数得ることは困難であった。そこで、解析の正確さを期するために、1匹あたりの観察細胞数は50個とした。

2-1-5. 染色体ペインティング

(1) ペインティング・プローブ

マウスの2番染色体に特異的なビオチン化プローブを用いて、染色体ペインティングを行った。3Gy照射群にはCLONTECH社のプローブを使用した。その後このプローブが製造中止となったため、1Gyおよび2Gy照射群にはCambio社のプローブを使用した。

(2) ハイブリダイゼーションおよび洗浄

2-1-3で作成した標本を70℃の70%ホルムアミド/2×SSCで2分間処理して染色体DNAを一本鎖に解離させ、氷冷したエタノールシリーズ(70, 90, 100%, 各2分間)を通してから風乾した。このスライドに、以下の条件でプローブのハイブリダイゼーションと洗浄を行った。

① CLONTECH社プローブ

プローブDNAを75℃で5分間処理して熱変性させた後、37℃で90～120分間インキュベートした。スライド1枚あたり15 μ lのプローブ溶液をのせ、カバーガラス(24×45mm)をかぶせて周囲を標本封入剤(ダイヤテックス:松浪硝子工業)でシールし、37℃のインキュベータ内に24時間放置した。ハイブリダイゼーション終了後、55%ホルムアミド/2×SSCで3回、1×SSCで3回、いずれも43℃で5分間ずつ洗浄処理を行い、室温の4×SSCに5分間以上浸した。

② Cambio社プローブ

プローブDNAを65℃で10分間処理して熱変性させた後、37℃で30～60分間インキュベートした。スライド1枚あたり20 μ lのプローブ溶液をのせ、カバーガラス(24×55mm)をかぶせて周囲を標本封入剤でシールし、42℃のインキュベータ内に16時間放置した。ハイブリダイゼーション終了後、50%ホルムアミド/0.5×SSCで2回、2×SSCで2回、いずれも42℃で5分間ずつ洗浄処理を行った。

(3) シグナルの検出

非特異的シグナルをブロックするために、洗浄処理の終わったスライドに4×SSC / 3% BSA, fraction V (Sigma) / 0.1% Tween-20 (Sigma) をのせ、パラフィルムをかぶせて、37℃で20分間インキュベートした。シグナルの検出には5 μ g/mlのfluorescein-avidin DCS (Vector Laboratory) を、増幅には5 μ g/mlのbiotinylated anti-avidin D (Vector Laboratory) をそれぞれ使用し、いずれも37℃で20分間インキュベートした後、42~45℃の4×SSC / 0.1% Tween-20で、3分間ずつ3回洗浄した。シグナルの増幅は、CLONTECH社プローブについては2回、Cambio社プローブについては1回行った。以上の処理を終えたスライドを、0.2 μ g/mlのDAPI (McIlvaine緩衝液, pH7に溶解) で20分間対染色し、蒸留水ですすいだ後、1~2 μ g/mlのヨウ化プロピジウムを含んだVectashield (Vector Laboratory) でマウントした。

(4) 観察

標本の観察は、落射蛍光顕微鏡オブチフォト2にUV-2AフィルタカセットおよびB-2Aフィルタカセット（励起：450~490nm、吸収：520nm）を装着して行った。標本のIDはすべてブラインドにし、観察中はそれぞれの標本がどの個体のものであるかわからないようにした。二倍性細胞を観察対象とし、染色体型の異常が認められた分裂像はすべて写真撮影した。染色体異常はPAINT (Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology) 方式に基づいて分類・記録したが、同分類方式では対象外となる欠失についても記録した⁴⁰⁾。

2-2. インビボ実験による急性骨髄性白血病誘発と染色体異常の観察

2-2-1. 実験動物および飼育条件

染色体異常の解析と同様に、C3H/HeNCrjマウスを51匹購入し、2-1-1に示した条件で、コンベンショナルな条件下で飼育した。1ケージに4匹ずつ群居させたが、闘争が見られ

た場合には、適宜隔離して単独で飼育した。

2-2-2. 放射線照射および化学物質投与

出生後57～62日のマウスをプラスチック製の照射用ケージに入れ、東京大学原子力研究総合センターの生物照射装置を用いて、 ^{137}Cs γ 線3Gyを全身照射した。線量率は0.2Gy/minに設定した。AMLの誘発率を高めるために、照射終了直後に酢酸プレドニゾン（和光純薬）1mgを皮下注射した^{18, 19)}。また、SJL/Jマウスにおいて、M-CSF投与によるAML誘発増強効果が報告されていることから、10匹については、放射線照射とプレドニゾン投与に加えて、照射14日後から2週間（5日/週）に渡って、Recombinant Murine M-CSF（R&D Systems）を約500U/日ずつ腹腔内投与した⁴²⁾。

2-2-3. 病理・組織学的観察

全身状態を毎日定期的に観察し、顕著な衰弱が認められた場合には、頸椎脱臼により屠殺・解剖した。死亡した場合には、発見次第解剖した。肉眼的な病理観察を行うとともに、肝臓・脾臓のスタンプ標本のペルオキシダーゼ反応および病理組織学的観察によって、AML発症の有無を判定した。組織はブアン固定し、パラフィン包埋した後、ミクロームで3～5 μm 厚に薄切して、ヘマトキシリン・エオジン染色により観察した。

2-2-4. 染色体異常の観察

AMLを発症したマウスについては、いずれも症状が急激に進行し死に至ったため、新鮮な骨髓組織が入手不可能であり、染色体標本を作成することができなかった。そこで、パラフィン包埋した脾臓の細胞に対して間期核FISH（fluorescence in situ hybridization）を行うことにより、2番染色体の異常について調べた。

マウスAMLにおける2番染色体の異常にはいくつかのパターンがあるが、CおよびF領域に切断を生じていることが多い^{21, 22, 27, 28, 31, 32)}。そこで、2C領域にマップされる2種類のBACクローン(クローンNo. 61, 471)のDNAを、英国National Radiological Protection BoardのBouffler博士より譲り受け、FISH用プローブとして使用した。CBA/HマウスのAMLでは、異常な2番染色体において、クローン61が欠損し、クローン471が保持されていることが多い⁴³⁾。

(1) 単離核標本の作成

Hedleyらの方法⁴⁴⁾に若干の変更を加えて、単離核標本を作成した。脾臓のパラフィン包埋標本を30~50 μ m厚に切り出し、脱パラフィン・再水和させた後、ペプシンで消化して、細胞浮遊液を調整した。それをメタノール/酢酸(3:1 v/v)で固定し、蒸気乾燥法でスライドガラス上に展開した。手順の詳細は、Fig. 2-1に示すとおりである。

(2) FISH

約500ngのBAC DNAを、ニックトランスレーションキット(Boehringer)を用いて、ピオチン-16-dUTP(Boehringer)で標識した。ピオチン標識DNA溶液に、10~16 μ gのサケ率丸DNA(Sigma)および5~10 μ gのマウスCOT-1 DNA(Gibco BRL)を添加してエタノール沈澱させた後、25 μ lの50%ホルムアミド/10%硫酸デキストラン/2×SSCに溶解して、プローブ溶液とした。プローブ溶液を75℃で10分間処理して熱変性させた後、37℃で60分間インキュベートした。

プローブの浸透を高めるために、(1)で作成した標本を90℃の50%グリセロール/0.1×SSCで5分間処理し、室温の2×SSCで冷却してから、アルコールシリーズで脱水・風乾した⁴⁵⁾。続いて、75℃の70%ホルムアミド/2×SSCで5分間処理して染色体DNAを一本鎖に解離させた。スライド1枚当たり3~5 μ lの変性プローブ溶液をのせ、カバーガラス(18×18mm)をかぶせて周囲を標本封入剤でシールし、37℃のインキュベータ内に2晩放置した。ハイブリダイゼーション後の洗浄とシグナルの検出は、2-1-5の染色体ペイ

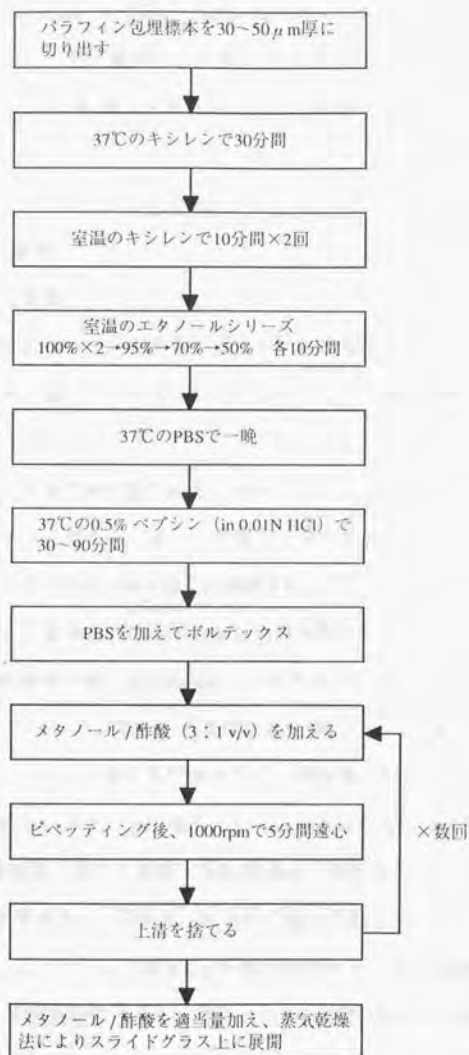


Fig. 2-1. Protocol of preparing separate cell specimens from paraffin embedded tissues.

ンティングに準じたが、ブロッキング用のBSAの代わりにブロックエース（大日本製薬）を使用し、fluorescein-avidin DCSおよびbiotinylated anti-avidin Dの濃度を、それぞれ20 μ g/ml、1 μ g/mlとした。また、洗浄の際の温度は37℃に設定した。標本の観察は、落射蛍光顕微鏡オプチフォト2にB-2Aフィルタカセットを装着して行った。

2-3. データの統計処理

2-3-1. 染色体異常の解析

染色体異常の頻度について、個体差に関する統計的検定を行った。独立性の χ^2 検定によって個体差の有無を調べ、異常値の判定にはSmirnov-Grubbsの棄却検定を適用した⁴⁶⁾。⁴⁷⁾有意水準は5%に設定した。

核型分析では、染色体切断の数をRCL (relative corrected length) に基づいて解析した。染色体切断がランダムに起こると仮定した場合、染色体あたりの切断数は当該染色体の相対長に比例するはずである。RCLはこの解析を行う際に用いられる染色体の相対長で、異常の種類に応じて、各染色体の物理的な相対長を補正したものである。具体的には、染色体異常を、染色体間交換 (interchange)、染色体内交換 (intrachange)、端部欠失 (terminal deletion) の三つに分類し、それぞれの分類について、総切断数をRCLに応じて各染色体に分配したときの値を期待値として、観察値と比較した。RCLの値は、分裂中期の各染色体の長さに関する文献値を用いて、Savageの方法により計算した^{40, 48)}。

2番染色体の異常頻度に関する線量-反応関係は、染色体ペインティングのデータを用いて解析した。異常頻度は二項分布 (n_j, p_j) に従うと仮定して、二項回帰によりフィッティングを行った。ここで、 n_j は線量群jのi番目のマウスにおける観察細胞数であり、 p_j は線量群jにおける異常誘発率である。フィッティングのパラメータは、SAS GENMOD Procedureを用いて、最尤法により求めた。

2-3-2. 白血病誘発実験

病理・組織学的観察の結果に基づいて、各実験群におけるAMLの誘発率を調べた。

生存曲線の解析には、統計解析ソフトJMP (SAS Institute) を使用し、Kaplan-Meier法により行った。その際、闘争による咬傷等、外的要因がもとで死亡した個体は、センサリングの対象とした。

3. 研究結果

3-1. 放射線による骨髄細胞の初期染色体異常

3-1-1. 核型分析による解析結果

(1) 2番染色体の放射線感受性

核型分析の結果をTable 3-1にまとめた。3Gy照射群では、合計250個の観察細胞のうち101個の細胞に構造的異常が認められた。101個の異常細胞中には合計238の染色体切断点が同定され、そのうち16が2番染色体由来であった。非照射群では、同数の観察細胞中に3個の異常細胞が認められたが、その内訳は15, 17番の染色分体切断が1例ずつと17番染色体の端部欠失が1例であり、2番染色体の異常はなかった。

Table 3-1. Number of chromosome-type aberrations in full karyotyping analysis.

Dose (Gy)	Number of mice	Metaphases analyzed	Metaphases with structural aberrations*	Number of breakpoints*
0	5	250	3 (0)	3 (0)
3.0	5	250	101 (12)	238 (16)
Total	10	500	104 (12)	241 (16)

* The number of aberrations / breakpoints of chromosome 2 are shown in parentheses.

照射群の5匹のマウス（マウスA, B, C, D, E）について、染色体ごとの切断数をFig.3-1～5に示す。また、Table 3-2は、2番染色体とそれ以外の染色体に分けて、切断数を5匹の間で比較表示したものである。Fig.3-1～5において、染色体ごとの切断数が比較的ランダムにばらついている中で、マウスEでは2番染色体の切断数が多い傾向が認められる。そこで、Table 3-2に独立性の χ^2 検定を適用すると、独立性は棄却され（ $p = 0.045$ ）、2番染色体切断の相対頻度に個体差があることが示唆された。 χ^2 値の分析から、有意差に寄与したのはマウスEであることがわかった。実際、5匹全体での2番染色体の相対切断数（16/238）を母比率と仮定した場合、マウスEにおいて観察値以上の2番染色体切断

を生じる二項確率はかなり低い値となる ($= 0.026$)。Smirnov-Grubbsの棄却検定では、マウスEは異常値とは判定されなかったが、これは同検定法が、対象データ数が少ない場合に検出力が落ちることが関係している。マウスEについて32個の細胞を追加観察したところ、染色体ごとの切断数の分布はFig. 3-6のようになり、他の染色体の切断数がFig. 3-5よりも均等化する中で、2番染色体の突出が一層際立っている。以上のことから、マウスEでは2番染色体の放射線感受性が有意に高いと考えられる。

Table 3-2. Number of chromosomal breakpoints in the irradiated mice.

