

テーマ（２）

放射線による健康影響の解明及び放射線以外の要因による健康リスクの低減を含めた総合的な健康リスクに関する研究

- 2-1 放射線誘発小児甲状腺がんの特異性に関する実証研究
山田 裕（量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所福島再生支援本部 本部長）
- 2-2 小児期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす影響とメカニズム解明
鈴木 啓司（長崎大学原爆後障害医療研究所放射線災害医療学研究分野 准教授）
- 2-3 小児・青年期の低線量率放射線被ばくによるがんリスクの評価——インドケララ州の高自然放射線地域住民の調査結果を中心として
秋葉 澄伯（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座疫学予防医学 客員研究員）
- 2-4 マウスを用いたセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくによる成体と子孫への影響の定量的実験検証
中島 裕夫（大阪大学大学院医学系研究科放射線基礎医学 助教）
- 2-5 低線量率放射線長期連続照射によるマウス急性骨髄性白血病の起因となる *PU.1* 遺伝子変異の線量率依存性の解析～放射線発がんの線量率効果の仕組みを考える～
甲斐 倫明（大分県立看護科学大学看護学部人間科学講座環境保健学教室 教授）
- 2-6 低線量放射線は循環器疾患のリスクを上げるか？低線量率放射線は？放射線関連循環器疾患の機序の解明
高橋 規郎（放射線影響研究所副理事長室 顧問）
- 2-7 DNA 損傷・修復に基づく放射線・化学物質影響の統合と個人差の評価に関する研究
松本 義久（東京工業大学原子炉工学研究所物質工学部門 准教授）

2-1 放射線誘発小児甲状腺がんの特異性に関する実証研究

山田 裕（量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 福島再生支援本部 本部長）

研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所事故後「県民健康調査」が実施されており、その甲状腺検査結果において、我が国の地域がん登録で把握されている甲状腺がんの罹患統計などから推定される有病数に比べて多い数値が示されている。このような状況については未だその原因が放射線によるものなのか、他の要因によるのか明らかにはなっていないことから、放射線誘発甲状腺がんの特異性を調べ、そのリスクや作用機序を明らかにすることは、今後、福島において発生している小児甲状腺がんの原因を理解する上で重要である。

そこで本研究では、小児期の放射線被ばく、特に低線量率連続被ばくによる甲状腺がん特異的な生物反応を明らかにし、小児期の放射線被ばくにより誘発される甲状腺がんのリスク評価、および診断のための基礎情報を得ることを目的として行うこととした。

実験では、まず B6C3F1 マウスを用いた動物実験試料のアーカイブを利用して、放射線照射により誘発した甲状腺がんの病理・分子解析をおこない、その特異性を明らかにすること、ついでヒトの甲状腺がんで見られる遺伝子変異を持つマウスに低線量・低線量率放射線を照射し、その遺伝子変異により誘発される甲状腺がんと修飾要因としての被ばくとの関連性を調べることを計画した。

この研究により、小児期の放射線被ばくによる甲状腺がんの線量効果関係とその遺伝子変異の特異性に関わる情報、その発がん機序と修飾要因としての被ばくとの関連性に関する情報が得られることが期待される。これらの成果は、小児期に低線量率放射線に被ばくした時に見られる甲状腺がんに関する理解を深め、適確な放射線防護対策を行っていくために重要な科学的根拠を提供する。

本年度は、既存試料（放射線照射及び非照射、生涯飼育マウス甲状腺組織）の病理診断と放射線影響評価を行った。その結果、7週齢被ばくよりも1週齢被ばくマウスにおいて放射線照射による甲状腺発がん感受性が高い傾向があること、甲状腺において「過形成」から「腺腫」、「腺癌」まで段階的に変化する像が観察されること、甲状腺腫瘍の発生頻度は線量依存性に増加し発生時期は線量に依存して早まる（潜伏期が短縮する）傾向があること、単回照射に比べて低線量率放射線（連続照射）では甲状腺腫瘍の発生は減少する傾向があることがわかった。

キーワード

放射線発がん、甲状腺がん、小児被ばく、低線量率放射線、マウス

研究参加者

柿沼 志津子（放射線影響研究部 部長）

森岡 孝満（長期低線量発がん病理研究チーム 主幹研究員）

臺野 和広（発達期被ばく影響研究チーム 主任研究員）

金 小海（長期低線量発がん病理研究チーム 研究員）

I. 研究目的

2001-2010年のがん罹患率に基づく福島県における18歳までの小児甲状腺がんは2.1人と推計されるが、「県民健康調査」において既に160人を超えて悪性ないしその疑いがあると診断されている。この解釈として、被ばくによる過剰発生の可能性を完全に否定するものではないが、将来的に臨床診断されるようながんを多数診断（過剰診断）している可能性が高いと考えられている^{1,2)}。よって現時点において放射線被ばくとの因果関係を明確に肯定あるいは否定することは困難な状況にある。そこで本研究では、これまで行われてきた動物実験試料のアーカイブを利用して、放射線照射により誘発した甲状腺がんの病理・分子解析をおこない、その特異性を明らかにする。ついでヒトの甲状腺がんで見られる遺伝子変異を持つマウスに低線量・低線量率放射線を照射し、その遺伝子変異により誘発される甲状腺がんと修飾要因としての被ばくとの関連性を調べる。以上より、小児期の放射線被ばくにより誘発される甲状腺がんのリスク評価、および診断のために有益な基礎情報を得ることを目的として行う。平成29年度は、既存の動物実験データと試料の病理解析をおこない、放射線誘発甲状腺がんの線量効果関係、線量率、照射時年齢による違いを調べた。また、組織標本の遺伝子変異解析方法を検討するとともに、遺伝子改変動物の導入を図った。

II. 研究方法

1. 既存資料の解析

これまでの動物実験データ、病理スライド標本、及び組織試料を蓄積整理した動物実験病理アーカイブ（B6C3F1 雄雌マウス）を利用して解析を行った。アーカイブシステムよりガンマ線（高線量率一回、あるいは低線量率連続、1週齢及び7週齢）照射マウスの試料を抜き出し、甲状腺がんの組織型（乳頭癌、濾胞癌等）を病理診断し、その線量効果関係、線量率、照射時年齢による違いを調べた。

2. 組織標本の遺伝子変異解析方法および遺伝子改変動物導入の検討

文献検索により実験動物およびヒト甲状腺がんの特異的遺伝子変異とその解析方法について調べると共に、放射線照射実験に最適な遺伝子改変動物と導入先を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、放射線医学総合研究所内の「動物実験委員会」において実験内容の妥当性が審議され、理事長の承認を受けた上で遂行された。

III. 研究結果

1. 既存資料の解析

① 寿命短縮効果

試料は、B6C3F1 雌マウスに高線量率一回照射、あるいは低線量率連続照射して生涯飼育した動物から得た (図 III-1)。

4Gy 一回照射では 43%、1Gy でも 6%の寿命短縮が認められた。しかしながら低線量率連続照射 (4週間) では、総線量 4 Gy あるいは 1 Gy 照射すると、寿命短縮はそれぞれ 14%、3%となり、寿命短縮効果は軽減した (図 III-2)。

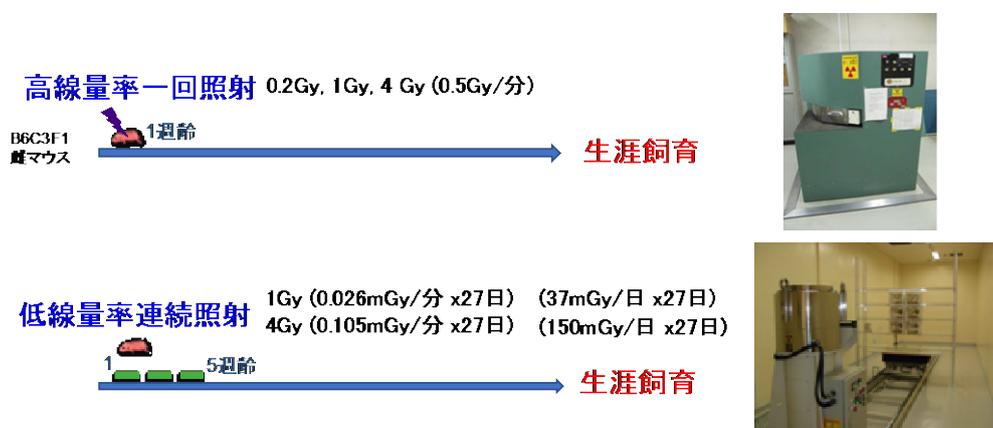


図 III-2 高線量率一回照射、低線量率連続照射方法

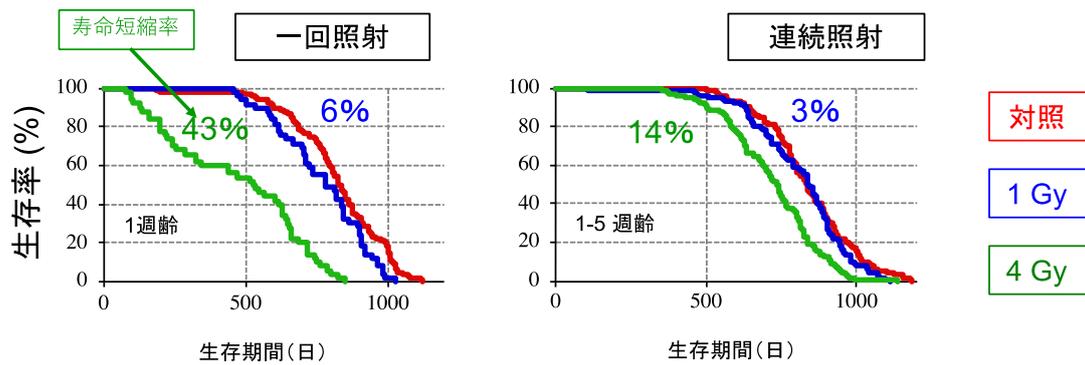


図 III-2 1週齢照射（一回または連続照射）マウス（雌）の生存曲線

②病理診断

コントロール（非照射）群と照射群において、甲状腺に病理組織型として前がん病変である過形成、腺腫、腺癌が認められた。腺癌については乳頭癌と濾胞癌の両方が観察された（図 III-3）。

これらのマウスの甲状腺組織の病理解析結果をまとめた（表 III-1）。調べた実験群は、コントロール群と、1週齢あるいは7週齢における0.2, 1, 4Gyの一回照射群、および1週齢から5週齢までの総線量1Gyと4Gyの連続照射群である。

一回照射では1週齢照射の0.2, および1Gy照射群でコントロールに比べて過形成の頻度（それぞれ33%, 26%）、および腫瘍（腺腫+腺癌）の頻度（それぞれ5%, 13%）が増加する傾向を示したが、7週齢照射ではほとんど増加しなかった。また1-5週齢の連続照射では、一回照射に比べて甲状腺腫瘍の発生頻度が減少した。

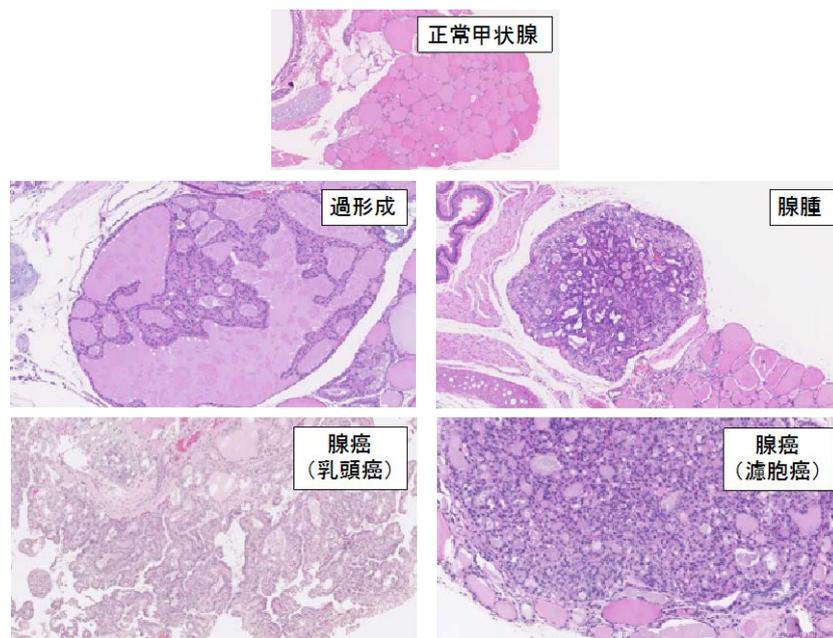


図 III-3 マウス正常甲状腺と放射線誘発甲状腺腫瘍の病理組織像

表 III-1 マウス正常甲状腺と放射線誘発甲状腺腫瘍の病理組織像

実験群	照射 週齢	照射 線量 (Gy)	動物数	過形成	%	腺腫	%	腺癌	%
コントロール		0	79	17	22	1	1	1	1
一回照射0.2Gy	1	0.2	99	33	33	1	1	4	4
一回照射1Gy	1	1	100	26	26	11	11	2	2
一回照射4Gy	1	4	97	11	11	3	3	1	1
一回照射1Gy	7	0.2	102	26	25	1	1	1	1
一回照射4Gy	7	4	100	25	25	3	3	0	0
連続照射1Gy	1-5	1	60	6	10	0	0	0	0
連続照射4Gy	1-5	4	27	0	0	1	4	0	0

③ 線量・効果関係

1 週齢マウスににおける、一回照射による甲状腺腫瘍等の線量依存性について、過形成、腺癌では 0.2Gy でピーク、腺腫は 1Gy でピークを示し、高線量では発生率は低下するような線量・効果関係が認められた。

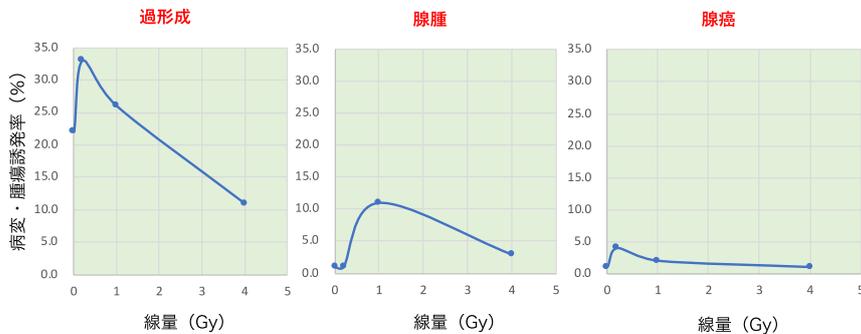


図 III-4 マウス放射線誘発甲状腺腫瘍の線量依存性 (一回照射)

④ 腫瘍発生時期

上記の線量・効果関係の現象を詳しく解析するために、寿命を 100 日間で区切り、その期間に死亡した動物数を表示して、甲状腺腫瘍の発生時期について調べた。コントロールでは 900 日以上で腫瘍が発生するのにに対し、0.2Gy では 700 日以降、1Gy 照射では 600 日以降からも腫瘍が発生しており、放射線照射により甲状腺腫瘍の潜伏期が短縮することがわかった。また 4Gy 照射では甲状腺腫瘍が発生する前にまで寿命が短縮され、すなわち甲

甲状腺腫瘍が発生する前にマウスが死亡するため、甲状腺腫瘍の発生率が低下していることがわかった。

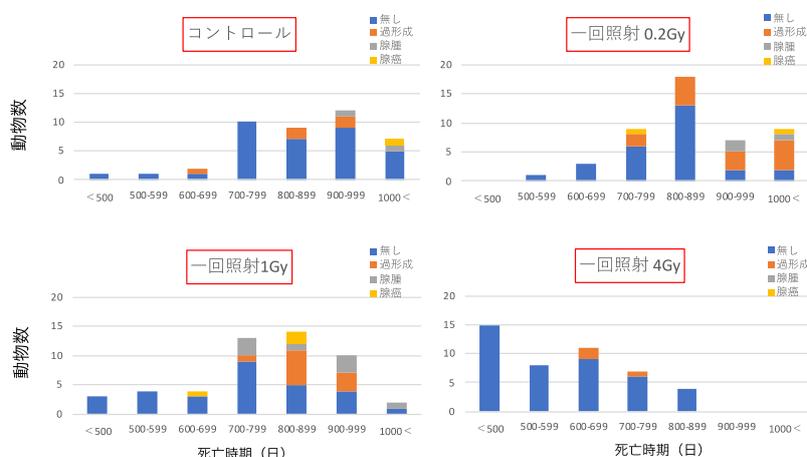


図 III-5 マウス放射線誘発甲状腺腫瘍の発生時期
(寿命を 100 日間で区切り、その期間に死亡した動物数を表示)

2. 組織標本の遺伝子変異解析方法および遺伝子改変動物導入の検討

①組織標本の遺伝子変異解析方法の検討

ヒト甲状腺がん遺伝子変異について文献検索した。乳頭癌では RET 遺伝子再構成と BRAF 遺伝子点突然変異がよく生じているが (RAS 遺伝子変異は少なく, PPAR γ 遺伝子再構成は無い)、濾胞癌では, RAS 遺伝子点突然変異と PPAR γ 遺伝子再構成が高率に生じている (RET 遺伝子, BRAF 遺伝子変異は無い) など、病理組織型により違いがあることが報告されている。また、実験動物ではほとんどみられないが、ヒト甲状腺低分化癌と未分化癌では、p53、 β カテニン (CTNNB1)、NTRK1 遺伝子の変異も生じていることがわかった。

放射線被ばく者に生じた甲状腺がんについては、チェルノブイリ小児甲状腺乳頭癌では、RET/PTC3 再配列が主な変異であり BRAF 遺伝子再配列も生じること、一方、原爆被爆者の成人甲状腺乳頭癌では RET/PTC1 再配列が主要な変異であり BRAF 遺伝子再配列は無いことが報告されており、甲状腺がん発生時期、あるいは内部被ばくか外部被ばくかにより遺伝子変異に違いがある可能性が示唆された。また、原爆被爆者のうち、若年被ばくでの甲状腺乳頭癌の RET/PTC 再配列頻度は、成年被ばくより高いことが報告されており、被ばく時年齢によっても遺伝子変異が違っていることが示唆された。

よって、上記遺伝子について既存の甲状腺がん組織の遺伝子変異を調べ、甲状腺がんの病理型、照射時年齢、発生時期による違いを比較検討することとした。腫瘍組織が小さいため、マイクロダイセクションにより病変部を選択的に採取した DNA を抽出し、PCR 増幅して、次世代シーケンサー-NEXT で解析することとした。

②遺伝子改変動物導入の検討

放射線照射時年齢を変えてその影響を調べるため、甲状腺腫瘍の発生時期を変えて調べることができる遺伝子改変マウスを検討した。標的遺伝子は福島の小児甲状腺がんで見られている **BRAF** 遺伝子とし、タモキシフェン投与により **Cre** リコンビナーゼがサイログロブリンプロモーター発現細胞（甲状腺濾胞細胞）でのみ活性化し、活性化後数週間で甲状腺腫瘍を誘発する条件を考慮して **BRafCA; TPO-Cre-ERT2** 遺伝子組換えマウスを選定した。当マウスを飼育繁殖している長崎大学に申請して許可を得、研究機関間の実験動物導入手続きを進めた。

IV. 考察

現在において、放射線はヒトにおける甲状腺がんの原因の一つである事が明らかになっている。甲状腺は、成長が著しいこどもにおいて特にヨウ素を取り込みやすく、原子力事故で大気中に放出された放射性ヨウ素を取り込んだ場合の内部被ばくが問題になる。小児甲状腺がんは年間 100 万人に 5 人程度と、非常に発生頻度の低いがんであるが、チェルノブイリ事故の時は、放射性ヨウ素を飲食物から大量に取り込んだこどもたちの間で、事故から 3~4 年後に甲状腺がんの増加が観察され始め、10 年後には 100 万人中 100 人以上までに増加した。しかも女子で感受性が高いのが特徴となっている³⁾。

放射線の外部被ばくによっても甲状腺がんのリスクが増加することが、原爆被ばく者や医療被ばく（白癬治療、小児がん治療等）患者の疫学調査によって知られている。この調査では 15 歳未満のこどもにおいてリスクの増加が認められるが 15 歳以上では認められず、放射線による甲状腺がん誘発には照射時年齢依存性があることが示されている⁴⁾。

チェルノブイリ事故における甲状腺がんの過剰相対リスク(**ERR**)は 18 歳以下の子どもの平均で 1 シーベルト(**Sv**)あたり約 1.9（ただし年齢を細かく分けると、4 歳未満で 7.4、4-12 歳で 1.6、12-18 歳で 0.7）であり⁵⁾、外部被ばく疫学調査では 15 歳未満において被ばくした場合の甲状腺がんの **ERR/Sv** は 7.7 であったことから⁴⁾、内部被ばくと外部被ばくによる甲状腺がんリスクに大きな違いは無いとされている。しかしながら、一度に被ばくしたときの甲状腺がんリスクと低線量で長期にわたり被ばくしたときのリスクが異なるかどうか、すなわち線量率依存性が有るかどうかについては不明である。

研究代表者らは、これまで大規模な実験動物を用いて放射線の影響を調べる研究をおこなってきており、発がんリスクの線量効果関係や、線量率、線質、照射時年齢依存性（特に幼若期被ばく）等を明らかにしてきた。本研究において、この動物実験アーカイブ試料を用いて甲状腺腫瘍について解析したところ、放射線照射したマウスの甲状腺においてもヒトにおいてみられる腫瘍（腺腫、腺癌）が病理学的に認められること、甲状腺腫瘍の発生頻度は線量依存性に増加すること、さらに今回の新規な発見として発生時期は線量に依存して早まる（潜伏期が短縮する）傾向があること、低線量率放射線（連続照射）では甲

甲状腺腫瘍の発生は減少する傾向があることがわかった。これらの結果は、このマウスモデルがヒトにおける放射線誘発甲状腺がんを調べる上で有効なモデルになることを示す。

次年度においては、病理検索症例を増やして定量性を持たせ、統計学的に有効なデータとしてまとめると共に、分子解析を進めて放射線誘発甲状腺がんの発生機序を調べていく予定である。

V. 結論

本年度は既存試料（放射線照射及び非照射、生涯飼育マウス甲状腺組織）の病理診断と放射線影響評価を行い、以下の結果を得た。

- ・ 1 週齢マウスにおいて放射線照射により甲状腺に腫瘍病変が増加する傾向があった。
- ・ 「過形成」から「腺腫」、「腺癌」まで段階的に変化する像が観察された。
- ・ 甲状腺腫瘍の発生頻度は線量依存性に増加し、発生時期は線量に依存して早まる（潜伏期が短縮する）傾向が見られた。
- ・ 低線量率放射線（連続照射）では、甲状腺腫瘍の発生は減少する傾向があることがわかった。
- ・ 組織標本の遺伝子変異解析における遺伝子を選定すると共に、実験に最適な遺伝子改変動物と導入先を決定した。

VI. 次年度以降の計画

1) 既存資料の解析

動物実験病理アーカイブ（B6C3F1 雄雌マウス）よりガンマ線（高線量率一回、あるいは低線量率連続、及び 7 週齢）照射マウスの病理診断を追加し、その線量効果関係、線量率、照射時年齢による違いを調べる。次いで、各週齢照射の甲状腺癌について、マイクロダイセクションによりがん細胞部分を取り出し、DNA を抽出する。放射線照射後に生じた甲状腺がん組織の遺伝子変異を全エクソンシーケンスにより調べる。

2) 動物照射実験

遺伝子改変動物として、タモキシフェンによりコンデシヨナル（甲状腺）に誘導する BRafCA; TPO-Cre-ERT2 を長崎大学より今年度中に導入する。小児期に放射線（低線量率、高線量率）を照射し、甲状腺がんの病理診断を行って発生率を求め、その線量依存性、線量率依存性を調べる。がん細胞部分を取り出し、セカンドヒットの遺伝子変異がさらに生じているのかを次世代シーケンスにより調べる。

3) 分子生物学的解析実験

上記小児期マウスに照射し、経時的に甲状腺および血清を採取する。免疫組織化学的に甲状腺組織の初期応答 (γ H2AX, Caspase3, 53BP1) や増殖能 (Ki-67) を調べるとともに、血清中の甲状腺関連ホルモン(TSH,T4 等)、免疫及び炎症関連因子 (インターロイキン等) 等を測定する。

非照射群と比較することにより照射群に特異的な変化をマーカーとして抽出し、どのような因子が放射線誘発小児甲状腺がんの発がん過程に関与するのか定性的、かつ定量的に明らかにする。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

無し

VIII. 参考文献

1) 津金昌一郎

「福島県における甲状腺がん有病者数の推計」

福島県「県民健康調査」検討委員会 第4回「甲状腺検査評価部会」、2014/11/11

2) 福島県県民健康調査検討委員会甲状腺検査評価部会

「甲状腺検査に関する中間とりまとめ」

第19回「県民健康調査」検討委員会、 2015/5/18

3) 国連科学委員会(UNSCEAR)

「チェルノブイリ事故からの放射線による健康影響」(日本語版)

国連科学委員会(UNSCEAR)2008年報告書、第2巻：影響、科学的附属書D、pp60-61

4) E. Ron, JH. Lubin, RE. Shore, K. Mabuchi, B. Modan, LM. Pottern, AB. Schneider, MA. Tucker, JD. Boice Jr., Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. Radiat Res. (1995) 141(3), 259-277.

5) AV. Brenner, MD. Tronko, M. Hatch, TI. Bogdanova, VA. Oliynik, JH. Lubin, LB. Zablotska, VP. Tereschenko, RJ. McConnell, GA. Zamotaeva, P. O'Kane, AC. Bouville, LV. Chaykovskaya, E. Greenebaum, IP. Paster, VM. Shpak, E. Ron. I-131 dose response for incident thyroid cancers in Ukraine related to the Chornobyl accident. Environ Health Perspect. (2011) 119(7), 933-939.

Study of carcinogenesis of radiation-induced thyroid cancer in childhood mice

Yutaka Yamada

Fukushima Project Headquarters, National Institute of Radiological Sciences
National Institutes for Quantum and Radiological Sciences and Technology

Abstract

After the accident at the Tokyo Electric Power Company Fukushima Daiichi Nuclear Power Station, it does not become clear whether a cause of the frequent occurrence of childhood thyroid cancer depends on a radiation whether it depends on other factors. It is important that a risk and mechanism of radiation-induced thyroid cancer is clarified to understand a cause of the frequent occurrence of childhood thyroid cancer in Fukushima.

A purpose of this study is to get clarifying carcinogenesis of thyroid cancer due to low-dose-rate radiation exposure at childhood period, and basics of thyroid cancer information for a risk estimation and a diagnosis.

By the experiment, pathological and molecular analysis of radiation-induced thyroid cancer are performed with the archive of the animal experiment sample (B6C3F1 female mice). Then, transgenic mice with gene mutation to be seen for human thyroid cancer are irradiated, and thyroid cancer induction and association with the radiation exposure as the modifying factor are investigated.

Radiation sensitivity of thyroid cancer in the B6C3F1 mice tended to be high in a 1 week of age radiation exposure mouse than 7 weeks of age radiation exposure. Hyperplasia, adenomas, and adenocarcinoma in thyroid gland progressively was observed. Radiation-induced thyroid cancer increased in dose dependent manner, and the latent period became short. The induction of thyroid tumor tended to decrease by the low dose rate radiation in comparison with irradiation in high dose rate.

Keywords

Radiation carcinogenesis, thyroid cancer, childhood cancer, low-dose-rate radiation, mice

2-2 小児期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす影響と

メカニズム解明

組織における DNA 障害および組織反応の解析

主任研究者：鈴木 啓司（長崎大学 原爆後障害医療研究所
放射線災害医療学研究分野 准教授）

分担研究者：柿沼 志津子（国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構
放射線医学総合研究所 放射線影響研究部 部長）

分担研究者：大塚 健介（一般財団法人電力中央研究所 原子力技術研究所
放射線安全研究センター 主任研究員）

研究要旨

東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故（以降は福島原発事故）を受けて、事故の被災者をはじめ、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。事故以来 4 年以上がたち、福島県内における県民健康調査において被ばく線量が把握されるにともない、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされている。しかしながら、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子ども達の学校生活環境の変化、戸外活動の制限、運動不足等に起因するカロリー摂取・消費バランスの変化による軽度の肥満傾向（以降これをカロリー摂取過多と呼ぶ）が、放射線の発がんリスクを修飾する要因となる可能性が指摘されており、健康リスクの低減という観点からも、その影響を明確にすることが望まれる。カロリー摂取過多の自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも関わらず、カロリー摂取過多が、放射線発がんリスクにおよぼす影響は、体系的に調べられている例は極めて乏しい。このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が低線量放射線被ばくの健康影響におよぼす影響を、メカニズム論を基盤とした科学的に実証された事実を提示する研究が強く求められている。

このような背景から、本研究では、動物発がんモデルを用いた高カロリー食（カロリーの 60% が脂肪に由来する餌で、対照餌では 10%）による肥満（Diet-induced obesity; DIO）の実験系を用い、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化が、臓器・組織の炎症反応を引き起こすことにより、放射線被ばくによる発がんリスクを上昇させる』との仮説を提唱し、これを証明する研究計画を立案した。特に、低線量（100mGy）の放射線被ばくを含む、放射線被ばくによる発がんの各プロセスでの DIO の影響を、分子・細胞・組織・個体レベルで統合的に解析する計画

を立てた。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの増加する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、肺がん、および消化管がんである。これらの解析に加え、放射線発がんの標的が組織幹細胞であることに留意し、カロリー摂取過多が消化管幹細胞ターンオーバーにおよぼす影響も解明する。

本研究は、長崎大学、放射線医学総合研究所（放医研）および電力中央研究所（電中研）の3機関が連携した共同研究を推進し、放医研では、DIO動物の長期飼育、放射線照射（100mGy、1Gy および 4Gy）、経時的標本採取、および発がん解析を担当した。一方、電中研では、DIO動物における消化管がん解析、およびDIOの消化管幹細胞影響の解析を担当した。長崎大学では、これら2施設から病理標本の提供を受け、組織におけるDNA障害、細胞死、細胞老化、および炎症反応の解析を担当した。解析結果は、定期的開催する班会議で共有し、各研究計画の推進に反映した。

平成28年度までに、B6C3F1マウスの飼育を継続し、4週齢から8週齢まで高カロリー餌を投与したマウスの初期発がんの有無を確認するために、継時的な組織の採取と解析を実施した。その結果、高カロリー餌の投与が終了した8週齢において、肝臓においてPLIN2（ペリリピン2）陽性の微細な脂肪滴を蓄積した肝細胞が多数出現し、脂肪肝の状態になっていた。また、この時点で、脂肪組織内に、PLIN2陽性の冠様構造を認め、マクロファージの集積が観察された。一方、遺伝子改変により消化管幹細胞系譜追跡を可能にしたマウス（LRZマウス）においても、高カロリー餌投与マウスの飼育を継続し、消化管幹細胞のターンオーバーに対する影響の解析に着手した。平成29年度は、これらの実験結果を受けて、終生飼育をさらに継続し、発がん頻度の検討及び発がんマウスの病理解析を実施した。

本研究課題を推進することにより、カロリー摂取過多が、低線量放射線被ばくによる健康影響にどのような影響をおよぼすかが明らかになる。また、カロリー摂取過多による放射線発がんへの影響のメカニズムが解明され、とりわけ小児期の生活習慣等の変化により懸念される放射線発がんリスクを低減するための、機構論に基づいた対策を可能にする科学的基盤が提供できると期待される。

キーワード

放射線、カロリー、低線量、炎症、組織幹細胞

I. 研究目的

東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故（以降は福島原発事故）を受けて、事故の被災者をはじめ、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。事故以来4年以上がたち、福島県内における県民健康調査において被ばく線量

が把握されるにともない、「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の中間取りまとめでも、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされている。しかしながら、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子ども達における生活習慣等の変化が、放射線発がんの頻度を修飾する要因となる可能性が懸念される。

中でも、学校生活環境の変化、戸外活動の制限、運動不足等に起因するカロリー摂取過多は、放射線の発がんリスクを修飾する要因として注視する必要がある、健康リスクの低減という観点からもその影響を明確にすることが望まれる。カロリー摂取過多の自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が、放射線発がんリスクにおよぼす影響は、体系的に調べられている例は極めて乏しく、特に、低線量放射線被ばくによる発がんに限れば、カロリー摂取過多の影響を評価する科学的知見は皆無である。このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が低線量放射線被ばくの健康影響におよぼす影響を、メカニズム論を基盤とした科学的に実証された事実を提示する研究が強く求められている。

そこで本研究では、動物発がんモデルを用いた高カロリー食による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の実験系を用い、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化が、臓器・組織の炎症反応を引き起こすことにより、放射線被ばくによる発がんリスクを上昇させる』との仮説を提唱し、これを証明する研究計画を立案した。特に、低線量 (100mGy) の放射線被ばくを含む放射線被ばくによる発がんのプロセスを、①DNA障害の誘発と除去、②細胞死を含む初期組織反応、③組織障害の回復、④初期がんと発がん微小環境、および、⑤がんの成立と進展、とに分け、各プロセスでの DIO の影響を、分子・細胞・組織・個体レベルで統合的に解析する事を目的としている。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの増加する、胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、肺がん、および消化管がんである。これらの解析に加え、放射線発がんの標的が組織幹細胞であることに留意し、消化管幹細胞の動態を追跡できるように工夫した遺伝子改変マウスを用いて、カロリー摂取過多が消化管幹細胞ターンオーバーにおよぼす影響も解明する事を目標にした。最終年度である平成 29 年度は、これまでの研究成果をさらに発展させ、終生飼育および定期的な標本採取により発がん頻度を評価し、組織反応の解析結果とともに成果の取りまとめを行った。

II. 研究方法

本研究は、3 研究機関の連携による共同研究として計画されたもので、研究全体の概要は以下のとおりである (図 II-1)。まず、発がん実験においては、放医研において放射線照射を行ったマウスに、小児期に相当する期間に高カロリー餌を与え、その後、長期飼育をすることによってがんの発生を解析した。具体的には、放医研において、B6C3F1 雄マウス (1 群 60 匹) に、1 週齢で放射線 (γ 線 (0.5Gy/分)、100mGy、1Gy および 4Gy) を照射

し、その後、4週齢から8週齢まで高カロリー餌を与えてDIOを誘導し、その後、通常餌にもどしてから700日以上長期終生飼育を継続した。放射線照射後は、一定期間毎に組織標本を採取して、初期発がんからの継時観察を実施した。対象とするがん腫は、小児期被ばくにより発がんリスクが上昇する、脾臓および胸腺リンパ腫、肝がん、および肺がんである。また、採取した組織は、一部を長崎大学に送付し、DNA損傷、細胞死、組織反応、および炎症反応の解析を行った。電中研では、幹細胞系譜追跡系導入(LRZ)マウスにおいて、同様のプロトコールによりDIOを誘導し、消化管幹細胞のターンオーバーにおよぼす影響を評価すると同時に、消化管がんの発生におよぼす影響を解析した。また、採取した組織は、長崎大学にも送付し、DNA損傷や細胞死、炎症反応の解析を行った(図II-2)。

研究概要

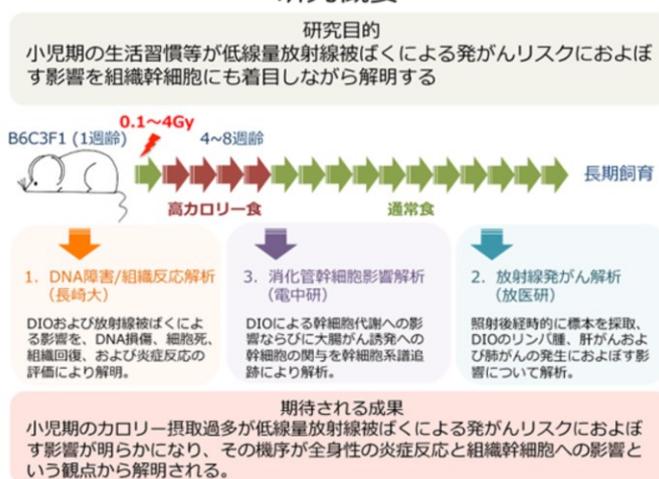


図 II-1. 研究の概要図

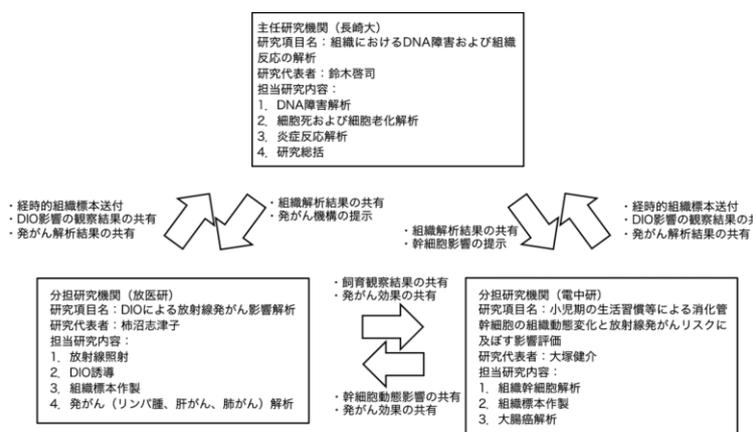


図 II-2. 研究組織間の連携

DIO を誘導するための、高カロリー餌としては、Research Diet 社の D12492 を用いた。D12492 は、カロリーの 60%が脂肪に由来し、残りの 20%ずつが蛋白質と炭水化物の飼料である。単位重量あたりのカロリー量は、コントロール餌 (D12450J、10%脂肪) にくらべおおよそ 140%増加しており、多くの DIO 研究の標準飼料として汎用されているものである。通常の DIO の誘導と異なるのは、小児期に相当する 4 週齢から 8 週齢までに限定して高カロリー餌を与えるところである。

1. 組織における DNA 障害および組織反応の解析

DIO あるいは放射線による DNA 障害あるいは組織反応を定量的に評価するため、放医研において採取された胸腺・脾臓、肝臓および肺を、ホルマリン中で固定後にパラフィン包埋し、薄切標本 (厚さ 4 μ m) を作成して解析に用いた。スライドガラス上に固定した薄切切片は、脱パラフィン処理を施した後に PBS 中に保管し、蛍光免疫染色を行うまで、冷蔵庫中で保存した。

標本の染色を行う当日に、賦活化液中で 95°C のウォーターバスに 30 分浸け、抗原の賦活化を行った。その後、5%skim milk を含む TBS-T (0.5%Tween-20 を含む TBS 緩衝液) に一次抗体を希釈して、切片と 37°C で 2 時間反応させた。反応終了後、PBS で十分に洗浄した後、二次抗体を 37°C で 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa546 標識の抗ウサギ IgG 抗体及び Alexa647 標識の抗ラット IgG 抗体を用いた。標本は、1 μ g/ml の DAPI を含む 10%グリセリン PBS 溶液中で封入して保存した。

作成した標本は、蛍光顕微鏡下で観察し、デジタル画像を取得した後、画像解析システムにより一次抗体のシグナルを解析した。一次抗体としては、DNA 損傷の検出には、抗 53BP1 抗体 (Bethyl、A300-272) を用いた。組織障害および回復の解析には、抗 Ki-67 抗体 (BioLegend、16A8 もしくは eBioscience、SolA15) を用いた。炎症反応は、組織におけるマクロファージの浸潤を、マクロファージに対する特異的抗体 (F4-80、BioLegend) を用いた蛍光免疫染色法により解析した。脂肪滴の蓄積は、抗 Perilipin (PLIN) 1/2 抗体 (Novus Biological) を用いて解析した。

2. DIO による放射線発がん影響解析 (詳細は分担研究者の報告書を参照)

B6C3F1 マウスを用いて、DIO の誘導、放射線照射および発がん解析を実施した。DIO の誘導は、4 週齢から 8 週齢まで高カロリー餌を与えることにより行った。また、放射線照射との組み合わせを行う場合には、1 週齢で放射線 (γ 線 (0.5Gy/分)、100mGy、1Gy および 4Gy) を照射し、4 週齢から DIO を誘導した。その後、通常餌にもどしてから 700 日後までの長期飼育を行った。放射線照射後には、一定期間毎に対象とする臓器・組織における発がんの継時観察を平成 29 年度にかけて実施した。解析するがんは、脾臓および胸腺リンパ腫、肺がんおよび肝がんである。合わせて、解析のための組織標本を作成し、主任研究者と協働により研究項目 1 の解析を実施した。対象とする組織は、胸腺、脾臓、骨髄、

肺および肝臓である。

3. 消化管幹細胞の組織動態変化（詳細は分担研究者の報告書を参照）

遺伝子改変により消化管幹細胞系譜追跡法を可能にしたマウス（LRZ マウス）（1 群 5～10 匹）において、幹細胞のターンオーバーに与える DIO の影響を解析した。DIO の誘導は、LRZ マウスに高カロリー餌を与えることにより行った。放射線照射との組み合わせの場合には、1～2 週齢で放射線（X線、0.5Gy/分、0.1～4Gy）を照射し、3～4 週齢から DIO を誘導した。幹細胞ターンオーバーへの影響は、Lgr5 プロモーターに制御される LacZ の発現の有無により評価した。

また、大腸炎症関連がんモデルを用いて、放射線による大腸がんの誘発に対する DIO の効果（1 群 5～10 匹）を 18～20 週齢後までの期間において検証し、放射線発がんにおける組織幹細胞に対する DIO の影響を解明した。

（倫理面への配慮）

本研究は、動物実験を行うにあたっては、国内の動物実験指針を遵守し、照射実験を行う環境科学技術研究所の動物実験委員会等の承認を受けた上で、同所の動物実験ガイドラインを遵守して実験を行った。

III. 研究結果

1. 高カロリー餌による組織反応

本研究では、1 週齢で放射線照射したマウスを、ヒトの小児期に相当するマウスの小児期の 4 週齢～8 週齢の間に限定して高カロリー食を与える計画を実施した。まず、高カロリー餌による飼育の影響を評価するために、非照射マウスにおいて、体重の変化を観察した。その結果、高カロリー餌によって飼育を行った 4 週間以内に、通常餌よりも 8 週齢までで約 20%の体重の過剰な増加を認めた。しかしながら、興味深いことに、8 週齢から通常餌に戻して飼育を継続したところ、10 週齢までには、当初から通常餌で飼育した実験群とほぼ同じ体重にまで改善することが明らかになった。

そこで、高カロリー餌の摂取にともなう組織反応を解析するために、肝臓を対象に、脂肪性肝傷害を検討した。DIO モデルマウスでは、肥満にともなう肝傷害として脂肪肝の出現がよく知られているので、脂肪肝を、その初期状態からの検出できるマーカーとして、脂肪滴に存在するペリリピン（Perilipin:PLIN）蛋白質を利用した。PLIN 蛋白質には、PLIN1 と PLIN2 を始めとするいくつかの相同タンパク質が存在し、PLIN ファミリーを形成している。その中で肝臓で最も高発現しているのが PLIN2 で、脂肪滴における脂肪の流入出を制御している。抗 PLIN2 抗体を用いた蛍光免疫染色法による解析の結果、高カロリー餌の投与を開始する前でも、PLIN2 を発現する細胞が散在して確認され（図 III-1）、

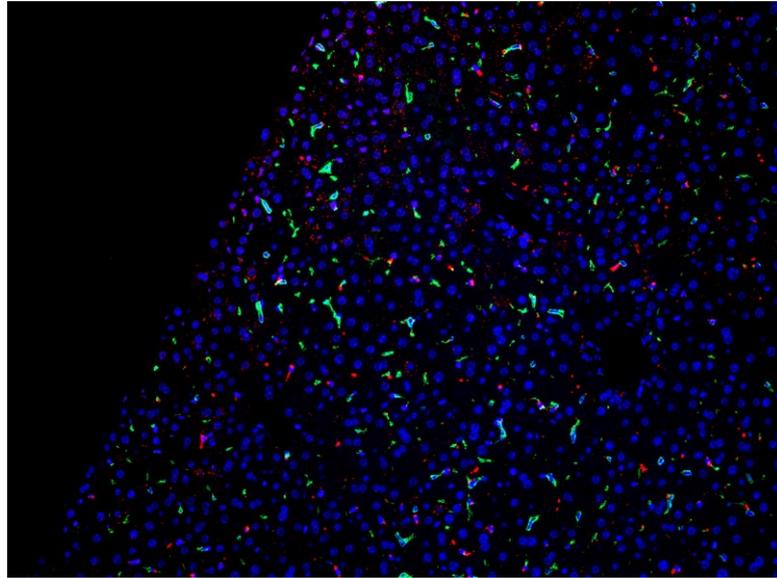


図 III-1. 4 週齢マウスの肝臓標本の蛍光免疫染色結果
(0Gy、通常食で飼育)

青色蛍光は核を DAPI で染色して得られたシグナル。赤色蛍光のシグナルは PLIN2 抗体によるもの。また、緑色蛍光は、抗 F4-80 により染色されたマクロファージ

これらは、肝臓組織中に散在する肝星細胞 (Hepatic stellate cell: HSC、別名伊東細胞) で、ビタミン A を貯留した油滴が染色されていた。また、抗 F4-80 により検出される肝臓の組織マクロファージは、類洞に広く分布していた。

これに対し、4 週間の高カロリー餌摂取を行った 8 週齢では、全ての肝細胞において、PLIN2 陽性の脂肪滴が高度に蓄積していることを見いだした (図 III-2)。PLIN2 陽性の脂肪滴は微細な脂肪滴として細胞質に分布し、脂肪滴を有する肝細胞は、肝臓全体に広がっていた。脂肪滴を有する細胞の分布にはやや偏りが見られ、中心静脈付近にとりわけ高度に脂肪滴を蓄積した細胞が分布していた。門脈付近では、逆に、脂肪滴の蓄積が軽度な細胞が多く、この傾向は、肝臓全体で確認された。抗 F4-80 抗体を用いたマクロファージの分布の評価では、もともと肝臓内に散在していたマクロファージの分布 (図 III-1) と比較すると、高カロリー餌を与える前後で特にその頻度に変化は認められなかった。また、PLIN2 陽性の脂肪滴の蓄積は、中心静脈付近で顕著であったが、マクロファージの分布は、特に中心静脈付近に集中しているということはなく、これら 2 つの結果から、高カロリー餌を給餌した 4 週間の間に、明らかな炎症反応が惹起されている可能性は低いと考えられる。

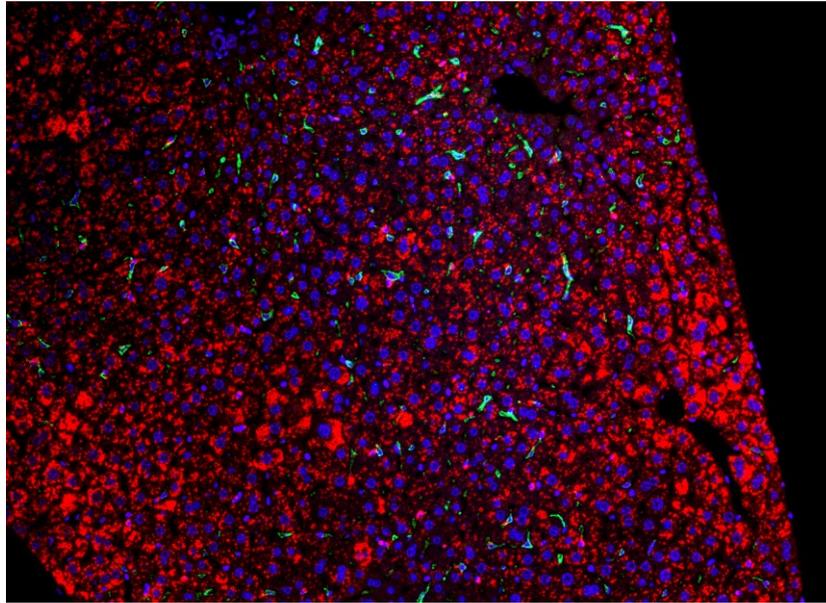


図 III-2. 高カロリー食による脂肪滴の蓄積
(0Gy、4 週齢から 8 週齢まで高カロリー食で飼育)
青色蛍光：核、赤色蛍光： PLIN2、緑色蛍光：マクロファージ