Mouse ID	Chromosome 2	Others	Total
A	4 (5.6%)	68	72
B	1 (2.3%)	42	43
C	4 (8.2%)	45	49
D	0 (0.0%)	30	30
E	7 (15.9%)	37	44
Total	16	222	238

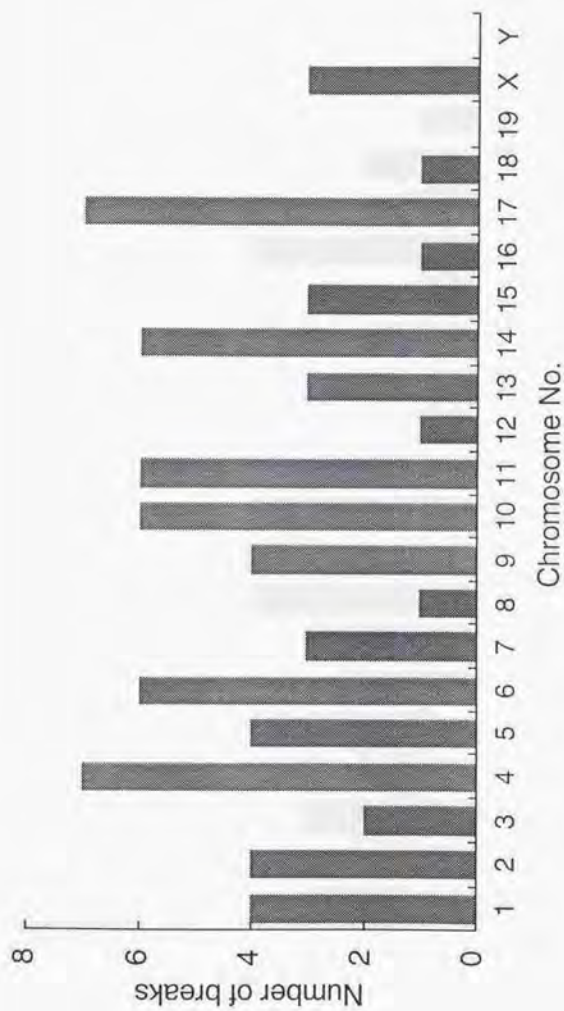


Fig. 3-1. Number of chromosomal break points in each chromosome of Mouse A.

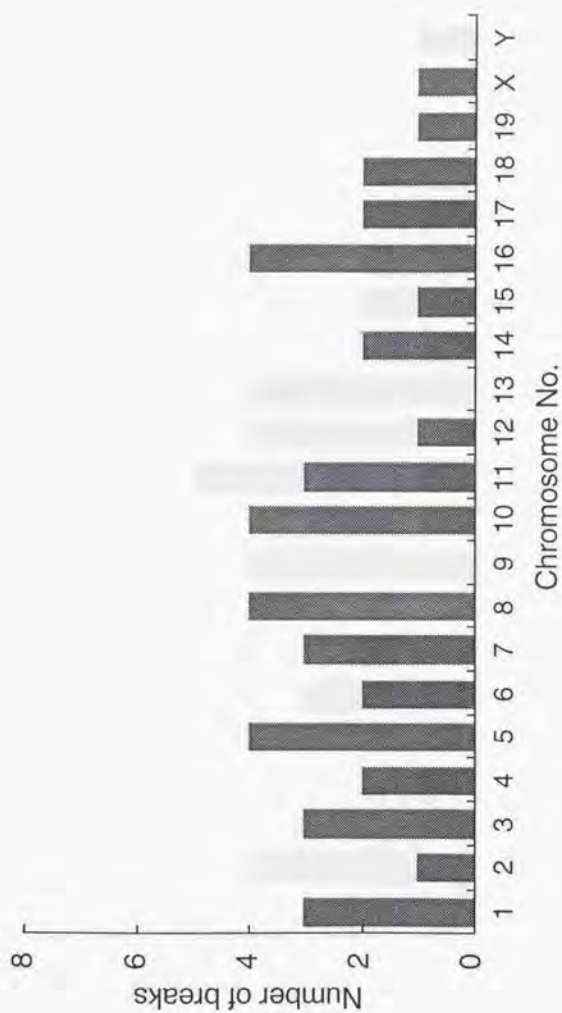


Fig. 3-2. Number of chromosomal breakpoints in each chromosome of Mouse B.

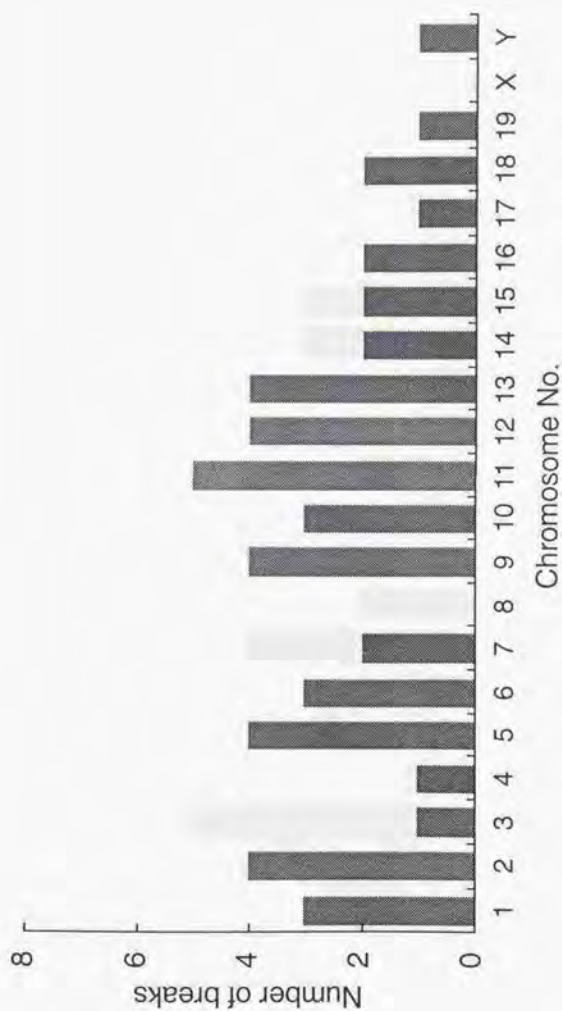


Fig. 3-3. Number of chromosomal breakpoints in each chromosome of Mouse C.

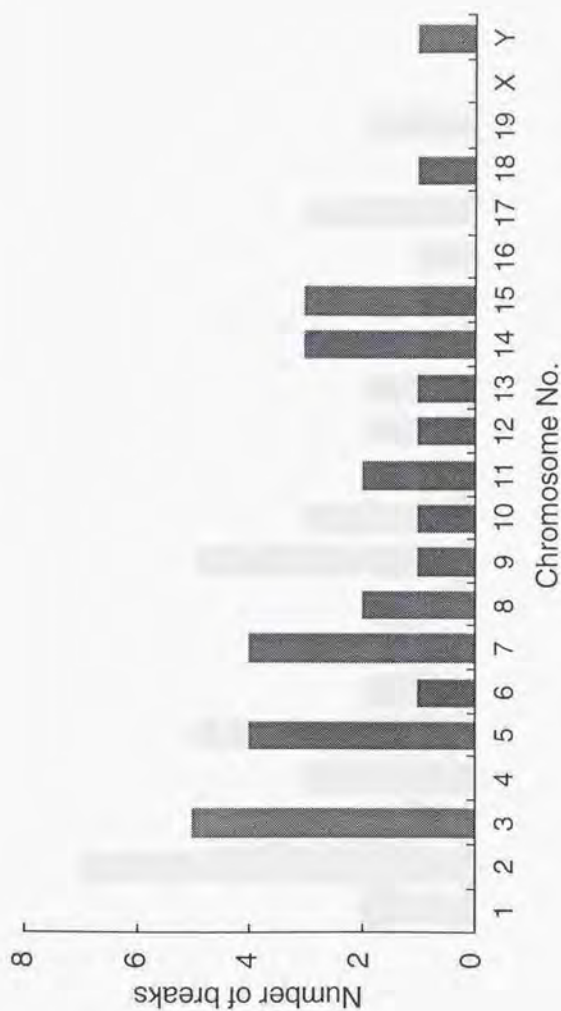


Fig. 3-4. Number of chromosomal breakpoints in each chromosome of Mouse D.

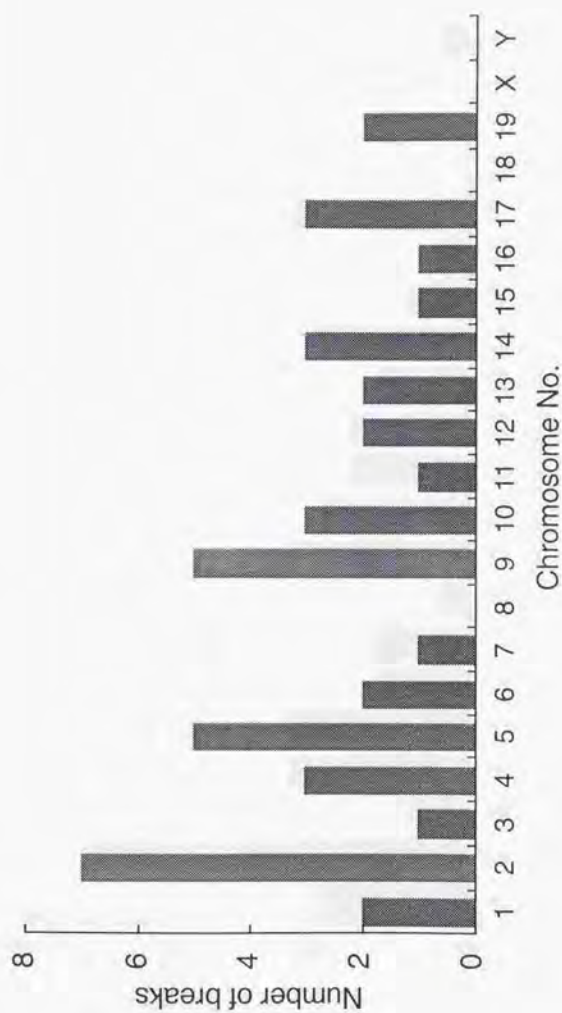


Fig. 3-5. Number of chromosomal breakpoints in each chromosome of Mouse E.

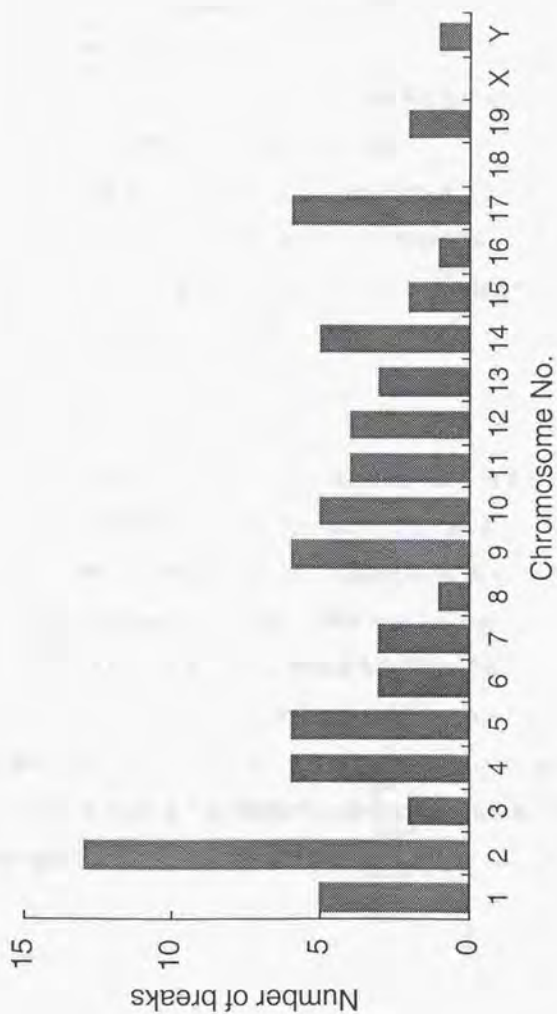


Fig. 3-6. Number of chromosomal breakpoints in each chromosome of Mouse E (Including additionally karyotyped 32 cells).

(2) 染色体切断点の分布

Fig. 3-7は、2番染色体上の切断点について、染色体領域ごとの頻度をまとめたものである。マウスEについては、追加観察した32の分裂像のデータが含まれている。マウスA～Dでは切断点が比較的ばらついているのに対し、マウスEでは2Cおよび2F領域に切断点が偏っていることがわかる。とくに2F領域は、2番染色体の全体長の8.5%を占めるにすぎないが、マウスEの切断点の38%が集中している。

2番染色体以外の切断点の分布については、付録にデータをまとめた。全体として切断点がばらついている中で、クラスターと思われる領域がいくつか存在する。しかし、いずれも染色体あたりの切断数が十分ではないため、ゲノム全体でのホットスポットの有無に関して、統計的な解析は行わなかった。

(3) 2番染色体の初期異常の種類

2番染色体に構造的異常が見られたすべての細胞について、核型をTable 3-3に示す。2番染色体には、様々な種類の異常が生じていたが、マウスEに関しては10例中7例が欠失であり、そのうち3例が中間部欠失であった。2番染色体の切断数について、異常の種類ごとにRCL (relative corrected length) に基づく解析を行うと、観測値と期待値はFig. 3-8のようになり、マウスEでは欠失、とくに中間部欠失の頻度が高いことがわかる。

Table 3-3の中で、下線を引いたのは、先行研究で明らかにされているAMLに特異的な2番染色体と同型の異常（以下、マーカー染色体と呼ぶ）である。Fig. 3-9にその分染像の例を示す。マウスEでは82個の観察細胞中に5個のマーカー染色体が認められたのに対し、マウスA～Dでは200個の観察細胞中に2個認められただけであった。

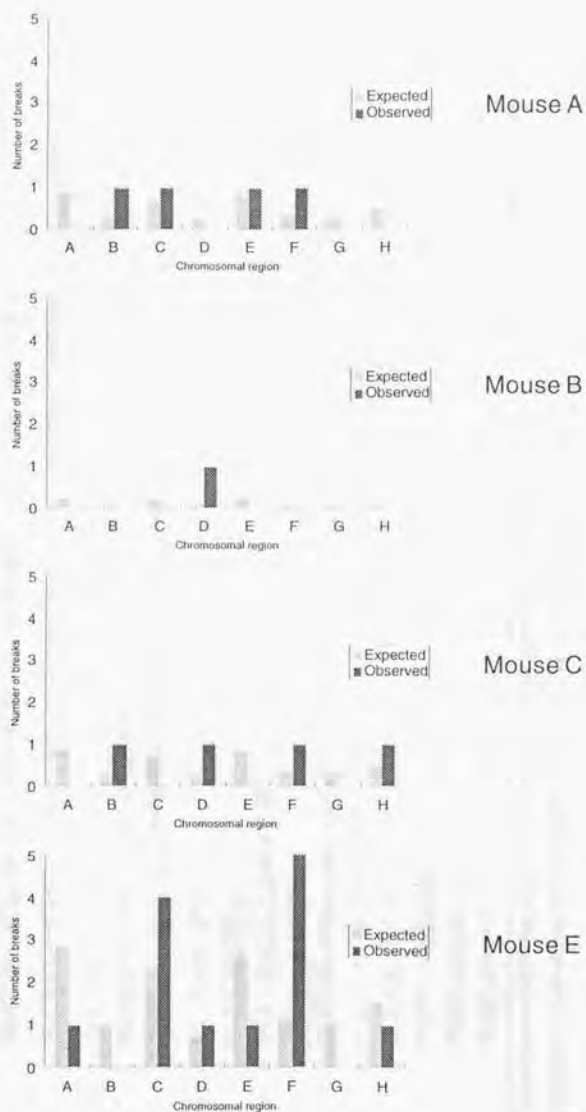


Fig. 3-7. Distribution of the breakpoints in chromosome 2. Expected values were calculated based on relative lengths of chromosomal regions. For Mouse E, data of additionally karyotyped cells are included. In Mouse D, no break was observed in chromosome 2.

Table 3-3. Karyotypes of the cells carrying chromosome 2 aberrations^{*1}.

Mouse ID	Karyotype ^{*2}
A	39,XY,-1,t(2;4)(4;17)(F2orf3;ter B1;ter),del(17)(B1) 40,XY,del(2)(B)
B	40,XY,del(2)(C2),del(2)(E1),inv(6)(D3G2),del(14)(B),del(15)(D1E1),del(X)(A2),ace(X) 36,XY,t(2;10)(D:B4),del(5)(B1),t(6;17)(C1:C),del(7)(D1orf2),dic(7;10)(D3orfE1:B4),t(6;16)(C1:C1.1),del(17)(C)
C	39,XY,dic(2;11)(H:D),ace(?) 38,X,t(2;7)(7;13)(B:B1cen:A3.3),del(Y) 38,XY,-16,del(2)(DF1),del(10)(B2),t(13;14)(C2:E1),ace(?),ace(?)
E	40,XY,del(2)(E2F1) 40,XY,del(2)(C2) 40,XY,del(2)(C1.1),del(19)(B) 40,XY,del(2)(C1F) 39,XY,dic(2;10)(A3;ter),ace(2) 41,XY,+4,t(2;4;7)(F:A2;E3) 39,XY,dic(2;17)(ter:E3),t(1;13)(D:A3.2) 39,XY,-1,del(2)(DF) 40,XY,del(2)(C1.1) 40,XY,del(2)(F3)

*1 82 metaphases were karyotyped for Mouse E, 50 metaphases each for the other mice.

*2 Aberrations of chromosome 2 identical to AML markers were underscored.

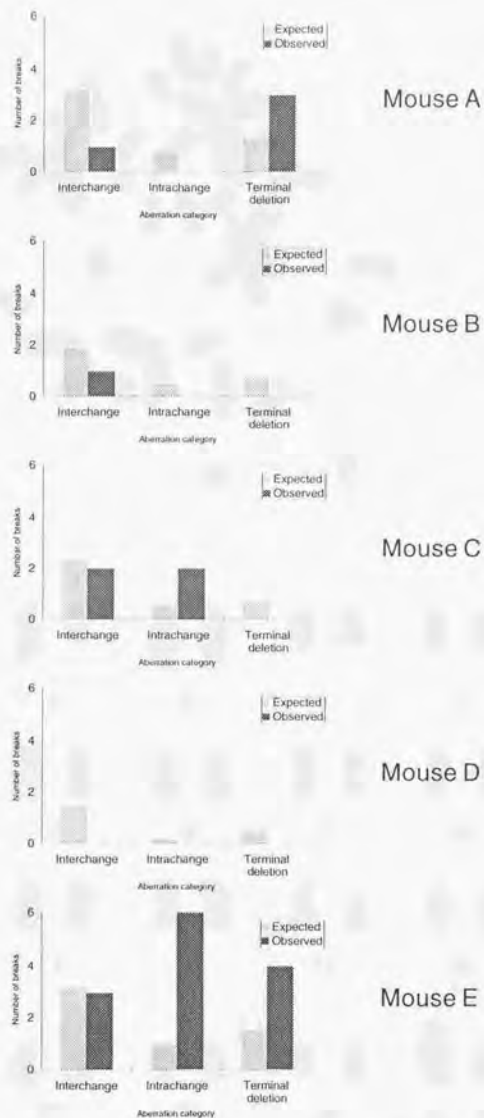


Fig. 3-8. Analysis of chromosome 2 breakpoints based on RCLs. For Mouse E, data of additionally karyotyped cells are included.

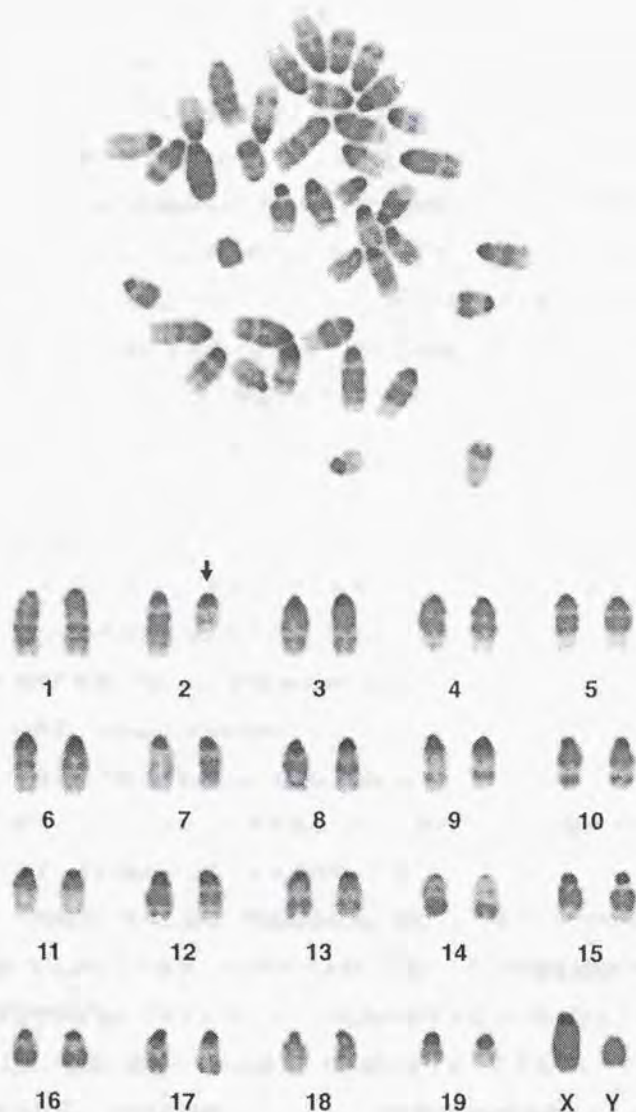


Fig. 3-9. An example of AML marker chromosome found in a bone marrow cell 24 hours after irradiation (40,XY,del(2)(C1F)).

3-1-2. 染色体ペインティングによる解析結果

(1) 検出された異常の種類

染色体ペインティングにより観察された2番染色体の初期異常の頻度を、Table 3-4にまとめた。様々な種類の異常が認められ、いずれの異常も線量とともに増加する傾向が見られた。Fig. 3-10に相互転座の例を、Fig. 3-11に欠失の例を示す。異常の種類としては、交換型の異常 (t, dic, ins) の頻度が高く、それに対して欠失 (del) の頻度は交換型異常の6割程度であった。しかし、ペインティングでは小さな欠失は検出できないため、欠失の頻度は若干過少評価になっている可能性も考えられる。また、ペイントした染色体ではDAPIのQバンドパターンが不明瞭であることが多く、欠失に関して中間部欠失と端部欠失を区別することは不可能であった。

(2) 線量-反応関係

染色体ペインティングのデータを定量的に解析する上で、ペイントされた染色体の異常に関して次の三つの指標を選定した。

- ・異常細胞の頻度 (frequency of the aberrant cells)
- ・欠失の頻度 (frequency of deletions)
- ・カラー接合部の頻度 (frequency of color junctions)

カラー接合部とは、ペイントされた染色体とペイントされていない染色体が接合している部分のことで、その頻度は交換型異常の指標となる⁴¹⁾。

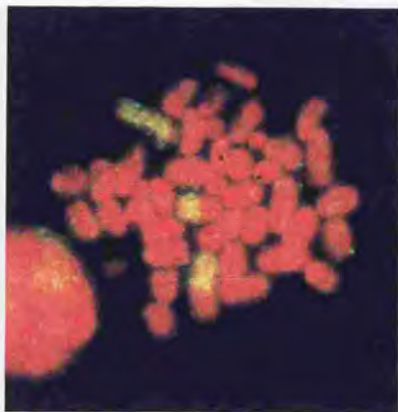
これら三つの指標に対する線量-反応関係をFig. 3-12~14に示す。いずれの線量-反応関係においてもかなりの個体差が認められるが、全体としては単調増加型の曲線になっている。核型分析において非照射群には2番染色体の異常が見られなかったことから、切片を0として、直線、直線-二次曲線、二次曲線の各モデルによるフィッティングを試みた。その結果、いずれの指標についても、二次曲線モデルは直線モデルよりもよくフィットしたが、直線-二次曲線モデルとの有意差は認められなかった。したがって、統計学的には、線量-反応関係はすべて二次曲線と考えることが妥当である。

Table 3-4. Number of the aberrations detected by chromosome 2-specific composite probes.

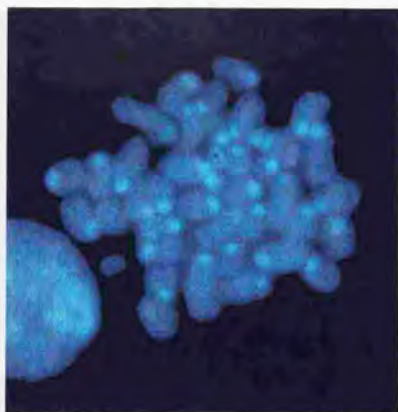
Dose (Gy)	Number of mice	Metaphases observed	Aberrant cells* ¹	Number of aberrations (frequency : per cell)					
				t	dic	ins	del	ace* ²	color junction
1.0	10	1571	19 (1.2%)	6 (0.004)	4 (0.003)	1 (0.001)	9 (0.006)	9 (0.006)	15 (0.010)
2.0	10	1393	84 (6.0%)	41 (0.029)	12 (0.009)	1 (0.001)	35 (0.025)	56 (0.040)	68 (0.049)
3.0	15	1096	99 (9.0%)	48 (0.044)	28 (0.026)	5 (0.005)	45 (0.041)	54 (0.049)	101 (0.092)
Total	35	4060	202	95	44	7	89	119	184

*¹ Cells carrying structural aberrations of chromosome 2.

*² Including acentric fragments, acentric rings and dots.