これら肝臓での解析と同時に、脂肪組織での組織反応を検討した結果、まず、脂肪組織では、脂肪滴に存在する PLIN の主要なタイプは、肝臓と異なり、PLIN1 であることがわかった。高カロリー餌の投与を開始する 4 週齢までは、脂肪組織を構成する脂肪滴は全てが PLIN1 陽性であったが、高カロリー餌投与を終了する 8 週齢では、PLIN1 陰性のクラスター状の構造が散在していた。驚くべきことに、これら PLIN1 陰性の領域には、PLIN2 陽性、かつ F4-80 陽性のマクロファージが局在しており、いわゆる冠様構造 (Crown-like structure: CLS) を形作っていた。これに対し、通常餌で飼育した実験群では、8 週齢においても CLS の出現は一切見られなかった。

2. 放射線照射による組織反応の修飾

小児期の生活習慣の変化が放射線影響におよぼす影響を検証するため、1 週齢時に放射線照射したマウスに、4 週齢から 4 週間の間、高カロリー餌を投与した。まず、放射線照射の体重への影響を調べると、0.1Gy および 1.0Gy 照射マウスでは体重の変化はほとんど見られなかったが、1 週齢で 4.0Gy を照射した場合には、体重の計測を始めた 4 週齢の段階で、非照射マウスの体重のおおよそ 20%程度まで減少していることが明らかになった。通常餌の飼育では、4 週齢時で見られた体重の減少傾向は、その後も長期間にわたって観察された。同様の傾向は、4Gy 照射の高カロリー餌投与群でも確認され、非照射群の高カロリー餌投与群と同様に 4 週齢から 8 週齢までの期間中の体重増加が見られた後は、非照射群よりも低い体重に移行し、高カロリー餌を与えていない照射単独群と同様の体重傾向として推移

した。

次に、PLIN2 陽性の脂肪滴の出現を調べると、通常餌で飼育した 4Gy 照射実験群でも、8 週齢の段階で、PLIN2 発現のレベルが上昇している細胞が散見された (図 III-3)。この飼育日数では、非照射群でも PLIN2 の発現レベルの上昇が認められたため、発現レベルの定量的評価を実施した (図 III-4)。

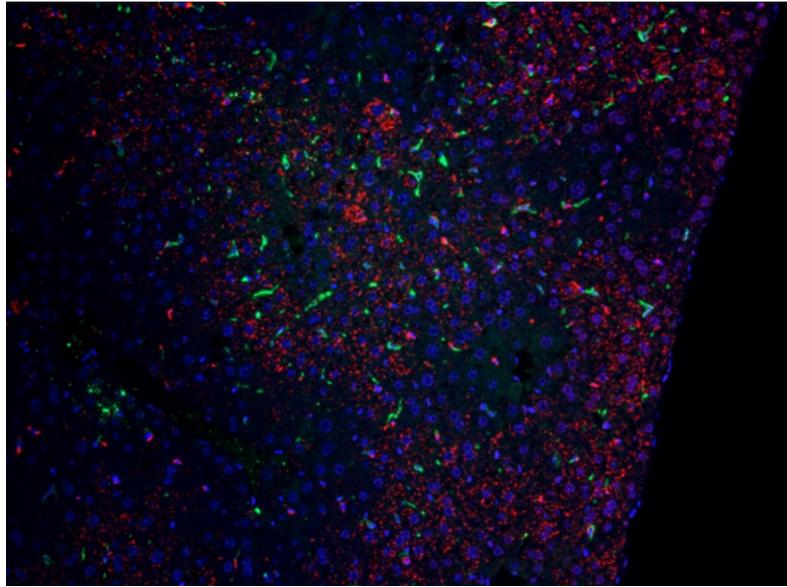


図 III-3. 放射線照射による脂肪滴の蓄積
(4Gy、通常食で飼育)

青色蛍光：核、赤色蛍光： PLIN2、緑色蛍光：マクロファージ

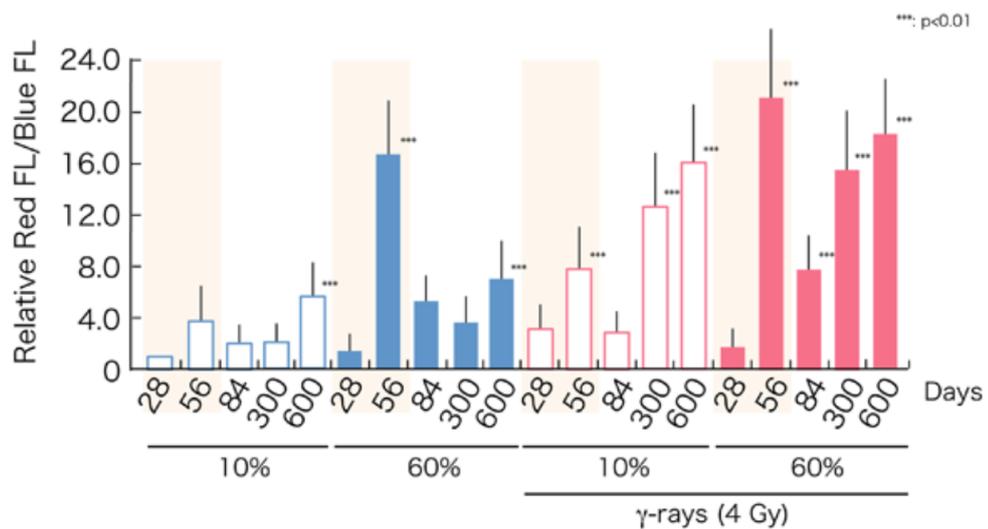


図 III-4. PLIN2 発現量の変化

PLIN2 の蛍光量 (Red FL) を、細胞数を反映する DAPI の蛍光量 (Blue FL) で除して、PLIN2 の相対的発現量を評価。通常食の 4 週齢のレベルからの変化の有意差を検定

その結果、4Gy 照射群での PLIN2 の発現レベルは、非照射群のレベルの約 2 倍程度であることがわかった。同様の傾向は、4 週齢から 8 週齢にかけて高カロリー餌を投与した実験群でも観察され、PLIN2 陽性細胞の過剰な増加は、4Gy 照射群の方がより増強されている結果であった。

放射線による肝がんの発症には、長期の潜伏期が必要であることがわかっており、照射後おおよそ 300 日程度の飼育期間を経て観察されるようになる。そこで、300 日を超えて飼育を継続したマウスから採取した肝臓組織においても、脂肪滴の蓄積を評価した（図 III-5）。

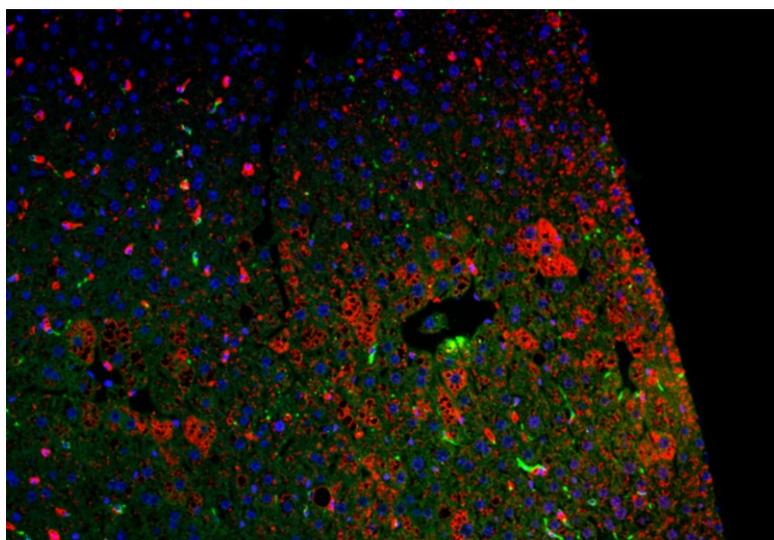


図 III-5. 放射線による脂肪滴蓄積の促進

(4Gy、高カロリー食で一時的に飼育)

青色蛍光：核、赤色蛍光： PLIN2、緑色蛍光：マクロファージ

その結果、放射線照射単独群で、脂肪滴を高度に蓄積した肝細胞が高頻度に出現することが判明した。また、子ども期に高カロリー餌で飼育したマウスでは、8 週齢までの高カロリー食終了後に速やかに脂肪滴の蓄積が解消されるが、放射線照射マウスでは、300 日を超える飼育によって、肝細胞における脂肪滴の高度な蓄積が促進されていることが明らかになり（図 III-5）、脂肪滴の蓄積に放射線が影響を及ぼしていることが予想された。

脂肪滴の高度な蓄積にともなう炎症性反応も検討した。既に、図 III-1 に示したように、肝臓組織内には F4-80 陽性のマクロファージが広く分布しているが、長期飼育によりその分布がどのように変化するのかを解析した。その結果、マクロファージの分布に明らかな変化は認められず、図 III-5 に示すように、放射線照射によってもその分布に変化は見られなかった。そこで、PLIN2 と同様に、定量的評価を実施した結果、飼育日数依存的な増加傾向は認められたものの、高カロリー食による飼育や放射線照射によってマクロファージ

の量が増えるという結果は得られなかった (図 III-6)。

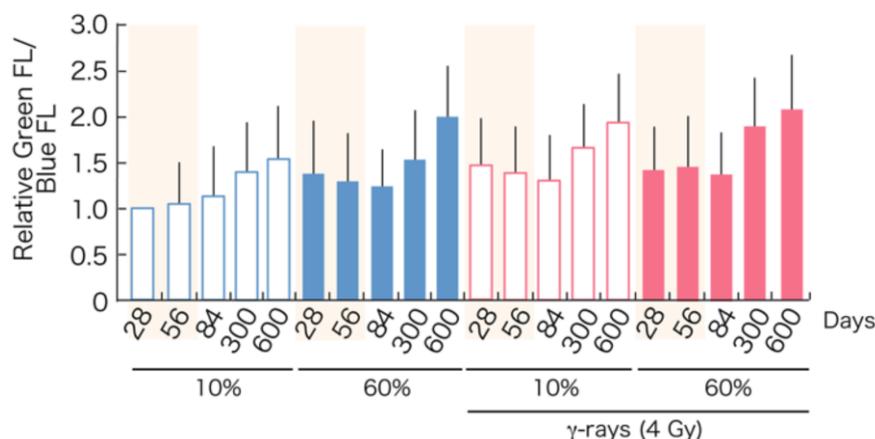


図 III-6. マクロファージの定量評価

3. 分担研究者の研究成果概要

【柿沼志津子】

B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に 0、0.1、または 4Gy を照射後、4 週齢からカロリーの異なる餌で 4 週間飼育し、その後通常餌で生涯飼育を行う 6 群を設定した。飼育観察および体重測定を継続しながら、がんの発生および病状の悪化が認められるマウスについて解剖に供し、病理サンプルの保存および解析を継続した。

これまでに、4 週齢から 8 週齢までの高カロリー餌投与による体重増加が、その後の通常餌に戻してから飼育でも影響が残ることを見いだした。また、カロリー餌の投与前でも、4 Gy 照射群で 20% 弱の体重抑制を認めた。一方、0 Gy および 0.01 Gy 照射群では、体重の変化は認められなかった。長期飼育による発がん観察では、照射後 200 日程度までに T 細胞白血病の発生を認めた。また、肝がんの発生も観察し始め、高カロリー投与群において、やや早期に腫瘍が発生する傾向は認められたが、両者の間に有意な差はなかった。

【大塚健介】

消化管幹細胞 (Lgr5 幹細胞) で、タモキシフェン (4OHT) の投与に依存して時期特異的に組換えを誘導し、その子孫細胞をレポーター遺伝子 (LacZ) で標識させるマウス (Lgr5-EGFP-CreERT2 / ROSA26-LSL-LacZ マウス、以下 LRZ マウス) を用いて、高脂肪食を摂取した場合に消化管幹細胞のターンオーバーにおよぼす影響を明らかにするために、LRZ マウスに離乳直後 (約 3~4 週齢) から 1 か月間、高脂肪食 (Research Diet 社、型番 D12492) を与えた。高脂肪食を与えている期間は、週に 2 回、餌を交換し、体重および摂餌量の測定を行った。比較のため、同じカロリーで低脂肪の対照食 (Research Diet 社、型番 D12450) を与えたマウスの体重および摂餌量の測定を行った。1 か月間の高脂肪食およ

び対照食を与えた後、すべてのマウスの餌を通常食に切り替えた。その結果、高脂肪食を与えた群で、週あたりの顕著な体重増加が認められ、成体マウス（10～15 週齢）になった時点で解剖し、幹細胞系譜追跡法（Lineage tracing）により標識された組織単位（LacZ+ クリプト）の割合を測定したところ、対象食群との違いは観察されなかったが、放射線照射後のターンオーバーは亢進するという結果が得られた。また、放射線照射による体重減少を認めたが、線量率の違いによる明らかな差は認めなかった。さらに、大腸関連炎症がんにおける高脂肪食摂取および放射線照射の影響を検討したが、いずれも腫瘍誘導を増強しないことが明らかになった。

IV. 考察

1. 高カロリー餌投与による体重への影響および組織反応

通常餌で4 週齢まで飼育したマウスを、4 週齢から8 週齢まで高カロリー餌によって飼育を行うと、ヒトの小児期に相当するその4 週間の間に、通常餌よりも8 週齢までで約20%の体重の過剰な増加を認めた。これは、高カロリー餌を投与したことによるカロリー摂取過多がもたらす影響で、学童・生徒のローレル指数をもとに換算すると、肥満ぎみから肥満に該当する増加に相当する。しかし、8 週齢から通常餌に戻して飼育を継続したところ、4 週間後の10 週齢までに、コントロールマウスとほぼ同等のレベルにまで体重が急激に改善することが明らかになった。通常餌に戻してからの急激な体重の減少が観察された理由は不明であるが、生活習慣の改善によりカロリー摂取過多が解消されれば、一時的な肥満傾向は、速やかに改善されることを証明した結果で、その背景にあるメカニズムの解明が健康管理において重要であることが提示された。

高カロリー餌の摂取に対する組織反応を検討するために、肝臓を対象に、PLIN2 の発現を解析した。その結果、4 週間の高カロリー餌投与が終了した8 週齢において、通常餌により飼育を行ったコントロール実験群ではほとんど見られないPLIN2 陽性の微細な脂肪滴を細胞質に無数に持つ肝細胞の出現を確認した。これは、ヒトの肝臓において、生活習慣と関連して観察される、いわゆる非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の前駆状態と同等であり、マウスにおいても、カロリー摂取過多により、肝臓において脂肪性の肝傷害が誘発されることが証明された。既に議論したように、8 週齢以降、通常餌に戻してからは、体重過多の顕著な解消が見られたが、PLIN2 陽性の脂肪滴の蓄積も、8 週齢以降の通常餌飼育により急激な減少が認められ、おおよそ12 週齢までには、通常餌飼育群と同等の染色像に戻ることが確認された。このことは、体重過多の解消が、細胞生物学的にも、脂肪滴の解消により通常の生理的状态に戻ったことが裏付けられた。

NAFLD では、持続性の肝障害により炎症反応が惹起され、非アルコール性肝炎（NASH）を経て肝硬変、いずれは肝がんに至る経路が示されている。そこで、組織における炎症反応の主要な役割であるマクロファージの分布を、マクロファージの代表的なマーカーであるF4-80を用いて評価した。その結果、もともと組織に常駐するマクロファージの量や分布と異な

る変化は顕著には認められず、炎症反応が惹起されたという確証は得られなかった。したがって、高度の脂肪滴を蓄積する脂肪性肝障害は、一時的であれば、炎症反応につながる障害にはならないことが明らかになった。

従来、肥満は、がんのリスクを上昇させる代表的な生活習慣と議論されてきており、肝臓がんのみならず肺がん、膵臓がん、甲状腺がんなど、放射線被ばくに関連するがんも含め一般的にがんのリスクを増加させる。その際、炎症性の組織反応が惹起されることが重要なステップになるが、今回の検討で一時的な脂肪性肝障害が軽度な肥満傾向により誘発されても、引き続き炎症性の反応が起こらないことで、このような一過性の変化は発がんリスクに影響を及ぼさないことが予想される。

2. 放射線照射の影響および高カロリー餌との相互作用

小児期の生活習慣の変化が、放射線照射による影響にどのように作用するかを検討するために、1週齢時に放射線照射したマウスに、4週齢から4週間の間、高カロリー餌を投与した。本研究で用いた放射線の線量は、0.1Gy、1.0Gy、および4.0Gyであるが、4.0Gyは、放射線発がん研究で一般的に用いられる発がん線量で、長期飼育により、大半のマウスで何らかのがんの発症が観察される線量である。一方、0.1Gy および 1.0Gy は低線量および中線量で、どの程度の発がん頻度を示すのかは、今回の検討で明らかにする計画であった。まず、1週齢で4.0Gyを照射した場合には、通常餌の飼育において、体重の計測を始めた4週齢の時点で、顕著な体重減少が認められた。一方、1Gyあるいは0.1Gy照射群では、そのような体重減少は認められなかった。現時点で、この体重減少の原因は不明であるが、本研究で使用しているB6C3F1雄マウスでは、4.0Gy照射後は、骨髄機能の低下や脱毛など急性障害が観察される。したがって、同様の組織障害が、例えば脳下垂体や甲状腺などに起こり、その結果、成長の減退が生じたと考えることができる。高カロリー餌による影響は、非照射実験群で観察された結果と同様で、一時的な体重増加が確認された。また、1週齢で4.0Gyを照射した実験群で当初見られた体重の減少傾向は、その後、長期間観察され、1週齢における放射線照射の影響は、長期飼育後でも残っていることを確認した。

次に、PLIN2陽性の微細な脂肪滴を高度に有する肝細胞の分布について、放射線照射の有無による違いを検討したが、まず、放射線照射のみでがんを誘発できる高い線量である4.0Gyの場合、放射線単独により、PLIN2の発現レベルが亢進していることを見いだした。そのメカニズムは不明であるが、放射線照射による脂質代謝の変化が、肝細胞における脂肪蓄積を促進した結果であると考えられる。肝臓における脂肪性傷害は、脂肪性肝炎、線維化を経て肝がんに至る初期変化として知られることから、放射線照射による肝がんの発症につながるのか、今後、さらに飼育を継続することによる追跡が必要である。また、0.1Gyあるいは1.0Gy照射マウスにおいても、同様の変化が認められるのかどうかを明らかにすることが必要である。

3. 小児期の放射線照射に対する子ども期の高カロリー餌摂取の影響

マウスにおいて、放射線照射によって最初に観察されるがんはT細胞リンパ腫であるが、高カロリー餌摂取群で若干早期からがんの発症が観察されたものの、両者に有意な差はなかった。また、照射後、200日~300日を超えたあたりから肝がんの発症が観察されたが、高カロリー餌摂取群でその発症が明らかに早まる傾向も認められなかった。以上の結果から、小児期の一時的な高カロリー餌の摂取による、放射線発がんリスクの増加は確認されなかった。しかしながら、組織病理学的検討から、発生したがんの組織像に違いがある可能性も指摘されており、今後はがん発症の分子プロセスにおける影響を検討する必要がある。

これらはいずれも4Gyという発がん線量を用いて得られた結果であるが、より低線量の1Gyあるいは0.1Gy照射群は、3年間の予定していた実施期間内では80%以上のマウスがいまだ生存しており、今後の継続的な飼育と観察が必要である。

放射線による発がんの標的が、組織中に存在する組織幹細胞であることが議論されている。そこで、小児期の被ばくによる組織幹細胞への影響を、幹細胞の動態が最もよく調べられている消化管幹細胞を対象にして検討した。ここで用いたマウスは、細胞系譜システムが導入されたマウスで、幹細胞のみを特異的にマーキングする事により、幹細胞の運命を追跡できる。検討の結果、放射線照射は、組織幹細胞のターンオーバーを早めることが明らかになった。消化管の基本構造は、クリプトと絨毛からなり、このうちクリプト部分に消化管幹細胞が存在して、絨毛部分に移動していく細胞を供給している。クリプト底部の幹細胞のバリエーションについては諸説があり混とんとした状態であるが、複数の種類の幹細胞が互いに相互関連しながらクリプトの恒常性を保っているようである。その中で、最も解析が進んでいるのがクリプトの最下部に存在する幹細胞で、CBC (crypt base columnar) 細胞と呼ばれる。CBCは、パネート細胞と呼ばれる支持細胞にはさまれた状態で存在しているが、今回の検討では、CBCに発現するLrg5を指標にした細胞系譜システムを利用している。放射線照射が、消化管幹細胞のターンオーバーを早めたことから、放射線による腸上皮細胞の障害を修復するための組織反応を考えることができるが、一方で、障害を受けた幹細胞が、細胞競合により積極的に排除された可能性も考えられ、ゲノム障害を有する幹細胞をより排除するメカニズムとして興味深い。

一方、高脂肪食の摂取は、組織幹細胞のターンオーバーには影響を及ぼさなかったが、放射線照射との組み合わせでは、放射線照射によるターンオーバーの促進がより増強されており、背景にあるメカニズムの解明が待たれる。

V. 結論

小児期(1週齢)に放射線を受けたB6C3F1マウスを終生飼育し、4週齢から8週齢まで高カロリー餌を投与したマウスの発がんリスクを評価するとともに、経時的な組織の採取により、放射線照射と高カロリー餌摂取との相互作用を検討した。その結果、高カロリー餌摂取が一時的な肥満と、肝臓における脂肪滴の高度な蓄積をともなう脂肪性障害を誘発

することを明らかにした。しかしながら、これらの症状は、通常食に戻すことによって速やかに解消し、放射線による発がんリスクにも影響を与えるものではなかった。また、低線量放射線による発がんリスクも、飼育日数が 700 日程度までの観察では、高カロリー餌の摂取による一時的な肥満による影響を受けなかったが、最終的な結論を得るためには、さらに終生飼育を継続し、長期の観察結果を待つ必要があると思われる。以上の結果から、生活習慣の変化による一時的な肥満傾向は、放射線被ばくによる発がんリスクに影響を及ぼさないと考えられる。

VI. 今後の展望

本研究では、小児期の放射線被ばくによる発がんリスクが、子ども期の一時的な肥満によりどのように修飾されるかを明らかにすることを目的とした。その結果、発がん線量である 4Gy の照射群においても、4 週間の高カロリー食摂取によるがん発症への明らかな影響は認められなかったが、誘発されたがんの組織学的タイプなど、全く影響が見られなかったわけではない。今後全ての終生飼育実験を完遂させ、寿命の短縮を含めた総合的な解析評価を完了する。また、1Gy あるいは 0.1Gy 照射群についても、終生飼育を継続しており、発がんリスクがどのように修飾されるのか、最終的な評価を実施する。

平成 30 年度からは、小児期に放射線被ばくを受けたマウスが、成体期に一時的な肥満を経験した時の影響を評価する研究に着手するが、全ライフコースを通じた生活習慣の変化が、小児期の放射線被ばくによる健康影響のリスクをどのように修飾するのかを明らかにする統合的研究として、本研究の成果を生かしていく。

一方で、本研究において得られた重要な知見の 1 つは、放射線や生活習慣の変化が、本来、年齢依存的に起きる組織反応の時期を早める効果を持つ事を証明したことである。これまでにも、放射線被ばくが寿命を短縮する、放射線発がんは自然発がんのライフコースを早めるなどの解釈があったが、今回の成果は、そのことを組織・細胞レベルで証明したことになる。特に、肝臓における脂肪性変化は、単に肝臓だけに留まらず、全身性の健康変化につながる現象だけに、その背景にあるメカニズムの解明は、極めて重要である。一方、この一連の事実は、放射線被ばくが特別なことを引き起こすのではなく、自然に起こるライフイベントを早める効果が単にあるだけであるということを示しており、放射線発がんのメカニズムの理解にも大きな影響を与える。放射線が発がん変異を引き起こすのか、あるいは自然発がんの頻度の上昇させるのか、放射線の健康影響を明らかにする今後の研究として、是非提案したい。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

該当なし。ただし、本年、長崎で開催される日本放射線影響学会第 61 回大会で、本事業の成果を報告するワークショップを企画した。

VIII. 参考文献

1) Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, et al. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell*, 2014; 26, 549-564.

2) Renehan AG, Zwahlen M, Egger M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat Rev Cancer*, 2015; 15, 484-498.

Analysis of the effects of life-style in childhood on low-dose radiation
carcinogenesis and its mechanism

Keiji Suzuki^{*1}, Shizuko Kakinuma^{*2}, Kensuke Otsuka^{*3}

^{*1}Department of Radiation and Life Sciences, Nagasaki University Graduate
School of Biomedical Sciences

^{*2}Department of Radiation Effects Research
National Institute of Radiological Sciences

National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

^{*3}Radiation Safety Research Center, Nuclear Technology Research Laboratory,
Central Research Institute of Electric Power Industry

Abstract

After the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant in Japan, much attention has been paid for the health risks associated with annual low-dose radiation exposure. The Health Management Survey governed by the Fukushima prefecture has reported that probable radiation dose delivered to children could be sufficiently low not to cause any delayed effects. However, enormous change in the life style and the school life of children might have affected the physical and psychological condition of those affected children. In particular, physical inertia may cause life-style-related complications, one of which is an excess calorie intake. Resulted obesity must be one of the health problem that should take into consideration.

Accumulating evidences so far have implicated notable relationship between obesity and multiple types of cancer. However, little is known about the effect of obesity on radiation-induced cancer. Therefore, we have intended to determine whether an excess calorie intake affects the cancer risks from low-dose ionizing radiation. Our final goal is to define the mechanisms underlying the possible interaction between an excess calorie intake and radiation exposure.

We have hypothesized that an excess calorie intake could cause systemic inflammation, resulting in alteration of tissue microenvironments to promote radiation carcinogenesis. So far, we found that high calorie diets between 4 and 8 weeks caused the initial phase of fatty liver, although there was no sign for the excess local inflammation. Experiments investigating the

effects of radiation exposure demonstrated accelerated fatty liver, although inflammatory macrophages have never been accumulated.

Also, considering that tissue stem cells are the origin of cancer, effects of an excess calorie intake on the turnover of intestinal stem cells were examined, and it became clear that high fat diet further accelerated their turnover in combination with radiation exposure.

Our results should provide a fundamental scientific basis towards the possible countermeasures for mitigation of any possible risks from low-dose/low-dose-rate radiation exposure.

Keywords

Radiation, Calorie, low-dose, inflammation, tissue stem cells

2-2-a 小児期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす影響と

メカニズム解明

DIO による放射線発がん影響解析

分担研究者：柿沼 志津子（国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構
放射線医学総合研究所 放射線影響研究部 部長）

研究要旨

本研究計画は、小児期の生活習慣等の変化が低線量放射線の発がんリスクにおよぼす影響とそのメカニズムの解明を目的としたものである。具体的には、『カロリー摂取過多が全身性の炎症を惹起することにより放射線発がんのリスクを修飾する』との仮説を提唱し、これを、動物発がんモデルと小児期の高カロリー食による肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデルを組み合わせた実験系により証明することを目指す。低線量（100mGy）の放射線被ばくを含む放射線被ばくによる発がんのプロセスを、①DNA 障害の誘発と除去、②細胞死を含む初期組織反応、③組織障害の回復、④初期がんと発がん微小環境、および、⑤がんの成立と進展、とに分け、各プロセスでの DIO の影響を、分子・細胞・組織・個体レベルで統合的に解析する。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの上昇する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、および肺がんである。

本分担研究では、B6C3F1 マウスを用い、幼若期での放射線照射（100mGy、1Gy および 4Gy）とその後の高脂肪餌による DIO の誘導、および終生飼育による発がん解析を実施する。平成 27 年度は、DIO 動物の飼育を開始し照射（100mGy 及び 4Gy）、および DIO による DNA 損傷、細胞死、炎症の誘導解析のための標本作製を行った。平成 28 年度は、1Gy 照射群を追加設定した。これまでに、子ども期（4 週齢から 8 週齢）の高脂肪餌摂取は、明らかな体重増加を示したが、8 週齢から通常餌に戻すことにより高脂肪餌の影響は改善されることが明らかになった。また、子ども期の高脂肪食摂取は、体重や寿命に大きな影響を与えないことが明らかになった。

キーワード

低線量、100mGy、高カロリー食、肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデル

研究参加者

尚 奕（国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所 研究員）

甘崎 佳子（国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所

研究員)

森岡 孝満 (国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所
研究員)

I. 研究目的

東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故（以降は福島原発事故）を受けて、事故の被災者を始め、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。事故後 4 年以上がたち、福島県内における県民健康調査において被ばく線量が把握されるに従い、「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の中間取りまとめでも、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされている。しかしながら、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子どもにおける生活習慣等の変化が、放射線発がんの頻度を修飾する可能性が懸念される。

中でも、学校生活環境の変化、戸外活動の制限、運動不足等に起因するカロリー摂取過多は、放射線の発がんリスクを修飾する要因として注視する必要がある、健康リスクの低減という観点からもその影響を明確にすることが望まれる。カロリー摂取過多の自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が放射線発がんリスクにおよぼす影響が体系的に調べられている例は極めて乏しく、特に、低線量放射線被ばくによる発がんに限れば、カロリー摂取過多の影響を評価する科学的知見は皆無である。このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が低線量放射線被ばくの健康影響におよぼす影響を、メカニズム論を基盤とした科学的に実証された真実を提示する研究が強く求められている。

そこで本研究では、動物発がんモデルを用いた高カロリー餌による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の実験系を用い、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化と炎症性サイトカインの分泌が、臓器・組織の炎症反応を引き起こすことにより放射線発がんリスクを上昇させる』との仮説を提唱し、これを証明することを目的とした。

本研究課題の実施により、生活習慣等による自然発がん要因が低線量放射線被ばくの健康影響にどのような影響をおよぼすか評価する際に不可欠な科学的知見が得られると期待される。また、カロリー摂取過多による放射線発がんへの影響のメカニズムが世界で初めて解明され、とりわけ小児期の生活習慣等の変化により懸念される放射線発がんリスクの低減に向け、機構論に基づいた対策を可能にする科学的基盤を提供できる。

平成 29 年度は、前年度までの飼育観察実験を継続し、発がんマウスの解剖および病理標本作製、病理解析および血清成分の解析を実施した。

II. 研究方法

放射線医学総合研究所は SPF レベルでのマウスの長期飼育およびガンマ線照射が可能な施設を有しており、本研究ではこの施設を使用した。分担者のグループでは、これまで長期飼育実験の実績が十分ある。また、マウスの発がん実験設定から終生飼育の終了までに 3 年半を要するが、これまでの経験から発がんに対する影響は約 2 年半で明らかになると予測できることから、中間段階までの発がんリスク解析を取りまとめるように計画した。

1. DIO による放射線発がん影響解析

B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に 0、0.1、または 4Gy（線量率は 0.5Gy/min）を照射後、4 週齢から脂肪含有量の異なる餌（10%餌、60%餌）で 4 週間飼育し、その後通常餌で生涯飼育を行う 8 群（1 群 60 匹、計 360 匹、実験群 1、2、3、4、7、8）を設定した（表 II-1）。飼育観察および体重測定を継続し、がんの発生等に伴う全身状態の悪化が認められるマウスについて解剖し、病理サンプルの保存および解析を行った。寿命短縮や特にリンパ腫、肝がん、肺がんに着目して各実験群におけるリスクの違いを解析した。

実験群	線量 (Gy)	餌 (カロリー)	終生飼育 (匹)	サンプリング (匹)
1	0	10%	60	40
2	0	60%	60	40
3	0.1	10%	60	50
4	0.1	60%	60	50
5	1.0	10%	60	70
6	1.0	60%	60	70
7	4	10%	60	70
8	4	60%	60	70

表 II-1 各実験群の条件とマウスの匹数（計 940 匹）

1 週齢 B6C3F1 マウスの作製は妊娠後期マウスを購入し、実験を行う環境下で出産させ、母マウスあたり子マウス 6 匹での飼育を行い体重のばらつきを最小限にした。妊娠後期マウスは平均 8 匹の F1 マウスを出産し、その半数が雄であることより 25 匹の妊娠後期マウスの購入で雄 100 匹の作製可能である。従って、雄 F1 マウス 680 匹の作製に、妊娠後期マウス 170 匹を購入した。平成 28 年度には、1Gy 照射群を追加設定したため（実験群 5、6）、当初計画に加え 260 匹を、妊娠後期マウス 60 匹を追加購入して作製した（表 II-1）。

2. DIO による放射線発がん影響のメカニズムの解析のためのサンプル供与

上記と同様に実験群を設定し、高脂肪餌による臓器の変化（4、5、8 週齢）、通常餌に戻

してからの臓器の変化（9、12週齢）、および発がん過程の変化を100日目から700日目まで100日毎に各群3匹を解剖し、病理標本を作製した（計12ポイント）。また、同サンプルの一部を長崎大学での免疫染色解析のために供与した。長期的には照射群や高脂肪餌群で発がん率が上昇し、サンプル採取予定時にマウスの匹数が減少することが予想される。これまでの経験から予定解剖ポイントでのマウス数の減少を考慮して、実験設定時のマウスの匹数を多めに設定した。非照射群で40匹、0.1Gy照射群で50匹、1Gyおよび4Gy照射群で70匹を設定した。従って、必要マウス数は上記表1に示すように、平成28年度から開始した1Gy照射群を合わせて、最終的に940匹のマウスを設定した。

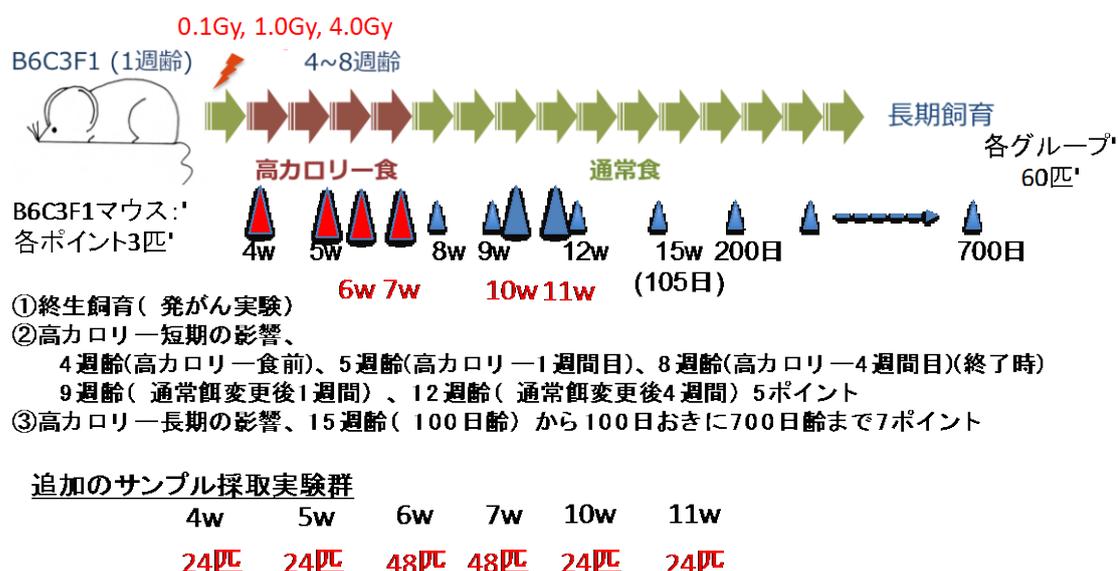


図 II-1. 研究方法の概要（H28年度追加実験群を含む）

①1Gy照射群：1週齢で1Gy照射後、4週齢から脂肪含有量の異なる餌（10%餌、60%餌）で4週間飼育する実験群を設定し、終生飼育を継続中である（図II-1）。

②追加のサンプル採取実験群の設定：高脂肪餌による臓器変化（4、5、8週齢）に加えて、追加のサンプル採取（4、5、6、7、週齢）、通常餌に戻してからの臓器の変化（9、12週齢）に加えて、追加のサンプル採取（10、11週齢）のための実験群を設定し、サンプル採取を終了した（図II-1）。

③29年度は、H28年度（前年度）までに設定した実験群の飼育、観察を継続し、900日齢程度までの実験群のスケジュール解剖、サンプリングを予定通り実施し、順次病理標本の作製を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、動物実験を行うにあたっては、国内の動物実験指針を遵守し、照射実験を行う環境科学技術研究所の動物実験委員会等の承認を受けた上で、同所の動物実験ガイドラインを遵守して実験を行った。

III. 研究結果

1. DIO による放射線発がん影響解析

1-1. 体重変化

図 III-1 に、体重変化についてのグラフを示した。子ども期（4 週齢から 8 週齢）の高脂肪餌摂取は、明らかな体重増加を示したが、8 週齢から通常餌に戻すことにより高脂肪餌の影響は改善された。しかし、1.0Gy 照射された高脂肪餌群は通常餌群の体重に比べて常に重い傾向が認められ、他の照射群とは異なった経時的変化を示した。

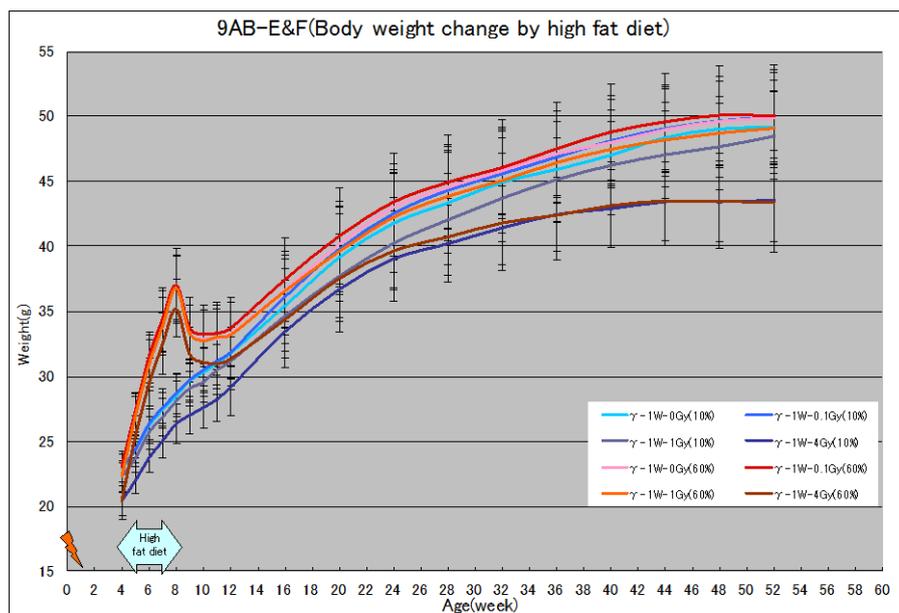


図 III-1. 放射線被ばくと子ども期の高脂肪餌摂取による体重への影響(52 週齢まで)

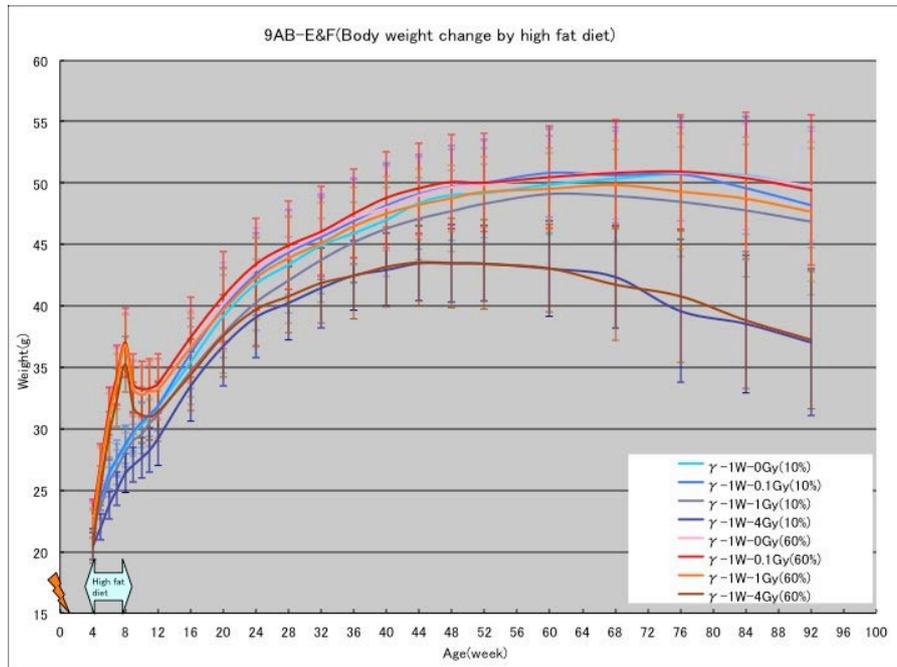


図 III-2. 放射線被ばくと子ども期の高脂肪餌摂取による体重への影響(100 週齢まで)

一方、図 III-2 には、約 100 週齢までの体重の変化を示したが、長期にわたる体重の減少傾向は、4Gy 照射群でのみ見られ、高脂肪餌摂取の影響は、長期的にも観察されていなかった。

1-2. がんの発生

4Gy 照射群において生後 120 日から 230 日の間に T 細胞白血病（胸腺リンパ腫）の発生が認められた。その発生率は、4Gy 10%脂肪餌群では 10% (6/60)、4Gy 60%脂肪餌群では 13% (8/60)であった。高脂肪餌群の方がやや早期に発生する傾向が認められた（図 3）。



図 III-3. T 細胞白血病 フリー Kaplan-Meier 生存曲線

その他のがんについては、400日齢までに、肝がんが4Gy 10%脂肪餌群では6例、4Gy 60%脂肪餌群では7例認められた(図 III-4)。肺がんは4Gy 60%脂肪餌群でのみ1例見られた。

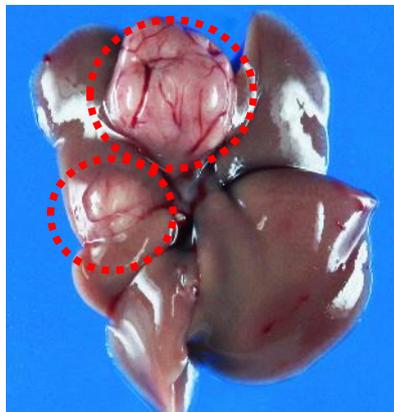


図 III-4. 400日齢マウスのスケジュール解剖で観察された肝腫瘍の肉眼像
淡桃色調で類球状を呈する2個の腫瘍(赤点線内)が肝腫瘍、暗赤褐色を呈する部分は正常の肝臓

1-3. 700日齢までの寿命変化

700日齢まで観察した結果、0、0.1、1Gy照射群の生存率がまだ80%以上であって、引き続き観察が必要である。それに比べて、4Gy照射群の生存率が20%まで下がって、高線量被ばくの寿命短縮影響が見られた(図 III-5)。各群において、10%脂肪摂取群と60%脂肪摂取群の寿命カーブに統計的有意差が見られなかった($p=0.65$ で有意差なし)。4Gy照射群の死因に関して、300日齢まではT細胞白血病、300日齢以後は肝腫瘍が多くみられた。今後は、病理診断を実施して、詳細解析を行う必要がある。

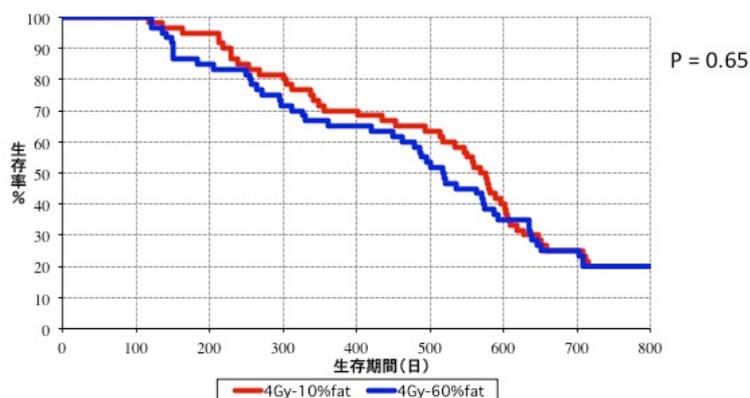


図 III-5. 900日齢までの生存率(4Gy照射群)

1-3. 肝の病理組織学的解析

γ線照射と高脂肪食の複合暴露による肝組織への影響を病理組織学的に解析した（図 III-6）。0Gy 10%脂肪餌投与群では、生後 400 日から肝細胞の空胞変性が認められ脂質沈着が惹起されることが分かった（図 III-6a-6）。4Gy 10%脂肪餌投与群では、生後 300 日から肝細胞の空胞変性を認め、非照射群に比べて照射により脂肪沈着が 100 日早期に誘発されることが確認された（図 III-6b-5）。また、0Gy 60%脂肪餌投与群でも、生後 300 日で肝細胞への空胞変性が認められ、高脂肪餌のみでも脂肪沈着の時期が 100 日早まることが分かった（図 III-6c-5）。一方、4Gy 60%脂肪餌投与群では、脂肪餌投与後 7 日目の生後 56 日において肝細胞の空胞変性に伴い細胞質のバルーン様変化を認め細胞質に多量の脂肪沈着を認めた（図 III-6d-1）。その後、生後 63 日以降は肝細胞の空胞変性は 1 次的に改善が認められものの生後 200 日に再び空胞変性が認められた（図 III-6d-4）。γ線と高脂肪餌の複合暴露は、γ線と高脂肪餌単独暴露群に比較し肝細胞への脂肪沈着が 100 日早期に誘発されることが分かった。

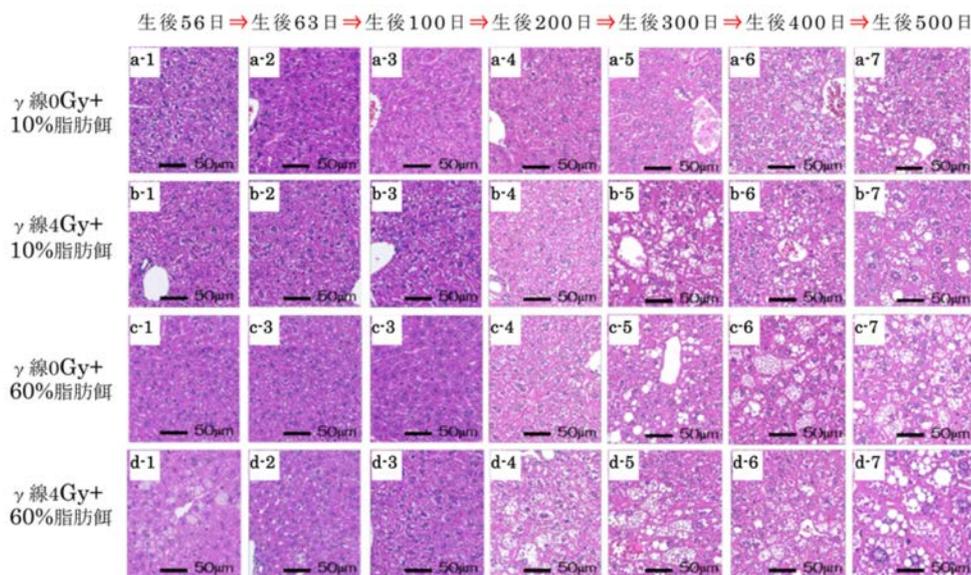


図 III-6. γ線照射と高脂肪食投与による肝組織像の経時的変化

肝腫瘍の発生に関しては、γ線の非照射群（0Gy）と照射群（4Gy）ともに生後 300 日で脂肪沈着を伴った肝細胞腺腫が認められた。γ線と高脂肪餌の複合暴露により、生後 300 日で認められた肝細胞線種のサイズは、単独暴露群に比べて増大傾向がみられた。肝細胞癌は、生後 400 日の照射群（4Gy）でのみ認められた（図 III-7a&b）。複合暴露群においては、肝細胞癌と肝内胆管癌の両成分が混在する混合型肝癌も認められた。放射線と高脂肪

餌の複合暴露という条件下で、肝発がんリスクと組織型との関連性について解析を進める事が重要である。さらに、脂肪沈着が認められた個体では、採取した血液サンプルの解析から、血清成分中のアディポサイトカインのレベルが上昇している傾向が認められ、これら液性因子の関与についても更に解析を進める必要がある。

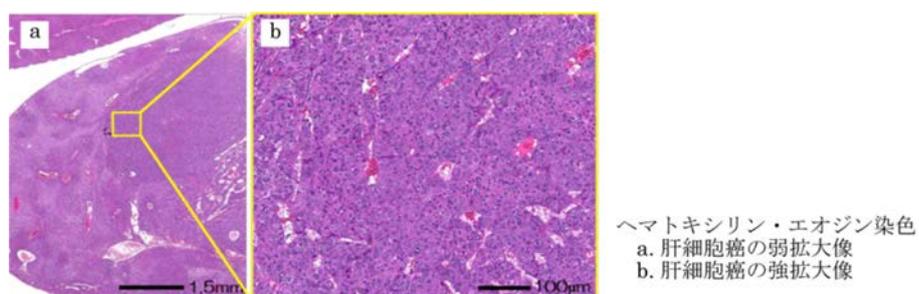


図 III-7. 4Gy 60%脂肪餌投与群に発生した肝細胞がんの病理組織画像

IV. 考察

10%脂肪餌群では、4Gy 照射により強い体重減少が認められたが、60%脂肪餌群ではその影響は小さいことが分かった。すなわち、高脂肪食摂取では、高線量照射による体重減少効果を小さくする作用がある可能性が示唆された。また、子ども期（4 週齢から 8 週齢）の高脂肪餌 4 週間投与による体重増加は、通常餌へもどすことで通常の体重に戻すことが出来る事が明らかになった。数 100 日に及ぶ長期飼育の結果でも、4Gy 照射による体重減少は顕著であったが、それ以外の群では明確ではなかった。肝細胞への脂肪沈着は、放射線照射、あるいは高脂肪食の投与で早期から見られたが、0Gy 群、あるいは通常食群でも飼育が進むにつれて観察されたことから、特異的な現象ではないことが明らかになった。今後、血液成分中の液性因子の関与など、背景にあるメカニズムについて明らかにする必要がある。

V. 結論

本実験が子ども期に一定期間高脂肪摂取した後、通常餌に戻した場合の実験系として予定通り設定できた。子ども期の高脂肪摂取は、700 日目までの観察においては体重や寿命に大きな影響を与えなかった。今後は発生してきているがんの詳細な病理組織解析により高脂肪摂取の影響が認められるかを検討する必要がある。

VI. 今後の展望

本研究は実施期間が 3 年間と限られていたため、現在、終生飼育中の実験群は、がんの好発時期にあるものが多く（肝がん、脾臓リンパ腫）、飼育観察を継続して行い、瀕死マウスの解剖を進め臓器サンプルの保存と病理解析を行う予定である。また、採取した血清サンプルを用いて、脂質代謝、内分泌関連因子の解析についても検討を加え、放射線照射の影響、あるいは子ども期の高脂肪食の影響についてさらに検討を進める。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

該当なし

VIII. 参考文献

なし

Uncovering the interaction of lifestyle factors in children with low dose
radiation-induced cancer risk and carcinogenic mechanisms

Shizuko Kakinuma

Department of Radiation Effects Research
National Institute of Radiological Sciences
National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Abstract

The aim of this research is to identify the impact that lifestyle changes in children have on the risk associated with exposure to low dose radiation and the mechanisms underlying radiation-induced cancer. Specifically, the high calorie diet-induced obesity (DIO) mouse model will be used to test the hypothesis that 'systemic inflammation associated with high calorie intake in children will alter their risk of radiation-induced cancer.' Following a low dose radiation exposure (100 mGy), the interaction of a high calorie diet on (1) DNA damage and repair; (2) initial tissue reactions including cell death; (3) subsequent tissue recovery; (4) the microenvironment for early cancer development; and, (5) the development of established tumors, will be examined by investigations at the molecular, cellular and tissue levels. The cancers of interest for induction by irradiation of young animals in this model will be thymic and splenic lymphomas, as well as lung and liver cancers.

As a part of this co-operative research, B6C3F1 mice are to be irradiated as infants (100 mGy, 1Gy or 4 Gy) before initiating diet-induced obesity (DIO) by rearing on a high-fat diet. In the annual plan for fiscal year 2015, the rearing of the DIO experimental animals was to be started, with subsequent preparation of tissue samples to study the effects of DIO on DNA damage, cell death and inflammatory responses. In the annual plan for fiscal year 2016, we have already finished the remaining rearing of half of the total DIO animals, with collection of the requisite samples, which are now ongoing. We also observed the predicted body weight gain in the mice reared on the high-fat diet confirming that the project is progressing. Thereafter, we observed the weight was reversed to normal level after changing the normal diet.

Keywords

Low dose, 100 mGy, high calorie diet, obesity, diet-induced obesity model

2-2-b 小児期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす影響と

メカニズム解明

小児期の生活習慣等による消化管幹細胞の組織動態変化と

放射線発がんリスクに及ぼす影響評価

分担研究者：大塚 健介（一般財団法人電力中央研究所 原子力技術研究所
放射線安全研究センター 主任研究員）

研究要旨

本研究では、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化と炎症性サイトカインの分泌が、消化管クリプトの炎症反応を引き起こし、それにより誘導される組織幹細胞の過増殖が発がん変異の蓄積に寄与する』との仮説を立てた。これを検証するために高カロリー食による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) を誘導し、消化管幹細胞ターンオーバーの変化を明らかにすることで、小児期における生活習慣の変化の影響を定量的に明らかにするための研究計画を立案した。あわせて、放射線による炎症関連大腸がんの誘発に DIO が及ぼす影響と消化管幹細胞の関与を解明する研究を実施し、発がんまでのプロセスを包含する研究計画とした。あらかじめ異なる線量の放射線を被ばくしたマウスに対し、小児期に高脂肪食、もしくは対照食（低脂肪食）を摂取させたところ、解剖時の体重は線量の増加とともに減少していたが、線量率による違いに有意な差は認められなかった。幹細胞ターンオーバーは高脂肪食摂取により照射後の亢進が認められたが、化学発がん誘導による大腸関連炎症がんにおいては、高脂肪食摂取と放射線被ばくのいずれによっても、腫瘍誘導は増強されないことが示唆された。炎症性サイトカインの遺伝子発現量の比較によっても、炎症に比べて放射線被ばくの影響は小さいことが推察された。

キーワード

生活習慣、小児期、高脂肪食、消化管、組織幹細胞

研究参加者

星 裕子（一般財団法人電力中央研究所 原子力技術研究所放射線安全研究センター
主任研究員）

藤通 有希（一般財団法人電力中央研究所 原子力技術研究所放射線安全研究センター
主任研究員）

I. 研究目的

東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故（以後、福島原発事故）を受けて、事故の被災者を始め、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の中間取りまとめ [1] では、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされたが、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子どもにおける生活習慣等の変化、中でも、学校生活環境の変化、戸外活動の制限、運動不足等に起因するカロリー摂取過多は、放射線の発がんリスクを修飾する要因として注視する必要がある、健康リスクの低減という観点からもその影響を明確にすることが望まれる。カロリー制限による自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が組織幹細胞におよぼす影響は十分に解明されているとは言い難く、このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が組織幹細胞におよぼす影響を、機構論に基づいて解明する研究が強く求められている。

そこで本研究では、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化と炎症性サイトカインの分泌が、消化管クリプトの炎症反応を引き起こし、それにより誘導される組織幹細胞の過増殖が発がん変異の蓄積に寄与する』との仮説を立て、消化管幹細胞系譜追跡法を用いて、高脂肪食による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) を誘導する実験を行った。加えて、生活習慣の違いと炎症に伴って生じる発がん頻度を比較することで、小児期の生活習慣のリスクを定量的に明らかにするため、放射線による炎症関連大腸がんの誘発に DIO が及ぼす影響と消化管幹細胞の関与を解明する研究を計画した。

II. 研究方法

消化管幹細胞 (*Lgr5* 幹細胞) で、タモキシフェン (4-hydroxytamoxifen, 以下、4OHT) の投与に依存して時期特異的に組換えを誘導し、その子孫細胞をレポーター遺伝子 (*LacZ*) で標識させるマウス (*Lgr5-EGFP-Cre^{ERT2} x ROSA26-LSL-LacZ* マウス, 以下、LRZ マウス) を用いて、高脂肪食がもたらすカロリー摂取過多による小児肥満の実験的誘導と *Lgr5* 幹細胞ターンオーバー攪乱への影響評価を行った。平成 27~28 年度には、①放射線感受性が高い授乳時期に、様々な線量の高線量率放射線を被ばくしたマウスに対して小児期のカロリー摂取過多が及ぼす影響を評価し、本年度は、平成 28~29 年度の実施項目である②授乳時期に線量率の異なる被ばくを受けたマウスにおける小児期のカロリー摂取過多の影響、および③小児期のカロリー摂取過多と炎症関連大腸がんを誘発する薬剤を暴露した場合の複合影響を評価した (図 II-1)。

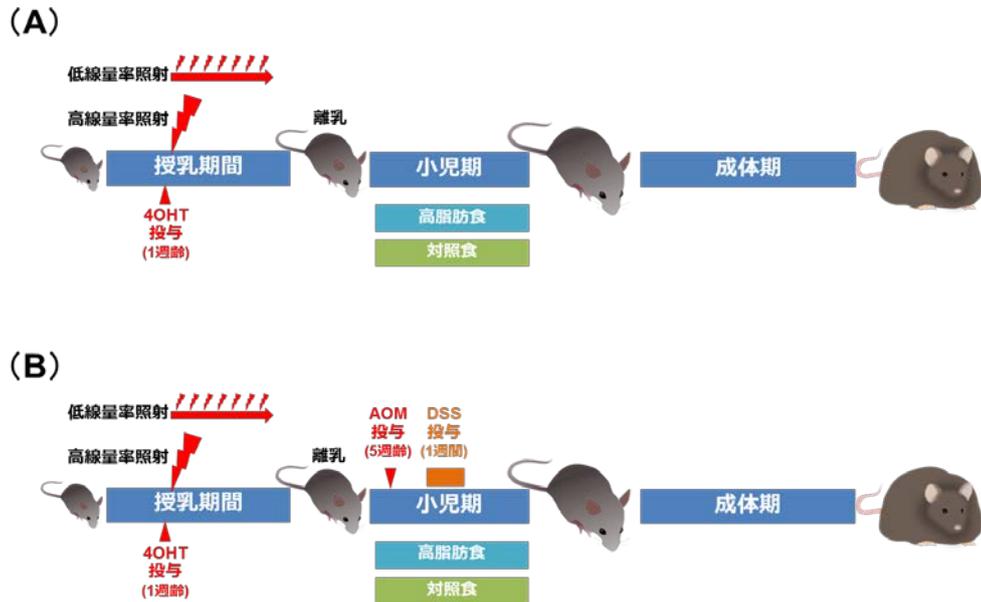


図 II-1 本年度実施した実験のスキーム

(A) 授乳中の LRZ マウスが 1 週齢 (9-13 日齢) の時にタモキシフェン (4OHT) 投与を行った。タモキシフェン投与後翌日に放射線を照射した。高線量率放射線は 30 Gy/h の条件で、X 線照射装置にて行った。低線量率放射線は 0.003 Gy/h の条件で電力中央研究所が保有するガンマ線照射施設にて連続照射を行った。3~4 週齢時に離乳し、ジェノタイピングを行った。タイピング前後から高脂肪食もしくは比較のために対照食を 1 か月 (4 週間) 自由摂取させた。その後、通常食に切り替えて、成体マウス (10-15 週齢) になった時点で解剖した。

(B) 授乳中の LRZ マウスに対し、(A) と同様に放射線照射を行った。(A) と同様に離乳させ、ジェノタイピング前後から高脂肪食もしくは比較のために対照食を 1 か月 (4 週間) 自由摂取させた。化学発がん剤との複合効果を確認するために、5 週齢時にアゾキシメタン (AOM) を単一腹腔内投与し、1 週間後に 2% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を飲水で 1 週間、自由摂取させた。DSS の投与が終了後、約 18 週が経過した成体マウスの時期に解剖した。

LRZ マウス (出生後 9~13 日齢時) に 10 mg/ml の濃度でヒマワリオイルに溶解した 4OHT (Sigma-Aldrich 社, #H6278) を 3 mg/40 g 体重ずつ単一腹腔内投与を行った。放射線は、空間線量が 30 Gy/h の高線量率 X 線照射群と、空間線量が 0.003 Gy/h の低線量率ガンマ線照射群とし、タモキシフェン投与翌日に照射を行った (低線量率照射の場合、照射を開始した)。マウスは 3-4 齢で離乳させ、離乳直後から 1 か月間、摂取カロリーの 6 割が脂肪由来である高ラード含有の高脂肪食 (Research Diet 社, 型番 D12492) を自由摂取さ

せた。高脂肪食を与えている期間は、週に1~2回、餌の交換と体重測定を行った。摂餌コントロールによる影響を比較するため、低ラード含有の対照食（Research Diet 社、型番 D12450J）を自由摂取させた群も設けた。1か月後に高脂肪食および対照食投与を終了し、すべての餌を通常食に切り替えた。表1には実験に用いた高脂肪食、対照食、通常食の餌の組成のうち、摂取カロリーに関係する成分を抜粋したものを示す。実験に用いたマウスは、遺伝子型タイピングの結果、*Lgr5-EGFP-IRES-Cre^{ERT2}* 遺伝子を有する個体のみとした。成体マウス（10~15週齢）になった時点で解剖し、十二指腸、回腸、および大腸組織を摘出した。これらは10cm程度の長さで切り分け、長軸方向に切開して広げ、スイスロール状に成形してから中性緩衝ホルマリン液で固定した。大腸組織の一部は、固定後にX-gal溶液（1gをDMSO10mlに溶かして凍結保存したもの）、NP-40水溶液（200μlを10mlの超純水に溶かしたもの）、フェリシアン化カリウム（1.65gを10mlの超純水に溶かしたもの）、フェロシアン化カリウム（2.1gを10mlの超純水に溶かしたもの）を、100mlのPBS(-)に対してそれぞれ1%の濃度で加えた染色液を用いて、遮光・室温で一晩浸漬してLacZ染色を行った。その後、中性緩衝ホルマリンに置換して再固定し、脱水・透徹後にパラフィン包埋ブロックとし、クリプト断面が円形になるような切断方向で切片を作製した。エオジン染色によるカウンター染色を行った後、LacZ陰性クリプト（エオジン染色のみ）およびLacZ陽性クリプト（クリプト断面がLacZで染色された細胞で埋め尽くされたもの）を高脂肪食群と対照食群とで比較した。

単位：重量%

摂餌種別	高脂肪食	対照食	通常食
販売元	Research Diet社	Research Diet社	株) フナバシファーム
型番	D12492	D12450J	MBR-1
タンパク質	26 (20 kcal%)	19.2 (20 kcal%)	24.2
脂質	35 (60 kcal%)	4.3 (10 kcal%)	4.4
内ラード	31.7	1.9	データなし
炭水化物	26 (20 kcal%)	67.3 (70 kcal%)	54.4 (可溶無窒素物)
内スクロース	7%	7%	データなし

表 II-1. 本実験で使用した餌の主成分

炎症関連大腸がんとの複合効果を観察するために、田中らの手法 [2] に倣ってアゾキシメタン (Azoxymethane, 以下、AOM) とデキストラン硫酸ナトリウム水溶液 (Dextran sodium sulfate, 以下、DSS) を利用した。あらかじめ4OHTを投与し、高脂肪食もしくは対照食を与えているLRZマウスに対し、5週齢時にAOMを1kg体重あたり10mgずつ腹腔内投与した。1週間後にDSSを2% (v/v)に調製した飲水に切り替え、1週間自由接摂取させた。DSSを1週間飲ませた後、通常の飲水に切り替え、およそ18週間後に解剖した。

大腸組織は LacZ 染色をする個体と、免疫染色を行う個体に振り分け、ゴム板にピンで留めて組織固定を行った。LacZ 染色用の組織については、大腸組織の LacZ 染色は上述と同様に行った。放射線被ばくと DSS による炎症の大きさを定量的に比較するため、炎症性サイトカイン・レセプターの制御に関与する遺伝子群を PCR アレイにより解析した。照射群は、30 Gy/h の X 線 (0.1, 1, 4 Gy) 照射後 3 時間後に、DSS 投与群は 2% DSS の飲水投与後 7 日後に解剖し、直ちに大腸組織断片を液体窒素にて凍結し、オートミルで凍結破碎後、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) で total RNA を抽出した。その後、RT² First strand kit (QIAGEN) で cDNA 合成し、RT² Profiler (QIAGEN) のマウス炎症性サイトカイン・レセプターパネル (#PAMM-011ZA) を用いて、対照群 (非照射かつ DSS 非投与) との比較を行った (各群 3 匹)。

(倫理面への配慮)

本研究は、当所が開催した動物実験委員会で定める「動物実験および実験動物取扱規則」に基づき動物愛護の観点から審査が行われ、研究計画の承認をもって実施した。

III. 研究結果

1. 小児期の高脂肪食摂取による体重変化に対する線量率の影響

授乳時期に高線量率 X 線照射もしくは低線量率 γ 線照射をし、小児期に高脂肪食もしくは対照食を与えた後の大腸組織における LacZ クリプト数への影響について、各群の平均値と標準偏差および非照射群との比を求めた結果を表 III-1 に、平均値と標準偏差を示すグラフを図 III-1 に示した。高線量率照射の場合、残存した LacZ 陽性クリプトの割合は、低線量照射 (0.1 Gy) の方が高線量照射 (1 もしくは 4 Gy) よりも高い傾向があり、高線量で幹細胞ターンオーバー攪乱の亢進が示唆された。また、低線量率照射 (0.003 Gy/h) の場合、高線量率照射 (30 Gy/h) よりも残存した LacZ 陽性クリプトの割合が高い傾向がみられたことから、幹細胞ターンオーバー攪乱に線量率効果があることが推察された。

非照射群では、対照食摂取群の方が高脂肪食摂取群よりも LacZ 陽性クリプトの割合が低い傾向にあった。各群間の有意差は Steel-Dwass の多重比較検定により行い、統計学的に有意差が認められたのは、高線量率照射・対照食摂取群の非照射群と 1 Gy、高脂肪食摂取群の 1 Gy、および高脂肪食摂取群 0.1 Gy と 1 Gy の群間であった ($p=0.05$)。総じて、高線量照射による影響が示唆されるものの、摂餌による影響は認められず、加えて、福島第一原子力発電所の事故後に生じたと推定されるレベルの低線量放射線被ばくでは、食餌に関わらず、非照射群と比較して LacZ 陽性クリプト割合に有意な差は認められなかったことから、低線量率放射線被ばくによる幹細胞ターンオーバーへの影響は小さいことが示唆された。

餌種別	線量率 (Gy/h)	線量 (Gy)	LacZ陽性細胞(%) 平均±標準偏差	非照射群との比
対照食	非照射	-	1.72 ± 0.41	1.00
	30	0.1	2.08 ± 1.00	1.21
		1	1.01 ± 0.36	0.59
		4	1.39 ± 0.67	0.81
	0.003	0.1	1.49 ± 0.70	0.87
		1	2.08 ± 0.41	1.21
高脂肪食	非照射	-	1.42 ± 0.93	1.00
	30	0.1	2.58 ± 1.17	1.82
		1	0.85 ± 0.42	0.60
		4	1.09 ± 0.81	0.77
	0.003	0.1	1.80 ± 0.97	1.27
		1	1.44 ± 0.59	1.02

表 III-1. 授乳時期に照射し小児期に高脂肪食もしくは対照食を与えた後の大腸組織における LacZ クリプト数への影響

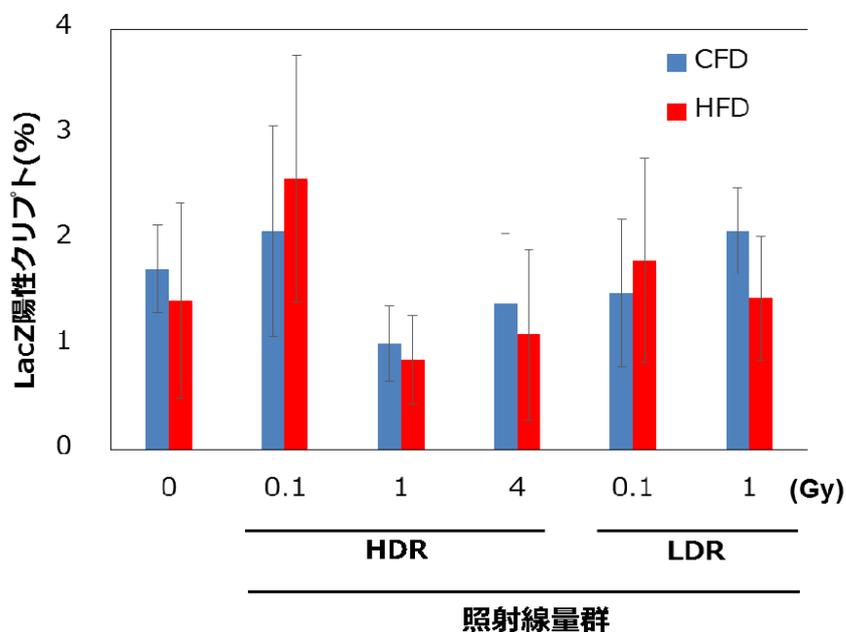


図 III-1. 授乳時期に照射し小児期に高脂肪食もしくは対照食を与えたマウスの大腸組織における LacZ 陽性クリプト割合

HFD: 高脂肪食摂取群、CFD: 対照食摂取群、HDR: 高線量率 X 線照射群、LDR: 低線量率ガンマ線照射群。

2. 小児期に高脂肪食を摂取したマウスの体重変化に及ぼす AOM、DSS 投与の影響

図 III-2 には 5 週齢で AOM を投与し、1 週間後に 2% DSS を 1 週間飲ませたメスマウスの離乳後からの体重変化を示す。図 III-3 には 5 週齢で AOM を投与し、1 週間後に 2% DSS を 1 週間飲ませたオスマウスの離乳後からの体重変化を示す。メスとオスのいずれにおいても、1 週間の DSS 摂取時期には体重が減少し、DSS 投与期間が終了し通常の飲水に切り替えてからは体重増加に転じた。食餌による体重変化は、メスでは有意差は認められた時期は限られていたが、オスでは高線量率照射群において DSS 投与以後の体重増加に有意差な差が認められた。

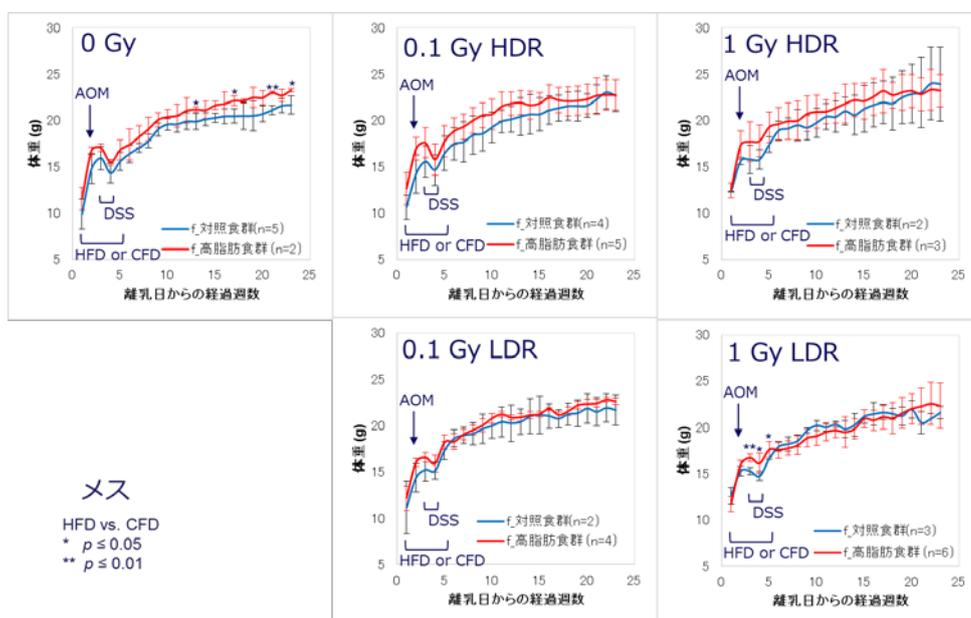
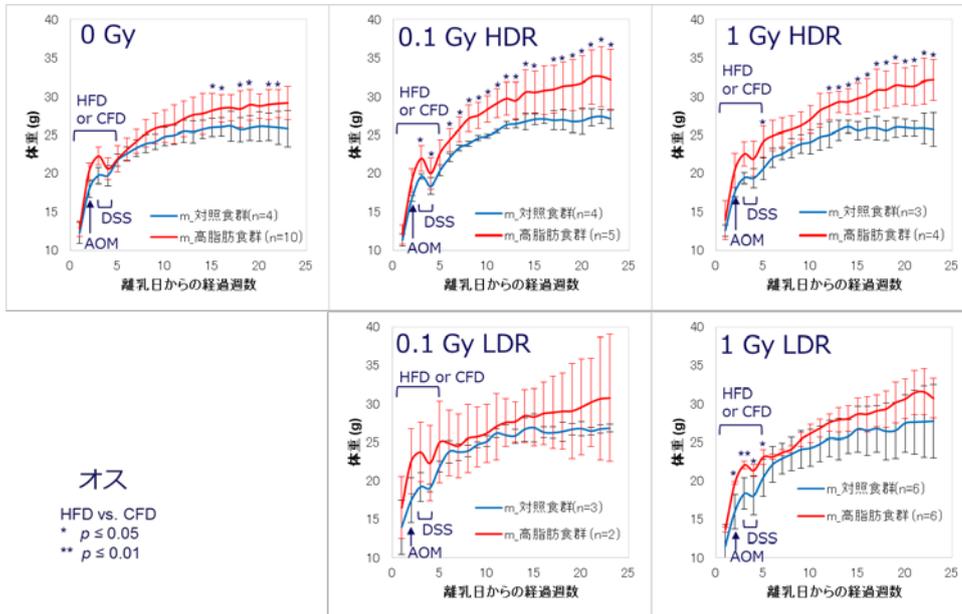


図 III-2 炎症関連大腸がんを誘導する処置を行ったメスマウスの体重変化

図中の略号は次の通り。HFD：高脂肪食摂取群、CFD：対照食摂取群、AOM：アゾキシメタン（発がん誘導剤）、DSS：デキストラン硫酸ナトリウム（大腸炎症誘導剤）、HDR:高線量率X線照射群、LDR:低線量率ガンマ線照射群。統計処理はウェルチの検定による有意差検定を行った。

(A)



(B)

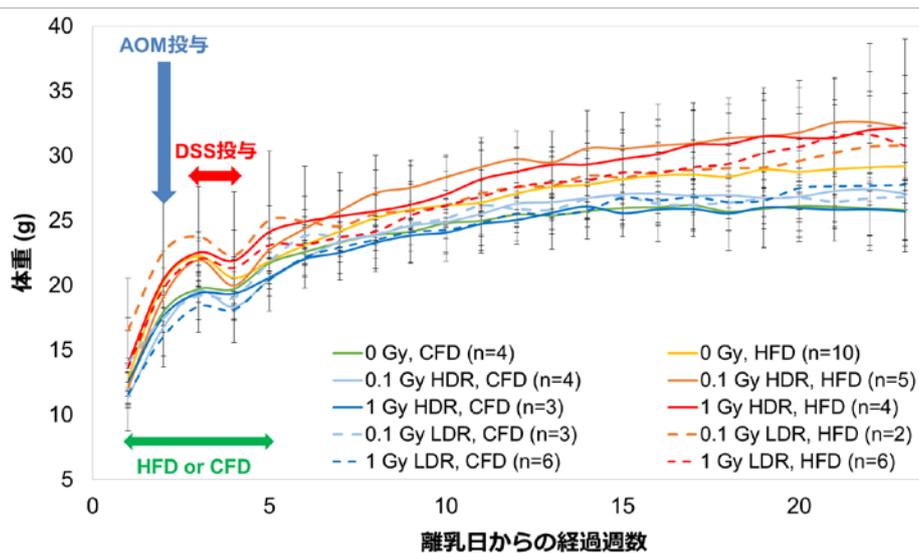
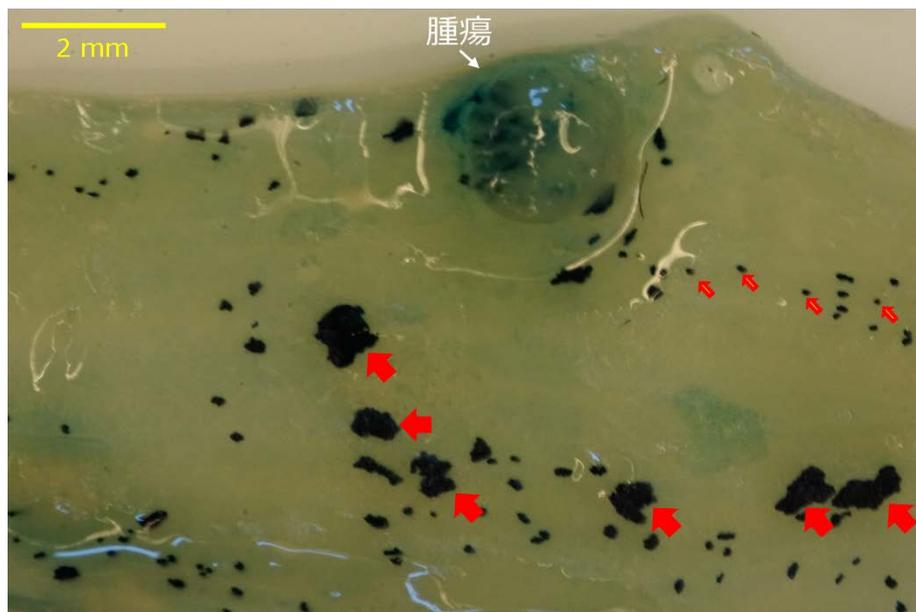


図 III-3 炎症関連大腸がんを誘導する処置を行ったオスマウスの体重変化

(A) 各群、(B) 全群の結果。図中の略号は次の通り。HFD：高脂肪食摂取群、CFD：対照食摂取群、AOM：アゾキシメタン（発がん誘導剤）、DSS：デキストラン硫酸ナトリウム（大腸炎症誘導剤）、HDR：高線量率X線照射群、LDR：低線量率ガンマ線照射群。統計処理はウェルチの検定による有意差検定を行った。

図 III-4 に AOM および DSS を投与したマウスについて、解剖後に LacZ 染色を行った大腸の染色像を示す。AOM と DSS 処置を行ったマウスにおいて、大腸炎症によって出現した LacZ クラスターおよび腫瘍が観察された。図 III-5 に各性別の高脂肪食もしくは対照食群、および高線量率照射群もしくは低線量率照射群における総線量と大腸腫瘍の数の関係を示す。いずれの線量群においても、対照食群のほうで多くの腫瘍誘発が観察される傾向があったが、各群間の有意差を Steel-Dwass の多重比較検定したところ、統計学的に有意差は認められなかったことから、化学発がん誘導による大腸関連炎症における腫瘍形成に対して、高脂肪食摂取と放射線被ばくによる複合影響は小さいことが示唆された。また、高脂肪食を与えたマウスに着目すると、高線量率照射群と低線量率照射群のいずれにおいても、1 Gy を照射したマウスでは非照射群よりも誘発された腫瘍の数が少ない傾向がみられた。



- 0.1 mm²以上のLacZ+クラスター (全てに表示)
- LacZ+クリプト1個 (いくつかを例示、約0.003 mm²)

図 III-4 炎症関連大腸がん誘発処置をしたマウス大腸の LacZ 染色像

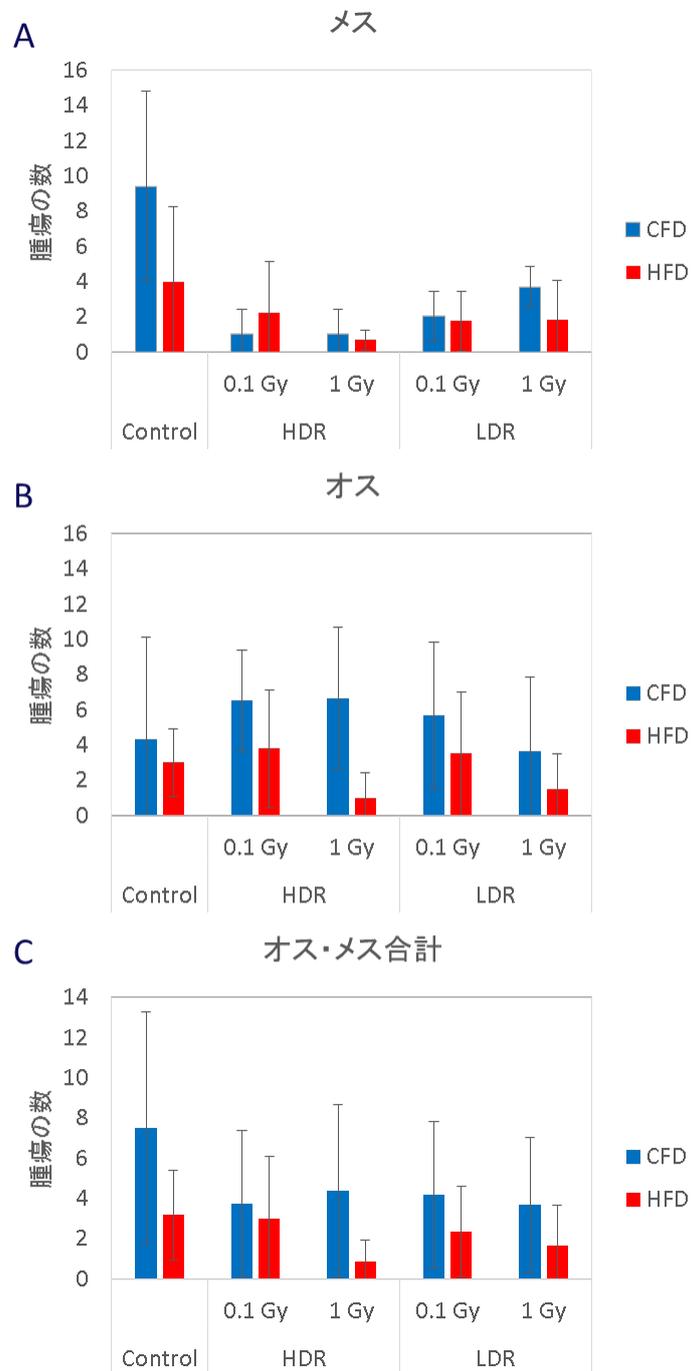


図 III-5 炎症関連大腸がん誘発処置をしたマウス大腸の腫瘍数

(A) メス、(B) オス、(C) オス・メスの合計を平均値および標準偏差で表す。HFDは高脂肪食摂取群、CFDは対照食摂取群、HDRは高線量率X線照射群、LDRは低線量率ガンマ線照射群を示す。

次に、大腸組織（ひだを除く）におけるマウス 1 個体あたりの LacZ クラスター数を計数した結果を図 III-6 に示す。高脂肪食摂取群と対照食摂取群とも、LacZ クラスター数は個体差が大きく、各群間の有意差を Steel-Dwass の多重比較検定したところ、統計学的に有意差は認められなかったことから、照射との複合効果は小さいと推察された。図 III-7 は LacZ クラスター数と腫瘍数の相関を調べた結果であるが、その相関には有意差があり、腫瘍の数が多いほど LacZ 陽性クラスターの数が多い正の相関 ($p=0.05$) が認められた。

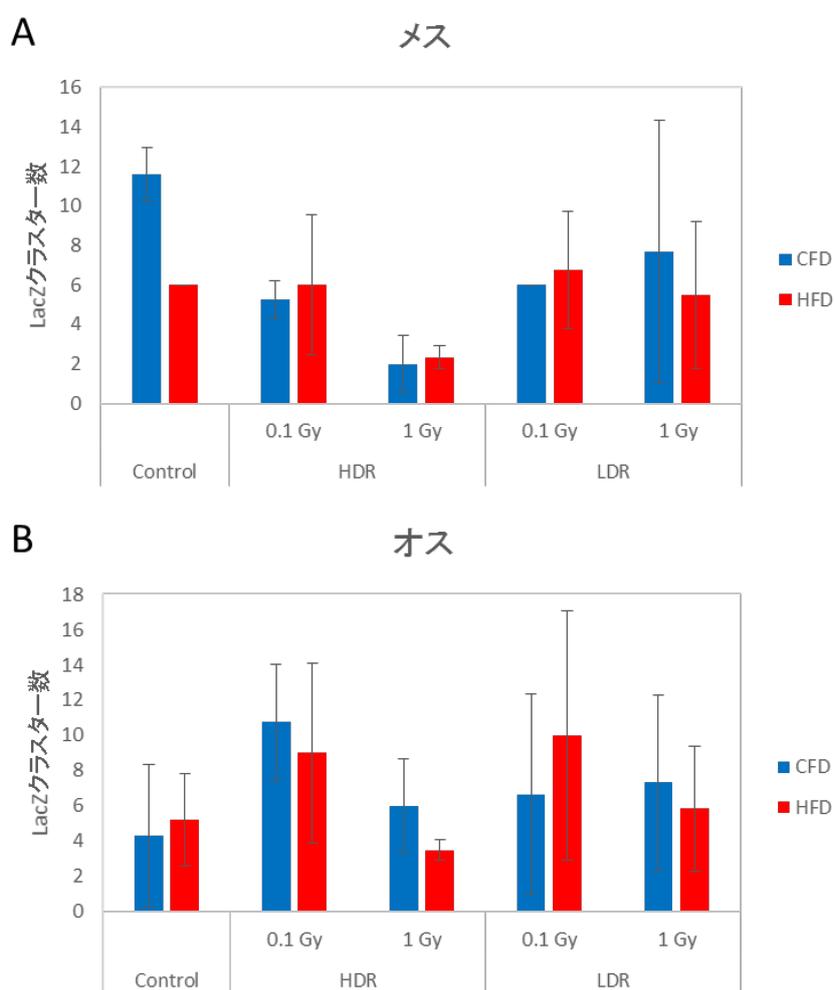


図 III-6 炎症関連大腸がん誘発処置をしたマウス大腸の LacZ クラスター数

HFD は高脂肪食摂取群、CFD は対照食摂取群、HDR は高線量率 X 線照射群、LDR は低線量率ガンマ線照射群を示す。(A) メス、(B) オス。

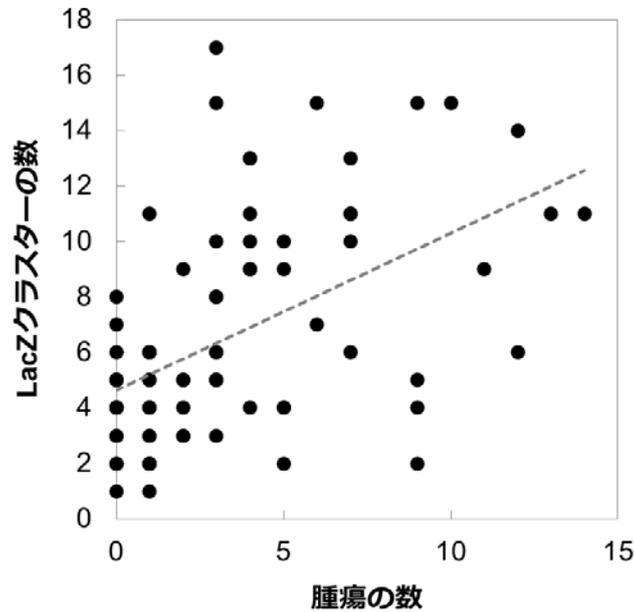


図 III-7 マウス大腸の LacZ クラスター数と腫瘍数の関係
 スピアマンの順位相関による解析の結果、正の相関が認められた。

また、組織全体における化学発がん誘発と放射線被ばくの影響の違いを大腸炎症の観点から評価するため、2% DSS を投与したマウスと放射線を照射したマウスの大腸を用いて PCR アレイを行った。炎症にかかわる遺伝子発現パネルについて、放射線照射群で線量依存的に遺伝子発現が増加したものは 89 遺伝子中 17 遺伝子、減少したものが 35 遺伝子と、多くの遺伝子で線量依存性が確認できた。対照群との t-検定で有意差 ($\alpha=0.01$) を示したものは、0.1, 1, 4 Gy それぞれ 89 遺伝子中 1, 0, 5 遺伝子であった。一方、2% DSS 投与群の場合、89 遺伝子中 10 遺伝子で有意差を示したこと、また、その発現量は放射線照射群と比較して、数倍から数十倍にも達したことから、DSS 投与後の大腸では放射線被ばく直後と比較して炎症が著しく生じていたことが判明した (図 III-8)。

遺伝子名	遺伝子発現量の対照群との比 (Fold Change)				p値 (t検定による対照群との比較)			
	0.1 Gy	1 Gy	4 Gy	DSS 2%	0.1 Gy	1 Gy	4 Gy	DSS 2%
Aimp1	1.08	-1.13	1.03	-1.28	0.663	0.336	0.867	0.679
Bmp2	1.13	-1.07	-1.84	-5.14	0.913	0.749	0.221	0.089
Ccl1	1.13	-1.12	-1.26	-1.25	0.386	0.495	N/A	0.045
Ccl11	-1.39	-1.14	1.13	2.30	0.162	0.552	0.569	0.220
Ccl12	-1.57	1.73	7.44	6.46	0.734	0.011	0.001	0.002
Ccl17	-2.31	-1.64	1.45	1.42	0.236	0.207	0.217	0.482
Ccl19	1.30	-1.16	2.90	13.04	0.653	0.525	0.022	0.026
Ccl2	-1.08	1.45	4.69	21.92	0.724	0.162	0.008	0.151
Ccl20	-1.03	1.92	3.93	1.63	0.961	0.033	0.032	0.002
Ccl22	1.01	-1.04	1.42	3.88	0.670	0.977	0.208	0.132
Ccl24	1.13	1.42	1.67	-2.09	0.386	0.130	0.166	0.112
Ccl3	1.37	3.96	3.92	12.03	0.352	0.080	0.004	0.069
Ccl4	-1.94	-2.18	1.45	7.21	0.166	0.147	N/A	0.118
Ccl5	1.22	1.16	1.55	15.19	0.625	0.507	0.666	0.110
Ccl6	-1.19	1.03	-1.28	1.38	0.378	0.969	0.260	0.288
Ccl7	1.22	1.73	5.83	21.27	0.429	0.205	0.003	0.088
Ccl8	1.11	1.01	1.59	27.94	0.702	0.956	0.107	0.016
Ccl9	-1.68	1.19	2.43	3.16	0.222	0.697	0.034	0.105
Ccr1	-1.17	-1.11	-1.08	3.19	0.790	0.651	0.900	0.047
Ccr10	1.97	1.11	-1.97	-11.16	0.297	0.558	0.195	0.013
Ccr2	1.50	-1.10	1.24	6.89	0.327	0.989	0.690	0.006
Ccr3	1.01	1.08	1.11	3.96	0.754	0.862	0.987	0.009
Ccr4	1.44	1.16	5.09	2.78	0.475	0.701	0.020	0.255
Ccr5	-2.35	-1.63	-2.21	3.97	0.018	0.224	0.027	0.021
Ccr6	2.44	1.12	2.10	2.46	0.261	0.774	N/A	0.054
Ccr8	-1.14	-1.44	-1.54	-1.35	0.525	0.232	0.172	0.140
Cd40lg	1.17	-1.11	-1.20	1.20	0.239	0.565	0.221	0.882
Csf1	1.79	1.37	1.28	-1.54	0.207	0.614	0.751	0.302
Csf2	-1.21	-1.35	-2.01	1.20	0.736	0.582	0.389	0.335
Csf3	1.13	-1.12	-1.20	5.99	0.386	0.495	0.221	0.203
Cx3c1	1.32	-1.27	-1.34	-3.97	0.577	0.515	0.378	0.069
Cxcl1	-1.84	-1.40	-2.04	18.53	0.403	0.464	0.333	0.093
Cxcl10	-1.60	1.23	3.18	37.83	0.324	0.844	0.182	0.155
Cxcl11	1.22	-1.12	-1.55	-1.40	0.850	0.832	0.331	0.396
Cxcl12	1.16	-1.08	-1.31	1.13	0.093	0.568	0.033	0.544
Cxcl13	1.67	1.37	-3.64	6.30	0.008	0.091	0.977	0.071
Cxcl15	1.13	-1.12	-1.20	-4.30	0.386	0.495	0.221	0.002
Cxcl5	-2.04	-2.63	-1.09	33.45	0.628	0.315	0.605	0.173
Cxcl9	1.13	1.03	-1.20	59.35	0.386	0.819	0.221	0.111
Cxcr2	-1.84	-2.33	-2.49	47.91	0.186	0.134	0.121	0.020
Cxcr3	-1.28	-1.53	1.33	5.32	0.443	0.330	0.529	0.039
Cxcr5	2.44	1.13	3.96	3.37	0.115	0.586	0.027	0.001
Fas1	1.13	-1.12	-1.20	2.36	0.386	0.495	0.221	0.292
Ifng	1.13	-1.12	1.07	13.87	0.386	0.495	0.703	0.124
IL10ra	1.15	-3.06	-3.79	1.61	0.565	0.023	0.028	0.450
IL10rb	1.11	-1.17	-1.31	-1.84	0.424	0.265	0.111	0.051
IL11	1.13	-1.12	1.22	23.43	0.386	0.495	0.377	0.164
IL13	1.34	-1.12	-1.20	-1.22	0.145	0.495	0.221	0.761
IL15	1.25	-1.37	1.00	-2.74	0.365	N/A	N/A	0.011
IL16	1.71	-1.61	-3.38	-1.07	0.451	0.467	0.180	0.805
IL17a	1.13	-1.12	-1.20	1.85	0.386	0.495	0.221	0.664
IL17b	1.91	1.30	-1.20	1.64	0.314	0.291	0.221	0.291
IL17f	1.45	1.45	1.69	3.90	0.212	0.401	0.223	0.005
IL1a	-1.13	-1.55	1.14	14.69	0.799	0.312	0.681	0.044
IL1b	-2.69	-1.94	-3.29	25.96	0.261	0.229	0.098	0.012
IL1rl	-1.04	-1.39	-2.07	-1.26	0.944	0.081	0.001	0.276
IL2L	-1.06	-1.06	1.15	-1.09	0.670	0.742	0.338	0.497
IL21	1.13	-1.12	-1.20	-3.74	0.386	0.495	0.221	0.002
IL27	1.13	-1.12	-1.20	3.58	0.386	0.495	0.221	0.098
IL2rb	1.50	-1.29	1.12	3.68	0.599	0.599	0.938	0.225
IL2rg	1.80	-1.25	1.69	3.43	0.115	0.405	N/A	0.001
IL3	1.13	-1.12	-1.20	-4.30	0.386	0.495	0.221	0.002
IL33	1.21	-1.42	-2.65	2.02	0.558	0.314	0.075	0.108
IL4	1.33	-1.42	1.47	3.74	0.356	0.219	0.346	0.202
IL5	-1.22	-1.63	-2.20	-6.57	0.694	0.211	0.103	0.032
IL5ra	1.27	-1.18	-1.11	1.15	0.321	0.290	0.657	0.502
IL6ra	-2.19	1.09	-1.10	-2.07	0.556	0.846	0.624	0.249
IL6st	1.23	1.03	1.05	1.09	0.674	0.903	0.964	0.962
IL7	-1.09	-1.14	1.12	-2.94	0.788	0.585	0.637	0.027
Lta	1.30	-1.12	1.65	-1.64	0.128	0.495	0.368	0.964
Ltb	2.25	1.16	-1.06	2.30	0.273	0.981	0.750	0.144
Mif	-1.17	-1.08	1.16	1.73	0.297	0.445	0.168	0.096
Nampt	-1.08	1.09	1.21	2.07	0.553	0.551	N/A	0.037
Osm	1.25	-1.49	-1.55	5.10	0.694	0.335	0.307	0.246
Pf4	1.01	-1.13	1.33	-1.17	0.947	0.520	0.118	0.757
Spp1	-1.38	-1.75	-1.10	21.60	0.461	0.374	0.855	0.112
Tnf	1.07	1.48	2.17	5.03	0.660	0.754	0.476	0.125
Tnfrsf11b	1.12	-1.30	-1.55	-1.19	0.873	0.439	0.361	0.639
Tnfrsf10	-1.29	-1.03	1.09	2.33	0.372	0.730	0.750	0.367
Tnfrsf11	2.32	2.42	2.08	4.63	0.422	0.236	0.463	0.100
Tnfrsf13	1.16	-1.08	-1.46	-1.46	0.548	0.822	0.154	0.131
Tnfrsf13b	1.45	1.28	1.60	1.78	0.072	0.049	0.025	0.084
Tnfrsf4	-1.11	-1.27	-1.66	-2.27	0.646	0.448	0.216	0.164
Vegfa	1.20	-1.25	-1.12	-2.17	0.599	0.390	0.612	0.065
Actb	-1.05	-1.08	-1.37	-1.52	0.757	0.646	0.291	0.144
B2m	-1.04	1.06	1.19	3.26	0.707	0.966	0.582	0.104
Gapdh	1.03	-1.26	-1.27	-2.28	0.983	0.342	0.290	0.037
Gusb	-1.04	1.07	1.46	1.76	0.801	0.568	0.023	0.109
Hsp90ab1	1.10	1.19	1.00	-1.65	0.276	0.067	0.985	0.298