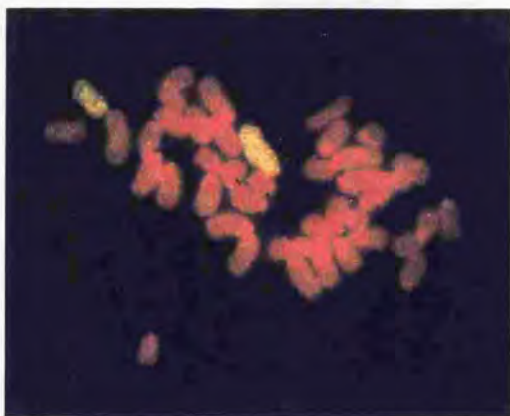


(a) fluorescein-painted chromosome 2 with PI counterstain

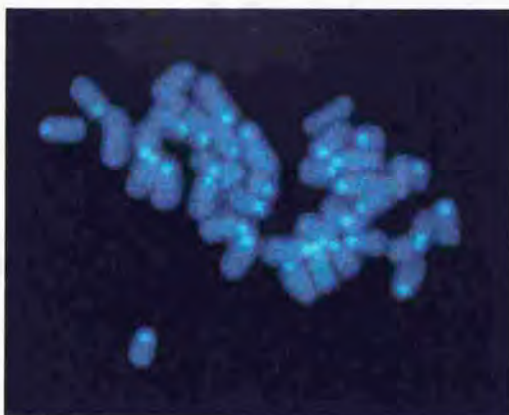


(b) DAPI counterstain

Fig. 3-10. An example of reciprocal translocation detected by chromosome painting.



(a) fluorescein-painted chromosome 2 with PI counterstain



(b) DAPI counterstain

Fig. 3-11. An example of deletion detected by chromosome painting.

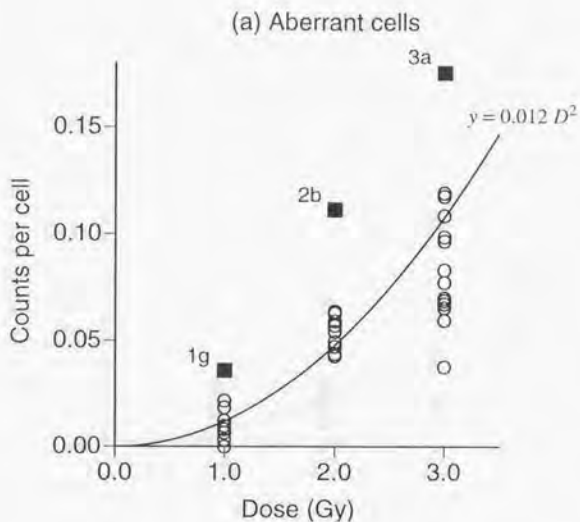


Fig. 3-12. Relationship between whole-body dose and frequency of chromosome 2 aberrations. Each point corresponds to an individual mouse. Three mice showing significantly large number of aberrant cells are distinguished with black square markers (Mice 1g, 2b and 3a).

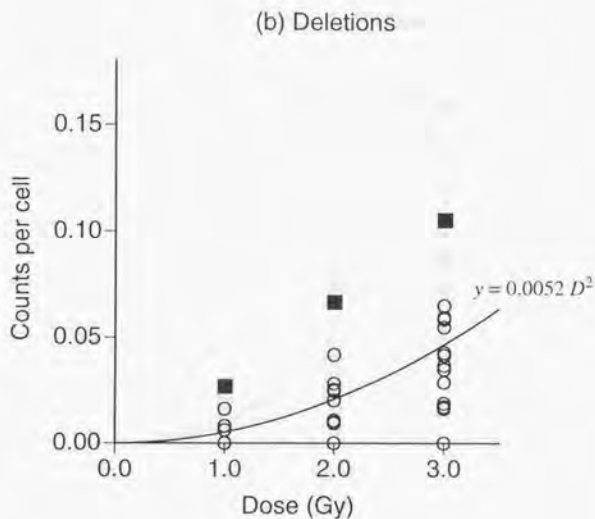


Fig. 3-13. Relationship between whole-body dose and frequency of chromosome 2 aberrations. Each point corresponds to an individual mouse. Three mice showing significantly large number of aberrant cells are distinguished with black square markers (Mice 1g, 2b and 3a).

(c) Color junctions

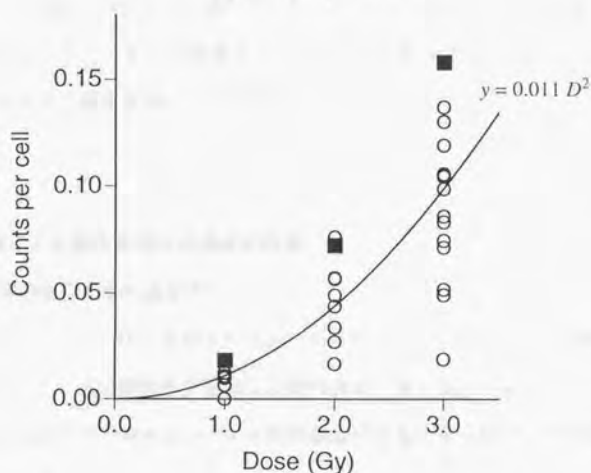


Fig. 3-14. Relationship between whole-body dose and frequency of chromosome 2 aberrations. Each point corresponds to an individual mouse. Three mice showing significantly large number of aberrant cells are distinguished with black square markers (Mice 1g, 2b and 3a).

(3) 染色体異常の頻度に関する個体差

Fig. 3-12において、異常細胞の頻度を個体間で比較すると、各線量群に1匹ずつ、突出して高い値を示す個体が見られる（マウスID：1g, 2b, 3a）。 χ^2 検定では、どの線量群についても有意差は認められなかったが、Smirnov-Grubbsの棄却検定では、片側検定でこの3匹は異常値であると判定された。Fig. 3-13の欠失の頻度に関しても同様の検定結果が得られたが、Fig. 3-14のカラー接合部の頻度については、いずれの検定法でも個体差は検出されなかった。これらの結果から、マウス1g, 2b, 3aの3匹において、2番染色体の異常の中でも欠失の頻度が高いことがわかる。

3-2. 放射線による急性骨髄性白血病の誘発

3-2-1. 急性骨髄性白血病の誘発率

3Gy+ブレドニゾロン投与群および3Gy+ブレドニゾロン+M-CSF投与群の生存曲線をFig. 3-15に示す。M-CSF投与を追加した群の方が、若干寿命が短くなる傾向が認められたが、Log-RankおよびWilcoxonのいずれの検定法でも、両実験群の生存曲線には有意差は検出されなかった。

Table 3-5は、AMLを発症したマウスの潜伏期等をまとめたものである。3Gy+ブレドニゾロン投与群において4匹、3Gy+ブレドニゾロン+M-CSF投与群において1匹の個体に、AMLが認められた。AMLと判定されたマウスでは、肉眼的な病理観察によって肝脾腫と軽度のリンパ節腫大が認められ、組織標本において、骨髄系の白血病細胞が脾臓および肝臓に浸潤している像が観察された（Fig. 3-16, 17）。センサリングを行った事例を除外してAMLの誘発率を求めると、Table 3-6に示すように、3Gy+ブレドニゾロン投与群では11%、3Gy+ブレドニゾロン+M-CSF投与群では10%となり、M-CSF投与による誘発率の上昇は認められなかった。照射からAMLによる死亡までの潜伏期は、3Gy+ブレドニゾロン投与群では302～422日であり、3Gy+ブレドニゾロン+M-CSF投与群の1匹については307日であった。

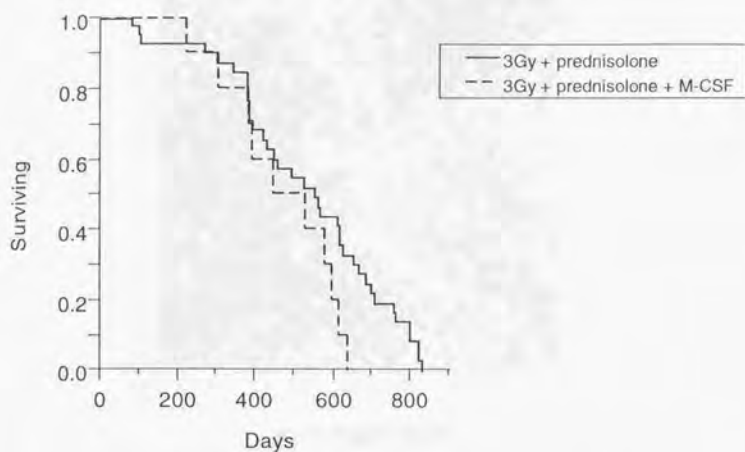
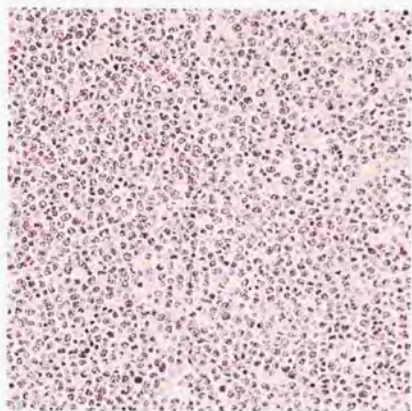


Fig. 3-15. Survival curves of the mice in the AML induction experiment.

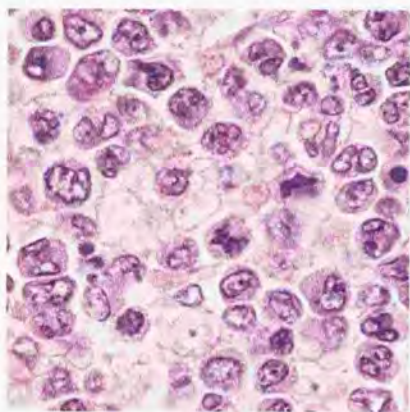
Table 3-5. Description of AML-induced mice.

Treatment	Latency (days)*	Body weight (g)	Spleen weight (g)	Liver weight (g)
3Gy + prednisolone	302	26.9	0.74	—
	341	25.2	0.77	3.31
	382	28.4	0.84	2.72
	422	24.5	0.33	1.81
3Gy + prednisolone + M-CSF	307	33.2	0.88	4.32

* Time between irradiation and leukemic deaths.

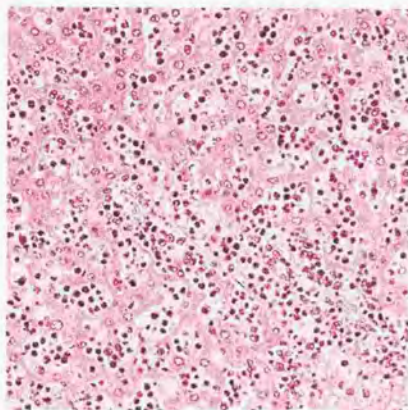


(a) low magnification

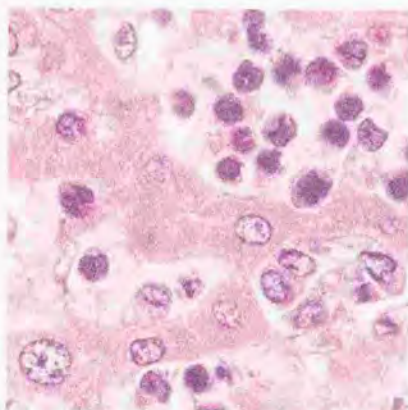


(b) high magnification

Fig. 3-16. Leukemic cells in spleen (AML induced by 3Gy + prednisolone + M-CSF).



(a) low magnification



(b) high magnification

Fig. 3-17. Infiltration of leukemic cells in liver (AML induced by 3Gy + prednisolone + M-CSF).

C3H/Heマウスは肝腫瘍を好発することが知られており、本研究においても、照射後400日ごろから発生が認められ、550日以降は大半のマウスに観察された。しかし、AMLはいずれも、肝腫瘍が優勢になる前に発症しており、死因の競合の影響は少ないものと考えられるため、AML誘発率の算定に際して、とくに補正を行う必要はない。

Table 3-6. Incidence of AML.

Treatment	Number of treated mice	Number of censored mice	Number of AML mice	AML incidence
3Gy + prednisolone	41	4	4	11%
3Gy + prednisolone + M-CSF	10	0	1	10%

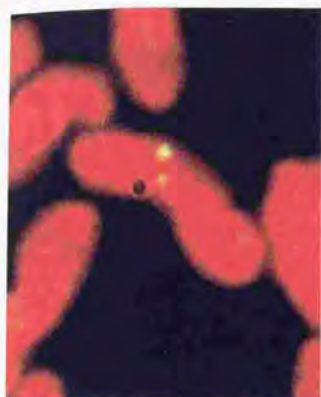
3-2-2. 急性骨髄性白血病マウスにおける2番染色体の異常

Fig. 3-18, 19に示すように、BACクローン61、471とも、2番染色体のC領域にマップされることが確認された。これらのクローンをプローブとして、パラフィン包埋組織へのFISHを行った結果、ハイブリダイゼーションが良好な細胞では、Fig. 3-20に示すような明瞭なシグナルが得られた。このような特異的シグナルが認められた細胞を1標本につき50個以上観察し、シグナル数に応じて集計した結果を、Table 3-7およびFig. 3-21に示す。なお、AMLを発症した5匹のマウスのうち1匹については、ペプシン処理の条件を加減しても細胞核の損傷が著しく、FISH用の標本を作成することができなかった。そのため、Table 3-7およびFig. 3-21には、他の4匹とコントロール（非照射、7月齢）についてのデータを示してある。

2番染色体に欠失がなければ、いずれのプローブを用いた場合でも、二倍性細胞では2個のシグナルが認められるはずである。しかし、Table 3-7およびFig. 3-21から明らかに、コントロールについても、シグナル数が1の細胞と2の細胞がほぼ同数認められる。これは、ブアン固定によるDNA損傷に加えて、ハイブリダイゼーションの効率が

100%ではないために、正常細胞でも1つのシグナルしか検出されない例が40~50%あることを示している。シグナル数の分布を比較すると、コントロールおよびAML-2では、クローン61と471の間に有意差は認められないが、他の3例のAMLでは、クローン61について、シグナル数が1の細胞が明らかに多い（いずれも、 χ^2 検定で $p < 0.0001$ ）。クローン61は471よりも2番染色体の末端側に位置することから、この3匹では、2番染色体の一方のホモログにおいて、C領域に切断点があり、プローブ61を含む染色体領域が欠失していることがわかる。シグナル数が2の細胞も少数認められるが、これは、正常細胞が白脾髄に残存しているためであると考えられる。また、AML-2については、2番染色体の欠失がないか、あったとしても、切断点はプローブ61よりも末端側に位置することになる。

以上の結果から、5例のAMLのうち、少なくとも3例において、AMLに特有な2番染色体の欠失が確認された。

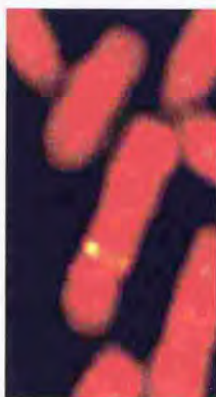


(a) fluorescent signals with PI counterstain

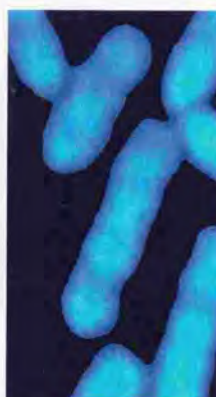


(b) DAPI counterstain

Fig. 3-18. Mapping of BAC clone 61 on chromosome 2 by FISH.