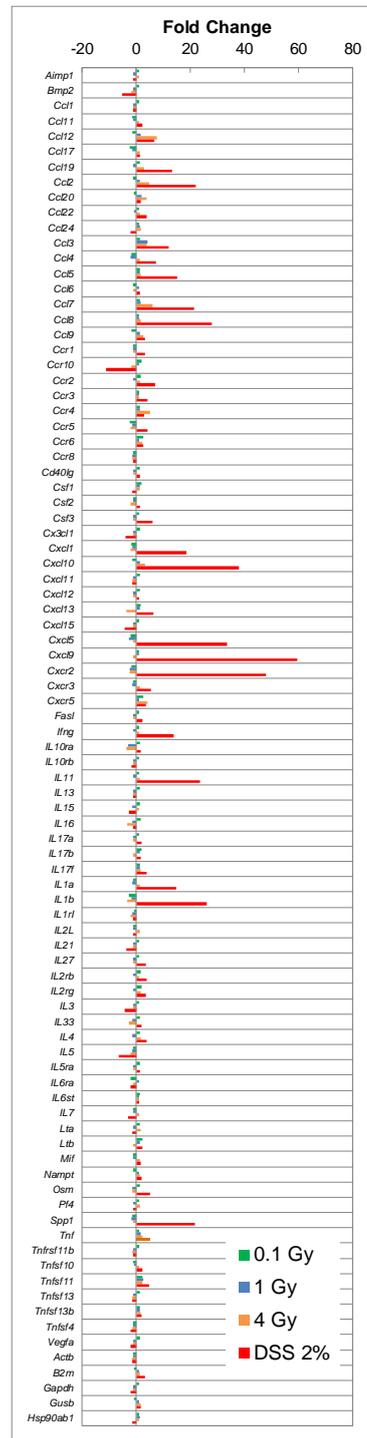


図 III-8 PCR アレイによる炎症性サイトカイン・レセプターの遺伝子発現量比較

各群 3 匹。有意差は、RT² profiler 付属の計算シートにより対照群との発現比較により求めた。左表中の赤字は p 値で 0.01 未満のもの。

IV. 考察

本研究においては、個体あたりの正確な摂取カロリーを算定することが難しいため、高脂肪食摂取においてはカロリー摂取過多になると仮定して実験を進めてきた。昨年度までの成果、および、本年度の低スクロース食においても同様の結果が認められたことから、高脂肪食摂取はカロリー摂取過多をもたらしたと考えられる。本研究が目指す生活習慣と放射線被ばくの因果関係の解明という観点からヒトの被ばくを考えた場合には、放射線による被ばくへの不安などがその後の生活習慣を変えるきっかけとなると考えられる。小児期における高脂肪摂取も生活習慣の変化の一因と考えれば、被ばくを放射線感受性の高い授乳期に行い、その後、高脂肪食を摂取するという本研究のデザインは、ヒトにおける被ばく状況を考慮する上で重要である。

高脂肪食摂取が腸管幹細胞の維持に及ぼす影響は、近年、高い関心を集めている。高脂肪食を与えたマウスで腸管幹細胞の増殖活性が高まることが報告されている [3]。興味深いことに、幹細胞を維持するニッチ細胞として知られているパネート細胞 [4]は、カロリー摂取過多によりその数が減少していた [3]。逆にカロリー制限をすることで、パネート細胞は幹細胞の維持能が高まり、分化よりも幹細胞プールを維持する力が働いた [5]。これらのことを総合的に捉えると、カロリー摂取過多になると、ニッチが幹細胞を維持できなくなり、幹細胞の増殖が誘導されて分化に働き、幹細胞プールの減少をもたらすことで、上位幹細胞の補充が誘導されるという仮説が成り立つ。本研究では、放射線照射が腸管幹細胞プールにおよぼす影響を評価したが、授乳時期に高線量率放射線を照射した場合に、小児期のカロリー摂取過多が幹細胞ターンオーバーの攪乱さらに亢進することが示唆されており、本課題で設定した仮説を支持する結果が得られた。また、幹細胞プールに及ぼす影響は線量・線量率に依存しており、高脂肪食摂取と低線量・低線量率被ばくとの相乗効果は認められなかった。

ヒトの小児期にあたる時期では、マウスの腸管では成長に伴って幹細胞の数を増やす時期にあり [6]、この時期に幹細胞のプールを維持する能力が保たれていなければ、増殖の激しい細胞が幹細胞として機能することで、必然的に変異が蓄積しやすいことになる。放射線を被ばくした後に小児期に高脂肪食を摂取した場合の発がんのリスクを調べるために、昨年度から本年度にかけて、AOM+DSSによる炎症関連がんの誘導をLacZ陽性クラスターや腫瘍の解析から評価する実験系を構築したところ、高脂肪食群と対照食群のいずれにもLacZ陽性クラスターや腫瘍が観察された。LacZ陽性クラスターはクリプト単位の過増殖の痕跡を示すものであり [7]、発がんの前がん状態を理解する上で重要な指標となりうる。本研究において、このLacZ陽性クラスターが多いほど腫瘍が多い傾向にあることが示唆された。また、化学発がん誘導による大腸関連炎症がんにおいては、腫瘍形成に対して、高脂肪食摂取と放射線被ばくによる複合効果はもたらさないことが明らかになった。

高線量率放射線 0.1 Gy の照射を行った個体において、LacZ クリプトの局在分布が観察されたため、今後も 0.1 Gy の線量に着目することは重要であろう。一方で、高カロリー食

群の方において腫瘍が発症しにくい現象のメカニズム解明は今後の検討課題である。化学発がん剤の非投与群では、LacZ クラスターも腫瘍も観察されなかったことから、LacZ クラスターの解析は発がん評価のための指標の 1 つとなりうること、ターンオーバーの過剰な亢進は発がんの誘導と関係があること、今回投与した化学発がん誘導剤は放射線被ばくのストレスを大きく上回り、このような炎症過多の場合は、1 Gy の照射が炎症による発がんを抑える方向に働く可能性があることが考えられた。高脂肪食群や 1 Gy 照射群において腫瘍が発症しにくい現象のメカニズムには、高脂肪食の油分で腸管粘膜が保護されて化学発癌誘導剤の効き目が弱くなる、高脂肪食群や 1 Gy 照射群の方が DSS の飲水摂取量が少ない、事前に照射することにより強い幹細胞が生き残り、強烈な炎症に堪えられるといった可能性等が考えられるが、さらなる解明のためには今後の実証研究が必要であろう。

V. 結論

幹細胞ターンオーバーは高脂肪食摂取により照射後の亢進の傾向がみられた、化学発がん誘導による大腸関連炎症がんにおいては、高脂肪食摂取によって放射線被ばくが腫瘍の形成に複合効果をもたらさないことが明らかになった。

VI. 今後の展望

高カロリー食群の方において腫瘍が発症しにくい原因は今後の検討課題である。そのメカニズムとして、高脂肪食の油分による腸管粘膜保護、高脂肪食群や 1 Gy 照射群における DSS 飲水摂取量の減少、事前照射による幹細胞選択的生存等が考えられるが、今後の実証研究が必要である。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

該当なし

参考文献

- 1) <http://www.env.go.jp/chemi/rhm/conf/tyuukanntorimatomesegohyouhannei.pdf>
- 2) T. Tanaka et al. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Science*, 2003; 94: 965-973.
- 3) A. T. Mah, L. Van Landeghem, H. E. Gavin, S. T. Magness and P. K. Lund, Impact of diet-induced obesity on intestinal stem cells: hyperproliferation but impaired intrinsic function that requires insulin/IGF1. *Endocrinology*, 2014; 155:

3302-3314.

- 4) T. Sato, J. H. van Es, H. J. Snippert, D. E. Stange, R. G. Vries, M. van den Born, N. Barker, N. F. Shroyer, M. van de Wetering and H. Clevers, Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 2011; 469: 415-418.
- 5) O. H. Yilmaz, P. Katajisto, D. W. Lamming, Y. Gultekin, K. E. Bauer-Rowe, S. Sengupta, K. Birsoy, A. Dursun, V. O. Yilmaz, et al., mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature*, 2012; 486: 490-495.
- 6) J. J. Dehmer, A. P. Garrison, K. E. Speck, C. M. Dekaney, L. Van Landeghem, X. Sun, S. J. Henning and M. A. Helmrath, Expansion of intestinal epithelial stem cells during murine development. *PLoS One*, 2011; 6: e27070.
- 7) 大塚ら. 放射線被ばくに対する組織反応 ～腸管～. *放射線生物研究*, 2014; 49 巻: 211-226.

Effects of life-style in childhood on radiation-induced carcinogenesis and cellular turnover of intestinal stem cells

Kensuke Otsuka

Radiation Safety Research Center, Nuclear Technology Research Laboratory,
Central Research Institute of Electric Power Industry

Abstract

In this study, we established a hypothesis that an excess calorie intake could cause systemic inflammation, resulting in alteration of tissue microenvironments in intestinal crypts to promote radiation carcinogenesis. To this end, we applied the diet-induced obesity (DIO) mouse model, which is widely used to study the effects of obesity, and evaluated the effects of life-style in childhood by feeding a high-fat diet (HFD) or a low-fat diet as control (CFD).

Lgr5-EGFP-Cre^{ERT2}x ROSA26-LSL-LacZ (LRZ) mice were irradiated with 0.1, 1 Gy of high dose-rate X-rays (30 Gy/h) or 0.1 Gy of low dose-rate X-rays (0.003 Gy/h) at 1 week-old, then HFD or CFD were given during childhood (from 3 to 7 week-old).

We quantified the rate of LacZ-positive colonic crypts to detect the effects of HFD or CFD on cellular turnover of intestinal stem cells. We found that the ratio of LacZ-positive crypts showed dose-dependent decrease after high dose-rate irradiation, but significant differences was not observed between non-irradiated groups and the low dose-rate irradiated groups. Treatment of HFD slightly accelerated the turnover of LacZ-positive crypts both in the high dose-rate and low dose-rate irradiated groups. We also found that both HFD diet and irradiation did not induce additional effects on chemically-induced colonic inflammation and tumors by AOM/DSS treatment. This was supported by the results of PCR array for inflammatory cytokines. These results suggested that taking HFD and/or radiation exposure in childhood may affect the turnover of intestinal stem cells, but the impact of them toward cancer development may be trivial compared to factors which can induce severe inflammation.

Keywords

Childhood; High fat diet; Intestine; Tissue stem cells

2-3 小児・青年期の低線量率放射線被ばくによるがんリスクの評価

——インドケララ州の高自然放射線地域住民の

調査結果を中心として

秋葉 澄伯（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座
疫学・予防医学 客員研究員）

研究要旨

福島原子力事故で被ばくした住民における健康影響が懸念されている。特に懸念されるのが悪性腫瘍リスクであるが、小児期に被ばくした場合、悪性腫瘍の線量あたりの過剰相対リスクは、成人と比べ2-3倍高い場合もあると考えられており、福島事故でも、小児・青年期の被ばくによるがんリスク増加を懸念する住民が少なくないようである。

本研究では、ケララ州カルナガパリ地域（高自然放射線地域）のがん罹患データを用いて、小児・青年期の放射線被ばくによるがんリスクを推定し、原爆被爆者など高線量被ばくを受けた集団の疫学調査結果などと比較するなどする。

1990-97年にインドのケララ州カルナガパリ地域住民全体を対象にベースライン調査が行われ、コホートが設立された（カルナガパリコホート）。現在、2013年までのがん罹患調査データが収集され、データベース化されている。これまで主任研究者は、インド側の研究者と連携して、この調査で得られたデータを用いて自然放射線への累積被ばく線量と悪性腫瘍などのリスクにかんして、検討を行ってきた。

本研究では、年間に2回程度インドを訪問し、カルナガパリ地域の腫瘍登録の担当者と面談して、白血病や甲状腺がんなどの悪性腫瘍症例に関して地域がん登録で収集された症例の診断の正確性や症例の把握漏れに関して口頭で情報を収集するとともに、登録事務所が管理している詳細な診断情報の検討を行った。白血病に関しては全例が血液学的診断を受けていることを確認した。固形がんに関しては、部位により異なるものと約80%が病理学的診断（細胞診を含む）を受けていた。また、放射線被ばくによる悪性腫瘍リスクの予備的解析を行った。統計解析では、データを性、年齢、観察期間、累積線量などで層別し、層別データを用いてポアソン回帰分析を行った。2013年までのカルナガパリコホートの追跡調査で、到達年齢が30歳未満の対象者は約10万人である。これまでの解析では追跡期間中に200例あまりのがん症例（診断年齢30歳未満）が確認された。解析では、累積線量を屋内外線量と居住係数などから推定し、この累積線量と30歳までのがんリスクの関連を検討した。

平成28年と29年に米国を訪問し、放射線疫学・生物統計の分野で著名な研究者であ

る David Hoel 博士と面談し、意見交換を行い、解析結果などを検討した。また、弘前大学医学部、福島県立医科大学などを訪問し、床次真司教授ら（弘前大学医学部）、安村誠司教授ら（福島医科大学）と面談し、インドでの調査に関して助言などを得るとともに、研究成果の福島県などの住民にどのように還元するのが良いか探った。

キーワード

高自然放射線、ケララ、小児、青年、がんリスク

研究協力者

なし

研究参加者

郡山 千早 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科疫学・予防医学 教授

上床 太心 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科疫学・予防医学 助教

JAYALEKSHMI NANDAKUMAR ATHIRA

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科疫学・予防医学 助教

I. 研究目的

研究の背景

福島の原子力事故で被ばくした住民における健康影響が懸念されている。国連の原子力放射線の影響に関する科学委員会(UNSCEAR)報告書 2013 によると、悪性腫瘍の線量あたりの過剰相対リスクは、小児期に被ばくした場合に成人と比べ2-3 倍高い場合もあると考えられており、福島事故でも、小児・青年期の被ばくによるがんリスク増加を懸念する住民が少なくないようである¹⁾。

放射線被ばくによるがんリスクの定量的評価において、最も重要な役割を果たしているのは広島・長崎の原爆被爆生存者の追跡調査の結果である。しかし、これは高線量率の放射線被ばくである。一方、福島の原子力事故による放射線被ばくは低線量率の被ばくである。しかし、低線量率の被ばくによる健康影響は不明確な点が多く、定量的なリスク評価に関するデータは不十分である。世界各地にはバックグラウンド放射線レベルが高い地域があり、住民は比較的低い線量率であるが、必ずしも低くない累積線量の放射線被ばくを受けている。そのような地域の住民の放射線被ばくによるがんリスクの調査結果が、UNSCEAR2017 報告書にまとめられている²⁾。この報告書では、自然放射線による被ばくに伴う小児がんリスク³⁻⁸⁾、チェルノブイリ事故汚染地域での小児白血病リスク⁹⁾、高バックグラウンド地域（テチャ川流域など放射能汚染地域とインド国ケララ州カルナガパリなどの高自然放射線地域）の住民の放射線被ばくとがんリスクが検討されている。その中のイギリスでの調査では、自然放射線被ばくにより小児の白血病が増加し、その線量あたりの過剰相対リスクが高線量率被ばくでの推定値と変わらないことが報告されている⁵⁾。この研究

では、ラドン被ばくと小児がんとの関連も検討されたが、明確な関連は認められなかった。なお、この研究では、個人線量が推定されているが、地域ごとの平均線量を基に得られた値であり、線量推定は正確とは言えない。同様の研究がスイスでも行われ、自然放射線の累積被ばく線量と小児の白血病や脳腫瘍などのリスクが関連していることが示された⁶⁾。一方、フランスで行われた同様の調査では急性白血病と自然放射線被ばくとの関連が検討されたが、リスクの増加は認められなかった⁷⁾。

UNSCEAR2017 報告書にはインドの高自然放射線地域での疫学調査結果も取り上げられている。この調査では、成人の固形がんに関しては、低線量率での放射線被ばくが高線量率での被ばくに比べ、線量あたりの過剰相対リスクが低くなることが強く示唆されている¹⁰⁾。しかし、小児・青年期の被ばくによる白血病や固形がんに関しては、不明確な点が多い。

目的：本研究の目的は、ケララ州カルナガパリ地域（高自然放射線地域）のがん罹患データの正確性などを検討したうえで、がんリスクとの関連が特に強いと考えられている小児・青年期の放射線被ばくによるがんリスクを推定するとともに、その線量あたりのリスクを成人期の被ばくによるものと比較する。仮に、小児期・青年期の被ばくでリスクが増加しているがんの部位があれば、成人期の被ばくの場合と比べて、リスクの大きさがどの程度異なりうるかを検討する。さらに、本研究で得られた低線量率被ばくによる線量あたりのリスクが、他の研究で得られた中・高線量率の被ばくを含む、様々な線量率で得られたリスク推定値と異ならないか（どの程度異なるか）を検討する。この目的を達成するには、がん登録で得られたがん症例の診断の信頼性の確認、症例の把握漏れなどの検討、小児期の被ばく線量に焦点を当てたリスク解析など総合的な検討が必要である。

II. 研究方法

主任研究者秋葉澄伯は、公益財団法人（以下、公財と略）体質研究会がインド・中国の研究者と共同で行ってきた高自然放射線地域の住民の疫学調査に協力してきている。調査方法の詳細は、平成 23-25 年度に原子力災害影響調査等事業（放射線の健康影響に係る研究調査事業）として実施された「低線量率放射線被ばくの健康影響——インド・中国の高自然放射線被ばく地域住民の調査結果を中心として（主任研究者：秋葉澄伯）の報告書でも記述した。

本研究では、平成 28 年と 29 年に米国を訪問し、放射線疫学・生物統計の分野で著名な研究者である David Hoel 博士と面談して意見交換を行い、これまでの解析結果などを検討するとともに、解析方法などに関し、助言を受けた。また、研究期間中、年に 2 回程度インドを訪問し、カルナガパリ地域の腫瘍登録の担当者と面談して、白血病や甲状腺がんなどの悪性腫瘍症例に関して地域がん登録で収集された症例の診断の正確性や症例の把握漏れに関して口頭で情報を収集するとともに、登録事務所が管理している詳細な診断情報の検討を行った。国内では、弘前大学医学部、福島県立医科大学などを訪問し、床次真司教

授ら（弘前大学医学部）、安村誠司教授ら（福島医科大学）と面談し、インドでの調査に関して助言などを得るとともに、研究成果の福島県などの住民にどのように還元するのが良いか探った。

以下、インド国ケララ州カルナガパリ地域でのコホート調査の概要を記述する。

1990-97年にインドのケララ州カルナガパリ地域住民全体を対象にベースライン調査が行われ、コホートが設立された。この調査には、それ以降にカルナガパリ地域で生まれた住民、または移住してきた住民は含まれていない。このコホートをカルナガパリコホートと呼ぶこととする。2009年のNairらの報告では、このコホートの半分（放射線コホート）を対象に2005年までの成人のがん罹患率が検討された¹⁰⁾。その後、カルナガパリコホート全体のデータベースが完成し、また、追跡期間は5年間延長され2013年までとなった。本研究では、このコホート研究で得られたデータを用いて、統計解析を行った。具体的には、データを性、年齢、観察期間、累積線量などで層別し、層別データを用いてポアソン回帰分析を行った。なお、累積線量は、それぞれの住民で測定された屋内外の線量と住民約1万人の調査から得られた性・年齢別の居住係数から計算された結腸線量である。

（倫理面への配慮）

本研究で得られるがん罹患率、死亡率のデータは、インドの研究者が（公財）体質研究会との共同研究で得たものであり、調査の実施に当たっては倫理委員会の承認を得ている。データの供与に関しては、（公財）体質研究会の許可、インドの研究者の同意を既に得ている。また、平成24年2月に鹿児島大学医歯学総合研究科疫学研究等倫理委員会から疫学調査で得られたデータの使用に関する承認を得た。しかし、平成27年3月末で、承認を受けた研究期間が終了したので、あらためて倫理委員会に申請を行い、平成28年4月に承認を得た。

III. 研究結果

2013年末までの悪性腫瘍罹患例は224例であった（診断年齢30歳未満）。このうち、白血病を除く悪性腫瘍は184例で160例が病理組織診断・細胞診などに基づくものであった。死亡診断書のみに基づく登録症例は15例であった。白血病症例は40例が同定されており、全例が血液学的診断などを受けていることを確認した。白血病の亜型に関しては、コホートメンバー以外の症例も含めて検討したが、急性リンパ性白血病との診断が半数以上（54%）を占め、また、約20%が急性骨髄性白血病と診断されていた。診断年齢は正確に計算できないが、0歳が1例、1-4歳未満が3例、5-9歳が4例、10-14歳が4例であった。小児白血病では3-5歳にピークがあることが多いのが、このデータでは明確でなかった。甲状腺がん（36例）に関しては病理組織診断・細胞診に基づくものであった。15歳未満で診断された症例は無かった。

放射線被ばくによる悪性腫瘍リスクの解析を行った。2013年までのカルナガパリコホー

トの追跡調査で、到達年齢が 30 歳未満の対象者は約 10 万人である。白血病に関しても、また白血病以外の悪性腫瘍に関しても、その罹患率と累積線量との間に統計学的に有意な関連は認められなかった（甲状腺がんに関しても関連は認められなかった）。累積線量を 0・10・20・50・100+mGy にわけ、線量 0-群（0mGy 以上、10mGy 未満の群）を参照群にして相対リスクを計算すると相対リスクは 0.8(95%CI=0.5-1.1)、1.0(0.6-1.5)、1.3(0.7-2.3)、1.5(0.7-3.6)であった。傾向性の P 値は 0.206 であった。なお、親の社会経済状態などに関して調整を行ったが、同様の結果であった。小児（15 歳未満）に限定した解析も行ったが、統計学的な誤差が大きく、意味があると思われる結果は得られなかった（累積線量とがんリスクに統計学的に有意な関連は得られなかった）。白血病に関しては、症例数が少なく詳細な検討が困難であった。今後、さらに症例が収集されるのを待ってリスク解析を行う予定である。

本研究では、また、欧州各国から報告された自然放射線レベルと小児白血病リスクの関連に関する報告との比較解析を行った^{3,6,8,9)}。被ばく線量当たりの過剰相対白血病リスクは、100mGy 当たりで 0-27 に分布しており、平均的な値は原爆被爆者で得られた結果と矛盾しないように思われた（表）。

表 自然放射線被ばくによる白血病リスクと原爆生存者の白血病リスクの比較

	100 mGy 当たりの過剰相対リスク(95% 新絡区間)
英国の UKCCS 研究 ³⁾	過剰リスクなし
スウェーデン ⁴⁾	過剰リスクあり
チェルノブイリ ⁹⁾	急性白血病 3(1,8)
英国(ブリテン島) ⁵⁾	12 (3, 22)
スイス ⁶⁾	4 (0,8)
フランス ⁷⁾	過剰リスクなし
フィンランド ⁸⁾	2-7 歳群で 27(1,160) ; 8-15 歳群で 5(0,100)
原爆被爆生存者 ¹¹⁾	被ばく時年齢 15 歳で 3-4

IV. 考察

本研究では、診断の正確性、悪性腫瘍症例の把握漏れなどの可能性を検討した。客観的な評価を行うための調査は行われていないが、病理診断などを持つ症例の全症例の中での割合、死亡診断書のみによる登録の割合、情報を収集するために訪れている病院・診療所・検査施設の網羅の程度などから、大きな問題があるとは思われない。

コホート研究から得られたデータの統計学的解析では、小児がんリスクと自然放射線被

ばくの関連を検討した。小児がんのなかで甲状腺がんと白血病は放射線との関連が強いと考えられるが、これらのがんを含め、小児がんと累積線量に統計学的に有意な関連は認められなかった。統計学的検出力は計算していないが、線量当たりの過剰相対リスク推定値の95%信頼区間は非常に広く、この研究単独で線量当たりのリスクを十分に評価できる可能性は低い。

小児期・青年期の放射線被ばくは、成人期での被ばくに比べて、線量あたりのがんリスクが高くなる可能性が高い。また、被ばく線量が同じでも、線量率が異なると健康影響は異なる可能性がある。in vitro や動物実験では、線量当たりの生物影響は、低線量・低線量率のほうが高線量・高線量率より小さい可能性が示されているが、ヒトでは十分な証拠は得られていない。

本研究では、また、欧州各国から報告された自然放射線レベルと小児白血病リスクの関連に関する報告の比較解析を行った³⁻⁹⁾。被ばく線量当たりの白血病リスクは、原爆被爆者で得られた結果と矛盾しないように思われた。しかし、得られた推定値の信頼区間は広く、また、UNSCEAR2017でも指摘されているように、これらの研究には幾つかの不確実性がある。現在、英国での研究に関しては、そのような不確実性を検討する追加の研究が実施されている。主任研究者は、英国の研究者と連絡を取ってきており、本研究が終了した後も、彼らと意見交換を行うなどしながら、この問題の検討を継続する予定である。

V. 結論

本研究では、診断の正確性、悪性腫瘍症例の把握漏れなどの可能性を検討したが、他の同様の調査と比べて大きな問題はないと考えられる。また、コホート研究から得られたデータを用いて統計学的解析を行ったが、小児がんと累積線量に統計学的に有意な関連は認められなかった。統計学的検出力は計算していないが、線量当たりの過剰相対リスク推定値の95%信頼区間は非常に広く、この研究単独で線量当たりのリスクを十分に評価できる可能性は低い。

VI. 今後の展望など

最近公表されたUNSCEAR2017報告書では、世界各国で行われた自然放射線被ばくに伴う小児がんリスクが検討されている。小児の医療被ばくによるがんリスクにも注目が集まっており、ヨーロッパ各国では共同研究も行われている。そのような状況の中で、インドの高自然放射線地域での疫学調査は大きな意味を持ちうる。残念ながら、症例数が少なく、十分な統計学的検出力は得られていないが、インド政府の研究助成によりコホートは拡大されており、今後の成果が待たれるところである。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

- A. 論文：査読あり
なし
- B. 論文：査読なし
なし
- C. 学内学会発表
なし
- D. 国際学会発表
なし
- E. 著書
なし
- F. 講演
なし
- G. 主催した研究集会
なし
- H. 特許出願・取得
なし
- I. その他
なし

VIII. 参考文献

- 1) UNSCEAR. UNSCEAR 2013 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Volume II, Scientific Annex B: Effects of radiation exposure of children. United Nations, New York: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation; 2013.
- 2) UNSCEAR. UNSCEAR 2017 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Volume II, Scientific Annex B: Epidemiological studies of cancer risk due to low-dose rate radiation from environmental sources. United Nations, New York: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation; 2018.
- 3) U.K. Childhood Cancer Study Investigators. The United Kingdom Childhood Cancer Study of exposure to domestic sources of ionising radiation: 1: radon gas. Br J Cancer 86(11): 1721-1726 (2002).
- 4) Axelson, O., M. Fredrikson, G. Akerblom et al. Leukemia in childhood and adolescence and exposure to ionizing radiation in homes built from uranium-containing alum shale concrete. Epidemiology 2002;13(2): 146-150 (2002).

- 5) Kendall GM, Little MP, Wakeford R et al. A record-based case-control study of natural background radiation and the incidence of childhood leukaemia and other cancers in Great Britain during 1980-2006. *Leukemia*. 27(1):3-9 (2013).
- 6) Spycher BD, Lupatsch JE, Zwahlen M et al. Swiss Pediatric Oncology Group; Swiss National Cohort Study Group. Background ionizing radiation and the risk of childhood cancer: a census-based nationwide cohort study. *Environmental Health Perspectives*. 123(6):622-8 (2015).
- 7) Demoury, C., F. Marquant, G. Ielsch et al. Residential exposure to natural background radiation and risk of childhood acute leukemia in France, 1990-2009. *Environ Health Perspect* 125(4): 714-720 (2017).
- 8) Nikkilä A, Erme S, Arvela H, Holmgren O, Raitanen J, Lohi O, Auvinen A. Background radiation and childhood leukemia: A nationwide register-based case-control study. *Int J Cancer*. 2016 Jul 12. doi: 10.1002/ijc.30264.
- 9) International Consortium for Research on the Health Effects of Radiation Writing Committee and Study Team. Childhood leukaemia in Belarus, Russia, and Ukraine following the Chernobyl power station accident: results from an international collaborative population-based case-control study. *Int J Epidemiol*. 35(2):386-96 (2006).
- 10) Nair RR, Rajan B, Akiba S et al. Background radiation and cancer incidence in Kerala, India-Karanagappally cohort study. *Health Physics*. 2009;96(1):55-66.
- 11) Hsu WL, Preston DL, Soda M, Sugiyama H, Funamoto S, Kodama K, Kimura A, Kamada N, Dohy H, Tomonaga M, Iwanaga M, Miyazaki Y, Cullings HM, Suyama A, Ozasa K, Shore RE, Mabuchi K. The incidence of leukemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950-2001. *Radiat Res*. 2013 Mar;179(3):361-82.

Cancer risk associated with childhood exposure to low-dose-rate ionizing radiation – risk evaluation mainly based on epidemiological studies of residents in high natural background radiation areas in Kerala, India

Suminori Akiba

**1 Department of Epidemiology and Preventive Medicine, Kagoshima University
graduate School of Medical and Dental Sciences.*

Abstract

Health effects of Fukushima residents after the nuclear accident in March 2011 is of concern. Particularly concerned is cancer risk after exposure among children and young people since the excess relative risk of cancer risk is considered to be a few times higher when compared to adulthood exposure. In Fukushima, residents are concerned about the childhood exposure and its cancer risk.

In this study, cancer risk associated with radiation exposure in the childhood and in young adulthood will be estimated, using the Karunagappally cohort data, and the estimates will be compared to those obtained from other studies, including the LSS of atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki.

The Karunagappally cohort was established after the baseline survey conducted in Karunagappally in Kerala, India during the period 1990-97, when the baseline survey was conducted. To date, the follow-up was completed until the end of 2013. Akiba, the principle investigator of the present study, has been helping Indian scientists to analyze cancer and other disease risks in relation to cumulative radiation dose.

We did not find any serious problems regarding the completeness of case ascertainment and accuracy of diagnosis of cancer cases registered to the Karunagappally Cancer Registry. In statistical analysis of cancer risk among residents aged under 30 years, no statistically significant risk increase was observed in relation to cumulative dose of radiation exposure. In addition, meta-analysis was conducted to estimate an excess relative risk (ERR) per dose, using those reported from recent European studies and a Chernobyl study on childhood leukemia. A statistically significant association between radiation exposure and leukemia risk among children was found. However, uncertainties regarding dose estimation cannot be ignored and potential confounding is also concerned in those studies.

Keywords

high natural background radiation, Kerala, children, young people, cancer risk

2-4 マウスを用いたセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくによる成体と子孫

への影響の定量的実験検証

多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫における

ゲノム変異検出とそのスペクトル解析

主任研究者：中島 裕夫（大阪大学大学院・医学系研究科・医学専攻・ゲノム生物学講座・放射線基礎医学教室 助教）

分担研究者：大野 みずき（九州大学・大学院医学研究院 生体制御学講座 助教）

分担研究者：石原 弘（量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所 研究チームリーダー）

研究要旨

東日本大震災に伴って発生した福島原発事故直後よりクローズアップされ社会問題となった低線量放射線内部被ばくの懸念は究極的には被ばく世代における発がんが次世代への遺伝的影響の存否に集約される。

本研究では、低線量の内部被ばくによる発がんとゲノム突然変異への影響についてマウス個体を用いて実験的に、そして、定量的に検証するものである。

研究期間内にセシウム 137 に対する低線量・低線量率内部被ばく影響を、酸化ストレス誘発消化管がんを高感度に検出できる *Msh2* 遺伝子改変マウス系統を用いて、被ばく世代における体細胞突然変異と発がん影響を調べた。さらに、多世代(20 世代以上)にわたりセシウム 137 水を飲み続けたマウスの塩基配列変異を全 DNA 塩基配列解析法により同腹仔由来の対照群と比較して、子孫でのゲノムにおける塩基変異の特徴について調べた。そして、内部被ばく線量と外部被ばく線量の同等性について検証が可能か検討した。さらに、統計学的手法に活路を見出しにくい低線量影響のような領域に対して、新たな視点から長期低線量被ばく影響を予測するための革新的な数理モデル構築が可能か検討した。

継世代影響実験では、同腹仔由来の A/J と C57BL/6J マウス系統のセシウム 137 飲水投与と非投与群間における両マウス系統の 3 世代間、また A/J の 20 世代間でセシウム 137 による DNA 塩基変異率を比較したが、ヒトに換算して 100,000Bq/l のセシウム 137 水を 20 世代飲み続けても対照群との間に DNA 塩基変異率に有意な差が認められなかった。

平均体重 24.8 g の雄マウスがセシウム 137 水 (100Bq/ml) を飲料水として飲み続け

ると、飲み始めから3~4週間で各臓器内のセシウム137分布量は、筋肉で168.3Bq/g、その他（心、肺、肝、腎、脳、精巣）では40~80Bq/gで平衡状態となり、以後同じ状態を保ち続ける。この時のホールボディーカウントは、1個体あたり平均93.5Bq（82.4~116.4Bq）であった。このような基本的な条件を踏まえたうえで、継世代実験ならびに研究分担者による一世代実験を行った。

継世代影響実験では、解析を行ったすべてのサンプルにおいて Depth（標的のゲノム領域に対して何回シーケンスをしたかを意味するもので数字が大きいほどDNA配列解析の信頼性が高い）が8以上となった領域長の、Exon（遺伝情報となる重要なDNA配列）、Intron（1つの遺伝子内にあるが遺伝情報として翻訳はされないDNA配列）、Intergenic（1つの遺伝子内にはなく遺伝子と遺伝子の間に存在するDNA配列）それぞれの領域ごとに homo（父親由来と母親由来双方のDNA）で変異している塩基のみを解析対象とした。

その結果、世代ごとで基準となるC57BL/6J系統マウスの参照塩基配列と同じになったり（復帰突然変異）、異なったり（突然変異）する変異が発生していることが分かった。

Y染色体は、雄の世代間変異の定量に適していると考えられたが、annotation情報（DNA配列の遺伝子に関連した情報）が少なく、塩基配列も不正確な部分が多いため、これまでのところでは検出の信頼性はかなり低いと考えられた。

本実験条件でのセシウム137によるマウス1世代（平均108日）あたりの平均内部被ばく線量は、単純物理計算、PHITS（Particle and Heavy Ion Transport code System）、EGS5（Electron Gamma Shower Version 5）コードシステムを用いて算定した結果、それぞれで、36.33、37.87、34.55 mGyであった。

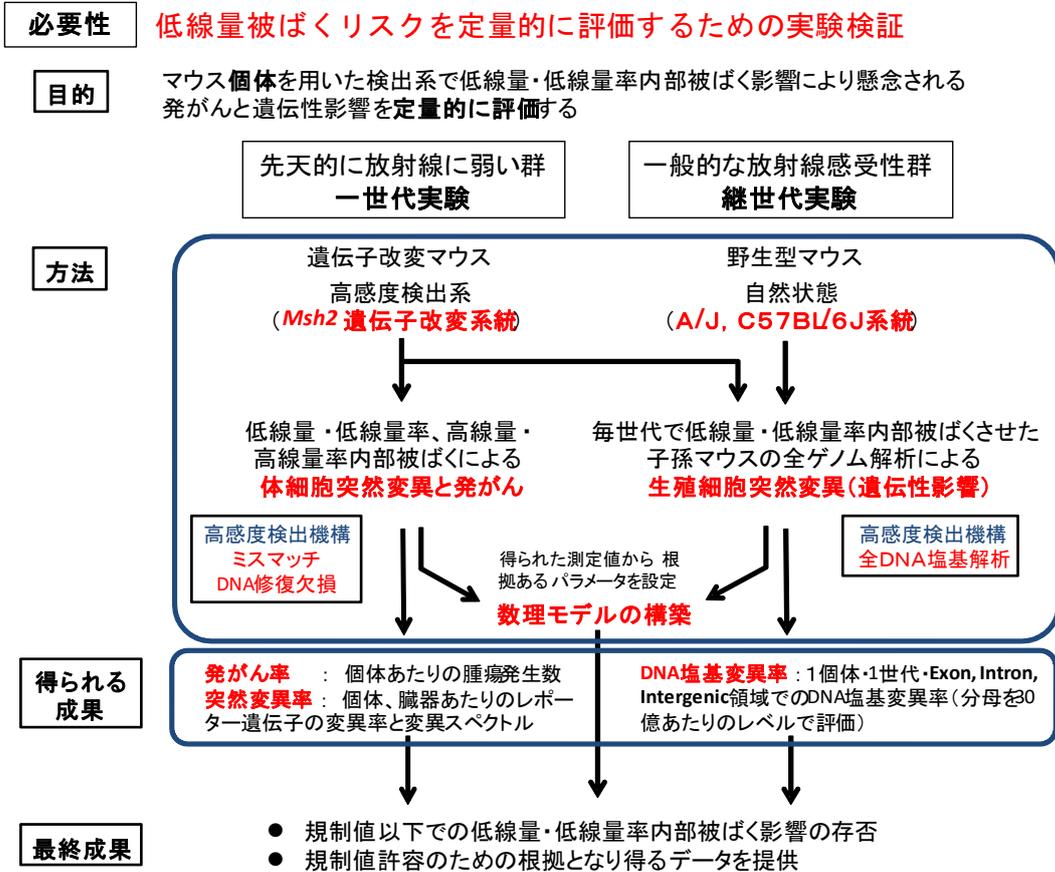
キーワード

低線量放射線、セシウム137、内部被ばく、遺伝性影響、発がん、福島原発事故

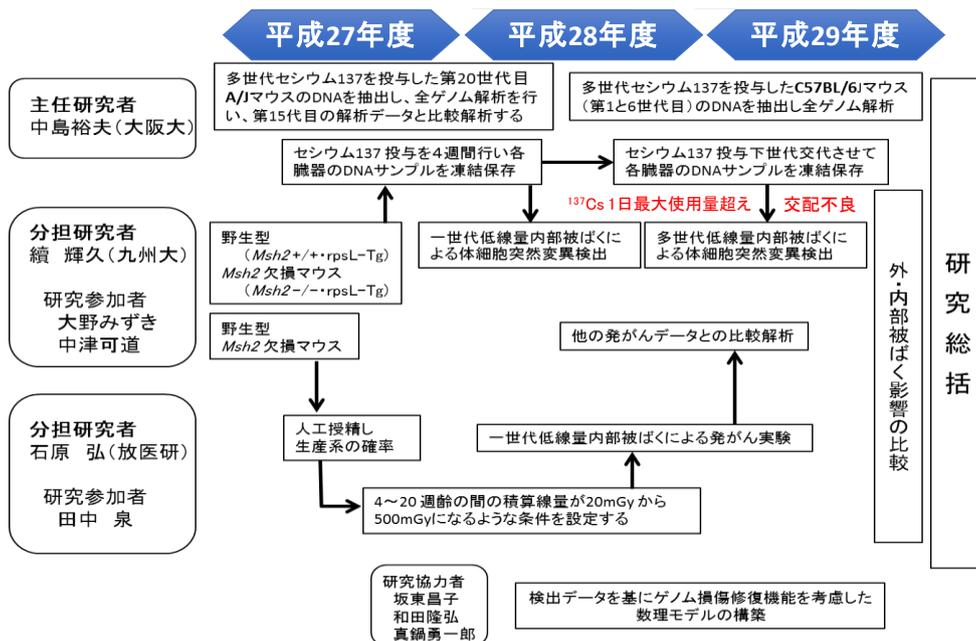
研究協力者

坂東 昌子（大阪大学核物理研究センター 共同研究員
NPO 知的人材ネットワークあいんしゅたいん 理事長）
和田 隆宏（関西大学 教授）
真鍋 勇一郎（大阪大学大学院工学（系）研究科 助教）

研究概要



3年間の実施項目対応のマイルストーン (目標設定内容)



I. 研究目的

福島原発事故による低線量被ばくが人々への発がんや遺伝影響の不安を招く要因のひとつになっている。そこでどの程度の内部被ばくまではそれほど心配しなくて良いのか等の判断材料を実験研究結果としてこれまでの疫学研究結果に加えて提供することが本研究の目的である。

本研究は、実験動物を用いた研究ではあるが、低線量・低線量率放射線被ばくの影響を定量的に評価する新たな実験システムを開発しようとするものであり、3年間で高感度検出系として *Msh2* 遺伝子改変マウスを用いて、また、野生型マウスでは、被ばくさせる世代数を多くして全ゲノムの中から変異の検出を試みる。DNA 修復欠損の *Msh2* 遺伝子改変マウスを放射線高感受性の人間と想定すれば、低線量内部被ばく影響が自然状態（DNA 修復能がある野生型）では検出限界以下でも高感受性群では検出できる限界点を見つけることが期待できる。このような実験結果から放射線の基準値設定に際して放射線高感受性の人間も考慮することができ、安心の根拠として役立てられるのではないかと考えている。

また、この研究成果は、ICRP 勧告や国内法の設定した線量の妥当性を検証する実験結果を与えるだけでなく、放射性セシウムによる内部被ばく影響の視点から検証することにもなるため、現在の設定された預託線量に基づく規制値の是非を実験的に検証・認知することを可能にし、今後の規準値の安心度を担保するための参考資料として福島復興に資することが期待できると考えている。

さらに、MELODI (Multidisciplinary European Low Dose Initiative : ヨーロッパの多分野にわたる低線量放射線研究プラットフォーム) などのような低線量被ばくに関する長期におよぶ基礎研究体制を福島原発事故に直面している日本においても構築する必要があると考えられ、得られた成果がその体制づくりの礎となるよう期待したい。

II. 研究方法

最も懸念される多世代にわたる低線量被ばくの子孫への影響を解明するためにヒトより世代交代の速い近交系マウスを利用し短期的にヒトへの影響の推測を試みるために A/J 系統、および C57BL/6J 系統マウスの1つがい（初代）の子（同腹仔）の中から2つがいを選び、1つがいを対照群として水を、もう1つがいを低線量内部被ばく群として $^{137}\text{CsCl}$ 水（100 Bq/ml）を自由摂取させて飼育した。

1. マウス継世代実験による全 DNA 塩基配列の解析

得られた子供を兄妹交配することによって世代交代を15世代以上繰り返し（ヒトでは約300年以上の世代交代に相当する）、多世代低線量内部被ばくした A/J マウス系統の初代（Origin）、20 世代目（F₂₀）、22 世代目（F₂₂）、23 代目（F₂₃）と初代由来の対照群の20 世代目、22 世代目、23 代目（いずれも♂）、また、C57BL/6J 系統

の同じ初代由来のセシウム 137 群と対照群の 0 世代目 (F₀)、1 世代目 (F₁)、2 世代目 (F₂) (いずれも♂) の肝臓組織から抽出した DNA の全ゲノム塩基配列解析を行い比較検討した。これにより、セシウム 137 投与群の 1 世代間、初代から 20 世代間の塩基変異の蓄積性や変異率が解析できるとともに、対照群の 1 世代間、20 世代間の自然塩基変異率も解析できた。表 II-1 に示すようにマウスの 1 世代自然突然変異率、1 塩基の変異率、遺伝子数がヒトと同じである点を考慮すると自然状態におけるヒトでの継代的影響をシミュレートするのに値する。すなわち、低線量・低線量率内部被ばくを続けながらヒトが世代交代を繰り返した場合の子孫における DNA 塩基への影響がどれくらいであるのか、また、その変異する場所は確率的に均等な分布なのか、それとも重要な部位には起こりにくいのかなどを推定するために全塩基数 (約 30 億塩基対) に対する変異塩基数として定量することができる。

表 II-2 ヒト、マウス、ショウジョウバエの 1 世代あたりの自然突然変異率

	1世代あたりの突然変異率	1世代、1塩基あたりの塩基変異率	1世代の平均期間 (月齢)	遺伝子数	ヒトに対する塩基配列の相同性
ヒト	3.6x10 ^{-6*}	1.2x10 ^{-8**}	300	30,000	
マウス	6.1x10 ^{-6*}	0.54x10 ^{-8***}	3	30,000	97 %
ショウジョウバエ	1.8x10 ^{-6*}		0.3	13,000	60 %

* [参考文献 1], ** [参考文献 2-11], *** [参考文献 12]

2. マウスの内部被ばく線量評価

本研究の最大の目的は、セシウム 137 による低線量内部被ばく影響の定量である。内部被ばく実験において吸収線量を求めることは線量評価の上でとても重要である。これまでの実験結果から図 II-1、表 II-2 に示すように、マウスが 100 Bq/ml のセシウム 137 水を自由に摂取した場合には、3~4 週以降において体内のセシウム量は、定常状態になることがわかっている (図 II-1a)。図 II-1b は、100 Bq/ml もしくは、10 Bq/ml のセシウム 137 水を 8 ヶ月間自由摂取し続けたときのセシウム 137 の臓器組織内分布量をオートマチックガンマカウンター (2480 WIZARD2, PerkinElmer Co., Ltd., Waltham, MA, USA) を用いて測定したものである。また、表 II-2 の全身測定は、3 か月齢の 4 匹の雄マウスそれぞれ 1 個体の全身をゲルマニウム半導体検出器 (Ge semiconductor detector GC3018 : Canberra Inc., Meriden, CT, USA) にて測

定した平均Bq数である。これらのセシウム 137 のマウス体内分布量を考慮しながら内部被ばく線量の算定を試みた。算定には、マウス個体を殆ど透過するγ線の透過率の設定により線量が変わる可能性があるため、正確な線量を求めるために、単純物理計算のみならず PHITS、EGS5 コードシステムの手法や生理的反応を指標にしたバイオドジメーター（研究分担）で求められる線量を総合的に検討した。

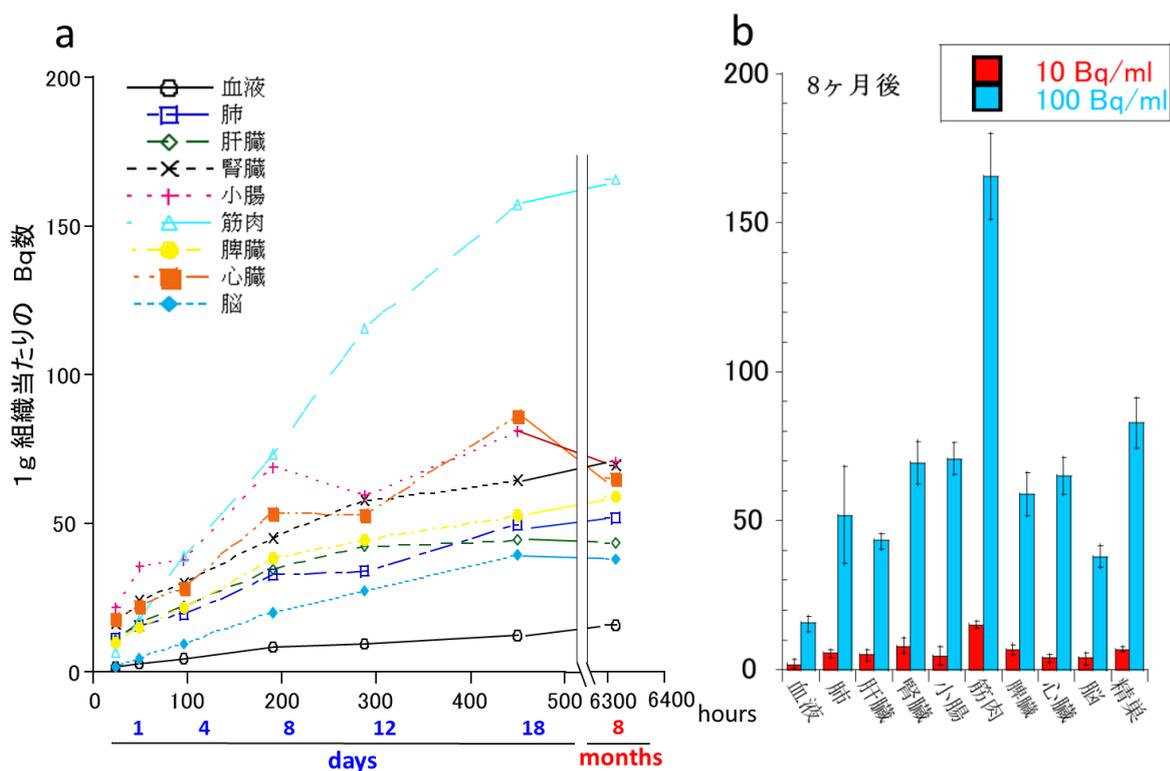


図 II-1 毎日 ^{137}Cs 水を自由摂取したときの臓器別 ^{137}Cs 量の変化と蓄積量

a : 100 Bq/ml の ^{137}Cs 水を自由摂取開始から 8 ヶ月後まで臓器別 ^{137}Cs 量の変化

b : 10 Bq/ml、もしくは、100 Bq/ml の ^{137}Cs 水を 8 ヶ月間自由摂取し続けたときの ^{137}Cs の各臓器組織内分布量

PHITS (Particle and Heavy Ion Transport code System) は、原子力機構が中心となり開発された任意形状の 3 次元体系内における放射線挙動を解析できる国産の汎用モンテカルロ計算コードである。

また、EGS5 (Electron Gamma Shower Version 5) はスタンフォード線形加速器センター、高エネルギー研究所、ミシガン大学の協力で開発された電子光子輸送モンテカルロ計算コードで、数 keV から数 100 GeV のエネルギー範囲での電子・光子輸送をシミュレートする汎用モンテカルロ計算コードである。これらの方法を使

うことでこれまでに測定されたセシウム 137 を長期投与された A/J、C57BL/6J マウスの体内セシウム 137 の Bq 数からマウスの 1 世代におけるセシウム 137 による内部被ばく線量 (Gy) を求めた。本研究の分担者により確立してきているバイオドジメトーターと合わせてより正確なそして信頼性を担保できる被ばく線量を求めることを検討した。

表 II-2 ^{137}Cs 水 (100Bq/ml)多世代自由摂取による 3 か月齢(108 日齢) A/J マウス各臓器の ^{137}Cs 濃度

雄マウス	Bq/g	95%CI	正味臓器線量 Bq/臓器
肺	40.12	7.26	7.72
心臓	69.46	11.04	7.12
肝臓	39.66	7.01	59.45
腎臓	59.17	7.09	24.41
脾臓	57.17	10.19	4.00
小腸	69.20	8.72	139.37
胃	60.77	13.78	8.20
脳	38.29	6.58	15.41
筋肉	168.27	43.40	
精巣	84.76	16.80	14.62
残りの全組織 (筋肉を含む)			1785.42
全身測定		93.54 Bq/g	
		2312.97 Bq/個体	

3. 低線量被ばくによる影響の数理モデル構築

数理モデルの構築は統計を否定することではなく、実験値のない低線量領域を推定するための試みの 1 つとして行うものである。自然放射線では遺伝性変異の明らかな増加が認められていない点から総線量が増加しても変異率がプラトーになる線量率の存在が予想される。このことを考慮した数理モデルとして真鍋、坂東、和田が提唱する Whack-A-Mole model (WAM) (モグラたたきモデル) (参考文献 13, 14) を基本として考える。この数理モデルの原型は、反応理論を基礎に、刺激応答反応の観点から線量率効果を取り入れて定式化したもので、突然変異率が小さく正常細胞数がほぼ一定と近似できる場合には変異発生頻度 $F(t)$ の時間変化は以下の微分方程式で与えられる。

$$\frac{dF}{dt} = (a_0 + a_1 d) - (b_0 + b_1 d)F, \quad d \text{ は線量率}$$

変異細胞は自然の刺激 a_0 と自然以外の放射線による刺激 $a_1 d$ で作られ、他方、生体の持つ自然修復 b_0 と放射線によって誘発された $b_1 d$ で修復・除去されるとする。時刻 $t=0$ で一定の線量率 d で照射を開始した場合、時刻 t での解 $F(t)$ は次式となる。

$$F(t) = F(\infty)(1 - e^{-\tau}) + F_s, \quad F(\infty) = \frac{a_0 + a_1 d}{b_0 + b_1 d}, \quad F_s = \frac{a_0}{b_0}, \quad \tau = (b_0 + b_1 d)t$$

変異発生頻度に対する総線量の閾値はない。しかし、低線量率で長期に被ばくする場合には変異発生頻度は $F(\infty)$ に近づきそれ以上増えない形になっている。つまり、影響が時間に比例して単純に蓄積されないことが重要で、LNT (Linear No-Threshold: 放射線影響が線量に依存して閾値なしで直線的に増加するという仮説) 的な考え方との決定的な差となり新たな低線量率影響のとらえ方と評価法を確立することが期待できる。

物理的に発生する諸現象は、生体内においても LNT 的であると考えることは理にかなっている。従って、生存に不要な DNA 領域 (Intron, Intergenic) での塩基配列変異は、LNT 的に発生し保存されることが十分に考えられる。この変異率を放射線作用の確率的影響のベースとして、生存に必要な DNA 領域 (Exon) における塩基変異率に生存のための選択圧が存在するとすれば、この領域間の差を数理モデルのパラメータの 1 つとして考えることができると予想し研究協力者と議論を重ねた。

(倫理面への配慮)

本研究では共同研究するいずれの研究機関においてもヒトの個人情報、サンプル等を研究対象としていない。

本実験の動物実験に関して、大阪大学においては、大阪大学動物実験規程のもと、動物実験委員会の承認を得た (動物実験計画書: 福島原発事故シミュレーションとしての多世代微量放射線内部被ばくによるマウス子孫での遺伝的、生理的影響の検討、承認番号: 第 動医 26-067-000 号、有効期限: 2020/03/31)。なお、放射性同位元素利用施設内での動物飼育については、大阪大学医学系研究科飼養保管施設等設置の承認を受けた (承認番号 飼医 19-01-0 号)。放射性同位元素利用施設内での実験操作に関しては、大阪大学ラジオアイソトープ総合センター放射線障害予防規定を遵守して行った。

III. 研究結果

1. マウス継世代実験による全 DNA 塩基配列の解析

解析を行ったすべてのサンプルにおいて Depth (標的のゲノム領域に対して何回シーケンスをしたかを意味するもので数字が大きいほど DNA 配列解析の信頼性が高い) が 8 以上となった領域長の、Exon (遺伝情報となる重要な DNA 配列)、Intron (1 つの遺伝子内にあるが遺伝情報として翻訳されない DNA 配列)、Intergenic (1 つの遺伝子内にはなく遺伝子と遺伝子の間に存在する DNA 配列) それぞれの領域ごとに父親由来、母親由来いずれの DNA でも同じ変異を持っている (homo 変異となっている) 塩基のみに着目して解析を行った。今回行った全 DNA 塩基配列解析の解析塩基数、解析範囲の網羅率、検出された変

異塩基数を A/J 系統については表 III-1、C57BL/6J 系統については表 III-2 に示す。

表 III-1 A/J マウス系統における全 DNA 塩基配列解析の解析塩基数、
解析範囲の網羅率、検出された変異塩基数

A/Jマウス系統	Exon	Intron	Intergenic
DNA塩基の対象領域長	85,215,676	1,020,239,909	1,544,463,199
7サンプルすべてにおいてDepth 8X以上となった領域長	78,136,347	905,185,220	1,228,763,247
解析網羅率(%)	91.69	88.72	79.56
変異塩基数合計 SNV	119,452	2,096,946	3,226,141
InDel	18,409	502,776	655,131

表 III-2 C57BL/6J マウス系統における全 DNA 塩基配列解析の解析塩基数、
解析範囲の網羅率、検出された変異塩基数

C57BL/6Jマウス系統	Exon	Intron	Intergenic
DNA塩基の対象領域長	88,281,447	1,038,534,313	1,523,103,023
6サンプルすべてにおいてDepth 8X以上となった領域長	88,054,106	1,033,554,409	1,507,267,892
解析網羅率(%)	99.74	99.52	98.96
変異塩基数合計 SNV	9,049	176,128	273,973
InDel	1,766	56,652	78,140

本研究で HiSeq X (イルミナ社) を用いて行った全 DNA 塩基配列解析では、C57BL/6 マウス系統の全 DNA 塩基配列を基準としたリファレンス DNA 配列に対して異なった塩基の数や場所を検出する方法である。従って、別系統である A/J においては、かなりの数の変異塩基が認められている(表 III-1、変異塩基数合計の SNV と InDel)。おなじ C57BL/6J 系統であっても阪大で 200 世代以上に渡って系統維持された本実験のマウスでは、自然突然変異によって、リファレンス DNA 配列とは、ある程度異なる変異塩基が認められている(表 III-2、変異塩基数合計の SNV と InDel)。ここで、SNV (Single Nucleotide Variation) は 1 塩基変異を、InDel (insertion/deletion) は塩基の挿入、欠失の数を意味している。

図 III-1 に A/J 系統の初代 (Origin) と 20 世代に渡って 100Bq/ml のセシウム 137 水を摂取し続けたマウス、同様に真水を摂取して 20 世代経過した対照群の全 DNA 塩基配列解析による 1 塩基変異 (SNV) の数を Exon、Intron、Intergenic 領域別に示す。

同じ初代から派生した両群であるが、20 世代後の塩基変異数が初代よりも少なくなっている。本グラフは、前述したように基準の塩基配列とどれくらい差があるかを検出して示しているグラフであるので、初代より塩基変異数が少なくなっているのは、いくつかの変異していた塩基が基準の塩基配列と同じになった(復帰突然変異を起こした)ことを示している。従って、世代を重ねるごとに塩基が基準とは異なった配列に変化して、塩基変異が常に加え続けるわけではなく、復帰する変異も存在しているために、検出される塩基変異数は世代ごとに増えて減ったりしていることを意味している。このことから、同じ初代から派生した 2 群間の塩基変異の数を 20 世代目だけで比較する場合は、その時点での変異塩基数の差が分かるだけで、20 世代の間で変異した塩基の総計の差を比較したことには

ならない。図Ⅲ-1 より初代から 20 世代までのセシウム 137 群と対照群の間での塩基変異数には大きな差は認められない。

図Ⅲ-2 は、C57BL/6J 系統の 0 世代 (F0) と 2 世代目 (F2) 間で SNV を比較した同様のグラフであるが、やはり同じ初代から派生したセシウム 137 群と対照群であるが、図Ⅲ-1 と同様に変異塩基数の世代間で増減が認められている。

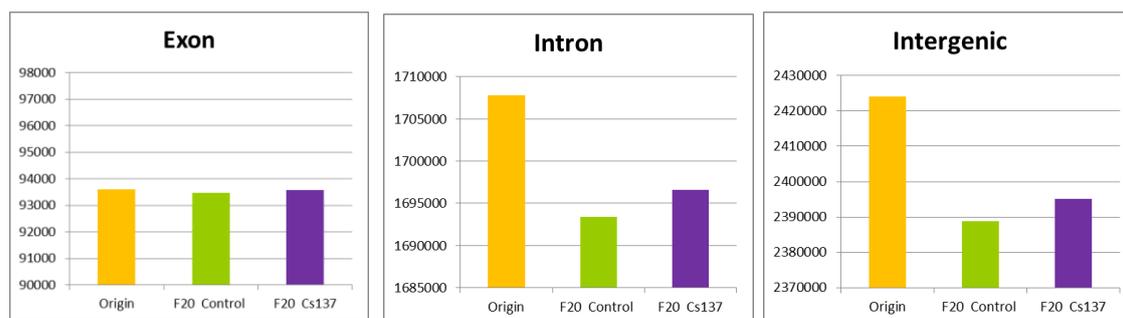


図 Ⅲ-1 A/J 系統の全 DNA 塩基配列解析による初代 (Origin) と 20 世代目 (F20) における ^{137}Cs 群と対照群の 1 塩基変異 (SNV) の数

縦軸はリファレンス DNA 配列と異なる塩基の数を示しており、Exon ではセシウム 137 群と対照群ともに 20 世代経過しても初代 Origin との間で大きな差が認められない。しかし Intron、Intergenic では差が認められる。

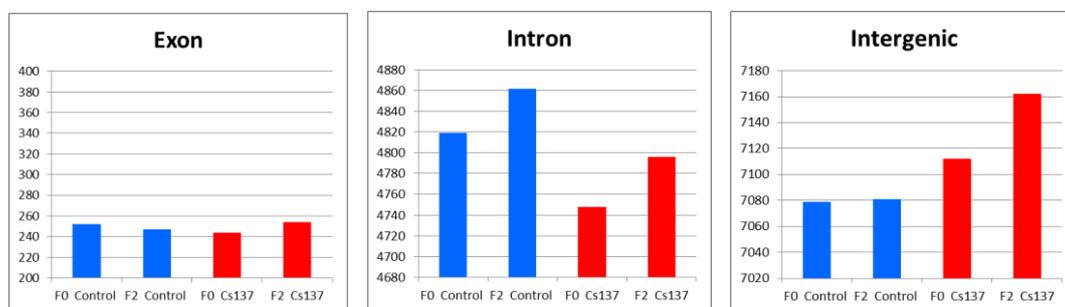


図 Ⅲ-2 C57BL/6J 系統の全 DNA 塩基配列解析による 0 世代 (F0) と 2 世代目 (F2) における ^{137}Cs 群と対照群の 1 塩基変異 (SNV) の数

縦軸はリファレンス DNA 配列と異なる塩基の数を示しており、Exon ではセシウム 137 群と対照群ともに 2 世代経過しても 0 世代との間で大きな差が認められない。しかし Intron、Intergenic では差が認められる。

図Ⅲ-3、図Ⅲ-4 は、A/J 系統のセシウム 137 群と対照群の 20、22、23 世代目 (F20、F22、F23) における各世代の Exon、Intron、Intergenic 領域それぞれの SNV 数を示すグラフである。また、図Ⅲ-5、図Ⅲ-6 は、C57BL/6J 系統のセシウム 137 群と対照群の 0、1、2

世代目 (F0、F1、F2) における各世代の SNV を示すグラフである。

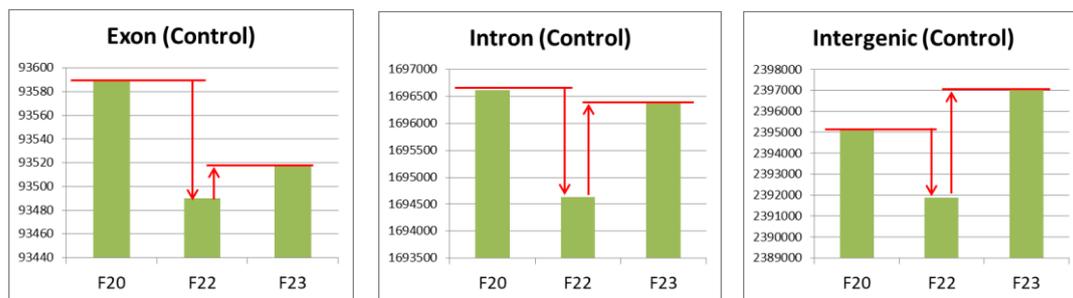


図 III-3 A/J 系統の対照群の各世代 (20, 22, 23 世代目) における 1 塩基変異 (SNV) の数

縦軸はリファレンス DNA 配列と異なる塩基の数を示しており、矢印は、各世代間での変異数数の増減量を示している。従って、Exon、Intron、Intergenic 領域それぞれのグラフ中の矢印の長さ分の合計は、20 世代 (F20) から 23 世代 (F23) の間で変異した変異塩基数の総合計となる。以下同じ。

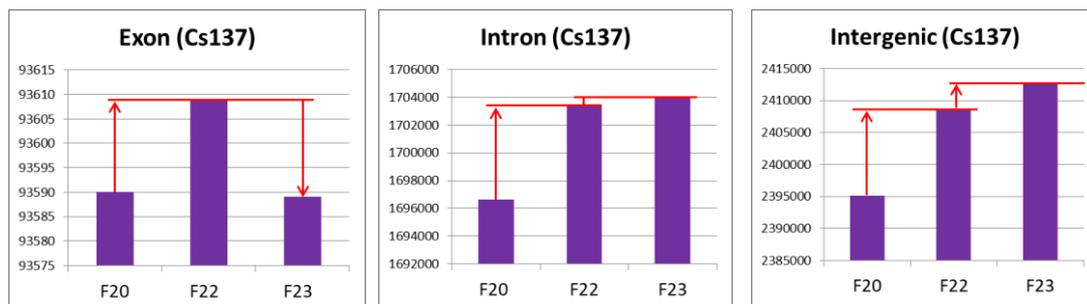


図 III-4 A/J 系統の ^{137}Cs 群の各世代 (20, 22, 23 世代目) における 1 塩基変異 (SNV) の数

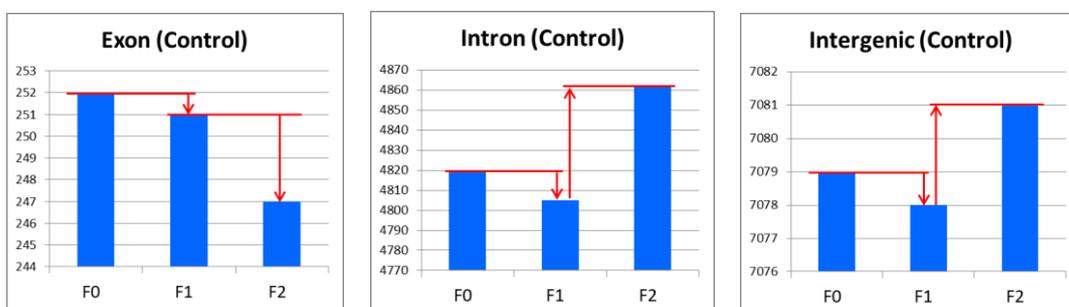


図 III-5 C57BL/6J 系統の対照群の各世代 (0, 1, 2 世代目) における 1 塩基変異 (SNV) の数

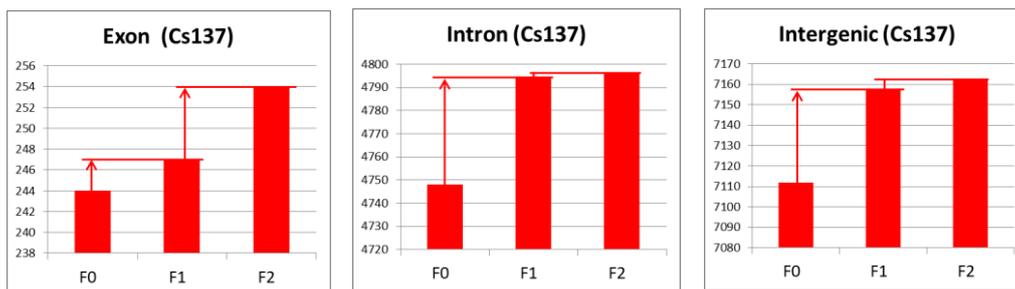


図 III-6 C57BL/6J 系統の ^{137}Cs 群の各世代 (0, 1, 2 世代目) における 1 塩基変異 (SNV) の数

図III-3、図III-4 は、A/J 系統のセシウム 137 群と対照群の 20、22、23 世代目 (F20、F22、F23) における各世代の Exon、Intron、Intergenic 領域それぞれの SNV 数を示すグラフである。また、図III-5、図III-6 は、C57BL/6J 系統のセシウム 137 群と対照群の 0、1、2 世代目 (F0、F1、F2) における各世代の SNV を示すグラフである。

これらの結果から、世代ごとで基準となっている参照塩基配列と同じになったり (復帰突然変異)、異なったり (突然変異) する変異がランダムに発生していることがわかった。

そこで、図III-3 から図III-6 それぞれで世代ごとの塩基変異数 (矢印の長さに相当) の合算を行い、対象世代間の総塩基変異数を求めた (例: 図III-4 の Exon(Cs137) グラフは増減しているが、上行矢印と下行矢印の長さの合計が F20 から F23 までの総塩基変異数とした)。

Depth 8 以上となった領域長に対する総塩基変異数から Exon、Intron、Intergenic 領域における SNV と InDel の頻度を求めたのが表III-3 (A/J 系統の SNV)、表III-4 (A/J 系統の InDel)、表III-5 (C57BL/6J 系統の SNV) 表III-6 (C57BL/6J 系統の InDel) である。

塩基変異率は生存に必須と考えられる Exon 領域より、必須ではないと考えられる Intron、Intergenic 領域の方が高い傾向を示した。

表 III-3 A/J 系統の Exon、Intron、Intergenic 各領域における解析総塩基数に対する 1 塩基変異 (SNV) の発生頻度と標準化調整後の変異率

A/Jマウス系統		Exon	Intron	Intergenic	平均変異率	調整後変異率
塩基変異率	Control	1.63×10^{-6}	4.14×10^{-6}	6.79×10^{-6}	4.19×10^{-6}	5.40×10^{-9}
(1塩基置換)	^{137}Cs	0.50×10^{-6}	8.10×10^{-6}	14.20×10^{-6}	7.60×10^{-6}	9.81×10^{-9}
$^{137}\text{Cs}/\text{Cont}$ 比						1.82

表 III-4 A/J 系統の Exon、Intron、Intergenic 各領域における解析総塩基数に対する 欠失挿入変異 (InDel) の発生頻度と標準化調整後の変異率

A/Jマウス系統		Exon	Intron	Intergenic	平均変異率	調整後変異率
塩基変異率	Control	1.59×10^{-6}	7.12×10^{-6}	6.65×10^{-6}	5.12×10^{-6}	3.10×10^{-10}
(欠失・挿入)	^{137}Cs	3.23×10^{-6}	14.29×10^{-6}	14.58×10^{-6}	10.70×10^{-6}	6.48×10^{-10}
$^{137}\text{Cs}/\text{Cont}$ 比						2.09

表 III-5 C57BL/6J 系統の Exon、Intron、Intergenic 各領域における解析総塩基数に対する 1 塩基変異 (SNV) の発生頻度と標準化調整後の変異率

C57BL/6Jマウス系統		Exon	Intron	Intergenic	平均変異率	調整後変異率
塩基変異率	Control	5.68×10^{-8}	6.87×10^{-8}	0.27×10^{-8}	4.27×10^{-8}	5.40×10^{-9}
(1塩基置換)	^{137}Cs	11.36×10^{-8}	4.64×10^{-8}	3.32×10^{-8}	6.44×10^{-8}	8.14×10^{-9}
$^{137}\text{Cs}/\text{Cont}$ 比						1.51

表 III-6 C57BL/6J 系統の Exon、Intron、Intergenic 各領域における解析総塩基数に対する欠失挿入変異 (InDel) の発生頻度と標準化調整後の変異率

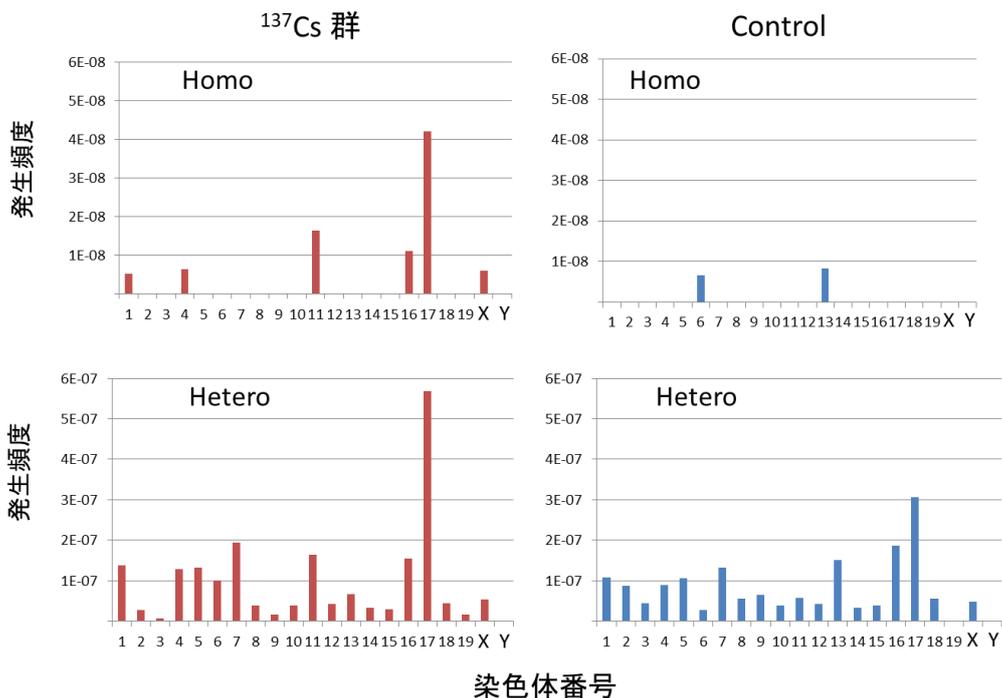
C57BL/6Jマウス系統		Exon	Intron	Intergenic	平均変異率	調整後変異率
塩基変異率	Control	1.48×10^{-7}	1.25×10^{-7}	1.31×10^{-7}	1.34×10^{-7}	3.10×10^{-10}
(欠失・挿入)	^{137}Cs	0.45×10^{-7}	1.50×10^{-7}	2.63×10^{-7}	1.53×10^{-7}	3.53×10^{-10}
$^{137}\text{Cs}/\text{Cont}$ 比						1.14

ここで得られている塩基変異率は、全 DNA 塩基変異解析におけるフィルタリング等のローカルな解析条件下での検出値であるので、相対的な変異率が示されている。そこで、絶対的な変異率を求めるために、対照群の Exon、Intron、Intergenic の全領域を総合して平均変異率を求め、これまでに Uchiyama ら (参考文献 12) によって報告されているマウスでの SNV の自然発生率 (5.4×10^{-9}) と InDel の自然発生率 (3.1×10^{-10}) を標準にして、本研究で得られた塩基変異率を比例調整して自然突然変異に対する ^{137}Cs 群の塩基変異率を算出した (各表の調整後変異率)。従って、対照群 (Control) の変異率は、SNV と InDel、双方とも Uchiyama らの報告値と同じになっている。そして、 ^{137}Cs 群の調整後変異率の自然突然変率に対する比 ($^{137}\text{Cs} / \text{Control}$) を求めた。その結果、SNV では、A/J と C57BL/6J 系統でそれぞれ、1.82 と 1.51、InDel ではそれぞれ、2.09 と 1.14 であった。

図 III-7 には各染色体における SNV の相対的発生頻度を示した。Homo 塩基変異 (父親由来と母親由来の DNA のいずれにも同じ塩基変異がある)、Hetero 塩基変異 (父親由来もしくは母親由来の DNA のいずれかに塩基変異がある) いずれでも 17 番染色体上に特異的に多く発生していた。

また、検出された塩基変異の一部で塩基変異スペクトルを解析したが、これまでのところでは、酸化ストレスによる特異的な塩基変異の傾向は検出されていない。

Y 染色体解析では、検出できた塩基変異数は数個程度であった。また、 ^{137}Cs 群の調整後変異率の自然突然変率に対する比 ($^{137}\text{Cs} / \text{Control}$) を求めたが、A/J 系統では SNV が 3.38、InDel が 1.84 と塩基変異の増加傾向を示したのに対して、C57BL/6J ではそれぞれ、0.52、0.26 と減少傾向を示す A/J とは逆の結果が出た。



図III-7 A/J系統の各染色体（1～19, X, Y）における1塩基変異（SNV）の相対的発生頻度

Homo塩基変異（父親由来と母親由来のDNAのいずれにも同じ塩基変異がある）、Hetero塩基変異（父親由来もしくは母親由来のDNAのいずれかに塩基変異がある）の染色体別発生頻度を示す。

2. マウスの内部被ばく線量評価

セシウム137水を摂取し続けた20世代目の3か月齢4匹の雄マウスの全身の線量測定ならびに各臓器セシウム137の体内分布量（表II-2）の測定より得られた表III-7の基礎データ（雄マウス平均体重24.8g、1個体平均2313Bq、全臓器組織平均93.5Bq/g）を基にして、マウス全身を円筒形と考えると内部被ばく線量を算出した。

表 III-7 ゲルマニウム半導体検出器による全身のガンマ線測定

Germa Whole body count			
	体重 g	Bq/g	Bq/個体
Average	24.8	93.54	2312.97
95%CI	1.8	15.14	337.07

表III-8に単純物理計算（セシウム137のベータ線の平均エネルギーを0.227MeV、100%吸収、ガンマ線エネルギーは0.66MeV、5%吸収と仮定して計算）、PHITS、EGS5コードシステムを用いて得られた1世代（平均108日）あたりの平均積算線量（mGy）を示す。

表 III-8 実験マウスの内部被ばく線量評価

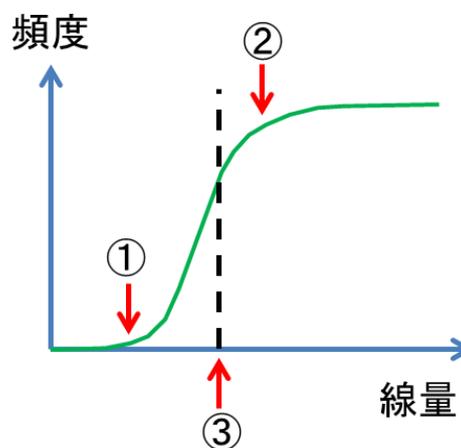
内部被ばく評価法	1世代平均積算	
	$\mu\text{Gy/day}$	mGy (108日)
単純物理計算による β 線+ γ 線(寄与率5%として)	336.4	36.33
EGS5*	319.9	34.55
FHITS**	350.6	37.87

*Electron Gamma Shower Version 5
(by Daiji Endoh, Rakuno Gakuen Univ.)

**Particle and Heavy Ion Transport code System
(by Satoru Endo, Hiroshima Univ.)

3. 低線量被ばくによる影響の数理モデル構築

本研究において検討した低線量放射線影響に関する数理モデルの基本論理は、真鍋ら(参考文献13, 14)によって考案されたモグラたたきモデルである。突然変異の原因(DNA損傷)が発生した場合に生物はそれを修復することができる。放射線によって発生したDNA損傷をモグラとすると、それをたたくのが損傷の修復である。低線量放射線の領域では、このモグラたたきは、たたく方が優位で、顔を出すモグラの数と叩かれる数はある範囲内で定常状態を保てるが(図III-8 ①)、ある一定の線量を超えてくるとモグラの方が優位になり、線量に依存して顔を出しているモグラ(修復できていないDNA損傷)が多くなる(図III-8 ①~②)。しかし、モグラの数が決まっていれば、線量依存的に顔を出しているモグラの数は永久に増え続けるのではなく、ある一定のところでプラトー(横ばい)となり、増えなくなる(図III-8 ②)。このモデルの中には、時間当たりのモグラの出現頻度が低い時にもたたく方が優位にモグラを制御できる(線量率を考慮する)ことも織り込める。このグラフの示すシグモイドカーブをDNA損傷による細胞死や突然変異率のモデルとして考えることで数理モデルの構築を試みた。



図III-8 修復できていないDNA損傷の頻度と線量の関係

突然変異について考えると、ある生物の遺伝子の数は決まっているので線量依存的な突然変異率もいずれは横ばいになるはずであるが、そのまえに、生物は別の要因で死滅する(図III-8 ③)。我々は、①~③までの間の線量依存性を観察していることになる。そして、定量性を捉えるために多くの場合にシンプルな式で扱えられる直線的な

線量依存性を示す領域が好まれて利用されている。しかし、①以下の領域では線量依存性による立ち上がりが少なく、生物の個体差などのばらつきの中にうずもれてしまい、グラフの立ち上がりの検出が非常に困難である。このような領域では、用量依存的な変異率の上昇を始めるターニングポイントを求めることはサンプル数や実験の精度の点から不可能に近いと考えられる。

そこで、定量的な実験から物理学や生物学の分野で根拠となり得るパラメータを求め、それを用いて数理モデルを構築することができれば、現実に即したシグモイドカーブを描き、修復能によって定常性を保てなくなる①に相当する線量を推定することができると考えられる。

このモグラたたきモデルは、細胞内レベルでは、DNA 損傷と修復、突然変異と淘汰、そして、組織レベルでは、がん化細胞と免疫能のように拮抗する事象を基にして数理モデルへと発展させることが期待できる。

研究協力者との討論により、他分野にも理解される数理モデルを構築するためには、根拠のあるパラメータを得る必要があるという結論に行き着いた。そのためには、本研究で確立された高感度な低線量放射線検出系を用いて、線量、線量率をいろいろと変えて、さらに多くのポイントデータを得る必要がある。

IV. 考察

1. マウス継世代実験による全 DNA 塩基配列の解析

セシウム 137 水 (100 Bq/ml) を飲料水として実験室内で 8 か月間飲み続けた A/J 系統マウスのセシウム 137 の臓器内蓄積量の変動を表した図 II-1 が示すように、セシウム 137 は筋肉内に多く蓄積している。そして、毎日一定量のセシウム 137 を摂取しているにも関わらず、臓器内セシウム 137 量は摂取量に応じて一定量でプラトーに達する（以後横ばいとなる）。図IV-1 は、18 世代目（8 か月齢）マウスでセシウム 137 の摂取を停止したのちの臓器内セシウム 137 の減衰を示したものである。体内へのセシウム 137 の摂取が途絶えると、筋肉以外の臓器ではセシウム 137 が体外へ排泄されて急速に減衰する。筋肉でも他臓器に比べてゆっくりではあるが、同様にセシウム 137 は減衰している。

以上のことから、セシウム 137 水を飲み続けている間は、マウスの放射線被ばく線量は一定であると考えられた。また、全身線量は、筋組織の B q 数、内臓組織の B q 数の平均的な値であったこと、マウスの体は筋肉が内臓の周りを一様に取り巻く構造であることから、内部被ばく線量のコード計算は、マウスの体を均一な円筒形として、全身線量を用いて行われた。

同腹仔をセシウム 137 群と対照群の 2 群に分けて世代交代させる実験を行っているので、両群ともに同じ DNA 塩基配列の祖先マウスから開始されている。基本的には、世代交代の間で異なる条件となるのは、セシウム 137 の内部被ばくがあるかないかのみである。

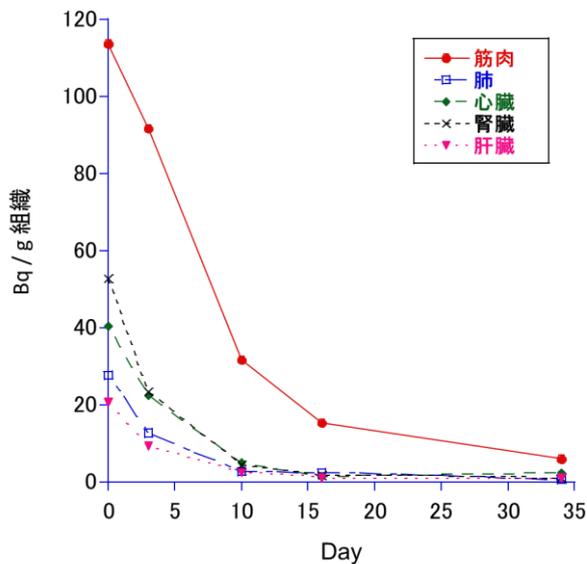


図 IV-1 ^{137}Cs 水摂取を停止した後の経時的な臓器別 ^{137}Cs 量の減衰

ようにマウス全身の平均セシウム 137 濃度は約 94 Bq/g で、ヒトに換算すると 94,000Bq/kg に相当する。このようなレベルの内部被ばくを 20 世代、23 世代と続けても対照群で自然に発生した塩基変異数とほとんど差はなく、偏った塩基変異の蓄積傾向も認められなかった。

マウスとヒトの次世代での自然突然変異率がほぼ同じ(表 II-1)であることを考慮すると、少なくともこのレベル(ヒト 1kg 当たり 94,000 Bq、50kg の体重では全身で 4,700,000 Bq)より低いセシウム 137 内部被ばくでは、子孫への影響の憂慮はほとんどないと考えられ、安心の根拠の一つとすることが出来る。

このことを裏付けるもう 1 つの結果として、上記線量のセシウム水 (100Bq/ml) を 1 世代から 18 世代まで継続的に飲み続けた A/J マウスとその対照群とを比較した平均性比 (♂/♀ : 対照群 1.06、セシウム 137 群 1.09) と平均産仔数 (一回に出産されるマウスの仔の平均匹数 : 対照群 5.13 匹、セシウム 137 群 5.35 匹) において有意な差が認められなかったことがあげられる。(参考文献 15)。

なお、Y 染色体は雄の世代間変異の定量に適していると考えられたが、本研究時の解析では検出変異数が数個であったこと、annotation 情報 (DNA 配列の遺伝子に関連した情報) が少なく、基準となる塩基配列も不正確な部分が多いことから、これまでのところでは検出の信頼性はかなり低いと考えられ、参照塩基配列が充実されるまで待たなければならぬことがわかった。

A/J ならびに C57BL/6J それぞれの世代間で比較した全 DNA 塩基変異解析 (全ゲノムシーケン) による 30 億塩基当たりの 1 塩基変異 (SNV : single-nucleotide variant) や挿入・欠失変異 (InDel : insertion/deletion) の発生率は Exon よりも Intron や Intergenic な部位で多く認められる傾向を示した。しかし、20 世代の世代交代を重ねてもセシウム 137 群と対照群間では、塩基変異数に大きな差が認められなかった。

マウスの摂取した 100Bq/ml のセシウム 137 水は、ヒトでの摂取量に換算すると 100,000Bq / l のセシウム 137 水に相当する。そして、表 II-2 で示す

2. マウスの内部被ばく線量評価

ヒトでの被ばく影響には吸収線量である Gy (J/kg) が基となっている。しかし、これは 1kg の組織当たりに吸収されたエネルギーをあらゆる単位である。マウスの内部被ばく実験の場合には、外部被ばくと異なり、1kg に満たない体内 (25g ほど) に蓄積された放射性物質からの放射線の吸収線量を考えなければならない。しかし、直径数センチのマウスの体内からの γ 線は、ほとんどが突き抜けて体外へ出てしまっている。このような場合、kg オーダーの吸収線量である Gy での評価でよいのだろうか。この疑問については、ヒトでも同じように考えられる。器官の分布や大きさにちがいがあがる乳幼児と成人で同じように内部被ばく影響を Bq から Gy への換算計数で評価できるかを確認しなければならない。

ICRP (pub108) では、ラットについては、Bq から Gy への換算計数 (dose conversion factor) が示されているが、マウスについては示されていない。マウス実験で実際の内部被ばく線量がどれくらいであるかの評価を正しく行わなければ実験結果にも大きな影響が出る。

これまでに考えられる内部被ばく線量の評価法としては、物理的計算から行った線量、EGS5 コードシステムやPHITSコードシステムなどのようなモンテカルロ法を使った評価法などが考えられ、本研究において比較検討した (表III-8)。その結果、それぞれの算定結果は近い値であり、体重 24.8g で 93.54Bq/g の条件が続いたと仮定した場合、おおむね 1 世代 (平均 108 日間) の被ばく線量が 34.55~37.87mGy と算定され、ある程度の信頼性もあると考えられた。

また、研究分担者 (石原弘) により被ばく後の特異的反応生成物である白血球中の非コードRNA (CDKN1a) の測定による高感度評価法を確立することが出来た。今後、この評価法と上記の算定結果の相関性を検討したい。

放射線影響による生物反応を高感度かつ精密に定量することで線量依存性の反応が検出できるようになれば、実際の外部照射と内部被ばくによる生物反応量から、これまでの評価法が正しかったかどうかのバリデーションが可能となる。

3. 低線量被ばくによる影響の数理モデル構築

本研究データ (研究分担者データも含む) を利用した低線量被ばくによる影響の数理モデルを構築するために、前述の論理を基礎として研究協力者との論議を重ねた結果、物理学者と生物学者が双方で納得できるパラメータ設定のためには、図III-8 のようなシグモイドカーブのグラフの立ち上がり前のポイント (図III-8 の①より左側)、線量依存的に増加しているポイント、そして、横ばいになるポイント (図III-8 の②より右側) が得られるような線量、線量率の実験を組むことが不可欠であると考えられた。

これまで困難あるいは意味がないと考えられた測定点のデータを得るための研究プランは、結果に大きなインパクトはないが、新たな視点からの数理モデルを構築するためにも、本研究で確立した高感受性の検出方法を駆使した研究の継続が望まれる。

V. 結論

A/J マウスでは、ヒトの 100,000Bq/l に相当するセシウム水を飲み内部被ばくを 23 世代続けても対照群で自然に発生した塩基変異数とほとんど差はなく、偏った塩基変異の蓄積傾向は認められなかった。そして、1~18 世代の平均性比と平均産仔数にも影響はなかった。マウスとヒトの次世代での自然突然変異率がほぼ同じであることを考慮すると、少なくともこのレベルより少ないセシウム 137 の内部被ばくでは子孫への影響の憂慮はほとんどないと考えられ、安心の定量的根拠の一つとすることができる。

研究分担者（大野みずき）により、放射線に対して感受性が高いタイプのヒトを想定した、発がん、突然変異を起しやすい *Msh2* 欠損マウス個体でヒトの 2,500,000Bq/l に相当するセシウム 137 水摂取による内部被ばくで突然変異頻度が対照群に比して 1.6 倍増加、野生型群に対しては 20 倍も高感度に検出できた。しかし、この突然変異頻度は小腸に腫瘍を発生させる KBrO₃ 投与群と同レベルであったにもかかわらず、同等以上の放射線線量被ばく（4~6 Gy）でも小腸腫瘍は発生しなかった。本研究では、被ばくにより突然変異は上昇するものの発がんにつながらなかったことで化学発がんと放射線発がんの発生機序のちがいが示唆される結果となり、ヒトにおける放射線感受性の個体差や感受性評価法確立の難しさが示された。

また、研究分担者（石原弘）によって長期セシウム 137 水（100Bq/ml）を摂取した A/J マウスにおいて lncRNA(CDKN1a)の発現が線量依存的に反応することが確認でき、高感度バイオドジメーターとして利用できることが分かった。

VI. 次年度以降の計画

最終年度であるので、今後の展望等を記載する。

マラーによるショウジョウバエを使った 1927 年の研究報告は、人類に低線量放射線による次世代影響を危惧させることとなった。そして、1950 年代に入り、ビキニの核実験や原発推進などによる環境放射線の増加の予想と共に大衆被ばくにおける安全領域について考えられ始めた。しかしながら、危惧をはじめてから 90 年以上も経過した 2018 年においても、なお、これらの低線量放射線の安全領域については確固たる見解が得られていない。これまでも 1986 年のチェルノブイリ原発事故当時に喫緊の問題として安全領域について討議されたにもかかわらず、その 25 年後の 2011 年の福島原発事故でも、低線量影響について科学者の意見が二分してしまった。これらの原因は、低線量放射線の安心領域の存否についての研究が積極的になされてこなかったことにある。しかし、これにはいくつかの理由がある。

1. 低線量影響のデータを得るには大量のサンプルが必要である。
2. 研究費の獲得が難しい。

3. 実験の大変さの割には結果のインパクトが低く、科学者のモチベーションが低い。
4. これまでの疫学調査データでは、交絡因子の考慮や被ばく線量が明確でない。
5. ネガティブデータの証明は難しい。

また、低線量放射線影響の研究の中には世に出ず埋もれたデータも多くあることも予想される。なぜなら、残念なことであるが、科学論文の発表の場はポジティブデータ有意の世界であり、どんなに周到な計画で精密に行われた研究(特に動物実験の場合)でもネガティブデータの発表の場は非常に少なく、インパクトも低く扱われるからである。

しかし、低線量放射線影響に関しては、後世への遺産としてデータを得るという科学者のモチベーションを持ち、低線量領域でも高感度で定量的な評価ができる方法を開発し、リスク評価の根拠となる基礎データの集積をすることが必要と考えられる。

これらのことをすべて踏まえ、放射線健康管理・健康不安対策事業（放射線の健康影響に係る研究調査事業）として 3 年間の研究の機会を与えて戴けた環境省に対して深く感謝したい。

今後は、本研究で得られた成果を基に数理モデルの構築のためのパラメータとなるデータを得るとともに、新たに見えてきた、世代間で塩基変異を有意に増加させる線量の策定、突然変異率から比較した化学発がん和放射線発がんのちがい（突然変異率が同じでも放射線発がんは化学発がんと同じようには起こらない）、高感度検出系を用いた内部被ばくと外部被ばくの相同性の問題を解決する研究へと発展させたい。

低線量影響のさらなる定量的根拠を得るためにも新たな研究プロジェクトとして本研究内容を含んだプロジェクトの立ち上げを提案させて戴きたい。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

- 1) 本年度なし

B. 論文：査読なし

- 1) 本年度なし

C. 学内学会発表

- 1) 中島裕夫、大野みずき、石原弘、續輝久、藤堂 剛、セシウム 137 の低線量内部被ばくによる生物影響：野生型 A/J マウスを用いた生殖細胞突然変異解析の試み、環境変異原学会第 46 回大会、p26、2017.11.7-11.7, 東京
- 2) 大野みずき、鷹野典子、中津可道、石原弘、中島裕夫、續輝久、セシウム 137 の低線量内部被ばくによる生物影響：Msh2 欠損マウスを用いた体細胞突然変異解析の試み、環境変異原学会第 46 回大会、p27、2017.11.7-11.7, 東京

D. 国際学会発表

- 1) Hiroo Nakajima, Quantitative Assessment for the Effects of Chronic Low-dose Internal Cesium-137 Radiation Exposure on Genomic, Carcinogenic and Hereditary Effects in Mice, The 7th Yamada workshop on RI Science Evolution 2018 (RISE18), March 16-17, 2018 (Osaka, Japan)

E. 著書

- 1) 本年度なし

F. 講演

- 1) 本年度なし

G. 主催した研究集会

- 1) The 7th Yamada workshop on RI Science Evolution 2018 (RISE18), March 16-17, 2018 (Osaka, Japan), Executive Committee.
- 2) International Workshop on the Biological Effects of Radiation. –Bridging the gap between radiobiology and medical use of ionizing radiation-
- 3) March 19-21, 2018(Osaka Japan), Executive Committee.

H. 特許出願・取得

- 1) 本年度なし

I. その他

- 1) 本年度なし

VIII. 参考文献

(記載形式は、上記の「本研究に関する現在までの研究状況、業績の例」に従う)

- 1) Drost JB1, Lee WR. Biological basis of germline mutation: comparisons of spontaneous germline mutation rates among drosophila, mouse, and human. *Environ Mol Mutagen.* 1995; 25 Suppl 26:48-64.
- 2) Roach JC, Glusman G, Smit AFA, et al. Analysis of Genetic Inheritance in a Family Quartet by Whole-Genome Sequencing. *Science*, 2010; 328: 636-639.
- 3) Conrad DF, Keebler JE, DePristo MA, et al. Variation in genome-wide mutation rates within and between human families. *Nat Genet*, 2011; 43: 712-4.
- 4) Campbell CD, Chong JX, Malig M, et al. Estimating the human mutation rate using autozygosity in a founder population. *Nat Genet*, 2012; 44: 1277-81.
- 5) Kong A, Frigge ML, Masson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*, 2012; 488: 471-475.
- 6) Michaelson JJ, Shi Y, Gujral M, et al. Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation. *Cell*, 2012; 151: 1431-42.