(a) fluorescent signals with PI counterstain



(b) DAPI counterstain

Fig. 3-19. Mapping of BAC clone 471 on chromosome 2 by FISH.



(a) AML-1, clone 61



(b) AML-1, clone 471

Fig. 3-20. Examples of FISH to interphase nuclei obtained from paraffin-embedded spleen cells.

Table 3-7. Summary of FISH to interphase nuclei obtained from paraffin-embedded spleen cells.

Description	Treatment	Latency (days)	Probe (BAC clone ID)	Number of cells with n signals		
				n = 1	n = 2	n \geq 3
Control	—	—	61	25	32	3
			471	34	45	2
AML-1	3Gy + prednisolone	302	61	56	14	1
			471	28	45	7
AML-2	3Gy + prednisolone	382	61	23	26	3
			471	27	32	5
AML-3	3Gy + prednisolone	422	61	45	7	2
			471	25	28	0
AML-4	3Gy + prednisolone + M-CSF	307	61	62	4	1
			471	31	34	2

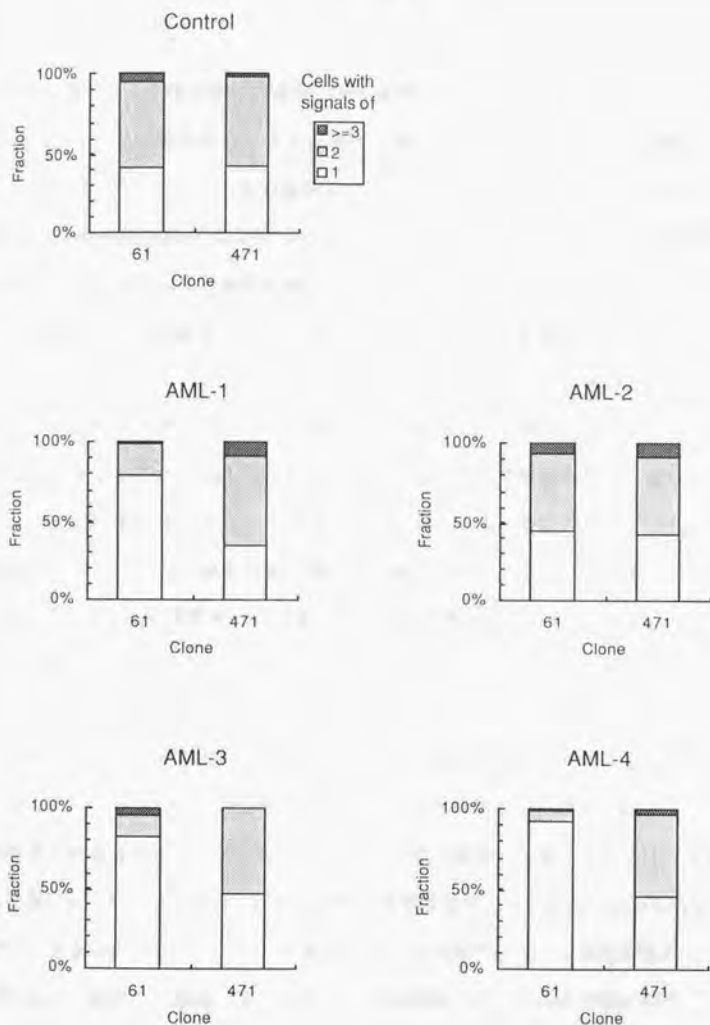


Fig. 3-21. Distribution of fluorescent signal among cells.

4. 考察

4-1. 放射線による急性骨髄性白血病の標的細胞とイニシエーション

白血病は、造血幹細胞あるいは前駆細胞が腫瘍化して、クローン性に増殖したものと考えられている⁴⁹⁾。マウスの放射線誘発AMLについても、X染色体上のPGK

(phosphoglycerate kinase) 遺伝子のアイソザイムパターンを利用して、白血球系の前駆細胞あるいはより未分化な細胞を起源とするクローン性疾患であることが示されている⁵⁰⁾。放射線によるAML誘発においては、これらの未分化な細胞にイニシエーションが引き起こされ、さらにプロモーションやプログレッションといった何段階かの変化を経て、腫瘍化に至るものと考えられる。放射線による2番染色体の異常がAMLのイニシエーションであるとするならば、AMLに特有なマーカー染色体は照射後早期から造血細胞中に存在し、一定の時間経過に伴って、異常をもった細胞の数が増加するはずである。これまで複数の研究によって、AML発症以前にマーカー染色体が存在していることが示されているが^{23, 34, 36)}、照射後最初の分裂像における染色体異常のパターンを調べた例はなく、マーカー染色体が放射線によって生成されたものなのか、二次的な変化なのかははっきりしなかった。

本研究では、この点を明らかにするために、照射24時間後のマウス骨髄細胞における染色体異常について、系統的な解析を行った。染色体標本を作成する段階で、人工的な増殖刺激や培養操作を加えていないため、本研究で観察した細胞の大半は、照射後最初の分裂期にあったものと考えられる。染色体体型異常が一部の細胞に認められたことも、このことを裏付けている。一方、骨髄中には分化の段階が進んだ細胞が数的に多いことを考えると、観察した細胞の多くは単能性前駆細胞であり、AMLの標的細胞ではないことになる。しかし、マウス骨髄細胞中の染色体異常を経時的に調べた研究によると、細胞増殖による重複を除外した場合に、染色体ごとの相対異常頻度は照射後の時期によらずほぼ一定であることが報告されている^{29, 34)}。このことは、染色体間の放射線に対する

相対感受性が血液系細胞の分化の段階によって大きく変化しないことを意味している。

また、CBA/Hマウスの骨髓細胞を用いたアッセイでは、多能性幹細胞に近い

MRA[CFU-S-12]の放射線感受性が、かなり分化の進んだCFU-Cと大きく変わらないことが示されている³⁰⁾。したがって、本研究で観察した照射24時間後の染色体異常は、AMLの標的細胞をも含む造血細胞全体の放射線損傷を反映しているものと考えられる。

4-2. 放射線による初期損傷としての骨髓細胞の染色体異常の特徴

4-2-1. 2番染色体の放射線感受性と個体差

核型分析では5匹のうち1匹（マウスE）において、2番染色体の異常頻度が有意に高いという結果が得られた。この個体は、2番染色体の異常の中でも、欠失、とくに中間部欠失が多いという特徴を持っていた。中間部欠失が生じるためには、同一染色体上に少なくとも2つ以上の切断が同時に起こる必要があり、放射線による電離密度が濃くなければならない。したがって、低LET放射線によって中間部欠失を生じた細胞では、他にも多数の染色体異常を伴っているはずである。実際、マウスCに観察された2番染色体の中間部欠失の例では、複数の異常が認められている。しかし、マウスEにおいては、2番染色体の中間部欠失が3例認められたにもかかわらず、いずれも2番以外の染色体には構造的異常が見られなかった。このことは、マウスEのゲノムの中で、2番染色体のみが放射線に対して高感受性であることを示している。

染色体ペインティングでは、各線量群に1匹ずつ、合計3匹の個体において高頻度の2番染色体の異常が観察された。欠失の頻度については、統計的に有意な個体差が認められたが、カラー接合部の頻度については、個体差は検出されなかった。したがって、この3匹についても、2番染色体の欠失に対する感受性が高く、核型分析におけるマウスEと共通の特徴が認められた。これらの結果から、本実験で用いたC3H/HeNCrjマウスでは、2番染色体の放射線感受性に個体差があり、ある一定の割合で高感受性の個体（以下、高感受性個体と呼ぶ）が存在するものと考えられる。

C3H/Heマウスの別の亜系について、X線全身照射1-8月後の骨髓細胞で2番染色体の異常が相対的に多く、しかも異常頻度の個体差が大きかったことが報告されている²⁹⁾。CBA/Caマウスを用いた実験でも、明瞭な個体差が報告されており、照射後の時期によらず、一部(20-30%)の個体にのみ2番染色体の異常が認められている³⁹⁾。このように、系統あるいは亜系による多少の違いはあるものの、C3HとCBAでは、一部の個体において2番染色体の放射線感受性が高いことが、文献からも示唆される。系統あるいは亜系によって、高感受性個体の全体に占める割合が異なるとすれば、本研究で用いたC3H/HeNCrjではその割合が比較的小さかったために、個体差として検出されやすかったと考えられる。

C3H/HeNCrjは、米国NIHで維持されていたC3H/HeNに由来し、米Charles River社での12代の交配の後、日本チャールス・リバー社に導入されたものである。本研究を開始した1994年12月の時点で、基幹の世代数はF76であり、NIHおよび米Charles River社における交配世代数も考慮すると、基本的にはsyngeneicであるとみなされる。しかし、交配を重ねる間に自然発生の突然変異を生じたとすれば、それによるheterozygosityが残存し、個体差の原因となった可能性も考えられる。

4-2-2. 放射線による染色体切断点と染色体脆弱部位との関連

高感受性個体のマウスEでは、2Cおよび2F領域に染色体切断点の集積が認められ、その傾向は2F領域において顕著であった。この2つの染色体領域はともに、CBA/Hの骨髓細胞において、放射線による染色体切断のホットスポットとして同定されている^{31, 32, 34)}。また、2F領域は、aphidicolinやmethotrexate等の化学物質で誘導される染色体脆弱部位でもある^{32, 33)}。ヒトのリンパ球を用いた実験で、染色体脆弱部位と放射線による高頻度切断点がかなり一致しているという報告もあり⁵⁰⁾、本研究のマウスEにおいては、2番染色体上に脆弱部位が存在していた可能性がある。

CBA/Hマウスに対しては、2番染色体の高感受性に関する分子機構が検討されており、

染色体の末端以外に存在するテロメア反復配列が、脆弱性の原因として提案されている^{55,56)}。本研究のマウスEについても、予備的実験として、(TTAGGG)_nをプライマーに用いたPRINS (oligonucleotide-primed in situ DNA synthesis)を試みたが、2番染色体では末端部以外にシグナルは認められなかった。PRINSでは小さな反復配列は検出できないとしても、そのような小規模の反復がゲノムの中で特殊な性質を持つとは考えにくい。したがって、本研究で使用了C3H/HeNCrjマウスでは、テロメア配列が脆弱部位の原因である可能性は低い。ヒトのFRAXAにおける(CCG)_nのような他の反復配列⁵⁷⁾や、何らかの"epigenetic"な要因が関与していることも考えられるが、現時点では推測の域を出ない。

4.2.3. 2番染色体の初期異常の線量-反応関係

染色体ペインティングの結果、異常細胞の頻度、欠失の頻度、カラー接合部の頻度のいずれについても、二次曲線型の線量-反応関係が認められた。線量の増加に伴ってmitotic indexが低下する傾向が認められたが、これはゲノムの損傷によって分裂遅延・停止が起こったためで、間期核における染色体異常も線量とともに増加することを示唆している。したがって、全細胞集団での潜在的な染色体異常に対する線量-反応曲線も、ペインティングの結果と大きく変わらないはずである。

欠失の頻度は直線モデルに従うことが期待されたが、1ヒット事象の端部欠失に加えて、不完全転座（転座において、染色体の再結合が一箇所では起こらず、t, del, aceが生成されたもの）や中間部欠失など、2ヒット事象による欠失が含まれているために、二次の項の影響が現れた可能性がある。さらに、ペインティングでは小さな欠失を検出できないため、一次の項を過小評価したことも考えられる。実際、欠失や転座がなく微小な断片のみ検出された例が、1Gyおよび2Gy照射群で何例か認められた。