- 7) Segurel L, Wyman MJ, Przeworski M. Determinants of mutation rate variation in the human germline. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2014; 15: 47-70.
- 8) Besenbacher S, Liu S, Izarzugaza JM, et al. Novel variation and de novo mutation rates in population-wide de novo assembled Danish trios. *Nat Commun*, 2015; 6: 5969.
- 9) Rahbari R, Wuster A, Lindsay SJ, et al. Timing, rates and spectra of human germline mutation. *Nat Genet*, 2016; 48: 126-133.
- 10) Wong WS, Solomon BD, Bodian DL, et al. New observations on maternal age effect on germline de novo mutations. *Nat Commun*, 2016; 7: 10486.
- 11) Jónsson H, Sulem P, Kehr B, et al. Parental influence on human germline de novo mutations in 1,548 trios from Iceland. *DNature*, 2017: 549-519.
- 12) Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, Ohno M, et al. Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice. *Genome Res*, 2015; 25: 1125-34.
- 13) Manabe Y, Wada T, Tsunoyama Y, et al. Whack-A-Mole Model: Towards a Unified Description of Biological Effects Caused by Radiation Exposure. *J. Phys. Soc. Jpn.* 2015; 84: 044002.
- 14) 真鍋勇一郎, 中村一成, 中島裕夫, 他. LNT再考 放射線の生体影響を考える. *日本原子力学会誌*. 2014; 56(11): 705-708.
- 15) Nakajima H, Yamaguchi Y, Yoshimura Y, Fukumoto M, Todo T, Fukushima simulation experiment: Assessing the effects of chronic low-dose internal ¹³⁷Cs radiation exposure on litter size, sex ratio, and biokinetics in mice. *J Radiat Res.*, 2015; 56: i29-i35, Special Issue-Fukushima.

Quantitative assessment for the effects of chronic low-dose internal
Cesium-137 radiation exposure on genomic, carcinogenic and hereditary
effects in mice.

Hiroo Nakajima

Department of Radiation Biology and Medical Genetics, Graduate School of Medicine
Osaka University

Abstract

Even 30 years after the Chernobyl catastrophe of 1986, people have been suffering from the concern that the southern districts of Belarus and Chernobyl are still highly radiocontaminated. Similarly, the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident, caused by the tsunami of the Great East Japan Earthquake of 2011, has led to environmental changes. It is predicted that radionuclides in the contaminated areas are taken into living organisms, and they irradiate organisms for long periods externally and internally. The health effects of radiation exposure, especially low dose and low dose-rates irradiation, on residents of contaminated areas, such as Chernobyl and Fukushima, have to be estimated based on the scientific data.

To investigate the genomic, carcinogenic and hereditary effects of chronic low dose-rate internal radiation exposure after the nuclear power plant accident, we are trying to develop new systems for quantitative assessment for the low-dose radiation effects.

Every generations of A/J and C57BL/6J mice were maintained in the radioisotope facility with free access to drinking water containing Cesium-137 (100 Bq/ml). And then, we performed all mouse genome sequences of the mouse (Origin, F20, F22, F23 of A/J male mice, and F0, F1, F2 of C57BL/6J male mice) to detect accumulated genomic mutations. Because small genomic mutations could occur, be inherited, and accumulate in each successive generation in non-coding genomic regions and have no effect on survival, we compared levels of accumulated base mutations between the offspring exposed to continuous low-dose radiation and control mice of the same generation that started from a littermate mouse.

There was a higher incidence of single-nucleotide variant (SNV) and insertion/deletion (InDel) per 3 billion bases at intron and intergenic sites than at exon sites in whole genome sequencing comparing each generation. However, even with repeated generations there was not a large difference in the total base mutation rate

between the Cesium-137 group and the control group.

If the amount of intake is converted to drinking water in humans, 100 Bq/ml ¹³⁷Cs water would equate to 100000 Bq/l. There was almost no effect on the mouse DNA even when the mice consumed water containing this volume of radiation for 23 continuous generations. Mice have almost the same spontaneous mutation rate per generation, base substitution rate per nucleotide per generation, and number of genes as humans. Therefore, this inbred mouse experiment is effective for removing confounding factors and for detecting fundamental biological effects.

Keywords

Low-dose radiation; Cesium-137; Internal exposure; Hereditary effects; Carcinogenesis; Fukushima nuclear power plant accident

2-4-a マウスを用いたセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくによる成体と 子孫への影響の定量的実験検証

Msh2 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん並びに継世代影響の解析

分担研究者：大野 みずき（九州大学・大学院医学研究院 生体制御学講座 基礎放射線医学
分野 助教）,

（H28 年度までの研究分担の代表者：續輝久（九州大学・大学院医学研究院 生体制御学講座
基礎放射線医学分野 教授））

研究要旨

低線量・低線量率放射線被ばくの影響を定量的・定性的に評価するための実験的検証を目的として、DNA 修復系遺伝子改変マウス個体を用いてセシウム 137 の内部被ばくにより誘発される体細胞突然変異を検出し、変異頻度や変異スペクトルの解析を行った。X線や γ 線等の低 LET 放射線^{注1)}による生物作用の多くは水の放射線分解に伴う活性酸素種による間接作用の寄与が大きいことから、セシウム 137 の慢性的内部被ばくの生体影響をゲノム変異の観点から解析するにあたり、酸化 DNA 損傷を含む種々の DNA 損傷に起因して発生する異なる種類の変異を網羅的に検出する必要がある。また、定量性がある情報量を効率的に得るために、本研究では酸化 DNA 損傷の修復にも関与するミスマッチ修復機構に必須の MSH2 タンパク質をコードする *Msh2* 遺伝子欠損マウスに体細胞変異検出用 *rpsL* レポーター遺伝子を導入した高感度変異検出用マウスを用いた。野生型並びに遺伝子改変マウスそれぞれに対して、4 週間のセシウム 137 または臭素酸カリウム（酸化剤）の飲水投与を行い、その後 2 週間の通常飼育の後、臓器をサンプリングした。内部被ばくの影響を直接受ける小腸組織を対象に変異解析を行った結果、高感度変異検出用マウスを用いることで、突然変異頻度の上昇を約 20 倍の高感度で検出できることがわかった。さらに変異スペクトルの詳細な解析により、高線量被ばく群では低線量被ばく群に比較して挿入・欠失変異の頻度が増加しており、線量依存的な放射線の影響が観察された。本実験系により生体内で発生した突然変異を高効率で定量性・定性性を持って検出することが可能であると考えられた。

キーワード

セシウム 137、内部被ばく、*Msh2* 欠損マウス、突然変異

注1) 低 LET 放射線 :

電離性放射線が物質中を通過する際、飛程の単位長さ当りに平均して失うエネルギーを線エネルギー付与 (LET : Linear Energy Transfer) といい、放射線の種類 (線質) の違いを現す指標としても用いられる。LET が低い放射線を低 LET 放射線という。例としては X 線、ガンマ線、ベータ線等がある。また高 LET 放射線の例としてはアルファ線、中性子線、粒子線等がある。

研究協力者

山内 一己 ((公財) 環境科学技術研究所 研究員)

研究参加者

中津 可道 (九州大学 准教授)

續 輝久 (福岡歯科大学 客員教授) (H29 年度)

I. 研究目的

ヒトを含む放射線の生物影響のうち、発がんや遺伝性影響 (継世代影響) は放射線防護の視点から閾値が無い確率的影響に分類されているが、低線量・低線量率の放射線被ばくによる生物影響については、様々な生体内での反応機構を踏まえた科学的議論が必要であり、そのための実証研究が不可欠である。X線や γ 線等の低 LET 放射線による生物作用の多くは水の放射線分解に伴う活性酸素種によるものの寄与が大きいと考えられることから、セシウム 137 の慢性的内部被ばくの生体影響をゲノム変異の観点から解析するにあたり、酸化 DNA 損傷を含む種々の DNA 損傷に起因して発生する異なる種類の変異を網羅的に検出する必要がある。

これまでに我々は大腸菌の *rpsL* 遺伝子を含むシャトルベクター^{注2)} を遺伝子導入したマウスを利用して、マウス体内で起こった稀な体細胞変異を効率的に検出し、変異頻度と変異スペクトルの効率的解析法を確立している。また、独自に樹立した DNA 修復系に関連する種々の遺伝子改変マウスを用いて、自然並びに様々な環境ストレスによって生じる酸化 DNA 損傷が、がんを引き起こす原因になることを世界に先駆けて明らかにしてきた^{1 2 3 4 5 6}。一般に「がん」は体細胞に生じた突然変異が原因で細胞増殖の制御機構が破綻し増殖を繰り返す状態であることから、体細胞突然変異頻度の上昇は発がんへの指標となる。ミスマッチ修復に関する *Msh2/MSH2* 遺伝子はヒトの遺伝性非ポリポーシス大腸がんの原因遺伝子の一つで、この遺伝子のホモ欠損マウスは生後 6 ヶ月程度で消化管がんを自然発症する。また酸化剤投与により短期間で消化管がんの発生頻度を顕著に増加させることができる。さ

らに酸化剤投与による腫瘍発生の前段階では消化管細胞の核ゲノム中での突然変異頻度が上昇することを明らかにしており²⁾、酸化ストレスが DNA 損傷を誘発し、体細胞突然変異頻度を上昇させ、結果として発がん頻度の上昇につながることを示した。同様の実験系を利用することで、セシウム 137 の継続的取り込みによる内部被ばくの生体影響を、突然変異と発がんに注目して、個体レベルで解析することできるのではないかと考えた。

そこで本研究では、*Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて、主任研究者の中島（大阪大学）、分担研究者の石原（放射線医学総合研究所）と共同して、それぞれの R I 施設においてセシウム 137 の投与および放射線照射実験を行った。放射線医学総合研究所にて発がん（平成 27 年度～平成 29 年度）への影響を解析することを試みた。九州大学では、各 RI 実験施設に提供するための遺伝子改変マウスの作出、維持、繁殖（平成 27 年度～平成 29 年度）、および体細胞突然変異解析を担当した（平成 28 年度～平成 29 年度）。また、被ばくマウスのデータと比較するための対照実験として、同じ遺伝子改変マウスに酸化剤を経口投与し、小腸組織での変異解析を行った（平成 28 年度～平成 29 年度）。

注 2) ベクターとは組換え DNA 実験の際に細胞または核内に外来の DNA を運び込む役割をするもの。シャトルベクターとは単一のベクターで 2 種類以上の生物系で複製が可能なベクターのこと。

II. 研究方法

1. 研究の役割分担と年度の研究計画概要

大阪大学、九州大学、放医研それぞれの機関における施設の条件、確立している技術の特徴を生かして連携を密にして最も効率よく速やかに研究が遂行できる体制を整え、セシウム 137 に対する慢性的低線量内部被ばく影響を調べるための実験を計画した。以下に各機関における研究の役割分担と年度計画の概要を示す（図 II-1）。

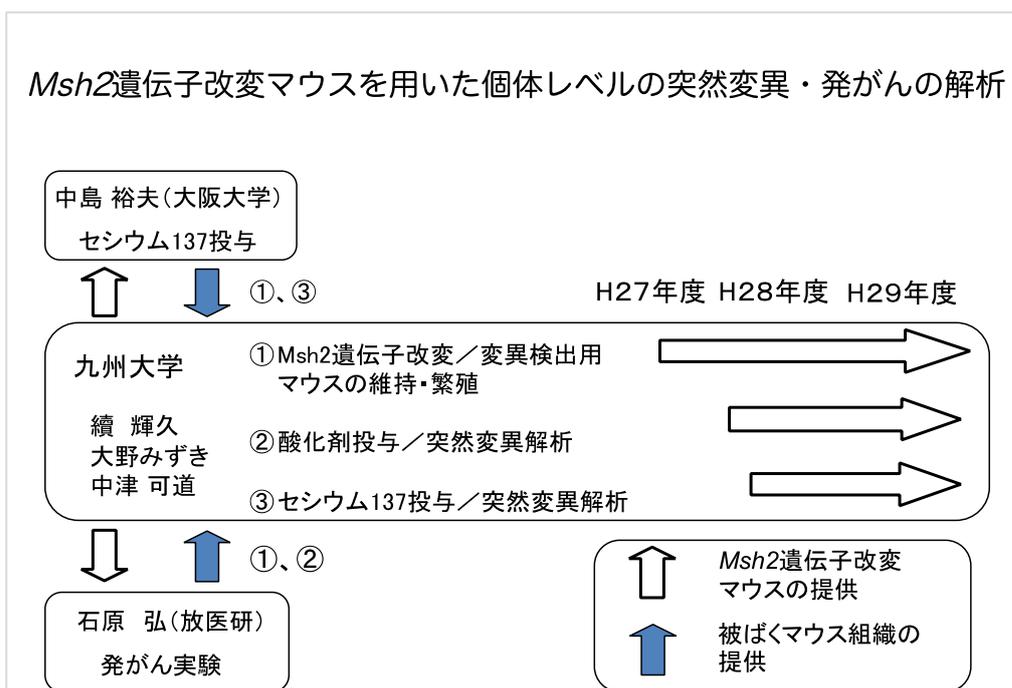


図 II-2 各機関における研究の役割分担と年度計画の概要（分担）

九州大学の動物実験施設で既に樹立して系統維持している *Msh2* 遺伝子改変マウスと大腸菌の *rpsL* 遺伝子を含むシャトルベクターを遺伝子導入した変異解析用マウスを交配し、*rpsL* シャトルベクターを有し、*Msh2* 遺伝子欠損アレルをホモで持つ高感度変異検出用マウス (*Msh2*^{-/-}, *rpsL*-Tg⁺)、および、野生型マウス (*Msh2*^{+/+}, *rpsL*-Tg⁺) を交配により同時期に複数匹作出するための交配計画をたて目的のマウスの作出を行った（図 II-2 参照）。

Msh2 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がん及び突然変異の解析
 —— マウスの準備、交配計画 ——

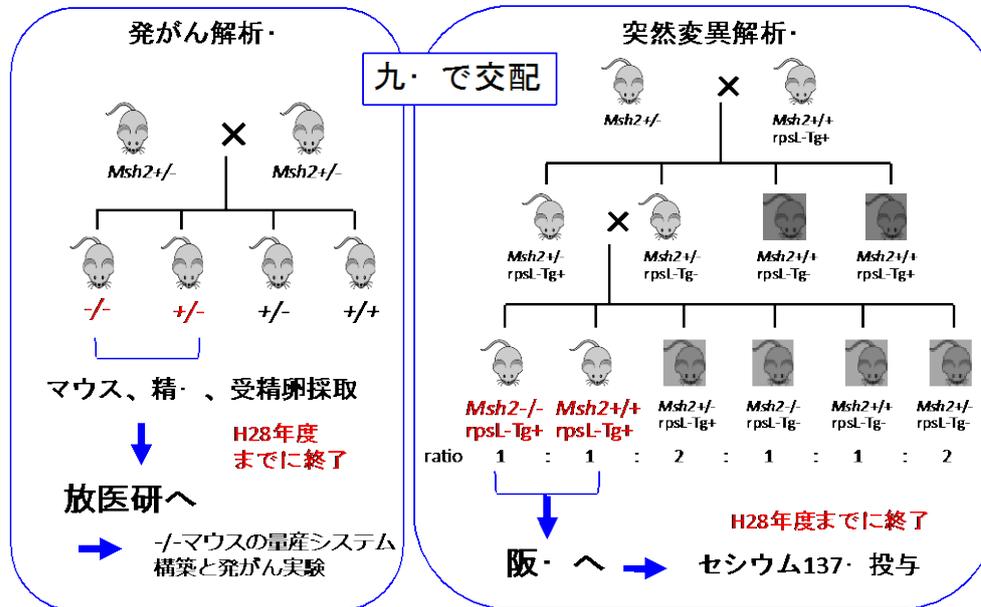


図 II-2 高感度変異検出用マウスの交配の概要

生後 3 週齢の時点で遺伝子型を決定し、離乳後生後 4 週齢で移送し、大阪大学の RI 実験施設においてセシウム 137 の経口投与を行った。

投与実験が終了した時点で全てのマウスを解剖し、臓器を摘出し凍結後、九州大学に返送してもらった (H28 年度)。九州大学では、同様の遺伝子型マウスを使用して、セシウム投与と同じタイムコースで対照実験としての酸化剤投与を行い、同様に臓器を摘出して保存した (H28-29 年度)。それらの臓器を用いて体細胞変異解析を行った (H28-29 年度)。

放射線医学総合研究所にて発がん実験用に *Msh2* 遺伝子改変マウスの人工授精による効率的生産ライン立ち上げを計画し、そのために必要な遺伝子型のマウスを九州大学で交配により作出し精子及び卵子を提供した (H27 年度)。

2. セシウム 137 及び臭素酸カリウム (酸化剤) の投与実験

Msh2 $-/-$, *rpsL-Tg+* マウス及び *Msh2* $+/+$, *rpsL-Tg+* はそれぞれ以下の 4 つの実験群に分けて処置を行った

- A 群： コントロール (自由飲水、通常飼育)
- B 群： 0.15% 臭素酸カリウム (酸化剤) 投与群 (自由飲水)

C 群： 2.5KBq/ml セシウム 137 投与群（自由飲水）

D 群： 初日に 4KBq/g 体重を強制飲水 2.5KBq/ml セシウム 137 投与群（自由飲水）、
（推定積算線量は C 群の約 2 倍）

投与実験のプロトコール概要を図 II-3 に示す。

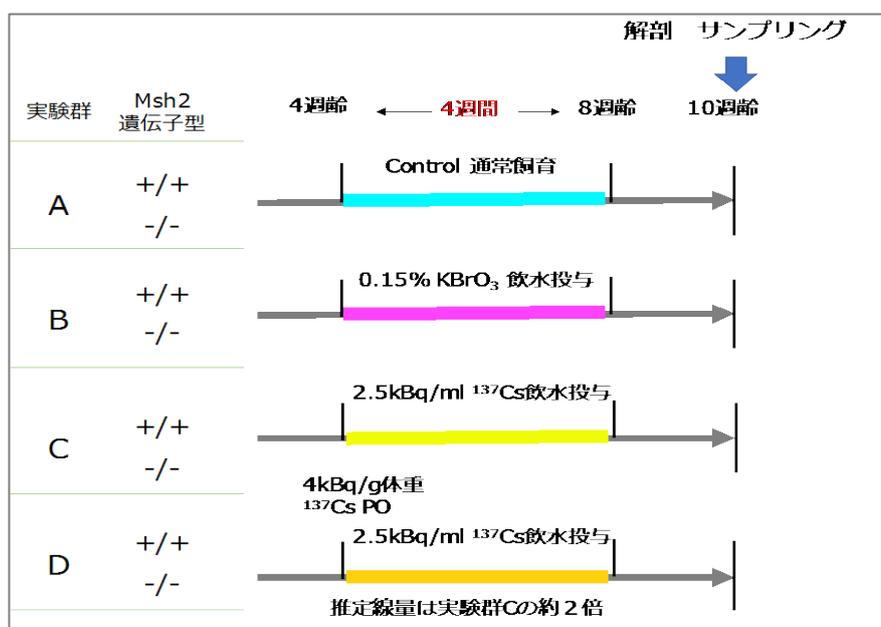


図 II-3 各実験群での投与プロトコール

マウスは生後 4 週齢から各群それぞれの試薬の投与を開始し 4 週間連続投与した。全実験群で投与期間中に死亡したマウスはいなかった。その後 2 週間、水に変更した通常飼育期間の後、全てのマウスを解剖し、臓器を摘出し、凍結保存した。

3. 高感度体細胞変異検出用マウスを用いた突然変異解析

今回使用した野生型及び *Msh2*^{-/-} マウスには、変異検出用シャトルベクター（大腸菌由来 *rpsL* 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を含む）がゲノム中に組み込まれている。単一ベクターは約 3 kb でタンデムに約 100 コピー連結した状態で導入されている。この DNA 領域をマウスゲノム DNA から切り出して回収し、マウス体内で *rpsL* 遺伝子上に生じた変異を、大腸菌プレート上でストレプトマイシン耐性の表現型を指標にして検出する。カナマイシンとストレプトマイシンは抗生物質であり、それらに対する耐性遺伝子を獲得した大腸菌カナマイシン、ストレプトマイシン含有培地で増殖することが可能となる。

本方法は変異頻度の算出だけでなく、塩基配列を解析することで変異部位での変化（スペクトラム）を同定できる優れた実験系である。大腸菌 *rpsL* 遺伝子を利用した突然変異解析の概要と詳細な方法については以下の文献⁷³を参照。

凍結保存した臓器約 10mg からゲノム DNA を抽出し、制限酵素 *Ban II* で処理した後、3Kb 付近の DNA をさらに選択的に抽出し精製し、酵素処理により *rpsL* 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を含むベクター領域の DNA を環状化する。精製し、濃度を調整した *rpsL* プラスミドベクターを用いて、大腸菌 DH10B β (NEB) にエレクトロポレーション^{注3)}により導入した。形質転換された大腸菌をカナマイシン含有 LB プレート^{注4)}、及びカナマイシンとストレプトマイシン含有 LB プレートに撒き 28°C で 40 時間培養した。大腸菌 DH10B β はカナマイシン感受性、ストレプトマイシン耐性の性質を持つ。野生型 *rpsL* 遺伝子を含むプラスミドが導入されるとカナマイシン耐性、ストレプトマイシン感受性を示す。一方 *rpsL* 遺伝子の機能欠失型変異を持つプラスミドが導入されるとカナマイシン耐性、ストレプトマイシン耐性を示す。したがって、変異頻度についてカナマイシン/ストレプトマイシン耐性コロニー数をカナマイシン耐性コロニーで除した値として算出される。

実際には全てのカナマイシン/ストレプトマイシン耐性コロニーを新たにプレーティングし、単一コロニーを分離、特定領域を PCR で増幅し、ゲル電気泳動パターンの確認及びシーケンスまで確認した上で、変異頻度の算出用データとして使用した。

注3) 電気パルスで細胞膜に孔をあけ物質を導入する手法。

注4) LB 培地と寒天を混ぜてシャーレに流し固めたもの。LB 培地は大腸菌の培養などに使用される富栄養培地の1種。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトの個人情報、サンプルなどを研究対象とていない。

九州大学における遺伝子組換え実験、動物実験に関しては、所定の手続きを行い機関の承認を得て実施した。

III. 研究結果

1. セシウム 137 の内部被ばくによる消化管組織での体細胞突然変異の解析

Msh2^{-/-}, *rpsL*-Tg⁺ マウス及び *Msh2*^{+/+}, *rpsL*-Tg⁺ はそれぞれ 4 群に分け、4 週間の投与処理を行い、その後同じ週齢時点で解剖し、凍結保存した臓器サンプルを用いて変異解析を行った。セシウム 137 を可溶性水溶液の状態での飲水させた場合、消化管（主に小腸）からそのほとんどが吸収され、その後、迅速に血中に移行し全身に分布すると考えられる（ICRP publication30）。そこで、セシウム 137 経口摂取による内部被ばくの影響を直接受ける小腸組織を用いてゲノム DNA を抽出し変異解析に用いた。

今回解析に使用した各実験群のマウスの匹数と個体あたりの平均変異頻度を表 III-1 に示す。また各実験群における平均変異頻度と SD をグラフにプロットした（図 III-1）。*Msh2* 欠損マウスでは通常飼育コントロール群（A 群）でも野生型マウスの 22.6 倍高い変異頻度を示した。0.15%臭素酸カリウム（酸化剤）の飲水投与（B 群）は、両遺伝子型マウスにおいて A 群の同遺伝子型マウスに比較して 2 倍近く変異頻度を上昇させた。一方 2.5kBq/ml セシウム 137 を 4 週間自由飲水により投与した C 群では、*Msh2* 欠損マウスでは A 群とほぼ同等の変異頻度を示し、野生型マウスでは上昇傾向は見られたものの個体差の範囲内であった。また初日に 4KBq/g 体重のセシウム 137 を強制飲水させた後に 2.5kBq/ml を自由飲水により投与した D 群（推定積算線量は C 群の約 2 倍）の変異頻度は、A 群に比較して野生型マウスでは約 2.6 倍に、*Msh2* 欠損マウス D 群では約 1.4 倍に上昇していた。また、C 群に比較して、野生型マウスでは約 1.8 倍に、*Msh2* 欠損マウス D 群では約 1.4 倍に上昇していたことから、セシウム 137 の内部被ばく量による変異頻度の変化が検出されていると考えられた。*Msh2* 欠損マウス D 群の変異頻度は 0.15%臭素酸カリウム投与群（B 群）とほぼ同程度の値まで上昇していた。

実験群	Msh2遺伝子型	マウス匹数	平均変異頻度 ($\times 10^{-5}$)	SD ($\times 10^{-5}$)
A	+/+	4	1.41	0.71
	-/-	3	31.83	7.00
B	+/+	4	2.65	0.74
	-/-	3	58.27	19.39
C	+/+	4	3.61	1.89
	-/-	4	32.82	5.11
D	+/+	1	6.62	-
	-/-	1	45.80	-

表 III-1 変異解析の結果 (平均変異頻度) ($\times 10^{-5}$)

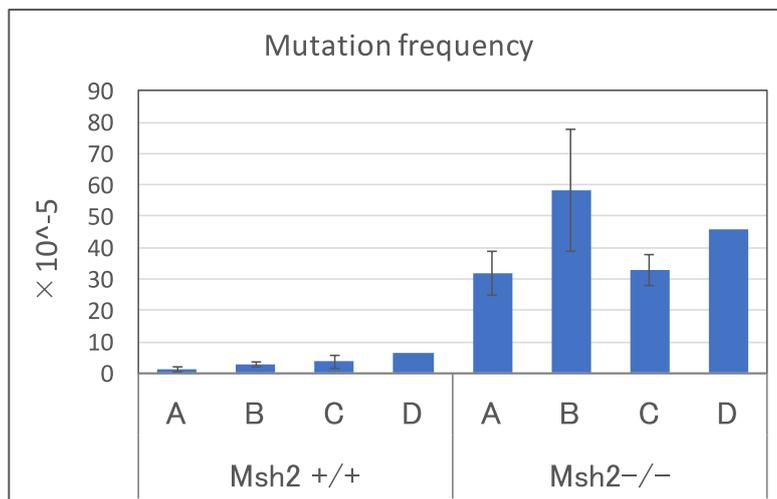


図 III-1 各実験群における平均変異頻度

- A 群： コントロール (自由飲水、通常飼育)
- B 群： 0.15%臭素酸カリウム (酸化剤) 投与群 (自由飲水)
- C 群： 2.5KBq/ml セシウム 137 投与群 (自由飲水)
- D 群： 初日に 4KBq/g 体重を強制飲水 2.5KBq/ml セシウム 137 投与群 (自由飲水)、
(推定積算線量は C 群の約 2 倍)

次に変異スペクトルの解析を行った。検出されたすべての変異について、塩基置換の種類、挿入/欠失のサイズなどを解析し、各実験群におけるスペクトル別の変異頻度 (10^{-5}) を算出した。結果を表 III-2 に示す。

通常飼育の状態での *Msh2* 欠損マウスの自然突然変異は、1-2 塩基の挿入/欠失が変異の大半を占めていた。特に *rpsL* 遺伝子に存在する数箇所の A-run 配列 (アデニン塩基が 4

から 6 塩基連続した部位) で高頻度に生じていた。これは、ミスマッチ修復機構を欠損する細胞の特徴であると考えられ、臭素酸カリウム投与サンプル、セシウム 137 投与サンプルでも同様の特徴を示した。*Msh2* 欠損マウスで、A 群と比較した際の B 群、D 群における変異頻度の上昇は主に A-run 配列での欠失の増加であった。野生型マウスでもセシウム 137 投与時に欠失の頻度が上昇していたが、これは A-run 配列ではなかった。D 群の挿入／欠失の頻度は C 群に比較して、野生型マウスで約 1.9 倍、*Msh2* 欠損マウスで約 1.4 倍に上昇していたことから、セシウム 137 投与による誘発変異が検出されていると考えられた。

塩基置換の種類は、*Msh2* 欠損マウスでは G:C から A:T へのトランジションがどの実験群でも全塩基置換の 70%以上を占めていた。野生型マウスでは塩基置換の種類に特に大きな偏りは見られなかったが、検出された変異の総数が少ないため特徴抽出はできない。D 群の塩基置換頻度は C 群に比較して、野生型マウス、*Msh2* 欠損マウス共に約 1.4 倍に上昇していたことから、セシウム 137 投与による誘発変異が検出されていると考えられた。

表 III-2 スペクトル別変異頻度 (10⁻⁵)

Exp. Group	Msh2 +/+				Msh2 -/-			
	A	B	C	D	A	B	C	D
Transition								
G:C→A:T	0.23	0.56	0.23		3.03	2.41	1.19	3.27
A:T→G:C		0.16		0.95	0.45	1.48	1.19	1.31
Transversion								
G:C→T:A	0.08	0.24	0.23		0.22	0.19	0.30	
G:C→C:G					0.22		0.30	
A:T→T:A	0.08		0.23		0.11		0.30	
A:T→C:G					0.67			
Frameshift								
1bp deletion	0.39	0.88	0.90	2.84	0.56	1.30	1.79	3.27
1bp deletion (A run)			0.45		21.07	46.76	23.27	31.40
1bp addition		0.08			0.11		0.30	
1bp addition (A run)					3.59	4.45	2.39	3.27
>2bps	0.63	0.72	1.58	2.84	1.34	1.48	1.79	3.27
>2bps (A run)					0.45			
Total	1.41	2.65	3.61	6.62	31.83	58.27	32.82	45.80

表 III-3 変異タイプ別頻度 (10⁻⁵)

Exp. Group	Msh2 +/+				Msh2 -/-			
	A	B	C	D	A	B	C	D
base substitution	0.39	0.97	0.68	0.95	4.71	4.08	3.28	4.58
deletion	1.02	1.61	2.93	5.68	23.43	23.43	26.85	37.95
insertion		0.08			3.7	3.7	2.69	3.27

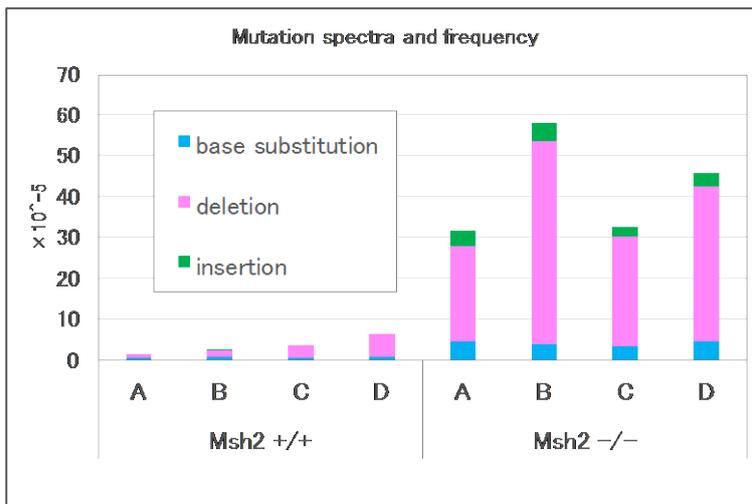


図 III-2 各変異タイプの割合

IV. 考察

今回用いた変異解析システムでは、*Msh2* 欠損マウスでは野生型マウスに比較して、通常飼育の状態で約 20 倍高い変異頻度を示した。対照実験としての臭素酸カリウム投与群では明らかな変異頻度の上昇が観察された。一方セシウム 137 投与群では、高線量被ばく群でコントロールに比較して変異頻度が 1.4 倍に上昇していたが、低線量被ばく群ではコントロール群と同程度であった。高線量被ばく群では低線量被ばく群と比較して野生型マウスでは約 1.8 倍に、*Msh2* 欠損マウス D 群では約 1.4 倍に上昇していたことから、線量による変異頻度の変化が検出されていると考えられた。今回行われた実験での高線量被ばく群は、ヒトの 2.35MBq/Kg に相当する被ばく線量と推定される。野生型マウスでは被ばくの影響が変異頻度のごくわずかな変化としてしか捉えられないが、*Msh2* 欠損マウスでは効率的に検出することが可能であると考えられた。

変異スペクトルの詳細な解析により、高線量被ばく群では低線量被ばく群に比較して挿入・欠失変異の頻度が増加しており、線量依存的な放射線の影響が観察された。臭素酸カリウムやセシウム 137 投与により、挿入/欠失変異の原因となる DNA 損傷または複製エラーが頻発するが、野生型マウスでは、細胞が複製する際にミスマッチ修復因子が正常に働くことにより、変異の原因が修復され、突然変異頻度が非常に低く抑えていると考えられた。*Msh2* 欠損マウスではミスマッチ修復機構が働かず、誘発された変異の原因が修復されずに残存するため、複製が進んだ場合、結果として変異が固定され、頻度の上昇につながると考えられる。野生型マウスはそもそも自然突然変異頻度が非常に低く、その頻度は実験的検出限界に近い値であるため、誘発突然変異頻度との差を検証する際に個体差・実験誤差が結果に大きく影響する。野生型マウス単独で変異原性を評価を行う際には数多くの個体を用いる必要があり、より多くのコストと時間を必要とする。従って変異を高感度に検出

できる *Msh2* 欠損マウスを併用することで突然変異誘発能が未知の物質の生体影響評価にも有効であると考えられた。

これまでの我々の研究で、B 群と同様の濃度の臭素酸カリウムの投与を 16 週間継続すると *Msh2* 欠損マウスの全個体で、小腸に複数の腫瘍が発生することを明らかにしている⁶。このことから、突然変異頻度が B 群とほぼ同程度まで上昇したセシウム 137 投与の D 群処理をさらに 16 週間までに延長した場合の *Msh2* 欠損マウスでの小腸の腫瘍発生頻度が上昇するかどうかを検証する必要がある。そこで共同研究者の石原（放射線医学総合研究所）は、*Msh2* 欠損マウス小腸に総吸収線量 4 から 64 グレイとなるように断続的に被ばく（体重 1 Kg あたり 425kBq から 136MBq のセシウム 137 を 16 週間体内に保持し続けた際のベータ線による吸収線量に相当）させたが腫瘍の発生は認められなかった。この結果は化学発がんや放射線発がんの発生機序のちがいはたは、同様の被ばく線量であっても内部被ばくと外部被ばくの違いである可能性も示唆された。このことは、生体における被ばくの影響を評価することの難しさを示唆しており、ヒトにおける放射線感受性の個体差や生体影響の評価のために、今後さらなる基礎的研究が必要であると考えられた。

V. 結論

セシウム 137 内部被ばくの生体影響を小腸の組織に発生する体細胞突然変異を指標にして解析することを試みた結果、*rpsL* 遺伝子をレポーターとした変異解析法がマウス個体レベルでのセシウム 137 内部被ばくにより誘発される体細胞突然変異の検出に有効であり、*Msh2* 欠損マウスを用いることで、高感度に検出可能であることが示された。本実験系を利用することで生体内で発生した突然変異を効率的に、定量性・定性性を持って検出することが可能であると考えられた。一方で、被ばく後の特定の時期における被ばく組織中の突然変異頻度の上昇とその後の発がん頻度との関連性や、化学発がんや放射線によるがんの発生機序の違いなどを含め、放射線の内部被ばくの生体影響を個体レベルで理解する必要が示され、今後もそのための基礎研究が重要であると考えられた。

VI. 次年度以降の計画

rpsL 遺伝子をレポーターとした変異解析法がマウス個体レベルでのセシウム 137 内部被ばくにより誘発される体細胞突然変異の検出に有効であることが分かったので、今後はさらに小腸以外の組織での変異頻度を解析し、セシウム 137 の臓器別影響を明らかにしたいと考えている。セシウムはカリウムと類似の化学的性質を持つことから、体内ではカリウム量の多い筋組織での蓄積が予測されるが、一方で、小腸から吸収され体液中に移行したセシウムは比較的速やかに尿中に排出されることも知られている。したがって肝臓や腎臓に対する影響も懸念される。一般に自然突然変異の発生率と発がん率は細胞増殖が盛んな組織で高いのだが、セシウム 137 を慢性的に経口摂取した場合の臓器別の誘発変異の頻度

は、外部被ばくの実験からは予測が困難であり、実験的な検証が不可欠である。

また今後、化学発がん和放射線発がんの違いについて、誘発ゲノム変異の観点からさらに解析を進め、特にゲノムワイドな変異解析や誘発変異の特徴解析、種々のゲノムデータとの関連解析を行うことで、それぞれの機構について明らかにしていきたいと考えている。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

国内学会発表

- 1) ○大野みずき、鷹野典子、中津可道、石原弘、中島裕夫、續輝久、“セシウム 137 の低線量内部被ばくによる生物影響：Msh2 欠損マウスを用いた体細胞突然変異解析の試み”、環境変異原学会第 46 回大会、2017 月 11 月、東京
- 2) ○中島裕夫、大野みずき、石原弘、續輝久、藤堂 剛、“セシウム 137 の低線量内部被ばくによる生物影響：野生型 A/J マウスを用いた生殖細胞突然変異解析の試み”、環境変異原学会第 46 回大会、2017 月 11 月、東京

VIII. 参考文献

- 1) Tsuzuki, T. *et al.* Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11456-11461, doi:10.1073/pnas.191086798 (2001).
- 2) Tsuzuki, T., Egashira, A. & Kura, S. Analysis of MTH1 gene function in mice with targeted mutagenesis. *Mutat Res* **477**, 71-78 (2001).
- 3) Egashira, A. *et al.* Mutational specificity of mice defective in the MTH1 and/or the MSH2 genes. *DNA Repair (Amst)* **1**, 881-893 (2002).
- 4) Sakamoto, K. *et al.* MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress induced intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* **67**, 6599-6604, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4802 (2007).
- 5) Isoda, T. *et al.* Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice. *Int J Biol Sci* **10**, 940-947, doi:10.7150/ijbs.9241 (2014).
- 6) Piao, J., Nakatsu, Y., Ohno, M., Taguchi, K. & Tsuzuki, T. Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis. *Int J Biol Sci* **10**, 73-79, doi:10.7150/ijbs.5750 (2013).
- 7) Gondo, Y., Shioyama, Y., Nakao, K. & Katsuki, M. A novel positive detection system of in vivo mutations in rpsL (strA) transgenic mice. *Mutat Res* **360**, 1-14 (1996).

Biological effects of chronic internal exposure to low-dose ^{137}Cs : Analysis of somatic mutations using *Msh2*-deficient mice

Mizuki Ohno and Teruhisa Tsuzuki*

Department of Medical Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medical Science, Kyushu University, (*current affiliation: Advanced Science Research Center, Fukuoka Dental College)

Abstract

To investigate the biological effects of chronic internal exposure to low-dose ^{137}Cs , we attempted to assess ^{137}Cs induced-somatic mutations by using a highly sensitive mutation detection system. Since majority of the biological effects due to low LET radiation, such as X-ray and γ -ray, are largely influenced by the indirect effects due to reactive oxygen species accompanying radiolysis of water, the biological effect of radiation exposure was examined from the viewpoint of genome mutation, it is necessary to comprehensively and quantitatively detect different kinds of mutations that occur due to various DNA damage including oxidized DNA damage. For this purpose, *Msh2* gene knockout mice harboring the *rpsL* reporter genes in their genome were utilized. *Msh2* gene encodes MSH2 protein that is essential for mismatch DNA repair, therefore *Msh2* gene knockout mice become mismatch repair deficient. Each of wild-type mice and *Msh2*-deficient mice were divided into four experimental groups as follows, unexposed control, potassium bromate (oxidant) exposure, ^{137}Cs exposure (low dose), ^{137}Cs exposure (high dose). Mice in each group were treated with corresponding reagent for 4 weeks and normal water following two weeks, then were sacrificed at endpoint. As a result of mutation analysis on small intestine which directly affected by ^{137}Cs internal exposure, it was found that by using the *Msh2*-deficient mice with *rpsL* reporter genes, the induced mutation frequency can be detected with a high sensitivity of about 20 times of wild-type mice. Further analysis of the mutation spectrum revealed that the frequency of insertion/deletion mutations increased in the ^{137}Cs high dose exposed group compared to the low dose exposed group, and dose-dependent radiation effects were observed. In conclusion, it is possible to detect mutations generated in vivo induced by ^{137}Cs internal exposure by this experimental system with high efficiency with quantitative and qualitative properties.

Keywords

Low-dose radiation, Cesium-137, Internal exposure, *Msh2*-deficient mice, Mutation frequency

2-4-b マウスを用いたセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくによる成体と 子孫への影響の定量的実験検証

Msh2 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証

分担研究者：石原 弘（国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線治療障害研究部 体内除染研究チーム チームリーダー）

研究要旨

放射性セシウムによる内部被ばくのような、低線量率で長期間にわたる被ばくの影響を通常の動物実験で識別することは容易ではない。放射性セシウム内部被ばくによる低線量率連続被ばくによる生体影響を定量化するために、我々は二種類の異なる新規生物学的指標を検証した。第一の指標は、九州大学で樹立された *Msh2* 遺伝子欠損マウスにおける小腸粘膜腫瘍の発生率である。このマウスに遺伝毒性のある過酸化物質である臭素酸を長期間経口投与すると小腸粘膜腫瘍を頻発することが示されている。本研究計画では、臭素酸と放射線被ばくの量的相関を解析するために、九州大学から *Msh2* 遺伝子欠損マウスを放医研に移入し、衛生基準を満たした *in vitro* 生産系を確立し、種々の線量で放射線照射した。第二の指標はマウス白血球細胞において DNA 損傷に応答して増加する長鎖非コード(lnc)RNA である。本研究計画ではマイクロアレイ分析により低線量被ばくに比例して増加する lncRNA を多数同定した。その中から、複数のマウス系統において、最良の線量依存増加の直線性を示す二種類の lncRNA 種を選択した。そして、 γ 線単回被ばく- γ 線連続被ばく- ^{137}Cs による β 線連続被ばく-臭素酸連続暴露における細胞への影響を精密定量 PCR 分析により比較解析した。さらに大阪大学で放射性セシウムを 12 月以上摂取したマウスの白血球中の lncRNA が有意に増加することを見出した。本研究により、当該 lncRNA が放射線による生体影響の高感度なバイオドジメトリー定量指標として様々なマウス実験モデルに適用できることが示された。

キーワード

放射性セシウム、内部被ばく、*Msh2* 遺伝子欠損マウス、lncRNA、バイオドジメトリー

研究協力者

研究協力者 1（所属 役職）鬼頭靖司（量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 技術安全部 生物研究推進課、客員研究員）

研究協力者 2（所属 役職）福津久美子（量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 計測・線量評価部 生物線量評価チーム、主幹研究員）

研究参加者

研究参加者 1 (所属 役職) 田中 泉 (量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部 体内除染研究チーム 研究員)

研究参加者 2 (所属 役職)

I. 研究目的

東電 F1 事故により膨大な量の放射性セシウムが周辺環境に放出され、飲食物等を介した内部被ばくを引き起こした。発災直後から導入された暫定規制とその実態調査結果、翌年度から適用された放射性物質の基準の適用により、一般公衆の放射性セシウムの内部被ばくによる確率的影響の有意な変動を予測する科学的根拠は乏しいにもかかわらず、漫然とした不安は全国に残った。また、半減期 30 年の放射性セシウム 137 は今後も長年にわたり周辺地域に残存することが予想され、社会的不安の要因となっている。我々は放射線影響研究者としてその不安の軽減に寄与する研究の遂行を目指した。

現行の安全基準は、第一に放射線影響に関する疫学研究や実験研究結果に基づいて国際的な放射線防護体系分野で合意された linear no-threshold(LNT)仮説[解説: 如何なる低線量であっても被ばく線量と人体への影響は比例する、という考え方。]、第二に疫学研究から推論された有意差の消失する追加線量限度であり、将来の最適化を目指すものである。それに対する不安のひとつに、放射性セシウムによる長期間の内部被ばくによる蓄積線量が高線量に至らない場合、その影響が LNT 仮説と線量限度の予測範囲に適合するののかという疑問がある。短期間または長期間におけるグレイオーダーの高線量被ばくの場合、動物や細胞を使用した過去の生物学的実験研究結果は LNT 仮説を支持している。ところが、低線量率で長期間にわたる低線量被ばくの影響については定量的な実験研究が不足しており、更なる実証的研究の追加が求められている。

本研究では二種類の異なる被ばく指標を使用して、低線量率被ばく影響を定量的に解析することを目的とした。まず第一の指標として、分担研究者の大野および續(九州大学)の樹立したミスマッチ修復に関わる Msh2 遺伝子のホモ欠損マウスに注目した。このマウスは過酸化剤である臭素酸カリウムの経口投与により小腸粘膜腫瘍を頻発することが報告されている。このことから、小腸粘膜腫瘍の発生頻度を指標として被ばく線量との相関を示すことができるのではないかと考えた。放射線医学総合研究所に整備された複数の外部・内部被ばく実験施設を用いて被ばく影響を解析するために、九州大学から Msh2 欠損マウスの胚を搬入して *in vitro* 生産して発がん実験を行った(平成 27~29 年度)。また第二の指標として、白血球細胞における放射線応答 RNA 群に注目した。ゲノム DNA に損傷を受けた白血球の増殖抑制やアポトーシス[解説: 細胞の死の一形態。致命的損傷を受けた細胞が能動的に自壊する機構。細胞自殺機構とも呼ばれる]に関連する多数の蛋白をコードする

mRNA が放射線被ばく後に発現誘導されることは古くから知られるが、多種多様なカスケード反応[解説: 細胞内で発生したある一つの生化学的反応が引き金となって別の生化学反応を引き起こすことが連鎖すること。この連鎖反応とそれを正負に制御する反応により生体は機能する。]が引き続いて発生するため、低線量被ばくなどの長期間の指標としての利用は容易でない。しかし、細胞には蛋白をコードしないサイレントな long non-coding (lnc) RNA が多数含まれることが近年明らかにされつつあり、こうした lncRNA の中に低線量被ばくの指標となる分子種が含まれているのではないかと考えた。そこで低線量被ばくさせたマウス血液の発現マイクロアレイ分析[解説: ポリマー製のマイクロ基板上に約 58,000 アドレスを割当て、それぞれのアドレスには約 50 塩基の RNA 分子が結合させたものがマイクロアレイ。マウス細胞で発現する mRNA や lncRNA 分子の塩基配列データベースに基づいて、主要な約 58,000 種類の RNA にそれぞれのアドレスを割当、それぞれの RNA に特有の塩基配列を持つ約 50 塩基の RNA 分子を結合されたものが発現マイクロアレイである。細胞の中には遺伝子発現により数千~数万種類の RNA が存在しており、その全体像を半定量的に把握するために発現マイクロアレイが使用される。具体的には、任意の細胞から RNA を調製して発現マイクロアレイと反応させる。約 58,000 アドレスのうち、試料中に存在する RNA のみが存在量にある程度比例して結合する。アドレス結合を同定することにより、任意の細胞の中に存在する RNA の種類と量を推定することができる。]により低線量被ばくで増加する lncRNA 種を同定し、これを定量指標として種々の条件で被ばくさせたマウスのバイオドジメトリー解析を行った(平成 27~28 年度)。そして、主任研究者の中島(大阪大学)は放射性セシウムを長期間投与することで極低線量率で長期間連続内部被ばくさせたマウスを本研究に使用しているので、その血液を放医研の RI 施設に輸送して RNA バイオドジメトリーに解析した(平成 29 年度)。

II. 研究方法

本研究では二種類の異なる放射線影響の定量指標として、1. Msh2 マウスの小腸粘膜腫瘍発生頻度、および 2. マウス血液の低線量放射線被ばく誘導性 lncRNA を利用したバイオドジメトリー技術の開発を平行して行った。