カラー接合部の頻度については、ヒトのリンパ球で二次曲線型の線量-反応関係が報告されており、本研究でも同様の結果が得られた⁵⁸⁾。

高感受性個体の3匹（マウス1g, 2b, 3a）に着目すると、異常の頻度は高いものの、線

量-反応関係の形は二次曲線型ないし直線-二次曲線型であり、全体の傾向と変わらない。このことは、これら3匹のマウスにおいて、染色体異常のバックグラウンドが高いのではなく、2番染色体の放射線感受性が高いことを示している。

4-3. 急性骨髄性白血病マウスに見られる染色体異常と放射線による初期染色体異常

4-3-1. 急性骨髄性白血病のイニシエーションとしての2番染色体の異常

長期間飼育後AMLを発症したマウスに対して間期核へのFISHを行った結果、5例のうち少なくとも3例において、AMLに特有な2番染色体の欠失が生じていることが確認された。また、AMLのマーカー染色体が、放射線照射24時間後にすでに生成されていることが、核型分析によって証明された。核型分析で観察されたマーカー染色体の頻度は、高感受性個体のマウスEにおいて観察細胞中約6%であり、腫瘍化に至る過程で強い増殖能を獲得すると考えれば、初期変異の確率としては十分に高い値である。さらに、AMLマウスの2番染色体では、2Cおよび2F領域が染色体切断の好発部位として知られているが^{21, 22, 27, 28, 31, 32)}、高感受性個体における2番染色体の切断点はこの二つの領域に集中する傾向が認められた。これらの結果はいずれも、放射線によるマーカー染色体の生成が、AMLのイニシエーションであるという仮説を支持する。

この仮説を前提とすれば、AML誘発の観点からは、イニシエートされた細胞が細胞死を起こさないこと、すなわち過度の放射線損傷を受けないことが重要である。この点に関しても、マウスEに代表される高感受性個体は、AML誘発に有利な条件を備えていると考えられる。高感受性個体では2番染色体の異常が生じやすいが、他の染色体の異常に対しては、それほど感受性が高くないからである。実際、マウスEにおいては、マーカー染色体を有する細胞5個のうち、2番染色体以外の構造的異常が認められたのは1個だけであり、細胞としての損傷は最小限のレベルにとどまっていた。逆に、マウスA-Dでは観察細胞の1%にマーカー染色体が認められたが、いずれも複数の染色体異常を伴っており、これらの細胞はいずれ細胞死を起こす可能性が高いと考えられる。長期生存細

胞におけるマーカー染色体の保有率は、マウスA~DとEの間で、大きな差を生じるはずである。したがって、放射線によるマーカー染色体の生成がAMLのイニシエーションであるとすれば、高感受性個体とそれ以外の個体の間で、イニシエーションの確率が大きく異なると考えられる。

4-3-2. 急性骨髄性白血病誘発率と2番染色体異常の頻度

C3H/HeNCrjでは、高感受性個体においてのみ、2番染色体の異常が高頻度に観察されたが、C3H/Heの他の亜系やCBA/H等では、集団全体で見た場合でも、同様の傾向が報告されている。とくにCBA/Hでは、2番染色体の高感受性が明瞭に観察されているにもかかわらず、統計的に有意な個体差は認められていない。したがって、マーカー染色体の生成がAMLのイニシエーションであると仮定した場合、本研究では高感受性個体の割合が全体の10%に過ぎないことを考えると、C3H/HeNCrjのAML誘発率は、C3H/Heの他の亜系やCBA/H等に比べて低くなることが予想される。

白血病誘発実験の結果、AMLの誘発率は、3Gy+プレドニゾン投与群において11%、3Gy+プレドニゾン+M-CSF投与群において10%であった。C3H/Heの別の亜系

(C3H/Hef, C3H/HeNirMs)を用いた場合、AMLの誘発率は3Gy全身照射単独で20~25%、プレドニゾンを併用すると40%近くになることが報告されており、それに比べて本研究では明らかに低い値となった^{18, 19)}。マウスにおけるAMLの誘発率は、様々な要因によって変化することが知られているが、本研究では、文献の報告に基づいて最も誘発率が高くなる条件で実験を行っている^{13, 17-19, 42, 59-65)}。したがって、この誘発率の違いは、実験条件によるものではなく、使用したマウスの亜系による差であると考えられる。

このように、放射線による2番染色体の初期異常の頻度と、放射線誘発AMLの発症率との間に関連が認められたことから、放射線によるマーカー染色体の生成がAMLのイニシエーションであるという仮説が支持された。白血病誘発実験におけるAMLの最大誘発率と、集団における高感受性個体の割合がほぼ一致したことを考え合わせると、

C3H/HeNCrjマウスでは、高感受性個体が放射線によるAMLの発症に主として寄与し、それ以外の個体からの寄与は、あったとしても小さいものと考えられる。

4-3-3. AMLマーカー染色体における欠損遺伝子

マウスの系統間で多型を示すマイクロサテライト・マーカーを用いた研究により、AMLマーカー染色体では、D2Mit126~D2Mit62の間の領域（2番染色体の49.0~65.0cM）が常に欠損していることが示されている^{26,28)}。この領域にマップされる遺伝子のうち、腫瘍化に関与する可能性のあるものをFig. 4-1に示した。この中で、欠損によって腫瘍化が促進されるもの、すなわち癌抑制遺伝子に分類されるものは、Ext2とWt1である^{64,65)}。

Ext2は、遺伝性のmultiple exostosesの原因遺伝子の一つであるが、造血系細胞での発現は観察されていない⁶⁶⁾。一方、Wt1については、ヒトの相同遺伝子WT1と白血病の関連が知られている。しかし、ヒトの白血病では、未分化な細胞において正常型WT1の増加が観察されていることから、WT1は癌抑制遺伝子というよりはむしろ、腫瘍細胞を分化抑制あるいは増殖促進するものと考えられている^{67,69)}。それでも、ヒトのWT1とマウスのWt1は機能的に異なることが指摘されており、マウスの白血病において、Wt1がヒトの場合と異なる働きを示す可能性はある⁷⁰⁾。

このように、マウスのAMLマーカー染色体の共通欠失領域に関して、遺伝子レベルでの機構は今のところ解明されていない。ヒトの肺癌に関する研究において、WT1の近傍に別の癌抑制遺伝子が存在する可能性が示唆されており、未知の遺伝子がこの領域に存在する可能性もある⁷¹⁾。いずれにしても、AMLマーカー染色体は欠失型の異常であることから、なんらかの癌抑制遺伝子または造血系細胞の分化に関わる遺伝子が関与しているものと思われる。放射線によって2番染色体の当該領域に欠失が生じた場合、もう一方のalleleにも突然変異を生じるか、あるいはgene dosageが変化することによって、細胞の増殖能や分化能に異常をきたし、最終的に白血病化に至るものと考えられる。

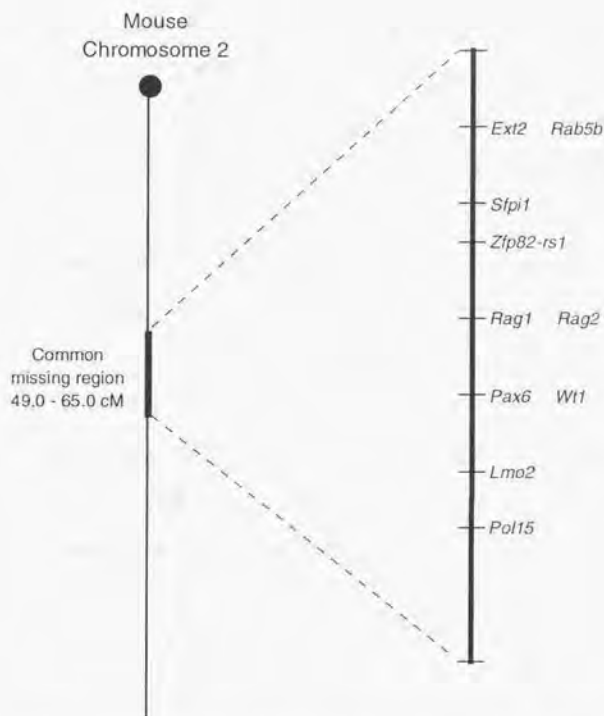


Fig. 4-1. Cancer-related genes mapped on common missing region of AMLmarker chromosome.

4-4. 動物実験をヒトへ外挿する際の問題点

動物実験は、放射線誘発がんの発生機構を知る上で有用な手段であるが、その結果をヒトへ外挿する際には、実験動物とヒトの間の生物学的な相違点について考察する必要がある。ここでは、マウスとヒトの造血機能の相違、ならびにマウス白血病とヒト白血病の相違について考察する。

4.4-1. マウスとヒトの造血機能の相違

造血機能に関して、マウスとヒトの間の大きな違いは、ヒトの造血器官は骨髓に限定されるのに対し、マウスでは骨髓の他に脾臓でも造血が行われている点である⁶⁹⁾。脾臓は白血病と密接に関連した臓器であり、白血病化したマウスでは顕著な脾腫大が認められる一方で、予め脾摘したマウスでは放射線やウイルスによる骨髓性白血病の誘発率が減少することが報告されている⁷²⁻⁷⁴⁾。これらのことから、マウスにおいては、脾臓の造血細胞がAMLの標的細胞になっている可能性がある。しかし、Graffi virus接種による骨髓性白血病の場合、脾摘による発現率の低下は、正常マウスの脾臓の移植やウサギの脾臓抽出液の投与によって回復することから、脾臓はAMLの原発巣としてよりも、サイトカイン等の液性因子の分泌を通して白血病化に寄与するものと考えられる⁷⁵⁾。白血病に伴う脾腫大はヒトでも認められ、また、脾臓の組織学的構造はヒトでもマウスでも本質的に変わらないことから、脾臓における造血能の有無によって、ヒトとマウスで放射線によるAMLの発生機構が異なることはないと考えられる。

4.4-2. マウス白血病とヒト白血病の相違

ヒトの血液系腫瘍では、骨髓性白血病が比較的大きな割合を占めるが、マウスでは、自然発生の骨髓性白血病は稀である^{76, 77)}。放射線によるものでも、ヒトでは原爆被爆者の疫学調査において、AMLの増加が認められているが、マウスでは胸腺リンパ腫が主であり、AMLの誘発は一部の系統に限られている^{18, 78)}。しかし、AMLも含め、マウス白血病とヒト白血病の病態は本質的に変わらないとされている⁷⁶⁾。

ヒトのAMLでは、様々な種類の病型特異的な染色体異常が報告されているが、マウスのAMLでは、系統によらずに2番染色体の欠失が高頻度に認められる^{7, 9, 20-28)}。マウスAMLにおける2番染色体の共通欠失領域は、ヒト染色体の11p14-q12および15pter-q14に相当する^{26, 28)}。ヒトのAMLで11p領域が欠失している症例があり、病型としてはFAB分類のM4、すなわち骨髓単球性白血病が多いことが報告されている⁷⁹⁾。C3H/HeマウスのAML

の病型を調べた先行研究では、骨髓単球性白血病の頻度が最も高いことから¹⁹⁾、このタイプのAMLについては、染色体異常、病型ともに、ヒトとマウスの間でよい相関が得られている。

このように、ヒトとマウスのAMLに関して、症状ならびに染色体レベルの変化がよく対応しており、マウスAMLはヒトAMLの有用なモデルとなり得る。ただし、11pに欠失があるヒト白血病の症例は比較的少数であり、また、マウスでのAML発症が一部の系統に限られることから、このタイプのAMLの発生に遺伝的素因が関与している可能性がある。

5. 結論

本研究では、AML特異的マーカー染色体について検討するために、C3H/HeNCrjマウスを用いて、放射線による初期の染色体異常の解析と、長期飼育後に誘発されたAMLマウスの染色体観察を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

- (1) 照射24時間後の骨髓細胞における染色体異常の解析の結果、C3H/HeNCrjマウスでは、2番染色体の放射線感受性に個体差が認められた。全体の10%の個体において、2番染色体の異常が高頻度に観察され、これらの個体（高感受性個体）は、2番染色体の欠失、とくに中間部欠失に対する感受性が高いことがわかった。
- (2) 高感受性個体においては、照射24時間後に観察された2番染色体の切断点がCおよびF領域に集中する傾向が認められた。これは、AMLマウスの2番染色体で、染色体切断の好発部位として知られている領域と一致した。
- (3) 2番染色体の異常頻度は、欠失、交換型異常のいずれについても、二次曲線型の線量-反応関係を示した。
- (4) インビボ実験により誘発されたAMLマウスの白血病細胞に、2番染色体の異常が生じていることがFISHにより確認された。また、このようなAMLのマーカーと同型の2番染色体の異常（マーカー染色体）が、照射24時間後にすでに骨髓細胞に存在することが、核型分析によって証明された。
- (5) 照射24時間後のマーカー染色体の頻度は、高感受性個体において高く、他の個体の約6倍であった。高感受性個体では、マーカー染色体を有する細胞に他の構造的異常は

認められなかった。それに対し、高感受性以外の個体では、マーカー染色体が複数の異常を伴っており、ゲノムの損傷が大きかった。

(6) インビボ実験でのAML誘発率は、3Gy全身照射+プレドニゾン投与の条件で11%、これにM-CSF投与を付加した群で10%であり、C3H/Heの他の亜系やCBA/H等に比べて、明らかに低い値となった。

以上のように、AMLのマーカー染色体が照射後24時間という早い時期に観察され、その異常がAML誘発マウスにも認められた。さらに、放射線による2番染色体の初期異常の頻度と、放射線誘発AMLに対する感受性の間に関連が認められた。これらの結果は、放射線によるマーカー染色体の生成が、AML誘発のイニシエーションであることを支持するものである。本研究で使用したC3H/HeNCrjマウスでは、高感受性個体が放射線によるAMLの発症に主として寄与し、それ以外の個体からの寄与は、あったとしても小さいものと考えられる。

放射線誘発がんの機構については、いまだ不明な点が多く、最近では、放射線によるDNA損傷が発がん性の変異を誘発するという考え方に対して、否定的な見解も数多く見られる。しかし、本研究では、染色体異常という放射線の直接的作用が、AML誘発の原因となり得ることを示した。

白血病をはじめとするがんは、放射線防護の観点から最も重要な放射線影響である。これまで、放射線誘発がんのリスクは、原爆被爆者等の高線量被ばくの疫学データからの外挿によって推定されてきたが、低線量でのリスク推定の精度を高める上で、発生機構にまで踏み込んだ議論が、今後必要になると思われる。本研究の結果は、放射線による白血病誘発の機構および放射線誘発がんの線量-反応関係等を考える上で、有用な情報を提供した。

謝辞

本論文をまとめるに当たって、多数の方々のお世話になりました。ここに感謝の意を表します。

指導教官である草間朋子先生は、常に大局から研究を見守り、実験が行き詰まる度に、あるいは私が独善的な考えに陥りそうなときに、適切なアドバイスによって軌道修正をしてくださいました。また、先生はご多忙にもかかわらず、論文の一字一句に目を通してくださいました。自由な雰囲気の中で実験を行いながらも、ゼロからスタートした研究をまとめ上げることができたのは、ひとえに先生のお蔭です。

甲斐倫明先生には、実験データの解析に際して、数々のご助力・ご助言をいただきました。単なる統計解析技術にとどまらず、実験の意味合い、現象のメカニズムにまで踏み込んだコメントをいただいたことは、自らの研究を客観的に見つめる上で、大変参考になりました。

英国National Radiological Protection BoardのSimon D. Bouffler博士は、FISHに必要なBACクローンDNAを快く提供してくださいました。また、国際学会や電子メールを通じて、この分野の最新情報をいただいたお蔭で、研究を円滑に進めることができました。

放射線医学総合研究所の早田勇博士は、日本におけるこの分野の先駆的研究者として、貴重なコメントをくださるとともに、いくつかの文献を提供してくださいました。英国Medical Research CouncilのJohn R. K. Savage博士も、染色体切断数の解析に関して数々のコメントをくださり、この問題に係る文献等を送ってくださいました。

技官の青木晋さんと大学院生の菊地優予さんには、動物の解剖と病理組織標本の作成を手伝っていただきました。布施理美さん、丸山朝子さん、赤羽恵一さんをはじめ、この数年間に在籍した大学院生・卒論生・研究生の皆さんは、苦楽をともにする中で、研究活動を支えてくださいました。

この他にも、たくさんの方々が、私の論文の進捗状況を案じ、完成を祈り続けてくださいました。とくに、なかなか収束しない研究に対して、ひたすら成功を祈り、支え続けてくれた妻と子供達に、心からの感謝をささげます。

参考文献

1. ICRP (1991) 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60, Ann. ICRP **21**(1-3).
2. Pierce, D. A., Shimizu, Y., Preston, D. L., Vaeth, M. and Mabuchi, K. (1996) Studies of the mortality of atomic bomb survivors. Report 12, Part 1. Cancer: 1950-1990. Radiat. Res. **146**: 1-27.
3. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (1993) Annex E. Mechanism of radiation oncogenesis. In: Sources and Effects of Ionizing Radiation, UNSCEAR 1993 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes, pp. 551-618, United Nations, New York.
4. Bishop, J. M. (1987) The molecular genetics of cancer. Science **235**: 305-311.
5. Solomon, E., Borrow, J. and Goddard, A. D. (1991) Chromosome aberrations and cancer. Science **254**: 1153-1160.
6. Rabbitts, T. H. (1994) Chromosomal translocations in human cancer. Nature **372**: 143-149.
7. 平井久丸 編 (1994) 白血病の分子医学, 羊土社, 東京.
8. Walker, H., Smith, F. J. and Betts, D. R. (1994) Cytogenetics in acute myeloid leukemia. Blood Rev. **8**: 30-36.
9. Mrózek, K., Heinonen, K., de la Chapelle, A. and Bloomfield C. D. (1997) Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. Seminars in Oncol. **24**: 17-31.
10. Kumar, R., Sukumar, S. and Barbacid, M. (1990) Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. Science **248**: 1101-1104.
11. Janowski, M., Cox, R. and Strauss, P. G. (1990) The molecular biology of radiation-induced carcinogenesis, thymic lymphoma, myeloid leukaemia and osteosarcoma. Int. J. Radiat. Biol. **57**: 677-691.

12. Cox, R. (1994) Molecular mechanism of radiation oncogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**: 57-64.
13. Upton, A. C., Wolff, F. F., Furth, J. and Kimball, A. W. (1958) A comparison of the induction of myeloid and lymphoid leukemias in X-irradiated RF mice. *Cancer Res.* **18**: 842-848.
14. Major, I. R. and Mole, R. H. (1978) Myeloid leukaemia in X-ray irradiated CBA mice. *Nature* **272**: 455-456.
15. Major, I. R. (1979) Induction of myeloid leukaemia by whole-body single exposure of CBA male mice to X-rays. *Br. J. Cancer* **40**: 903-913.
16. Mole, R. H., Papworth, D. G. and Corp, M. J. (1983) The dose-response for X-ray induction of myeloid leukaemia in male CBA/H mice. *Br. J. Cancer* **47**: 285-291.
17. Resnitzky, P., Estrov, Z. and Haran-Ghera, N. (1985) High incidence of acute myeloid leukemia in SJL/J mice after X-irradiation and corticosteroids. *Leuk. Res.* **9**: 1519-1528.
18. 関正利, 吉田和子, 西村まゆみ, 野島久美恵 (1984) 放射線誘発白血病と副腎機能. 放医研シンポジウムシリーズ: 発がん -放射線を中心として-, pp. 138-149, 実業公報社, 東京.
19. Seki, M., Yoshida, K., Nishimura, M. and Nemoto, K. (1991) Radiation-induced myeloid leukemia in C3H/He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Radiat. Res.* **127**: 146-149.
20. Azumi, J. and Sachs, L. (1977) Chromosome mapping of the genes that control differentiation and malignancy in myeloid leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 253-257.
21. Hayata, I., Ishihara, T., Hirashima, K., Sado, T. and Yamagiwa, J. (1979) Partial deletion of chromosome #2 in myelocytic leukemias of irradiated C3H/He and RFM mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **63**: 843-848.
22. Hayata, I., Seki, M., Yoshida, K., Hirashima, K., Sado, T., Yamagiwa, J. and Ishihara, T. (1983) Chromosomal aberrations observed in 52 mouse myeloid leukemias. *Cancer Res.* **43**:

23. Silver, A., Breckon, G., Masson, W. K., Malowany, D. and Cox, R. (1987) Studies on radiation myeloid leukaemogenesis in the mouse. In: Radiation Research, Vol. 2, Eds. E. M. Fielden, J. F. Fowler, J. H. Hendry and D. Scott, pp. 494-500, Taylor and Francis, New York.
24. Trakhtenbrot, L., Krauthgamer, R., Resnitzky, P. and Haran-Ghera, N. (1988) Deletion of chromosome 2 is an early event in the development of radiation-induced myeloid leukemia in SJL/J mice. *Leukemia* 2: 545-550.
25. Rithidech, K. N., Bond, V. P., Cronkite, E. P. and Thompson, M. H. (1993) A specific chromosomal deletion in murine leukemic cells induced by radiation with different qualities. *Exp. Hematol.* 21: 427-431.
26. Alexander, B. J., Rasko, J. E. J., Morahan, G. and Cook, W. D. (1995) Gene deletion explains both in vivo and in vitro generated chromosome 2 aberrations associated with murine myeloid leukemia. *Leukemia* 9: 2009-2015.
27. Bouffler, S. D., Meijne, E. I. M., Huiskamp, R. and Cox, R. (1996) Chromosomal abnormalities in neutron-induced acute myeloid leukemias in CBA/H mice. *Radiat. Res.* 146: 349-352.
28. Clarke, D. J., Meijne, E. I. M., Bouffler, S. D., Huiskamp, R., Skidmore, C. J., Cox, R. and Silver, A. R. J. (1996) Microsatellite analysis of recurrent chromosome 2 deletions in acute myeloid leukemia induced by radiation in F1 hybrid mice. *Genes Chrom. Cancer* 16: 238-246.
29. Hayata, I. and Dutrillaux, B. (1985) Non-random involvement of rat and mouse chromosomes in the stable type chromosomal rearrangements observed in irradiated bone marrow cells. *Proc. Japan Acad.* 61, Ser. B: 180-182.
30. Hayata, I., Ichikawa, T. and Ichikawa, Y. (1987) Specificity in chromosomal abnormalities in mouse bone marrows induced by the difference of the condition of irradiation. *Proc. Japan*

Acad. 63, Ser. B: 289-292.

31. Breckon, G., Papworth, D. and Cox, R. (1991) Murine radiation myeloid leukaemogenesis: A possible role for radiation-sensitive sites on chromosome 2. *Genes Chrom. Cancer* 3: 367-375.
32. Breckon, G., Silver, A. and Cox, R. (1991) Radiation-induced chromosome 2 breakage and the initiation of murine radiation acute myeloid leukaemogenesis. *J. Radiat. Res.* 32, Suppl. 2: 248-256.
33. Bouffler, S. D., Breckon, G. and Cox, R. (1996) Chromosomal mechanisms in murine radiation acute myeloid leukaemogenesis. *Carcinogenesis* 17: 655-659.
34. Bouffler, S. D., Meijne, E. I. M., Morris, D. J. and Papworth, D. (1997) Chromosome 2 hypersensitivity and clonal development in murine radiation acute myeloid leukaemia. *Int. J. Radiat. Biol.* 72: 181-189.
35. Rithidech, K., Bond, V. P., Cronkite, E. P., Thompson, M. H. and Bullis, J. E. (1995) Hypermutability of mouse chromosome 2 during the development of x-ray-induced murine myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1152-1156.
36. Hayata, I. (1985) Leukemogenesis and chromosomal abnormalities : experimental animals. *Acta Haematol. Jpn.* 48: 1857-1863.
37. 福嶋義光, 井上信男 (1984) 染色体検査法. *臨床検査* 28: 759-770.
38. Schweizer, D. (1981) Counterstain-enhanced chromosome banding. *Hum. Genet.* 57: 1-14.
39. ISCN (1985) An international system for human cytogenetic nomenclature, Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Birth Defects Original Article Series* 21: 1-117.
40. Evans, E. P., Davison, M. T., Somssich, I. E. and Hameister, H. (1989) Standard normal chromosomes. In: *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Eds. M. F. Lyon and A. G. Searle, pp. 576-578, Oxford University Press, Oxford.
41. Tucker, J. D., Morgan, W. F., Awa, A. A., Bauchinger, M., Blakey, D., Cornforth, M. N.,

- Littlefield, L. G., Natarajan, A. T. and Shasserre, C. (1995) A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet.* **68**: 211-221.
42. Haran-Ghera, N., Peled, A., Krauthamer, R. and Resnitzky, P. (1992) Initiation and promotion in radiation-induced myeloid leukemia. *Leukemia* **6**: 689-695.
43. Bouffler, S. D. Personal communication.
44. Hedley, D. W., Friedlander, M. L., Taylor, I. W., Rugg, C. A. and Musgrove, E. A. (1983) Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* **31**: 1333-1335.
45. Hyytinen, E., Visakorpi, T., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. and Isola, J. J. (1994) Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* **16**: 93-99.
46. 吉村功, 大橋靖雄 編 (1992) 毒性試験データの統計解析, 地人書館, 東京.
47. 藤森利美 (1995) 分析技術者のための統計的方法, 第2版, 日本環境測定分析協会, 東京.
48. Savage, J. R. K. (1991) Testing the participation of chromosomes in structural aberrations. In: *Eukaryotic Chromosomes: Structure and Functional Aspects*, Eds. R. C. Sobti and G. Obe, pp. 111-125, Narosa Press, New Delhi.
49. 須田年生 (1992) 血液幹細胞の運命, 羊土社, 東京.
50. Bessho, M. and Hirashima, K. (1987) Clonal origin of radiation-induced myeloid leukemia in mice with cellular mosaicism. *Jpn. J. Cancer Res.* **78**: 670-673.
51. Meijne, E. I. M., van der Winden-van Groenewegen, R. J. M., Ploemacher, R. E., Vos, O., David, J. A. G. and Huiskamp, R. (1991) The effects of x-irradiation on hematopoietic stem cell compartments in the mouse. *Exp. Hematol.* **19**: 617-623.
52. Djalali, M., Adolph, S., Steinbach, P., Winking, H. and Hameister, H. (1987) A comparative mapping study of fragile sites in the human and murine genomes. *Hum. Genet.* **77**: 157-162.
53. Elder, F. F. B. and Robinson, T. J. (1989) Rodent common fragile sites: Are they conserved?

Evidence from mouse and rat. *Chromosoma* **97**: 459-464.