1. Msh2 遺伝子欠損マウスの小腸発がんモデルによる解析(平成 27～29 年度)
本課題は図 II-1 に示す年次計画に基づいて研究を進めた。

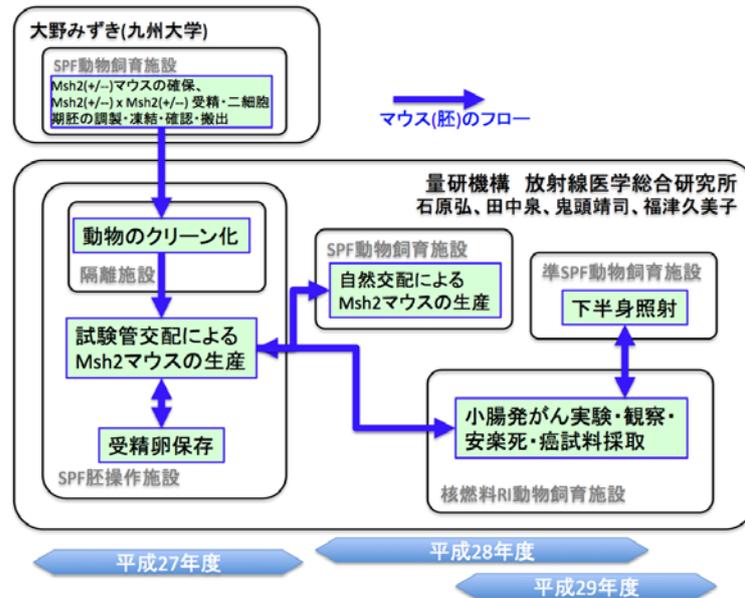


図 II-1 Msh2 遺伝子欠損マウスの放医研への導入から発がん実験までの年次計画

① Msh2 遺伝子欠損マウスの導入: 胚保存・清浄化・人工授精生産系の確立(平成 27 年度):
放射線医学総合研究所の動物飼育施設は、放射線影響の長期観察が可能のように、独自の
実験動物衛生基準を設定しているため、所外からの導入のためには二細胞期の凍結受精卵
を搬入し、代理母マウスの子宮に移植して胎仔を成長させ、帝王切開で無菌的に誕生させ、
清浄継母マウスに授乳させて成熟個体とするという一連の操作の後に、病原体のないこと
を確認する必要がある。その上で、Msh2 遺伝子欠損マウスの雌から卵、雄から精子を分離
して *in vitro* で受精および培養して二細胞期受精卵をプールするとともにその一部は次の
サイクルの生殖細胞採取のための生産に使用した。プール受精卵は適宜代理母に移植して
Msh2 欠損マウスを生産させて発がん実験に使用した。

② Msh2 遺伝子ホモ欠損マウスを用いた小腸発がん実験(平成 28～29 年度)
上記①で得られた Msh2 ホモ欠損マウスを使用して小腸発がん実験を図 II-2 に示すスケ
ジュールで行った。各群の正対照として、大野らの発がん条件である 0.15%(8.9mM)または
0.20%(12mM)臭素酸カリウムを飲水として、離乳直後の 4 週令から 16 週間マウスに摂取
させた。至適放射線線量域の探索は、我々が既に確立している麻酔下での下半身全体の X

線照射条件を採用した(1, 2)。小腸粘膜組織に軽微な影響が現れる被ばく線量は 8Gy 以上であるが、8Gy を全身照射すると骨髄の造血系が死滅してマウス個体は死亡してしまう。しかし、下半身照射法であれば肋骨造血組織は温存されるので、1 週間以内に造血組織は回復する。したがって、2 週間ごとに反復して照射することにより、小腸吸収線量を拡大することができる。多くの放射線発がんモデルでは、軽度な急性組織障害の発生する線量で放射線誘発腫瘍が頻発するので、1 回 8Gy を標準とした。この方法では照射後 10 日程度で小腸粘膜組織は回復するので(3)、2 週間に 1 回の照射を繰り返して蓄積線量を高めた。また、1 回の被ばくでは小腸粘膜障害の観察されない 4Gy、または造血系すら損傷を受けない 0.5Gy の下半身照射を、毎週行った群も設定した。

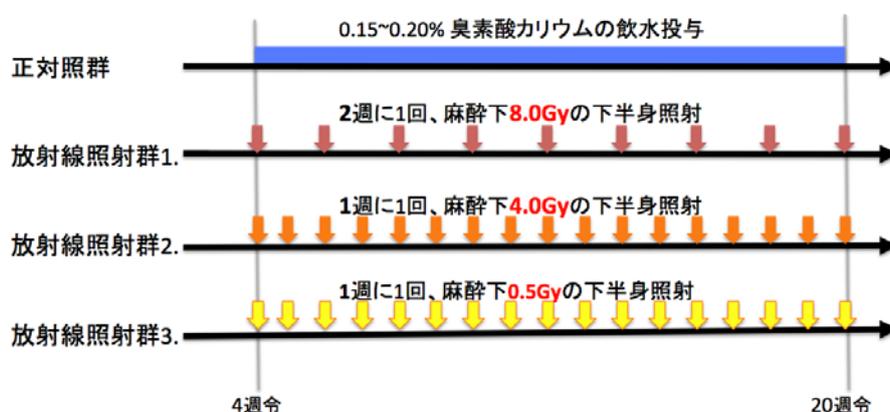


図 II-2 Msh2 ホモ欠損マウスを用いた発がん実験

2. 血液 RNA を指標としたバイオドジメトリー技術の開発(平成 27~29 年度) 未分化増殖細胞では、放射線被ばく後 4~8 時間にかけて、細胞の増殖停止に係る蛋白やアポトーシス過程のトリガリング[解説: 一連のカスケード反応の端緒となる生体反応。]に関わる蛋白の mRNA が誘導される。マウスを全身照射すると、白血球細胞内の CDKN1A や Bbc3, Bax などの DNA 損傷誘導性(DDI)-mRNA が放射線吸収線量に比例して増加することを我々は見出したが、マウス個体から採取した白血球は概日リズム影響が大きくバイオドジメトリー指標にはそのままでは使えなかった(4)。その後、白血球細胞のうち Myc mRNA を発現している増殖期細胞が上記 DDI mRNA を発現することを見出し、DDI-mRNA/Myc mRNA 比が概日リズム影響を相殺したバイオドジメトリー指標になることを見出した(5, 6)。これらのうち、CDKN1A/Myc mRNA 比は検出感度が高く、20mGy 程度の被ばくで有意な増加を示すことが分かったが、CDKN1A mRNA の発現による細胞の状況変化が CDKN1A mRNA 発現にも影響するため、低線量率における連続被ばくなどの分析には限界があった。近年、蛋白をコードする mRNA 以外にも細胞には多種多様な lncRNA が mRNA と同様な制御で発現誘導を受けることが明らかになってきた。そこで、低線量被ばくにより循環白血球中で増加する RNA 種を発現マイクロアレイで網羅的に検

索し(平成 27 年度)、極微量精密定量 PCR 技術を用いて検証することで、Psrcend lncRNA が良好なバイオドジメトリーであることを明らかにするとともに、前記の Msh2 マウスやその基盤系統である C57BL6 マウスで分析を進めた(平成 28 年度)。そして、主任研究者の中島(大阪大学)の採血した放射性セシウム長期摂取 A/J マウスの lncRNA の定量分析を行った(平成 29 年度) (図 II-3)。

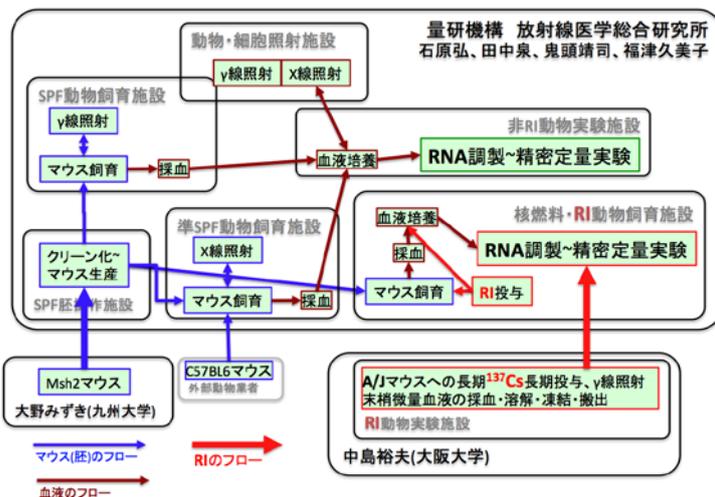


図 II-3 RNA バイオドジメトリー研究における動物・血液・RI 汚染試料等のフロー図

① 低線量放射線被ばくにより増加する lncRNA の探索(平成 27 年度) Msh2 マウスの基盤系統である野生型 C57BL6 マウスを使用して 100mGy および 200mGy の全身照射 6 時間後に採血し、白血球 RNA を調製して発現マイクロアレイ分析を行った。線量依存性に増加する RNA リストについて精密定量 PCR で検証し、放射線特異性の高い 2 種類の lncRNA として 34Ae と Psrce を絞り込んだ。これらが蛋白をコードする mRNA でないことは、その構造解析およびフィードバック発現阻害のないことで確認した。

② 低線量放射線応答性 lncRNA のバイオドジメトリー指標としての検証(平成 28 年度) 放射線照射後のマウス白血球におけるこれらの DDI-lncRNA の発現様式から、被ばく初期のピーク RNA レベルを 8 時間までの連続被ばく指標として、その後の RNA ベースレベル上昇を数日以上連続被ばく指標として利用可能であることが分かった。前者についてはマウス個体分析のみならず、マウスから採取した血液の ex vivo 照射モデルにより、線量率効果や、 γ 線外部被ばく線量と内部被ばく放射性セシウム量、臭素酸カリウム量の相関を分析した。

③ 極低線量率による長期間連続被ばくモデルにおける lncRNA 発現量の分析(平成 29 年度) 主任研究者の中島(大阪大学)が本研究で使用している放射性セシウムを長期間摂取した A/J マウスの血液の RNA 分析を行った。大阪大学の RI 施設内で採血した 137Cs 汚染マウス血液を溶解・凍結・密封した後に、専門業者に委託して放医研の核燃料 RI 施設内に輸送し、RNA 調製から精密定量は放医研の核燃料 RI 施設内で実施した。

(倫理面への配慮)

本研究では遺伝子組換え動物を使用しているのでカルタヘナ法にしたがって実施した。また、当所の動物倫理規程に従って動物操作や照射・投与・採血などは人道的に行った。さらに放射線照射、放射性物質の取扱いは放射線障害防止法ならびに電離則に従い、化学物質等は毒物劇物取締法や消防法などの関連法規を遵守することで実験作業者の労働安全衛生の確保に努めた。本研究の遂行にあたり問題等は発生しなかった。なお、これらは何れも事前に当所の所掌委員会への申請・教育訓練の受講を経た上で実験計画の承認を受けている。

III. 研究結果

1. Msh2 遺伝子欠損マウスの小腸発がんモデルによる解析

平成 29 年度から開始した九州大学から放医研への二細胞期胚の搬入からクリーン化、in vitro 生産までの一連の過程は問題無く進めることができた。具体的には 100 個の二細胞期胚の解凍後には 94 卵が生存していたので、生存卵を代理母の子宮に移植した。胎仔として成長し、帝王切開後も生存していた新生仔は 36 個体であった。新生仔を里親飼育で成長させた結果、18 個体の成体を得ることができた。その後 Msh2 ホモ欠損マウスとヘテロ欠損

マウスに野生型マウスを自然交配と *in vitro* 交配させて Msh2 欠損マウス個体数を増やし、二細胞期受精卵をプールした。平成 28 年度から 29 年度にかけて自然交配および人工授精により二細胞期受精卵の調製を繰り返し、適宜、凍結胚を移植して多数のマウスを生産して Msh2 ホモ欠損マウスは発がん実験に使用した。

C57BL6 マウスは胸腺腫瘍多発系統であるため約 3 割の Msh2 ホモ欠損マウスが 20 週令到達前に死亡した。臭素酸カリウムを投与して 20 週令以上生存したマウスは空腸粘膜部分に多数の腫瘍が認められた。非投与・非照射マウスからは小腸粘膜腫瘍は見られなかった。臭素酸も照射もしない対照マウスで小腸腫瘍は見られなかった。放射線照射マウスの小腸吸収線量の積算値は 4Gy から 64Gy までの広範囲であったが、臭素酸カリウム投与マウスに比べて小腸粘膜組織の状態は健常であり、小腸粘膜腫瘍を発生したマウスは結局得られなかった(表 III-1)。当初は長期被ばく影響の定量指標とする予定であった小腸粘膜腫瘍であるが、20 週を超えて生存した被ばくマウスが 14 匹の時点で腫瘍が得られなかったことから、放射線発がん実験モデルとしては何らかの変更が必要であることが示唆された。

表 III-1 Msh2 ホモ欠損マウスの発がん実験結果

処理条件	使用匹数	20 週到達匹数 と線量範囲	小腸腫瘍陽性 匹数
非照射・非投与	8	6	0
臭素酸カリウム投与	12	7	6
8Gy 隔週照射	9	4 (72~88Gy)	0
4Gy 毎週照射	16	7 (68~72Gy)	0
0.5Gy 毎週照射	7	3 (4Gy)	0

2. 血液 RNA を指標としたバイオドジメトリー技術の開発

100mGy および 200mGy の X 線を全身照射した野生型 C57BL6 の循環血液白血球の発現マイクロアレイ分析を行ったところ、放射線線量に依存して増減する RNA が多数同定されたが、これ自体は目新しいことではない。我々の目的は低線量被ばくで増加する機能しない lncRNA であり、広く知られている DDI mRNA 種は対象から除却した。絞り込んだ RNA セットは適宜、PCR プライマーを合成して低線量照射マウス白血球の RNA プールを鋳型として定量 RT-PCR により増幅様式や増幅率、値の偏差を測定して比較したところ、最終的に PrimiR34a RNA および Psrc1 が選択された。PrimiR34a はマイクロ RNA である miR34a の約 5000 塩基の初期転写物とされている。しかし、その発現量は通常の mRNA の 1/10 以下であり、極微量 RNA の解析技術がないと分析は困難である。我々は長年来 RNA の極微量分析を行ってきたので分析対象とした。PrimiR34a は DDI-lncRNA として miR34a の放射線応答機構についても提唱されてきたが、実際に放射線被ばくで増加する RNA 分子種の構造を解析すると、PrimiR34a の 3'末端に相当するごく短い断片であり、

miR34a を生産することのできないものであることが分かった。そこで我々はこの断片を 34ae としてバイオドジメトリー指標の候補とした。一方、PsrcI は酵素遺伝子として知られるが、放射線で実際に発現増加する RNA を解析すると、3'末端の非コード領域に相当する短い断片のみが増加していることが分かった。これも Psrcce としてバイオドジメトリー候補として分析に使用することとした。

野生型 C57BL6 を 200mGy で 1 回全身照射した後の循環血液白血球における 34ae/Myc RNA 比および Psrcce/Myc RNA 比を図 III-1 に示す。両者とも照射後 4-8 時間にかけて値が著しく増加した後に漸減する。34ae/Myc 比は照射後 1 週間でベースレベル付近に低下するが、Psrcce/Myc 値はなかなか復帰しない。このことから、両者のピークレベル増加は約 8 時間までの連続照射の分析には使用できることが示唆された。また、それ以上の長期被ばく影響を解析するためには、Psrcce/Myc の late phase 定量が有効であることが示唆された。

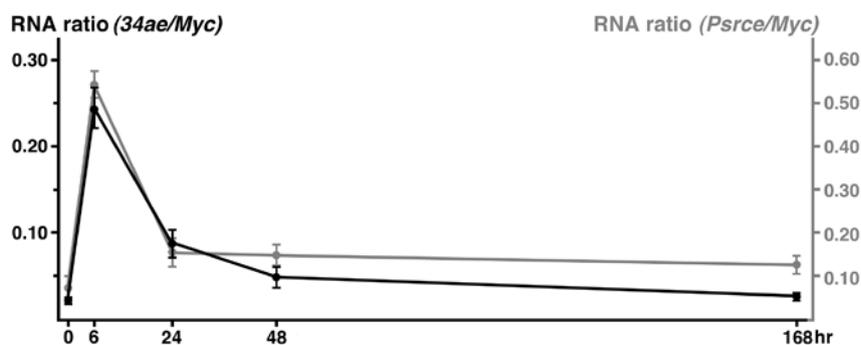


図 III-1 200mGy の X 線全身照射した野生型 C57BL6 の循環白血球における 34ae/Myc(黒) および Psrcce/Myc (灰色)の RNA 比の経時変化。

図 III-2 には、50~200mGy を 1 回照射した C57BL6 の 6 時間後の循環白血球中の 34ae/Myc 値を示す。非照射におけるベースレベル変動が少ないので 10mGy 程度の被ばくでも定量することができることが示された。我々は既に 10mGy 程度の被ばくにより白血球 CDKN1A/Myc 比が有意に増加することを報告している(5, 6)が、CDKN1A よりも 34ae の方が偏差が少なく、連続被ばくにも利用できることが示唆された。

8 時間までの連続照射影響を精細に分析するために、C57BL6 から採取した血液を試験管内で 37 度に保温して、様々な線量率で ex vivo 照射した(図 III-3)。血液は凝血だけを阻害して培地や緩衝液などで処理することなく、そのまま 37 度で保温することで、体内循環を模した状態を分析できる。総吸収線量が 30mGy となるように、線量率を毎分 200mGy(照射時間 9 秒)から毎分 0.0625mGy(照射時間 8 時間)で γ 線を連続照射して、照射から 8 時間後に RNA を回収分析した。34ae/Myc RNA への被ばく応答は毎分 10mGy(照射時間 3 分)にかけて急激に低下するが毎分 2mGy(照射時間 15 分)より線量率が下がると応答性低下は緩やかになる。こうした線量率効果は古くから知られているが、本モデルを使用することにより精細な解析が可能であることが示された。

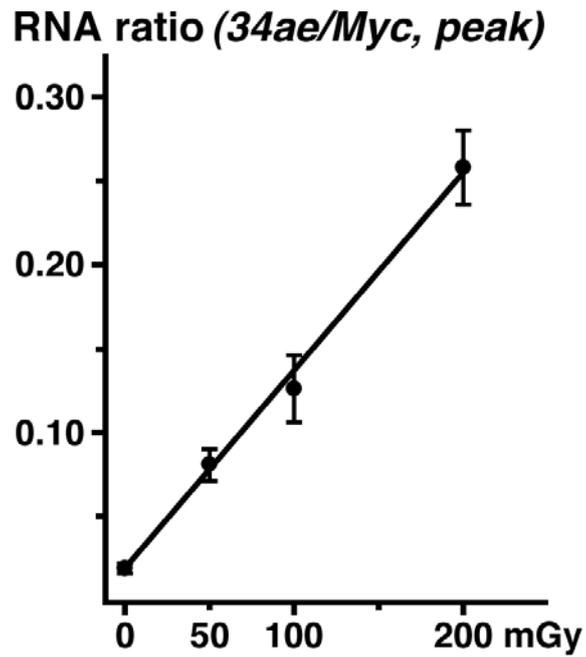


図 III-2. バイオドジメトリック指標 34ae/Myc RNA 比の線量依存性。C57BL6 の全身照射後 6 時間後に採取した循環白血球を分析した。

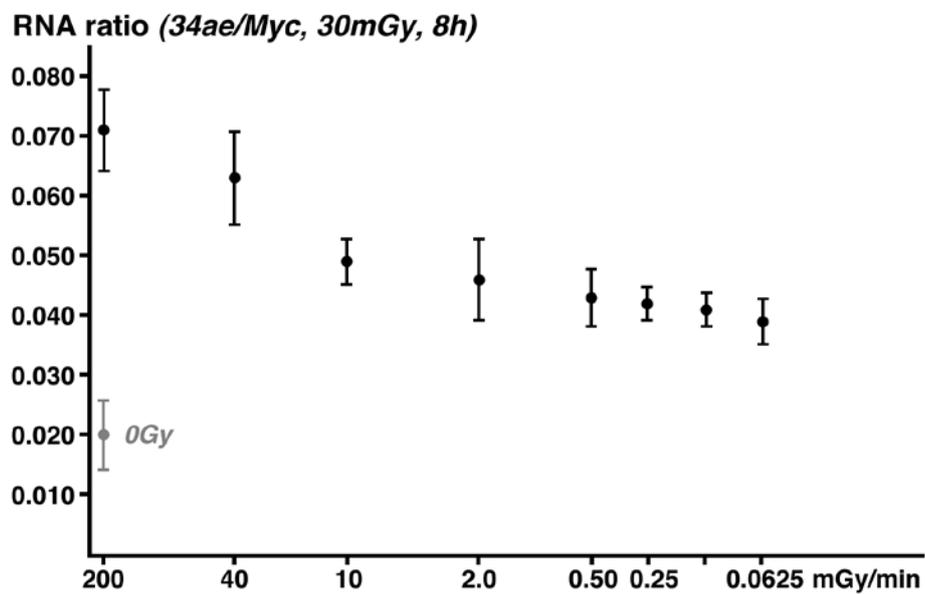


図 III-3. 34ae/Myc RNA 値で示される線量率効果。C57BL6 の血液を試験管内で 37 度に保温しつつ様々な線量率で総線量が 30mGy となるように ex vivo 照射した。照射開始から 8 時間後に RNA を調製して分析した。

この *ex vivo* 血液照射モデルを使用して、 γ 線連続照射線量と放射性セシウム量の相関を求めた。試験管内で血液を保温しながら 8 時間 γ 線を連続照射したことによる 34ae/Myc 比は、 ^{137}Cs を血液 1 グラムあたり 73kBq および 146kBq 投入して 8 時間保温する条件に匹敵することが分かった(図 III-4)。 γ 線量 30mGy の 8 時間連続照射では、定量下限なので誤差が大きく、現在のところ決定的なことは判断できないが、さらに条件を変えた定量実験を進めることで、 ^{137}Cs のベクレル数と吸収線量に関するデータの得られることが期待される。また、上述の Msh2 ホモ欠損マウスの小腸腫瘍を誘発する臭素酸カリウムの影響を検証した。臭素酸カリウムは活性酸素として核酸に酸化損傷を与えるとされている。臭素酸を血液に 1mM となるように投入したときの 34ae/Myc RNA 比は ^{137}Cs を 244kBq/g となるように投与した時の応答に匹敵した。Msh2 欠損マウスに経口投与する臭素酸カリウムは 9~12mM であることを考えると著しい影響に見える。ただし、臭素酸は血液と多様な生化学反応を引き起こす可能性もあるので、この 34ae/Myc の誘導は、過酸化作用だけではないかもしれない。

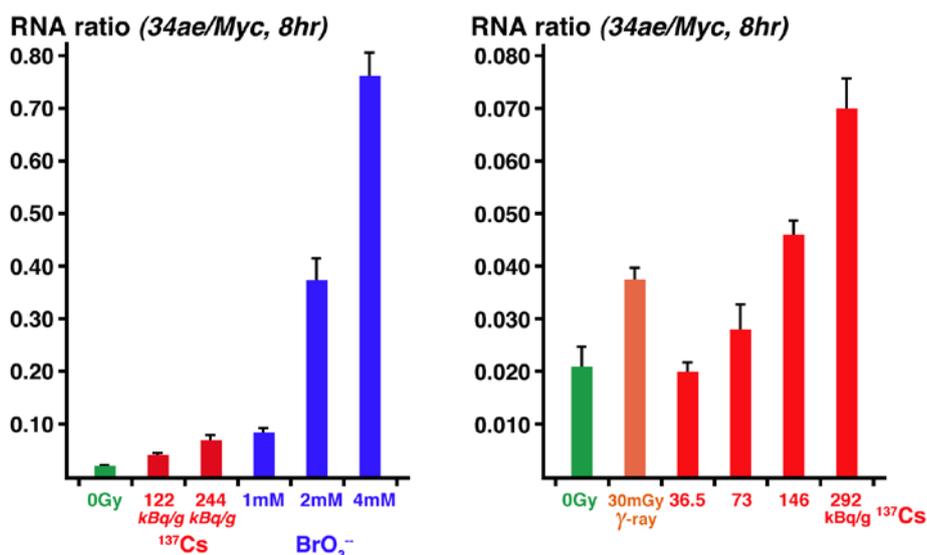


図 III-4 試験管内で保温した血液を γ 線 8 時間連続照射、放射性セシウムと 8 時間培養、または、臭素酸カリウムと 8 時間培養し、RNA を調製・分析した。

本研究課題では、長期に渡って放射性セシウムを摂取することによる影響を定量的に示すことが求められている。主任研究者の中島らは経世代影響研究のために大阪大学で長期間放射性セシウムを摂取させたマウスを飼育している。これは極低線量被ばくモデルであり、上記の Psrce/Myc RNA 比の late phase であれば分析できる可能性はあった。しかし、1 年を超える連続被ばくの影響が現時点での RNA 分析で測定できるのであれば意義は大きい。大阪大学 RI 施設において当該マウスの採血と溶解・凍結保存後、放医研の RI 施設に移送して RNA 分析を行った。図 III-5 は放射性セシウム摂取マウス群と、非摂取マウスで有意差の有無を検証した結果である。摂取から 1 年を超えたあたりで摂取群と非摂取群で

有意差のあることが判明した。

このデータを回帰分析したところ、非投与群の白血球中における $Psrce/Mye$ 比は月齢とともに増加することが分かった(図III-6、右)。このことは $Psrce$ は加齢とともに、白血球集団で蓄積していることが分かる。一方、セシウム摂取群では $Psrce/Mye$ 比はそれ以上の速度で増加していることが分かった(図III-6、左)。このことから、両者の相違が測定可能になる時期は現在のセシウム投与量の場合、1年程度を要することが分かった。

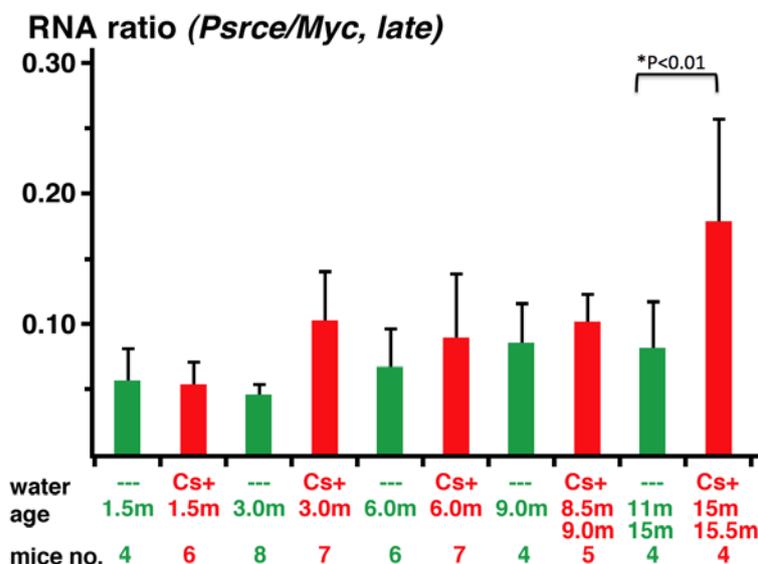


図 III-5 放射性セシウムを離乳後以降連続して飲水摂取したマウス(赤)と同等月齢の対照マウス(緑)群の白血球における $Psrce/Mye$ RNA 比。one-way ANOVA および LDS 法で有意差を検証した。

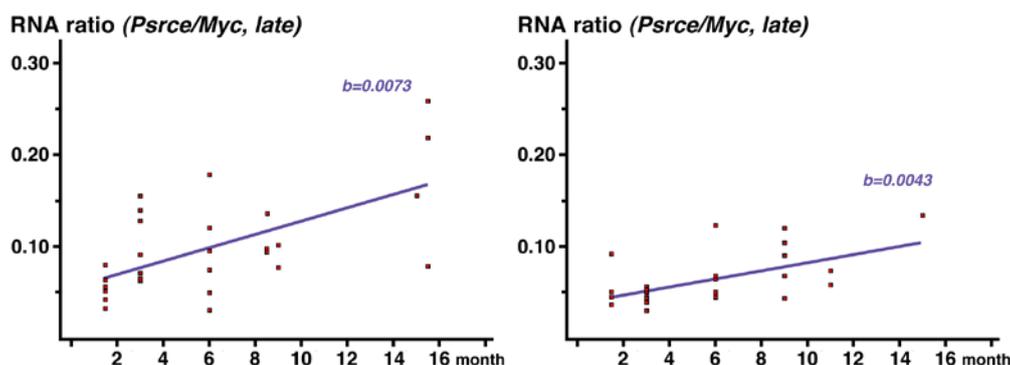


図 III-6 放射性セシウム摂取群(左)と非摂取群(右)における、月齢による $Psrce/Mye$ の散布図。

IV. 考察

本研究では放射性セシウムなどによる極低線量率による長期被ばく影響を定量的に示すことを目的として、**Msh2** ホモ欠損マウスにおける小腸腫瘍を指標とした研究と、白血球中の **RNA** を指標とした研究を同時に進めた。前者については、単なる放射線照射実験では小腸腫瘍を容易に発生させることの出来ないことが示唆された。消化管からの過酸化物質摂取は主に胃から十二指腸、上部回腸に酸化損傷や消化器粘膜環境のかく乱を引き起こすことが予想される。そのため、**Msh2** ホモ欠損マウスの放射線影響は、発がんのような高度生命現象よりもゲノムの軽微損傷と修復機構研究の方が容易であることが推定される。今回の研究計画では放射線影響の定量指標とすることはできなかったが、**Msh2** 変異マウスの受精卵は凍結し、その生産系は放医研で確保しているので、様々な放射線影響研究に使用するための環境は整備された。

本研究予算により、低線量放射線で誘導される **lncRNA** 群に関する知見が蓄積し、少なくともその一部は **RNA** バイオドジメトリーに活用できることが示された。これらの **RNA** については発現亢進により生体影響を示すことを示唆する科学的根拠がなく、むしろ細胞にとって役に立たない **RNA** 分子種がゴミのように細胞質に滞留していることを暗示している。生物学的影響がなくとも、これを利用して、放射線影響のみならず、加齢や化学物質影響など、遺伝毒性の程度を定量的に測定するための有用な技術として発展させることが可能かもしれない。

低線量率連続被ばくの際の線量率効果は情報が不足している。現時点では 8 時間までの連続被ばくと、1 年間の連続被ばくについてデータが得られたが、その中間過程である数日間から数ヶ月間の被ばくモデルの構築が今後の課題であり、放射線影響の理解を進めて既存の線量評価モデルの正当性を確固たるものとするためにも、本研究をさらに進める必要があると考えている。

V. 結論

放医研で **Msh2** 欠損マウスの人工授精生産系を確立し、同利用施設として今後の多様な放射線研究に貢献できるものと考えられる。また、白血球中の **lnc RNA** を指標としたバイオドジメトリー定量技術が大きく進展した。本技術は放射線影響研究のみならず、多様な実験研究で遺伝毒性を定量的にモニターするアイテムとしての活用も考えられる。

VI. 次年度以降の計画

この三ヶ年の研究により、当チームにおけるバイオドジメトリー研究や内部被ばく影響研究知見や実験技術が大きく進展した。この 3 年間の予算的補助に深く感謝するだけでなく、この研究をさらに発展させたいと考えている。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

国内学会発表

- 1) ○大野みずき、鷹野典子、中津可道、石原弘、中島裕夫、續輝久、“セシウム 137 の低線量内部被ばくによる生物影響：Msh2 欠損マウスを用いた体細胞突然変異解析の試み”、環境変異原学会第 46 回大会、2017 月 11 月、東京
- 2) ○中島裕夫、大野みずき、石原弘、續輝久、藤堂 剛、“セシウム 137 の低線量内部被ばくによる生物影響：野生型 A/J マウスを用いた生殖細胞突然変異解析の試み”、環境変異原学会第 46 回大会、2017 月 11 月、東京

VIII. 参考文献

(記載形式は、上記の「本研究に関する現在までの研究状況、業績の例」に従う)

- 1) Ishihara H, Tanaka I, Yakumaru H et al. Acceleration of Regeneration of Mucosa in Small Intestine Damaged by Ionizing Radiation Using Anabolic Steroids. *Radiat Res* 175:367-74 (2011).
- 2) Ishihara H, Tanaka I, Yakumaru H et al. Pharmaceutical Drugs Supporting Regeneration of Small Intestinal Mucosa Severely Damaged by Ionizing Radiation in Mouse. *J Radiat Res* 54:1057-64 (2013).
- 3) 石原弘. 放射線障害から小腸粘膜は回復できるか、分子消化器病 10: 51 -55 (2013).
- 4) Ishihara H, Tanaka I, Yakumaru H et al. Circadian transitions in radiation dose-dependent augmentation of mRNA levels for DNA damage-induced genes elicited by accurate real-time RT-PCR quantification. *J Radiat Res* 51:265-75. (2010).
- 5) Ishihara H, Tanaka I, Yakumaru H et al. Quantification of damage due to low-dose radiation exposure in mice: Construction and application of a biodosimetric model using mRNA indicators in circulating white bloodcells. *J Radiat Res* 57: 25-34 (2016).
- 6) 石原弘. <総説>低線量被ばくによる生体影響を利用したバイオドジメトリー. 放射線生物研究 51:241-254 (2016).

Studies to validate accumulated internal irradiation dose that increases the tumor incidence in Msh2 gene-deficient mouse.

Hiroshi Ishihara,

Internal Decorporation Research Team, Department of Basic Medical Sciences for Radiation Damages, National Institute of Radiological Sciences, National Institute for Quantum and Radiological Science and Technology

Abstract

Biological effects by long-term exposure at low dose-rate of ionizing radiation, including internal contamination of radiocesium, is hardly to be estimated in conventional animal experiment. To quantify biological effect by the continuous irradiation at low-dose rate by internal contamination of radiocesium, we examined two distinct biological indicators which are established recently. The first indicator is mucosal tumor incidence in small intestine of Msh2 deficient mice, established by Kyushu university. The intestinal tumor incidence was significantly increased by the long-term oral administration of one of the genotoxic peroxide, potassium bromate. For the quantitative comparison of the genotoxicity between bromate and radiation, we introduced the embryo of Msh2 deficient mouse from Kyushu university, established production system of the Msh2 deficient mice by surrogate birth following test tube fertilization, and used the mice for irradiation experiments. The second indicator is long non-coding(lnc) RNA species induced by DNA damage in white blood cells of irradiated mouse. Using microarray analysis, we identified several lncRNA species whose intracellular amounts are increased by low dose radiation. Among them, we selected two lncRNA species showing the best quantitative linearity between the RNA amount and irradiated dose in the several inbred mice strains. Using accurate quantitative PCR technology, we compared quantitative relationship among single exposure of gamma-ray, continuous exposure of gamma-ray at low dose-rate, internal exposure by radiocesium, and genotoxic exposure by bromate. Furthermore, we also found significant increase in the lncRNA in white blood cells from mice which were ingested radiocesium more than 12 months in Osaka university. These results showed the lncRNA can be used for quantification of biological effects in various irradiation conditions in mice experiments, as a high-sensitive biodosimetric indicator.

Keywords

Radiocesium, Internal irradiation, Msh2-deficient mice, lncRNA, Biodosimetry

2-5 低線量率放射線長期連続照射によるマウス急性骨髄性白血病の起因となる *PU.1* 遺伝子変異の線量率依存性の解析 ～放射線発がんの線量率効果の仕組みを考える～

甲斐倫明（大分県立看護科学大学看護学部 教授）

研究要旨

福島原発事故以来、低線量率放射線の長期連続被ばくによる健康リスクは社会的に関心が高いテーマである。健康リスクを科学的に理解するためには、正常な細胞からがん細胞が発生するまでの種々の生物学的プロセスに対する放射線の影響を線量率および集積線量の違いによって明らかにしていかななくてはならない。これまでに我々は C3H 系マウスの造血系細胞における細胞動態実験とその細胞動態の数理モデルによって rAML（放射線誘発マウス急性骨髄性白血病）発症までの生物学的プロセスを考察してきた。その結果、rAML の起源となる細胞（HSC、MPP、CMEP、CMLP）が白血病細胞に変化するには、放射線によってこれらの細胞群の全体的な細胞動態の変化（細胞増殖、細胞死、細胞分化）が関与していて、それは線量率に依存している可能性が示唆された。そこで本研究はこの仮説に基づき、rAML の起源となる細胞を対象に、低・中・高線量率で放射線を照射後、1) 細胞数、2) 片側 *Sfpil* 遺伝子（*PU.1* をエンコードしている遺伝子）領域に欠失が生じている細胞の割合、3) 対立 *Sfpil* 遺伝子に点突然変異が生じている細胞の割合を検討し、低線量率放射線による発がんリスクの科学的評価を行うことを目的とした。C3H 系マウスに 20 mGy/day、200 mGy/day、1 Gy/min の線量率で集積線量 3 Gy の γ 線を全身照射した結果、線量率依存的に、1) 造血幹細胞（HSC）数の減少とそれに伴う DNA 複製ストレスの増加、2) 片側 *Sfpil* 遺伝子の欠失と対立 *Sfpil* 遺伝子に点突然変異が生じている HSC の割合が増加していることがわかった。以上の本研究結果より、rAML に関わる細胞の変化に線量率効果が見られることがわかった。よって、rAML の発症までの初期過程だけでなく、晩期の過程のすべてにおいて線量率効果があることが示唆された。

キーワード：放射線、細胞動態、2 番染色体異常、*Sfpil* 遺伝子、*PU.1* の発現、rAML
研究協力者：廣内篤久（環境科学技術研究所）、有吉健太郎（弘前大学）

I. 研究目的

二動原体染色体は 1960 年代から放射線影響のエンドポイントとして最も調べられてきた。我々は本研究に先立ち、二動原体染色体発生頻度と集積線量、ならびに線量率の係に着目して文献調査を行った。文献調査の対象は *in vitro* での人の末梢血リンパ球に X 線または γ 線を照射した実験である。二動原体染色体発生頻度と線量率の関係においては、集積線量が 1000 mGy 未満での線量率効果（同じ線量でも線量率の低い方の影響が小さい

現象)は観察されないことが分かった¹⁾が、調査対象の文献での最小線量率は0.5 mGy/min以上で低線量率によるものはなかった。しかし *in vivo* では、最近マウスに0.0007~0.14 mGy/minの低線量率 γ 線を集積線量100~8,000 mGyまで照射し、脾細胞の二動原体染色体発生頻度に関する報告があった。この中で使用された最も低い線量率は自然放射線レベルの約400倍、現在の福島県内の立入制限区域の約10倍程度に相当する。この報告では、集積線量250 mGyで、0.0007 mGy/minと0.014 mGy/minの低線量率で線量率効果が観察されている¹⁾。従って、*in vivo*での極めて低い線量率領域での線量率効果を発がんなどの疾患で解析することが重要であると考えられた。

放射線発がんの代表例として急性骨髄性白血病がある。ヒトの急性骨髄性白血病の実験動物であるC3H系マウスを用いたこれまでの研究で、放射線誘発マウス急性骨髄性白血病(rAML、radiation-induced acute myeloid leukemia)を発症したマウスの骨髄細胞には2番染色体上の片側*Sfp1*遺伝子領域を含む欠失型異常と、対立2番染色体上の*Sfp1*遺伝子に点突然変異が生じていることが分かってきた^{2,9)}。しかし、これらの異常が放射線照射後、いつ、どのようにして生じるのか未だ明らかではない。そこで、我々はrAMLの発症機構として下記の仮説を立てた。「放射線の照射により末梢血球細胞数が減少し、これを補うために造血幹細胞(HSC; hematopoietic stem cell)が平常時に比べて過剰に増殖する。また、放射線は同時にHSCの2番染色体上の片側*Sfp1*遺伝子領域に欠失を起こす。その後、HSCの過剰増殖によりDNA複製ストレスや早期老化が生じ、残存するもう一方の対立*Sfp1*遺伝子座に点突然変異を誘発する。これによって*Sfp1*遺伝子の転写因子であるPU.1の機能が抑制されHSCは白血病幹細胞に変異する。」この仮説のように放射線が間接的に細胞動態を変化させることによりがん化を促進するという考え方は、甲状腺がんや胸腺リンパ腫等でも提案されている^{10, 11)}。そこで、我々は前回の環境省の事業(研究課題名:細胞動態のシステマティックレビューと実験データ解析による低線量・低線量率における放射線発がんリスクの描写、研究期間:2012年4月~2015年3月)で低線量率(20 mGy/day)、中線量率(200 mGy/day)および高線量率(1 Gy/min)の γ 線をC3H系マウスに3 Gyまで照射し、HSCの細胞数の変化を調べた。その結果、中線量率と高線量率の γ 線では短期的なHSCの細胞数減少が観察されたが、低線量率 γ 線では細胞数の変化は認められなかった。しかし、分裂したHSCは分化と自己複製という2種類の細胞動態を示すが、前回事業ではこのHSCの非対称的な細胞動態を勘案しておらず、過剰増殖による影響の評価が一部十分ではなかった。

また、2010年にBondarらは1Gyの放射線を照射したC57BL/6マウスと非照射のC57BL/6マウスの骨髄細胞を混合し、致死線量を照射したC57BL/6マウスに移植する実験を行い、1Gyを照射したマウス由来のHSPC(Hematopoietic stem and progenitor cells)は、移植後、骨髄再建に寄与する割合が非照射マウス由来のHSPCに比べて低いことを報告した¹²⁾。この結果は、放射線によって、DNA損傷を受けたHSPCは、細胞競合の結果、排除されてしまうことを意味している。この現象が一般的に生じるならば、放射線がHSCに2番染色体の欠失型異常を誘発したとしても、細胞集団の中で当該細胞の増殖・分化は抑制され、白血

病細胞には発展しにくいことになる。この現象は rAML の線量率効果を考える上で非常に重要である。

そこで本研究では低・中・高線量率で集積線量が 3 Gy になるまで γ 線を C3H 系マウスに照射し、照射開始日から数えて250日間における末梢血レベル (WBC、RBC、PLT) の細胞数、rAML の起源となりうる造血系細胞 (長期造血幹細胞 (LT-HSC)、短期造血幹細胞 (ST-HSC)、多能性前駆細胞 (MPP)、骨髄系/リンパ球系共通前駆細胞 (CMLP)、骨髄球系/赤血球系共通前駆細胞 (CMEP)) を対象にして、1) 細胞数、2) 片側 *Sfp1* 遺伝子領域に欠失が生じている HSC の割合、3) 対立 *Sfp1* 遺伝子に点突然変異が生じている HSC の割合をそれぞれ解析し、低線量率放射線による rAML 発症リスクを評価することを目的とした。

II. 研究方法

<マウス>

本研究では 8 週齢の♂の C3H/HeNjcl マウスを用いた。マウスは最大 4 匹ずつケージに收容し、温度、湿度、室内照明の明暗サイクルが管理された SPF 環境下の飼育室中で飼育した。固形飼料と水は自由に摂取させた。

< γ 線の照射>

γ 線照射は環境科学技術研究所に設置してある Cs-137 低線量率 γ 線照射装置を用いて行った。マウスをコントロール群 (0 Gy)、低線量率群 (20 mGy/day)、中線量率群 (200 mGy/day) および高線量率群 (1 Gy/min) の 3 群に分け、集積線量が 3 Gy (rAML が好発する線量) になるまで γ 線を全身に連続照射した。本研究では 1 群 5 匹のマウスを使用した。照射終了後も飼育を続け、照射開始日から数えて 250 日間飼育した。

<血球数の測定>

マウスをイソフルランで麻酔後に眼窩採血を行なった。その後コールターカウンターを用いて、末梢血中の白血球 (WBC)、赤血球 (RBC)、血小板 (PLT) の数を計測した。

<フローサイトセルソーターによる造血幹/前駆細胞の単離>

イソフルラン処理により屠殺したマウスの両側の大腿骨から骨髄細胞を摘出した。各分化段階の造血系細胞では細胞膜表面タンパク質の発現パターンが異なっていることが分かっている。その特性を利用してそれぞれのタンパク質の抗体処理を骨髄細胞に行ない、フローサイトセルソーターにて造血幹細胞 (HSC) ^{*1}、長期造血幹細胞 (LT-HSC) ^{*2}、短期造血幹細胞 (ST-HSC) ^{*3}、多能性前駆細胞 (MPP) ^{*4}、骨髄系/リンパ球系共通前駆細胞 (CMLP) ^{*5}、骨髄球系/赤血球系共通前駆細胞 (CMEP) ^{*6} をそれぞれ単離した^{13,14,15,16}。骨髄中の造血系細胞の増殖・分化模式図を図 1 に示す。この操作は全て環境科学技術研究所にて実施した。

^{*1}HSC : CD150 陽性、CD48 陰性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

^{*2}LT-HSC : CD34 陰性、CD150 陽性、CD48 陰性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

*³ST-HSC : CD34 陽性、CD150 陽性、CD48 陰性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

*⁴MPP : CD150 陽/陰性、CD48 陽性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

*⁵CMEP : CD34 陽性、CD48 陽性、Lin 陰性、sca1 陰性、c-kit 陽性

*⁶CMLP : CD34 陽性、CD48 陽性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陰性

<片側 *Sfpil* 遺伝子領域の欠失の解析>

Sfpil 遺伝子の BAC クローンを用いて蛍光染色体プローブを作成した (弘前大学で実施)。この *Sfpil* 遺伝子領域の蛍光染色体プローブを用いて染色体 FISH (Fluorescence in situ hybridization) を行い、蛍光顕微鏡下で、*Sfpil* 遺伝子の蛍光が 1 個しか観察されない細胞を片側 *Sfpil* 遺伝子領域に欠失が生じている HSC として評価した。本研究では 150 日目および 250 日目における間期の HSC を観察対象として、1 匹あたり 50 個以上の細胞を観察した。

<対立 *Sfpil* 遺伝子の点突然変異の解析>

Sfpil 遺伝子の転写因子である PU.1 は、GM-CSF (顆粒球単球コロニー刺激因子) レセプター α に結合して HSC の分化を調節している^{17, 18)}。rAML に必須な *Sfpil* 遺伝子のコドン 235 に点突然変異が生じると、転写された PU.1 は GM-CSF レセプター α と結合できなくなる。これにより分化異常が起きると考えられている。そこで、本研究では PU.1 と GM-CSF レセプター α の免疫蛍光抗体染色を行い、Tali イメージベースサイトメーター (自動細胞計測装置) を用いて、PU.1⁺/GM-CSF レセプター α 細胞を対立 *Sfpil* 遺伝子に点突然変異が生じている HSC として評価した。

(倫理面への配慮)

公益財団法人環境科学技術研究所動物実験委員会に実験計画書を提出し、苦痛の軽減、代替法の活用および動物数などの倫理面および計画の妥当性等の審査を受け、承認を得た (承認番号 27-26 号)。

III. 研究結果

<末梢血中の血球数の継時的変化>

WBC: コントロール群は飼育開始から 1 日目に 80×10^2 個/ μ l、5 日目に 103×10^2 個/ μ l、10 日目に 99.8×10^2 個/ μ l、15 日目に 120×10^2 個/ μ l、54 日目に 75×10^2 個/ μ l、150 日目に 104×10^2 個/ μ l、250 日目に 69×10^2 個/ μ l となった。これに対して高線量率群では 1 日目に 54×10^2 個/ μ l、3 日目に 17×10^2 個/ μ l、7 日目に 40×10^2 個/ μ l、150 日目に 102×10^2 個/ μ l、253 日目に 92×10^2 個/ μ l となった。1 日目から 7 日目にかけて顕著な減少傾向を示した。その後は増加傾向を示し、150 日目以降はコントロール群と差は見られなくなった。中線量率群では 1 日目に 80×10^2 個/ μ l、5 日目に 70×10^2 個/ μ l、15 日目に 58×10^2 個/ μ l、18 日目に 42×10^2 個/ μ l、22 日目に 72×10^2 個/ μ l、152 日目に 72×10^2 個/ μ l、251

日目に 80×10^2 個/ μ l となった。照射が終了する 15 日目まで緩やかな減少を示した。その後は増加傾向を示し、150 日目以降にはコントロール群と差は見られなくなった。低線量率群では 10 日目に 113×10^2 個/ μ l、54 日目に 85×10^2 個/ μ l、150 日目に 79×10^2 個/ μ l、157 日目に 95×10^2 個/ μ l、250 日目に 48×10^2 個/ μ l となった。250 日間コントロール群と同様の变化を示した。

RBC : コントロール群は飼育開始から 1 日目に 84×10^5 個/ μ l、5 日目に 76×10^5 個/ μ l、10 日目に 74×10^5 個/ μ l、15 日目に 74.7×10^5 個/ μ l、54 日目に 77.4×10^5 個/ μ l、150 日目に 81.2×10^5 個/ μ l、250 日目に 43.4×10^5 個/ μ l となった。これに対して高線量率群では 1 日目に 75.5×10^5 個/ μ l、3 日目に 74.7×10^5 個/ μ l、7 日目に 72.8×10^5 個/ μ l、150 日目に 73.4×10^5 個/ μ l、253 日目に 66.6×10^5 個/ μ l となった。中線量率群では 1 日目に 80.7×10^5 個/ μ l、5 日目に 71.9×10^5 個/ μ l、15 日目に 71.3×10^5 個/ μ l、18 日目に 65.7×10^5 個/ μ l、22 日目に 71×10^5 個/ μ l、152 日目に 69×10^5 個/ μ l、251 日目に 57×10^5 個/ μ l となった。低線量率群では 10 日目に 71.2×10^5 個/ μ l、54 日目に 74.6×10^5 個/ μ l、150 日目に 78.7×10^5 個/ μ l、157 日目に 76.6×10^5 個/ μ l、250 日目に 36.1×10^5 個/ μ l となった。高線量率群、中線量率群、低線量率群いずれも 250 日間コントロール群と同様の变化を示した。