54. Yunis, J. J., Soreng, A. L. and Bowe, A. E. (1986) Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. *Oncogene* **1**: 59-69.
55. Bouffler, S., Silver, A., Papworth D., Coates, J. and Cox, R. (1993) Murine radiation myeloid leukaemogenesis: Relationship between interstitial telomere-like sequences and chromosome 2 fragile sites. *Genes Chrom. Cancer* **6**: 98-106.
56. Bouffler, S., Silver, A. and Cox, R. (1993) The role of DNA repeats and associated secondary structures in genomic instability and neoplasia. *BioEssays* **15**: 409-412.
57. Kremer, E. J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S. T., Schlessinger, D., Sutherland, G. R. and Richards, R. I. (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* **252**: 1711-1714.
58. Tucker, J. D., Lee, D. A. and Moore II, D. H. (1995) Validation of chromosome painting. II. A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* **67**: 19-28.
59. Upton, A. C., Odell, Jr., T. T. and Sniffen, E. P. (1960) Influence of age at time of irradiation on induction of leukemia and ovarian tumors in RF mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **104**: 769-772.
60. Upton, A. C., Jenkins, V. K., Walburg, H. E., Jr., Tyndall, R. L., Conklin, J. W. and Wald, N. (1966) Observations on viral, chemical, and radiation-induced myeloid and lymphoid leukemias in RF mice. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **22**: 329-347.
61. Walburg, H. E. Jr., Cosgrove, G. E. and Upton, A. C. (1968) Influence of microbial environment on development of myeloid leukemia in X-irradiated RFM mice. *Int. J. Cancer* **3**: 150-154.
62. Mole, R. H. and Major, I. R. (1983) Myeloid leukaemia frequency after protracted exposure to ionizing radiation: experimental confirmation of the flat dose-response found in ankylosing spondylitis after a single treatment course with X-rays. *Leuk. Res.* **7**: 295-300.

63. Yoshida, K., Inoue, T., Nojima, K., Hirabayashi, Y. and Sado, T. (1997) Calorie restriction reduces the incidence of myeloid leukemia induced by a single whole-body radiation in C3H/He mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2615-2619.
64. Clines, G. A., Ashley, J. A., Shah, S. and Lovett, M. (1997) The structure of the human multiple exostoses 2 gene and characterization of homologs in mouse and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res.* **7**: 359-367.
65. Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Glaser, T. and Housman, D. E. (1991) Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1707-1712.
66. Stickens, D. and Evans, G. A. (1997) Isolation and characterization of the murine homolog of the human EXT2 multiple exostoses gene. *Biochem. Mol. Med.* **61**: 16-21.
67. Miwa, H., Beran, M. and Saunders, G. F. (1992) Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* **6**: 405-409.
68. Miyagi, T., Ahuja, H., Kubota, T., Kubonishi, I., Koeffler, H. P. and Miyoshi, I. (1993) Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells. *Leukemia* **7**: 970-977.
69. 井上和司, 杉山治夫 (1995) WT1と白血病. *臨床血液* **36**: 552-558.
70. Goodyer, P., Dehbi, M., Torban, E., Bruening, W. and Pelletier, J. (1995) Repression of the retinoic acid receptor-alpha gene by the Wilms' tumor suppressor gene product, wt1. *Oncogene* **10**: 1125-1129.
71. Bepler, G. and Garcia-Blanco, M. A. (1994) Three tumor-suppressor regions on chromosome 11p identified by high-resolution deletion mapping in human non-small-cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5513-5517.
72. Yoshida, K., Nojima, K., Seki, M. and Inoue, T. (1996) Reduction of radiation-induced myeloid leukemia following splenectomy in C3H/He mice. *J. Radiat. Res.* **37**: 380.
73. Fey, F. and Graffi, A. (1958) Beeinflussung der myeloischen Filtrat-leukämie der Maus durch

Splenektomie. *Naturwissenschaften* **45**: 471-472.

74. Nason-Burchenal, K. and Wolff, L. (1992) Involvement of the spleen in preleukemic development of a murine retrovirus-induced promonocytic leukemia. *Cancer Res.* **52**: 5317-5322.
75. Yokoro, K., Takemoto, H. and Kunii, A. (1964) Role of mouse lymphoma virus in induction of myeloid leukemia by X-ray. *Ann. NY Acad. Sci.* **114**: 203-212.
76. 伊藤洋平 編 (1974) 白血病, 講談社, 東京.
77. 厚生省大臣官房統計情報部 編 (1997) 平成7年人口動態統計, 下巻, 厚生統計協会, 東京.
78. Preston, D. L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., Kamada, N., Dohy, H., Matsuo, T., Nonaka, H., Thompson, D. E., Soda, M. and Mabuchi, K. (1994) Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat. Res.* **137**: S68-S97.
79. Gibbons, B., Czepulkowski, B., Tucker, J., Simpson, E., Amess, J. A., Young, B. D. and Lister, T. A. (1987) Subtle abnormalities in the short arm of chromosome 11 in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **28**: 287-92.

付 録

本研究では、マウスの骨髓細胞における2番染色体の初期異常を中心に解析したため、本文中の図表には、他の染色体についてのデータがほとんど含まれていない。しかし、放射線による初期染色体異常をインビボで調べた数少ない例として、2番以外の染色体に関する情報も重要であるため、核型分析において観察された染色体切断点に関する全データを、以下のとおり付録としてまとめた。

マウス	観察細胞数	染色体番号	Figure No.	掲載頁
A	50	1-10	A-1 (1)	65
		11-19, X and Y	A-1 (2)	66
B	50	1-10	A-2 (1)	67
		11-19, X and Y	A-2 (2)	68
C	50	1-10	A-3 (1)	69
		11-19, X and Y	A-3 (2)	70
D	50	1-10	A-4 (1)	71
		11-19, X and Y	A-4 (2)	72
E	50	1-10	A-5 (1)	73
		11-19, X and Y	A-5 (2)	74
E (追加観察分)	32	1-10	A-6 (1)	75
		11-19, X and Y	A-6 (2)	76

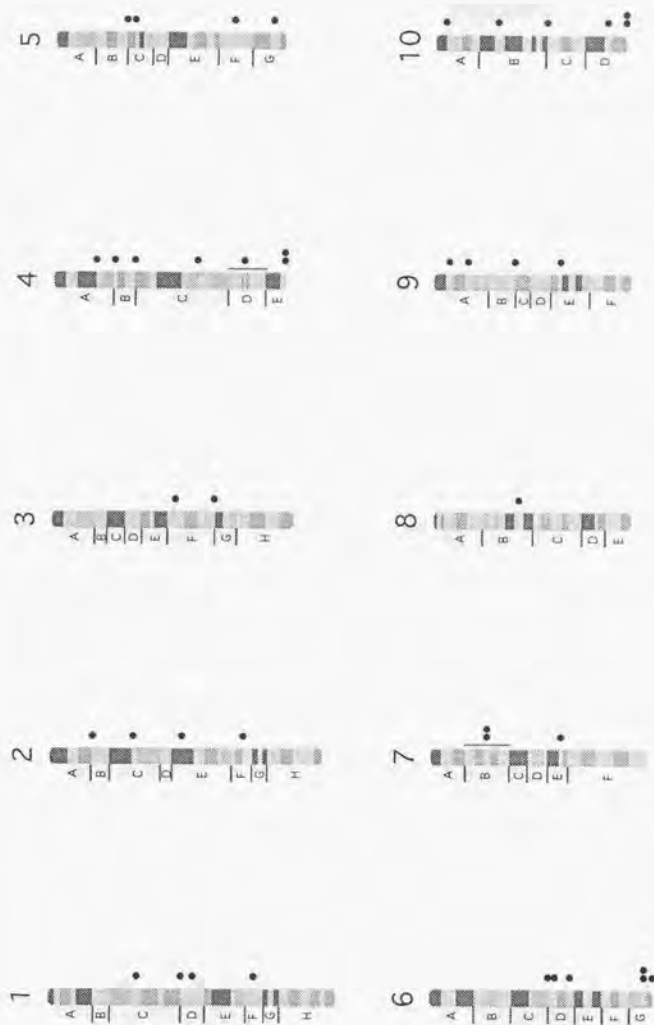


Fig. A-1 (1). Distribution of breakpoints in each chromosome (Mouse A, Chromosome 1-10).



Fig. A-1(2). Distribution of breakpoints in each chromosome (Mouse A, Chromosome 11-19, X and Y).



Fig. A-2 (1). Distribution of breakpoints in each chromosome (Mouse B, Chromosome 1-10).



Fig. A-2 (2). Distribution of breakpoints in each chromosome (Mouse B, Chromosome 11-19, X and Y).



Fig. A-3 (1). Distribution of breakpoints in each chromosome (Mouse C, Chromosome 1-10).



Fig. A-3 (2). Distribution of breakpoints in each chromosome (Mouse C, Chromosome 11-19, X and Y).

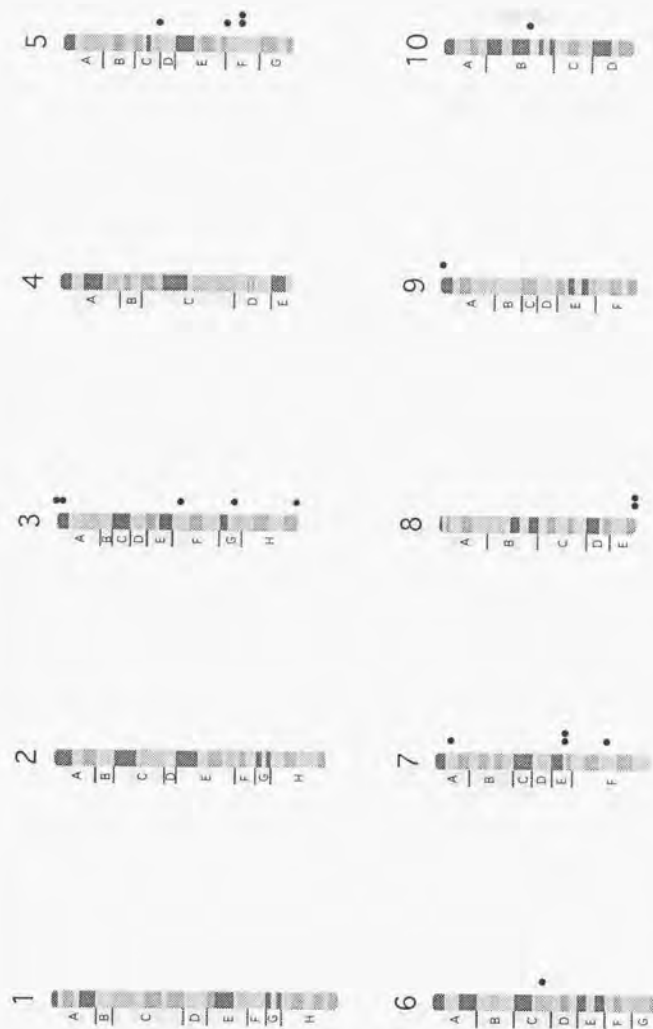


Fig. A-4 (1). Distribution of breakpoints in each chromosome (Mouse D, Chromosome 1-10).



Fig. A-4 (2). Distribution of breakpoints in each chromosome (Mouse D, Chromosome 11-19, X and Y).

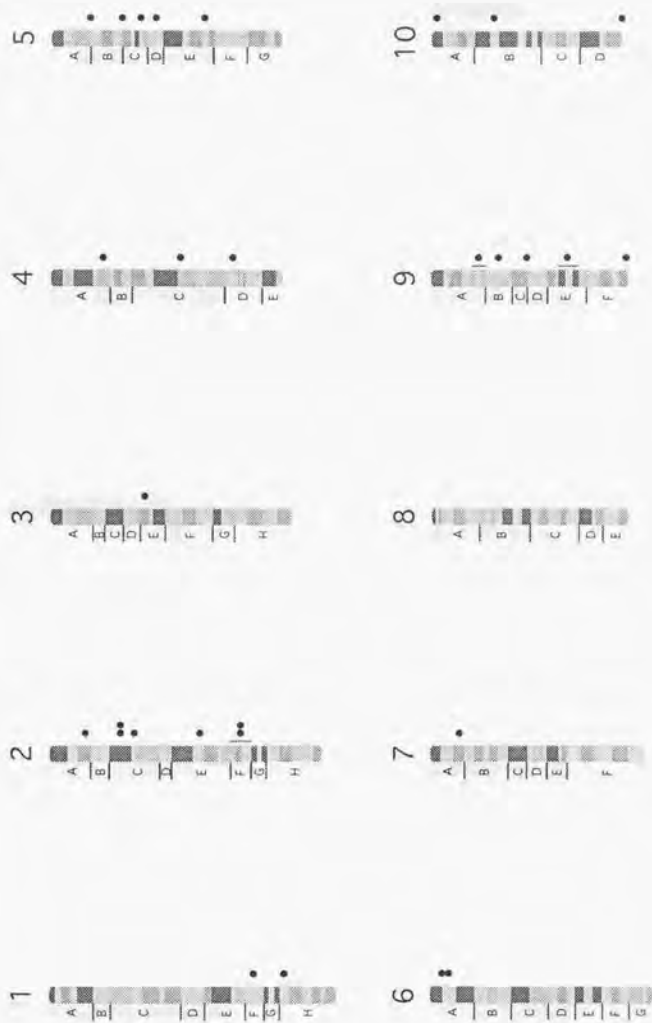


Fig. A-5 (1). Distribution of breakpoints in each chromosome (Mouse E, Chromosome 1-10).



Fig. A-5 (2). Distribution of breakpoints in each chromosome (Mouse E, Chromosome 11-19, X and Y).



Fig. A-6 (1). Distribution of breakpoints in each chromosome (Additionally karyotyped 32 cells of Mouse E, Chromosome 1-10).



Fig. A-6 (2). Distribution of breakpoints in each chromosome (Additionally karyotyped 32 cells of Mouse E, Chromosome 11-19, X and Y).