PLT : コントロール群は飼育開始から 1 日目に 74.3×10^4 個/ μ l、5 日目に 89.6×10^4 個/ μ l、10 日目に 123×10^4 個/ μ l、15 日目に 69.2×10^4 個/ μ l、54 日目に 123.4×10^4 個/ μ l、150 日目に 80.2×10^4 個/ μ l、250 日目に 85.5×10^4 個/ μ l となった。これに対して高線量率群では 1 日目に 78.6×10^4 個/ μ l、3 日目に 112×10^4 個/ μ l、7 日目に 55.5×10^4 個/ μ l、150 日目に 96.5×10^4 個/ μ l、253 日目に 118.1×10^4 個/ μ l となった。7 日目に減少が見られたが、その後増加傾向を示し、150 日目以降はコントロール群と差は見られなくなった。中線量率群では 1 日目に 76.4×10^4 個/ μ l、5 日目に 96×10^4 個/ μ l、15 日目に 38.2×10^4 個/ μ l、18 日目に 77.3×10^4 個/ μ l、22 日目に 100×10^4 個/ μ l、152 日目に 113.5×10^4 個/ μ l、251 日目に 99.8×10^4 個/ μ l となった。照射が終了する 15 日目に減少を示したが、その後は増加傾向を示し 18 日目以降にはコントロール群と差は見られなくなった。低線量率群では 10 日目に 116.4×10^4 個/ μ l、54 日目に 122.6×10^4 個/ μ l、150 日目に 116.6×10^4 個/ μ l、157 日目に 111.8×10^4 個/ μ l、250 日目に 68.9×10^4 個/ μ l となった。250 日間コントロール群と同様の变化を示した。

<骨髄細胞中における造血幹/前駆細胞数の割合の継時的変化>

LT-HSC : コントロール群は飼育開始から 1 日目に 0.096%、5 日目に 0.011%、10 日目に 0.153%、15 日目に 0.186%、54 日目に 0.15%、150 日目に 0.028%、250 日目に 0.082% となった。これに対して高線量率群では 1 日目に 0.057%、3 日目に 0.129%、7 日目に 0.339%、150 日目に 0.095%、253 日目に 0.117% となった。1 日目から 7 日目にかけて増加傾向を示した。150 日目以降はコントロール群と差は見られなくなった。中線量率群では 1 日目に 0.079%、5 日目に 0.022%、15 日目に 0.094%、18 日目に 0.067%、22 日目に 0.047%、152 日目に 0.024%、251 日目に 0.098% となった。250 日間コントロール群と同様の变化を示した。低線量率群では 10 日目に 0.122%、54 日目に 0.126%、150 日目に 0.219%、157 日

目に 0.365 %、250 日目に 0.077 % となった。照射が終了する 150 日目に増加が見られたが、それ以外はコントロール群と同様の变化を示した。

ST-HSC : コントロール群は飼育開始から 1 日目に 0.043 %、5 日目に 0.003 %、10 日目に 0.067 %、15 日目に 0.092 %、54 日目に 0.062 %、150 日目に 0.005 %、250 日目に 0.019 % となった。これに対して高線量率群では 1 日目に 0.022 %、3 日目に 0.044 %、7 日目に 0.038 %、150 日目に 0.034 %、253 日目に 0.055 % となった。250 日間コントロール群同様の变化を示した。中線量率群では 1 日目に 0.04 %、5 日目 0.011 %、15 日目に 0.045 %、18 日目に 0.023 %、22 日目に 0.008 %、152 日目に 0.01 %、251 日目に 0.023 % となった。22 日目に減少が見られたが、その後はコントロール群と同様の变化を示した。低線量率群では 10 日目に 0.045 %、54 日目に 0.059 %、150 日目に 0.062 %、157 日目に 0.048 %、250 日目に 0.015 % となった。250 日間コントロール群と同様の变化を示した。

HSC : HSC の割合の継時的変化を表 1 に示す。 コントロール群は飼育開始から 1 日目に 1.475 %、5 日目に 1.656 %、10 日目に 1.39 %、15 日目に 1.282 %、54 日目に 1.485 %、150 日目に 1.242 %、250 日目に 1.068 % となった。これに対して高線量率群では 1 日目に 0.873 %、3 日目に 0.246 %、7 日目に 0.045 %、150 日目に 1.35 %、253 日目に 1.166 % となった。7 日目まで急激な減少傾向を示した。その後は増加傾向を示し、150 日目以降はコントロール群と差は見られなくなった。中線量率群では 1 日目に 1.37 %、5 日目に 1.3 %、15 日目に 0.68 %、18 日目に 0.169 %、22 日目に 0.186 %、152 日目に 1.122 %、251 日目に 0.462 % となった。照射が終了する 15 日目に急激な減少を示した。その後は増加傾向を示し、150 日目以降にはコントロール群と差は見られなくなった。低線量率群では 10 日目に 1.378 %、54 日目に 1.247 %、150 日目に 0.298 %、157 日目に 0.337 %、250 日目に 0.618 % となった。照射が終了する 150 日目に減少が見られた。その後、緩やかな増加傾向を示したが 250 日目でもコントロール群と差が見られた。

MPP : コントロール群は飼育開始から 1 日目に 0.328 %、5 日目に 0.034 %、10 日目に 0.321 %、15 日目に 0.372 %、54 日目に 0.384 %、150 日目に 0.065 %、250 日目に 0.073 % となった。これに対して高線量率群では 1 日目に 0.119 %、3 日目に 0.028 %、7 日目に 0.004 %、150 日目に 0.197 %、253 日目に 0.344 % となった。7 日目まで急激な減少傾向を示した。その後は増加傾向を示し、150 日目以降はコントロール群と差は見られなくなった。中線量率群では 1 日目に 0.252 %、5 日目に 0.036 %、15 日目に 0.164 %、18 日目に 0.007 %、22 日目に 0.033 %、152 日目に 0.329 %、251 日目に 0.153 % となった。照射が終了する 15 日目に急激な減少を示した。その後は増加傾向を示し、150 日目以降にはコントロール群と差は見られなくなった。低線量率群では 10 日目に 0.305 %、54 日目に 0.286 %、150 日目に 0.066 %、157 日目に 0.091 %、250 日目に 0.039 % となった。250 日間コントロール群と同様の变化を示した。

CMEP : コントロール群は飼育開始から 1 日目に 0.173 %、5 日目に 0.021 %、10 日目に 0.093 %、15 日目に 0.116 %、54 日目に 0.115 %、150 日目に 0.037 %、250 日目に 0.09 % となった。これに対して高線量率群では 1 日目に 0.017 %、3 日目に 0.068 %、7 日目に 0.004 %、

150日目に0.053%、253日目に0.143%となった。1日目と7日目に急激な減少を示した。その後は増加傾向を示し、150日目以降はコントロール群と差は見られなくなった。中線量率群では1日目に0.106%、5日目に0.015%、15日目に0.051%、18日目に0.14%、22日目に0.295%、152日目に0.158%、251日目に0.457%となった。250日間コントロール群と同様の変化を示した。低線量率群では10日目に0.092%、54日目に0.099%、150日目に0.304%、157日目に0.12%、250日目に0.057%となった。照射が終了する150日目に増加を示したが、それ以外はコントロール群と同様の変化であった。

CMLP：コントロール群は飼育開始から1日目に1.236%、5日目に0.357%、10日目に0.4%、15日目に0.472%、54日目に0.779%、150日目に0.354%、250日目に0.345%となった。これに対して高線量率群では1日目に0.467%、3日目に0.703%、7日目に0.153%、150日目に0.438%、253日目に0.731%となった。1日目と7日目に減少が見られたが、その後は増加傾向を示し、150日目以降はコントロール群と差は見られなくなった。中線量率群では1日目に0.965%、5日目に0.382%、15日目に0.401%、18日目に0.133%、22日目に0.071%、152日目に1.097%、251日目に1.085%となった。22日目に急激な減少が見られた。その後、増加傾向を示し、150日目以降はコントロール群と差は見られなくなった。低線量率群では10日目に0.497%、54日目に0.775%、150日目に0.158%、157日目に0.142%、250日目に0.374%となった。照射が終了する150日目に減少が見られたが、それ以外はコントロール群と同様の変化であった。

<片側 *Sfp1* 遺伝子領域の欠失を持つ HSC の割合>

片側 *Sfp1* 遺伝子領域の欠失を持つ HSC の割合を表2に示す。コントロール群では7日目に3.96%、150日目に6.17%、250日目に8.8%観察された。これに対して高線量率群では7日目に38.93%、150日目に19.85%、250日目に20.68%観察された。コントロール群と比較すると7日目では約10倍、150日目では約3倍、250日目では約2倍であった。中線量率群では150日目に18.47%、250日目に14.7%観察された。コントロール群と比較すると150日目では約3倍、250日目では約1.7倍であった。低線量率群では150日目に14.17%、250日目に12.32%観察された。コントロール群と比較すると150日目では約2.3倍、250日目では約1.4倍であった。

<対立 *Sfp1* 遺伝子に点突然変異が生じている HSC の割合>

対立 *Sfp1* 遺伝子に点突然変異が生じている HSC の割合を表3に示す。コントロール群では150日目に2.4%、250日目に0.86%観察された。これに対して高線量率群では150日目に2.82%、250日目に11.5%観察された。コントロール群と比較すると150日目に約1.2倍、250日目では約13倍であった。中線量率群では150日目に1.33%、250日目に4.89%観察された。コントロール群と比較すると150日目では約0.5倍、250日目では約5.7倍であった。低線量率群では150日目に1.61%、250日目に1.42%観察された。コントロール群と比較すると150日目では約0.7倍、250日目では約1.7倍であった。

IV. 考察

本研究は、rAMLにつながる生物学的変化の線量率依存性を明らかにすることで、低線量率放射線による発がんリスクを科学的に評価することを目的としている。そこで、まず、20 mGy/day（低線量率群）、200 mGy/day（中線量率群）、1000 mGy/min（高線量率群）の線量率で集積3 Gyの γ 線をC3H系マウスに全身照射し、照射開始日から数えて250日間における末梢血球数と造血系細胞数の継時的変化を調べた。照射後に細胞数が減少しきった時点の値を用いて比較した（図2）。その結果、PLT、CMEP、MPPは中・高線量率で細胞数の明らかな減少が見られたが、線量率依存性は認められなかった。これに対して、WBCとHSCは線量率に依存して有意に細胞数が減少していることが分かった。特にHSC数の変化は顕著に見られ、コントロール群と比較すると高線量率群では1日目に0.6倍、3日目に0.15倍、7日目に0.03倍となり、照射終了後から7日目までに急激な減少を示していた。その後は増加傾向を示し、150日目にはコントロール群レベルまで達していた。中線量率群では1日目にコントロール群の0.9倍、5日目に0.8倍、15日目に0.5倍、18日目に0.1倍、22日目に0.14倍となった。15日目に照射は終了していたが18日目まで減少が続いていた。その後は増加傾向を示したが、250日目でもコントロール群の0.4倍であった。低線量率群では150日目にコントロール群の0.23倍、157日目に0.26倍、250日目に0.57倍となった。照射が終了した150日目に減少が見られた。その後増加傾向を示したが250日目でもコントロール群レベルまで達していなかった。これらの結果から、細胞数の減少だけでなく、コントロール群レベルまで増殖するパターンも線量率によって異なっていることがわかった。つまり、高線量率では短期間に急激な増殖を、中・低線量率では時間をかけてゆっくり増殖していることがわかった。HSC数の減少が細胞死によるものなのか、もしくは下流の細胞に分化したことによるのか本研究では明らかにできなかったが、いずれにしろ線量率に依存してHSCに増殖負荷がかかっていることがわかった。

次に、rAMLに必須な異常の一つである片側*Sfp1*遺伝子領域の欠失を持つHSCの割合の線量率依存性を検討した。表2より、片側*Sfp1*遺伝子領域の欠失を持つHSCの割合は250日目に高線量率群では20.68%、中線量率群では14.7%、低線量率群では12.32%観察され、線量率に依存して増加していることがわかった。本研究では片側*Sfp1*遺伝子領域の欠失が放射線照射後いつのタイミングで生じているのか調べるために高線量率で3 Gyを照射し、7日目に同様の解析を行った。その結果、片側*Sfp1*遺伝子領域の欠失を持つHSCの割合が38.93%観察された（表2）。これまでの研究でマウスの2番染色体の中間部位にRSS（放射線に高感受性の領域：Radiation-Sensitive Site）が存在していることが報告されている¹⁹⁾。実際に、BanらはC3H系マウスに3 Gyを照射し2番染色体の異常をG-bandで解析したところ中間部位の欠失が放射線照射後24時間に高頻度で観察されることを報告している²⁰⁾。2番染色体の中間部位には*Sfp1*遺伝子が存在するため、本研究で観察された片側*Sfp1*遺伝子領域の欠失もRSSの存在により、放射線照射後早い段階で生じていたものと考えられた。しかし、250日目には片側*Sfp1*遺伝子領域の欠失を持つHSCの割合は20%まで減少していた。HSC数の継時的変化の結果（表1）を見てみると、高線量率群では7日目

から 150 日目にかけて HSC 数が増加している。片側 *Sfpil* 遺伝子領域の欠失は安定型の染色体異常であるので、この異常を持つ HSC の割合も増加しておかしくない。しかし、実際には減少していたことから、細胞競合の可能性が考えられた。これらの結果から、片側 *Sfpil* 遺伝子領域の欠失は 1) 線量率に依存して生じていること、2) 放射線照射後早い段階で生じていること、3) 細胞競合を引き起こすことがわかった。また、片側 *Sfpil* 遺伝子領域の欠失を持つ HSC がそのまま白血病細胞になるのではないことがわかった。

rAML に必須なもう一つの異常として対立 *Sfpil* 遺伝子の点突然変異がある。この変異パターンはこれまでの研究で *Sfpil* 遺伝子内のエクソン 5 のコドン 235 に相当する塩基配列の CGC から TGC への変異であることが分かっている¹⁸⁾。我々は当初放射線が HSC に老化を引き起こし活性酸素種 (ROS) が蓄積することで対立 *Sfpil* 遺伝子に点突然変異が生じると考えていた。しかし、この C から T への変異は ROS が関与しないことが報告された²¹⁾。その後、Helleday らによって C から T への変異は細胞分裂の際の DNA 複製ストレスによる脱アミノ化によって生じることが明らかにされた²²⁾。表 1 の結果から HSC には線量率に依存して増殖負荷がかかっていることから、対立 *Sfpil* 遺伝子の点突然変異も線量率に依存して生じる可能性が考えられた。そこで、本研究では対立 *Sfpil* 遺伝子の点突然変異の線量率依存性を下記の方法で解析した。*Sfpil* 遺伝子の転写因子である PU.1 は *Ets* 遺伝子群の一つで、GM-CSF (顆粒球単球コロニー刺激因子) レセプター α に結合して末梢血細胞への増殖・分化を調節している^{17,18)}。対立 *Sfpil* 遺伝子のコドン 235 に点突然変異が生じると、転写された PU.1 は GM-CSF レセプター α と結合できなくなるため、分化異常が起こり rAML につながると考えられている。そこで PU.1 と GM-CSF レセプター α の免疫蛍光交代染色を行い、PU.1 のみを発現している HSC を対立 *Sfpil* 遺伝子に点突然変異が生じた HSC として評価した。その結果 (表 3)、対立 *Sfpil* 遺伝子に点突然変異を持つ HSC の割合はコントロール群と比較すると高線量率群では 150 日目に約 1.2 倍、250 日目では約 13 倍、中線量率群では 150 日目に約 0.5 倍、250 日目に約 5.7 倍、低線量率群では 150 日目に約 0.7 倍、250 日目に約 1.7 倍観察された。よって、対立 *Sfpil* 遺伝子の点突然変異も線量率に依存して生じていることがわかった。

本研究では片側 *Sfpil* 遺伝子欠失の割合 (表 2) と対立 *Sfpil* 遺伝子の点突然変異発生頻度 (表 3) から HSC に占める rAML リスク細胞の割合を計算した (表 4)。その結果、高線量率群では 2%、中線量率群では 0.7%、低線量率群では 0.2% が rAML リスク細胞であることが分かった。

以上の本研究結果から rAML の発症メカニズムを考察する。放射線を C3H 系マウスに照射すると HSC に片側 *Sfpil* 遺伝子領域の欠失と細胞数の減少が生じる。その後、末梢血球数を維持するために増殖負荷がかかる。この過程で細胞競合も生じるが、同時に増殖負荷に伴う過剰な DNA 複製ストレスにより対立 *Sfpil* 遺伝子に点突然変異が引き起こされる。これにより分化異常が引き起こされ rAML につながると考えられた。この一連の過程が線量率に依存しているため、rAML も線量率に応じて発症することを強く示唆することが考えられた。

V. 結論

以上の本研究結果より、rAMLの至適線量である3 GyをC3H系マウスに照射するとHSCに線量率に依存して、1)細胞動態が変化すること、2)DNA複製ストレスがかかること、3) *Sfp1* 遺伝子欠失および*Sfp1*遺伝子の点突然変異が生じることがそれぞれわかった。

よって、rAMLの発症に繋がる放射線の作用のメカニズムの視点から、発症までの初期過程だけでなく、晩期の過程のすべてにおいて、これまでに明らかにされていない放射線発がんの線量率効果を定量的に明確にすることができたことが本研究の成果である。

VI. この研究に関する現在までの研究状況、業績

小嶋光明, 廣内篤久: 急性骨髄性白血病につながる造血細胞および造血組織の放射線応答. 放射線生物研究. 2016, 51, 34-56.

小嶋光明, 廣内篤久, 甲斐倫明: 急性骨髄性白血病につながる造血細胞および造血組織の放射線応答. 第59回日本放射線影響学会シンポジウム, 広島, 2016, 10月.

VII. 参考文献

1. 小嶋 光明, 甲斐 倫明. 低線量域における線量率効果. 放射線生物研究. 2012; 47: 347-360.
2. Azumi J Sachs L. Chromosome mapping of the genes that control differentiation and malignancy in myeloid leukemic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 77: 253-257.
3. Hayata I, Seki M, Yoshida K et al. Chromosome aberrations observed in 52 mouse myeloid leukemias. Cancer Res. 1983; 43: 367-373.
4. Trakhtenbrot L, Krauthgamer R, Resnitzky P et al. Deletion of chromosome 2 is an early event in the development of radiation-induced myeloid leukemia in SJL/J mice. Leukemia. 1988; 2: 545-550.
5. Rithidech KN, Bond VP, Cronkite EP et al. A specific chromosomal deletion in murine leukemic cells induced by radiation with different qualities. Exp Hematol. 1993; 21: 427-431.
6. 伴 信彦. マウスの急性骨髄性白血病と2番染色体の異常. 放射線生物研究. 2000; 35: 115-126.
7. Cook WD, McCaw BJ, Herring C et al. PU.1 is a suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. Blood. 2004; 104: 3437-3444.
8. Suraweera N, Meijne E, Moody J et al. Mutations of the PU.1 Ets domain are specifically associated with murine radiation-induced, but not human therapy-related, acute myeloid leukemia. Oncogene. 2005; 24: 3678-3683.
9. Hirouchi T, Takabatake T, Yoshida K et al. Upregulation of c-myc gene accompanied by PU.1

- deficiency in radiation-induced acute myeloid leukemia in mice. *ExpHematol.* 2008; 36: 871–885.
10. Kominami R, Niwa O. Radiation carcinogenesis in mouse thymic lymphomas. *Cancer Sci.* 2006; 97: 575-581.
 11. Suzuki K, Yamashita S. Low-dose radiation exposure and carcinogenesis. *Jpn J Clin Oncol.* 2012; 42: 563-568.
 12. Bondar T, Medzhitov R. p53-mediated hematopoietic stem and progenitor cell competition. *Cell Stem Cell.* 2010; 6: 309-322.
 13. Hirouchi T, Akabane M, Tanaka S et al. Cell surface marker phenotypes and gene expression profiles of murine radiation-induced acute myeloid leukemia stem cells are similar to those of common myeloid progenitors. *Radiat Res.* 2011; 176: 311-322.
 14. Shao L, Wang Y, Chang J et al. Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury. *Transl Cancer Res.* 2013; 2: 397-411.
 15. Ban, N, Kai, M. Implication of replicative stress-related stem cell ageing in radiation-induced murine leukaemia. *Br. J. Cancer.* 2009; 101: 363-371.
 16. Kawamoto H, Ikawa T, Masuda K, Wada H, Katsura Y. A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunol Rev.* 2010; 238: 23-36.
 17. Silver A, Moody J, Dunford R, Clark D, Ganz S, Bulman R, Bouffler S, Finnon P, Meijne E, Huiskamp R, Cox R. Molecular mapping of chromosome 2 deletions in murine radiation-induced AML localizes a putative tumor suppressor gene to a 1.0 cM region homologous to human chromosome segment 11p11-12. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999; 24: 95-104.
 18. Verbiest T, Bouffler S, Nutt SL, Badie C. PU.1 downregulation in murine radiation-induced acute myeloid leukaemia (AML); from molecular mechanism to human AML. *Carcinogenesis.* 2015; 36: 413-419.
 19. Breckon, G., Papworth, D., Cox, R. Murine radiation myeloid leukaemogenesis: a possible role for radiation-sensitive sites on chromosome 2. *Genes Chromosomes Cancer.* 1991; 3: 367-375.
 20. Ban, N., Kai, M., Kusama, T. Chromosome aberrations in bone marrow cells of C3H/He mice at an early stage after whole-body irradiation. *J. Radiat. Res.* 1991; 38: 219-231.
 21. Ohno M, Sakumi K, Fukumura R, Furuichi M, Iwasaki Y, Hokama M, Ikemura T, Tsuzuki T, Gondo Y, Nakabeppu Y. 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. *Sci Rep.* 2014; 4: 4689.
 22. Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat Rev Genet.* 2014; 15: 585-598.

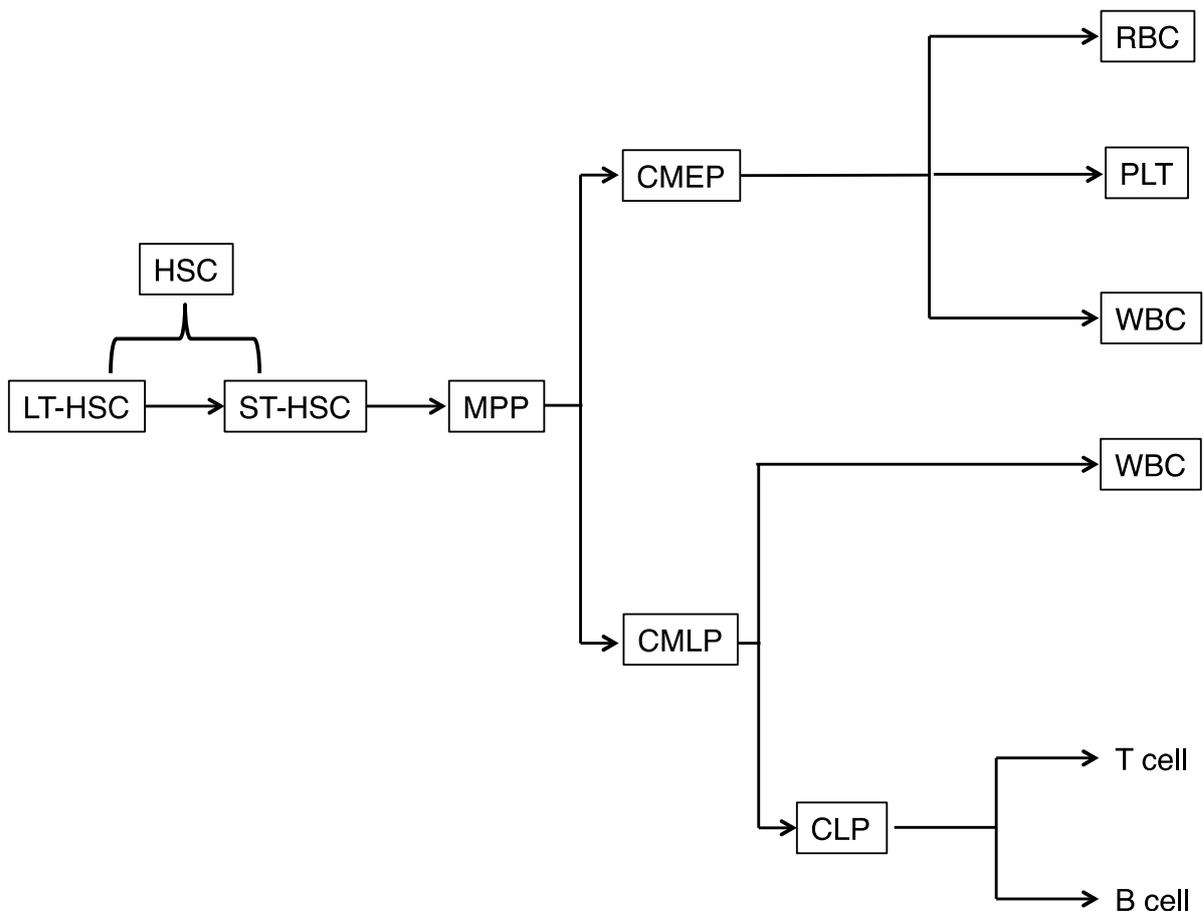


図 1. 骨髄中の造血系細胞の増殖・分化模式図

造血幹細胞（HSC, hematopoietic stem cell）とは長期造血幹細胞（LT-HSC, long-term hematopoietic stem cell）と短期造血幹細胞（ST-HSC, short-term hematopoietic stem cell）を表す。LT-HSC には長期の自己複製能と分化能が維持されている。ST-HSC は短期で自己複製と分化を繰り返し、自己複製能を失った多能性前駆細胞（MPP, multipotent progenitor）を生産する。その後、MPP は骨髄球系/赤血球系共通前駆細胞（CMEP, common myeloid-erythroid progenitor）と骨髄球系/リンパ球系共通前駆細胞（CMLP, common myelo-lymphoid progenitor）に分かれ、CMEP は赤血球（erythrocyte）とマクロファージ（macrophage）に分化する。CMLP はマクロファージへの分化とリンパ球系共通前駆細胞（CLP, common lymphoid progenitor）に分かれ、CLP は T 細胞（T cell）と B 細胞（B cell）に分化する。

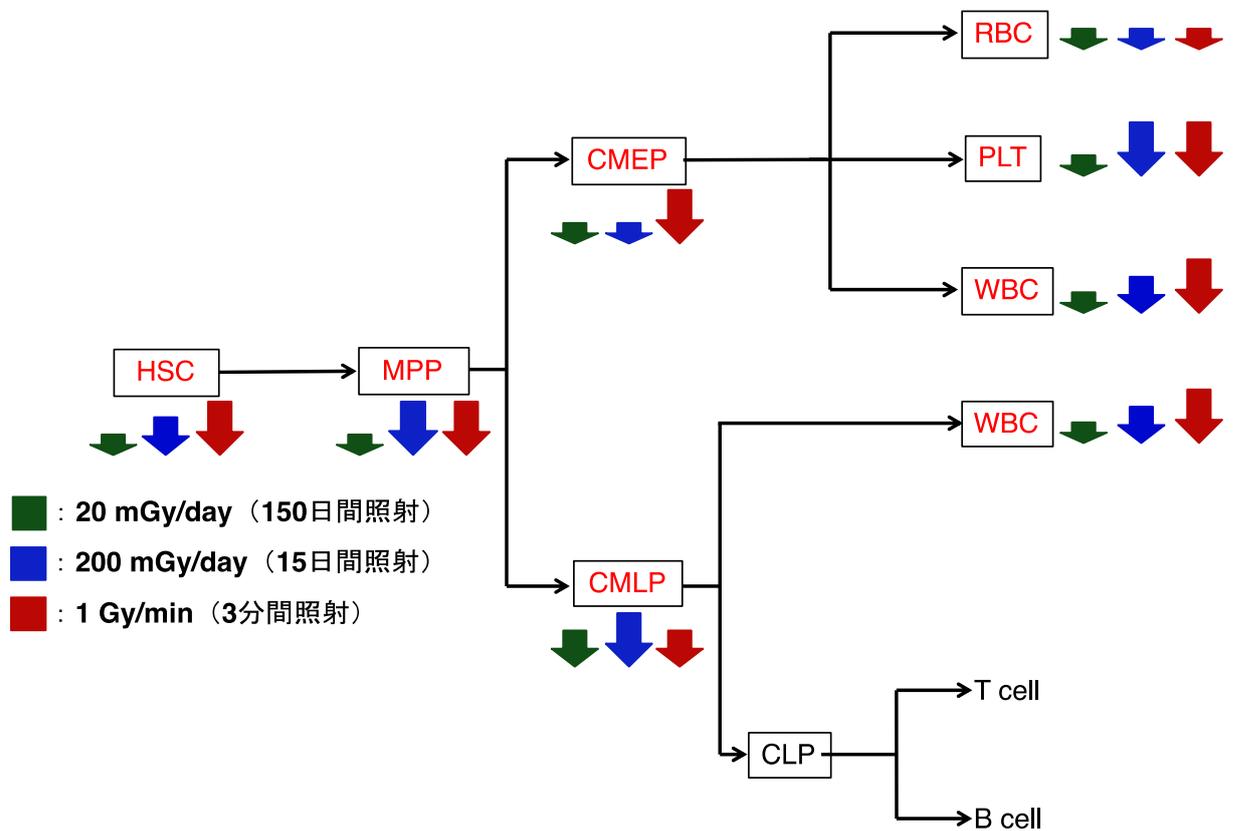


図 2. 細胞数の継時的変化のまとめ

20 mGy/day、200 mGy/day、1000 mGy/min の線量率で 3 Gy を照射後、最小値の細胞数で比較した。図の矢印の大小は減少率の大きさを示している。

表 1. HSC (造血幹細胞) 数の継時的変化

(%)

日数	コントロール群		高線量率群		中線量率群		低線量率群	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
1	1.475	0.158	0.873	0.366	1.370	0.080		
3			0.246	0.079				
5	1.656	0.129			1.301	0.196		
7			0.045	0.017				
10	1.390	0.121					1.378	0.098
15	1.282	0.240			0.697	0.158		
18					0.169	0.148		
22					0.186	0.063		
54	1.485	0.218					1.247	0.159
150	1.242	0.182	1.350	0.200			0.298	0.169
152	1.295	0.235			1.122	0.258	0.417	0.131
157							0.337	0.038
250	1.068	0.494					0.618	0.407
251					0.462	0.076		
253	1.158	0.182	1.166	0.293				

表 2. 片側 *Sfpi1* 遺伝子領域の欠失を持つ HSC の割合

(%)

日数	コントロール群		高線量率群		中線量率群		低線量率群	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
7	3.96	2.69	38.93	7.16				
150	6.17	2.10	19.85	5.84	18.47	6.89	14.17	1.82
250	8.80	2.20	20.68	6.74	14.70	5.51	12.32	1.04

表 3.
対立 *Sfpi1* 遺伝子に点突然変異が生じている HSC の割合

(%)

日数	コントロール群		高線量率群		中線量率群		低線量率群	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
150	2.40	4.21	2.82	3.75	1.33	1.89	1.61	3.61
250	0.86	1.49	11.50	12.00	4.89	7.77	1.42	1.99

表 4. HSC に占める rAML リスク細胞の割合

線量率	細胞競合後の 片側 <i>Sfpi1</i> 欠失細胞 の割合	対立 <i>Sfpi1</i> 点突然変異の 発生頻度	HSC に占める rAML リスク細胞の割合
20 mGy/day	12.32 %	1.42 %	$12.32 \% \times 1.42 \% = 0.17 \%$
200 mGy/day	14.70 %	4.89 %	$14.70 \% \times 4.89 \% = 0.71 \%$
1000 mGy/day	20.68 %	11.5 %	$20.68 \% \times 11.5 \% = 2.38 \%$

A dose-rate effect on chromosome 2 aberrations and *Sfp1*/PU.1 loss leading
to radiation-induced murine acute myeloid leukemia
- Aiming at clarifying radiation cancer risk at low doses and dose rates

Michiaki Kai

**1Oita University of Nursing and Health Sciences*

Abstract

The dose-rate effect (DRE) is a critical phenomenon that should be considered to estimate the low-dose radiation cancer risk for human health. However, the DRE remains unclear in the light of not only mechanical process of radiation carcinogenesis but also low-dose rates. As a pilot study, we had reviewed the DRE on radiation-induced dicentrics in the recent reports and had suggested that DRE exists in the low dose-rate region *in vivo* system. Resultantly, it became very important to analyze the DRE at low-dose rates by conducting an *in-vivo* study on radiation cancer using mice. It is well known that exposure to radiation leads to rAML (radiation-induced acute myeloid leukemia) in C3H mice after an incubation period of 1 to 2 years. In murine studies, it has been reported that dysfunction of PU.1, encoded by the murine *Sfp1* gene, expression in hematopoietic progenitors (ST-HSC: short term hematopoietic stem cell, LT-HSC: Long term hematopoietic stem cell, MPP: Multipotent progenitor, CMEP: Common myeloid-erythroid progenitor, CMLP: Common myeloid-lymphoid progenitor) by radiation-induced *Sfp1* gene-site deletions in chromosome 2 and subsequent *Sfp1* point mutation in the remaining allele, leads to rAML. In our previous study, we had observed that cell turnover of hematopoietic progenitors was activated depending on dose rates, and hypothesized that DNA replicative stress through radiation-induced cell turnover can induce rAML-related mutations. To clarify our hypothesis in this study, we examined the dose-rate response of cell turnover, *Sfp1* gene-site deletions in chromosome 2, and PU.1 loss in hematopoietic progenitors of γ -irradiated C3H mice, and thus aimed at clarifying DRE of radiation cancer. We showed that the pattern of cell turnover in HSC was markedly different depending on the dose rates that can be classified into high (1 Gy/min), middle (200 mGy/day) and low (20 mGy/day). We also found that the frequencies of HSC with deletion of *Sfp1* gene site in chromosome 2 and HSC with dysfunction of PU.1 increased depending on the dose rates. Our experimental results will provide a clear insight into the DREs of *Sfp1* loss in HSCs that is likely to lead radiation

leukaemogenesis.

Keywords: radiation, dose-rate, C3H mice, chromosome 2, *Sfp1/PU.1*, rAML
(radiation-induced acute myeloid leukemia)

2-6 低線量放射線は循環器疾患のリスクを上げるか？低線量率放射線は？

放射線関連循環器疾患の機序の解明

放射線と脳卒中発症時期の相関検索、バイオマーカーおよび

メタボローム解析による発症機序の解明

主任研究者：高橋 規郎（公益財団法人 放射線影響研究所 副理事長室 顧問）

分担研究者：中村 麻子（茨城大学 理学部 放射線生物学 教授）

研究要旨

原爆被爆者に代表される高線量放射線に被曝した集団では、放射線被曝が循環器疾患の発症リスクの上昇と相関すると報告されている。しかし、その結果には不確実性が存在するとの報告もある。我々は循環器疾患のリスクが被曝線量に相関して上昇するか否かを動物実験にて調べる。特に、低線量・低線量率放射線被曝と循環器疾患の関係およびその機序の解明を行う。モデル動物として、放射線のような外的要因が循環器疾患におよぼす影響を見る際に広く使われている、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット（SHRSP）を用いる。先行実験では、100mGy 照射群においても非照射群に比べて脳卒中症状の発症時期の早期化が見られた。このように、本実験系では極めて高感度で放射線の循環器疾患への影響を調べることが可能である。100mGy 未満の低線量域および50mGy および100mGy/日の低線量率放射線の影響を調べる。血液や臓器切片の試料を用いて、種々のバイオマーカーを解析することにより放射線の作用機序を解明するとともに、高感度で低線量の影響を検出できるマーカーを同定する。これらを利用して、より低線量・低線量率放射線の影響を検討する。この結果を用いることにより、リスクの低減化法を考案することを目指す。

キーワード

動物モデル、循環器疾患リスク、放射線影響、放射線被曝、低線量・低線量率放射線

研究協力者

津山尚宏・公立大学法人・福島医科大学・医学部・准教授

水野初・公立大学法人・静岡県立大学・薬学部・講師

大石和佳・公益財団法人・放射線影響研究所・臨床研究部・部長

三角宗近・公益財団法人・放射線影響研究所・統計部・研究員

村上 秀子・益財団法人・放射線影響研究所・分子生物科学部・ 来所研究員

I. 研究目的

放射線影響研究所(放影研)の原爆被爆者の調査結果は、循環器疾患のリスクが被曝線量と相関することを示唆している。しかし、核関連施設の作業者などから得た低線量域での結果には矛盾も含まれる。更に、被曝経験などよりもたらされた精神的ストレスでも循環器疾患のリスクは上がるなど、交絡因子の存在が問題を複雑にしている。そのため、United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation(UNSCEAR; 原子放射線の影響に関する国連科学委員会)などの国際機関は、動物実験により得られる低線量被曝と循環器疾患リスクの相関についての知見を求めている。本研究では、①この事象を動物実験で検証とともに、低線量域・低線量率の放射線と循環器疾患のリスク上昇における相関を明らかにする。②放射線により循環器疾患がいかなる機序で生じるかを新しい方法を導入して検証する。③その過程で得られた新規マーカーを用い得られた機序から循環器疾患リスクを低減化する方法論を得る。過去 2 年間の研究では、①に関しては、脳卒中発症時期の早期化を指標にした場合は、しきい値の存在が考えられた。また線量率効果が存在する可能性が考えられたので、来年度はその確認を行う。②については、機序を推定する可能性を示す結果が得られている。③では、これらの結果に来年度の結果を合わせて得られた機序を基に循環器疾患リスクを低減化する方法論を構築する努力を行う。本研究において用いられている動物種は循環器疾患を高頻度で発症するという特殊なモデル系であるため、そこで得られた事象がヒトの場合には直接適用できないかもしれないが、ヒトにおける放射線に相関する循環器疾患リスクを理解するには有用と考えられる。

II. 研究方法

1. 低線量放射線と脳卒中発症リスクとの相関を観察した。50mGy 照射した SHRSP (42 匹)、非照射対照群(38 匹)を用いて脳卒中発症時期を指標として、放射線の影響を観察した。
2. 低線量率放射線と循環器疾患リスクの上昇との相関を検討した。線量率としては 50mGy/日および 100mGy/日を、また集積線量としては 0.5Gy(100mGy/日×5 日)、1Gy(100mGy/日×10 日および 50mGy/日×20 日)および非照射群を用いた実験を行った。各群 10 匹を使用した。脳卒中の発症時期を指標として、先行実験で得られている一括照射群の結果と低線量率照射の各群を比較することにより、線量率の変化に伴う影響の変化を調べた。
3. 機序を調べるために、実験 1、実験 2、実験 3 を行った。実験 1 では、表に示した線量を照射した SHRSP(各群の匹数は表 II-1)を照射後 1 週間目で、実験 2 では照射後 3 週間目で、実験 3 では 5 週間目で全血採取し、得た試料を用いてバイオマーカー測定、メタボローム解析、DNA 損傷、老化レベル、炎症反応などを観察する。サイトカイン類(免疫

細胞のあいだで情報伝達を担うタンパク質の総称)の測定はバイオラッド社製のマルチプレクスキットを用い、同社のマニュアルに従って、放影研で行った。メタボローム解析は、静岡県立大学の水野に試料を送付して次項で記述した方法に従って測定を行い、結果の解釈は水野と福島医科大学の津山が共同で行った。DNA 損傷、老化レベル、炎症反応などの測定は茨城大学の中村が実施した。(方法の詳細は中村の報告書を参照) この結果と先行研究において高血圧症自然発症ラット(SHR)を用いて同一の指標を調べた結果とを比較して、放射線がいかんして循環器疾患のリスクを上昇させるかの機序に関する仮設の構築を実施中である。

表II-1実験のスキーム

実験番号	0mGy	100mGy	250mGy	500mGy
1	10	10	10	10
2	10	10	10	10
3	10	10	10	10

4. メタボローム解析は次記のようにして行った。冷凍下で送付された血清をメタノール抽出し、親水クロマトグラフィ(BEH Amide, 2.1×150 mm, Waters)で分離し、質量分析計(Xevo G2-XS QToF, Waters)によって得られたデータは解析ソフト(Progenesis QI, Waters)にてピーク抽出、アライメントした後、分散分析、多変量解析、t-検定により試料間の比較を行い、線量に伴い増減を示す分子を抽出した。得られたピークの精密質量値からデータベース検索(KEGG, METLIN, LIPID MAPS)を行い代謝物の推定を行った。尚、安定同位体窒素(¹⁵N)により標識化したクロレラ乾燥粉末を標品として、上記分析を行い、質量分析計で得られたデータは解析ソフト(MS-DIAL, RIKEN PRIME)によりピーク抽出およびアライメントを行った。得られたピークの精密質量値から¹⁵N標識化クロレラ代謝物を抽出し、それらを内部標準ピークとして血清から得られたデータを補正した。

(倫理面への配慮)

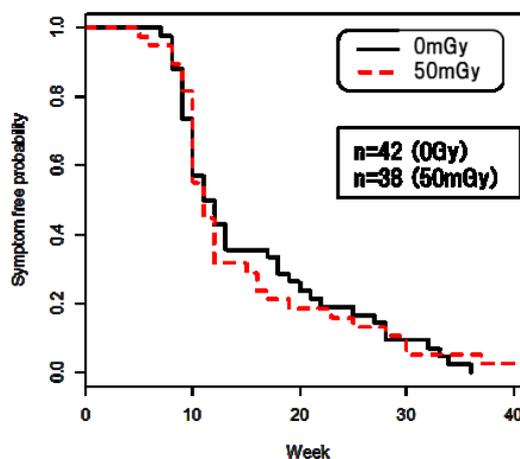
本研究は、ヒトを研究対象として行うものではない。動物実験に関しては、広島大学動物実験指針を遵守するとともに、「動物の愛護及び管理に関する法律」並びに「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に則って計画を作成し、広島大学動物実験委員会より承認を受けて実施している。実施する動物実験等は通常の実験範囲のものであり、特段、倫理的に問題のあるものとは思われない。

III. 研究結果

1. 低線量放射線を一括照射した場合の放射線と脳卒中発症時期の相関

50mGy 照射した SHRSP を用いて脳卒中発症時期を観察した。発症時期を時間の経過に伴うリスクの推移を考慮に入れながら、暴露の効果を解析する際に広く用いられる Kaplan-Meier 法で解析した。(図 III-1)

図 III-1 で示したように脳卒中発症リスクを時間的要素を加えて解析(コックス回帰)して得られた、0mGy に対する相対的な危険度の比は、 $\times 1.025$ で p-値は 0.91 であった。この結果は、50mGy 照射群と非照射群の間には、脳卒中発症時期に関して有意な差がないことを示している。一方、平成 28 年度の報告書で述べたように 100mGy 照射した SHRSP では発症時期の有意な早期化が認められた。即ち、同様にして得た相対的な危険度比(0mGy に対する)は、 $\times 1.81$ で p-値は 0.05 であった。この結果は 50mGy と 100mGy の間にしきい値が存在することを示唆している。



図III-1 低線量(50mGy)放射線を一括照射したSHRSPの脳卒中発症時期

2. 低線量率放射線を緩照射した場合の放射線と脳卒中発症時期の相関

線量率効果を調べる実験を行った。UNSCEAR 2012 Report¹ で記載されている低線量率とは 144mGy /日未満である。そこで本研究では、線量率としては 50mGy/日および 100mGy/日を用いた。集積線量として、0.5Gy および 1.0Gy を用いた。尚、0.5Gy および 1.0Gy を一括照射した SHRSP では、脳卒中の発症時期が有意に早期化することが先行実験で示されている。緩照射した SHRSP より得られた結果を図 III-2 で示した。このように、線量率が低い場合では、放射線照射にともなう発症時期の早期化は全く認められないことがわかった。

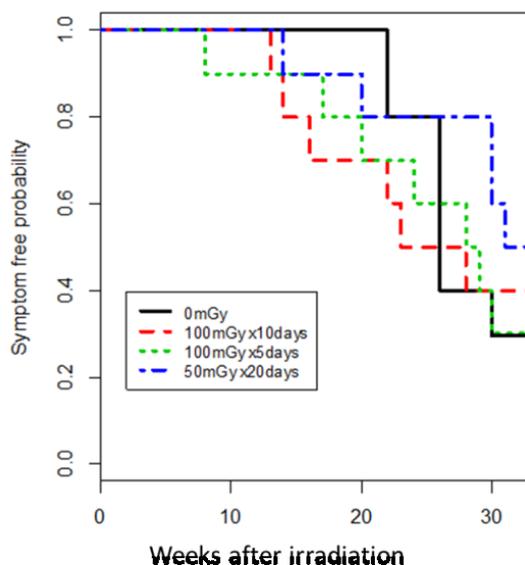


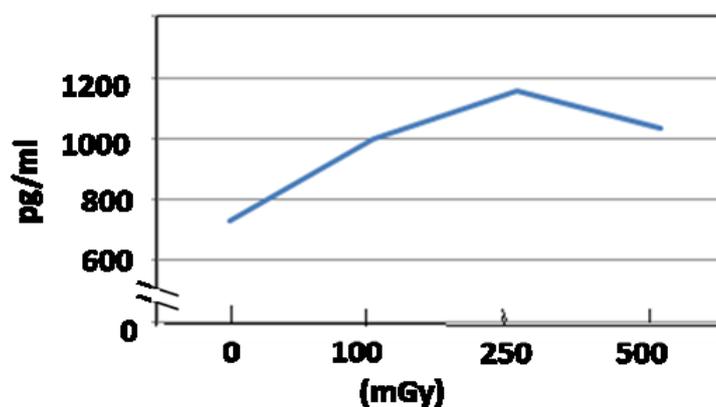
図 III-2 低線量率放射線を照射したSHRSP の脳卒中発症時期

3. 血清バイオマーカーの測定結果

SHRSP に 100、250、500mGy を照射し、照射後 1、3、5 週目に得た血清を用いて、12 種類のサイトカインの濃度測定およびメタボローム解析を行った。

- ①サイトカイン測定の結果。検査した種類は 12 種である。免疫系の活性化や調節を行うことで知られているインターロイキン(IL)-1 α 、1 β 、2、4、5、6、10、12p70、13、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)、ウイルス抑制因子であるインターフェロン(INF)- γ 、腫瘍壊死因子(INF)- α から構成されている。

図 III-3 では、例として 1 週目で採取した血清から得られた IL-13 の結果を示している。0mGy に比べて照射群で高値を示す傾向は IL-5 GM-CSF 以外の 10 種類のマーカーでも認められた。同様な傾向は照射後 3 週目で



図III-3 サイトカイン(IL-13)の濃度と放射線量の関係。照射後1週間目のSHRSPの血清を用いた。

得られた試料でも観察されたが、5 週目の試料では認められないようである。現在、再試験および試料数を増やすことにより結果の確認を行っているところである。この結果から、100mGy のような低線量でも照射により細胞にダメージが生じ、それに伴う炎症反応が認められた。その事象は少なくとも 3 週間は持続するものと考えられる。

- ②メタボローム解析。

照射後 1 および 5 週目の SHRSP の血清試料から得られた各 LC-MS (液体クロマトグラフィー-質量分析) データのクラスタ解析を行ったところ、放射線照射有無により区別することができた (データ不掲載)。さらに判別分析により、1 週目および 5 週目のそれぞれにおいて放射線照射した SHRSP の血清で特異的に変動が観察されたピークを探索したところ、1 週目および 5 週目で、それぞれで約 2,600 本、300 本が抽出された (データ不掲載)。これらのピークには、照射後 1 週目のみで変動しているピークと、1 週目・5 週目とも継続して変動しているピークの 2 通りがあることが分かった。これらのピークの精密質量値から各種代謝物データベースをもちいて代謝物を推定した結果、照射後 1 週目のみで変動の大きかった代謝物としては、TCA サイクルや糖代謝関連代謝物が挙げられた。一方で継続的

に変化していた代謝物としてコール酸やその代謝物が挙げられた (図 III-4)。

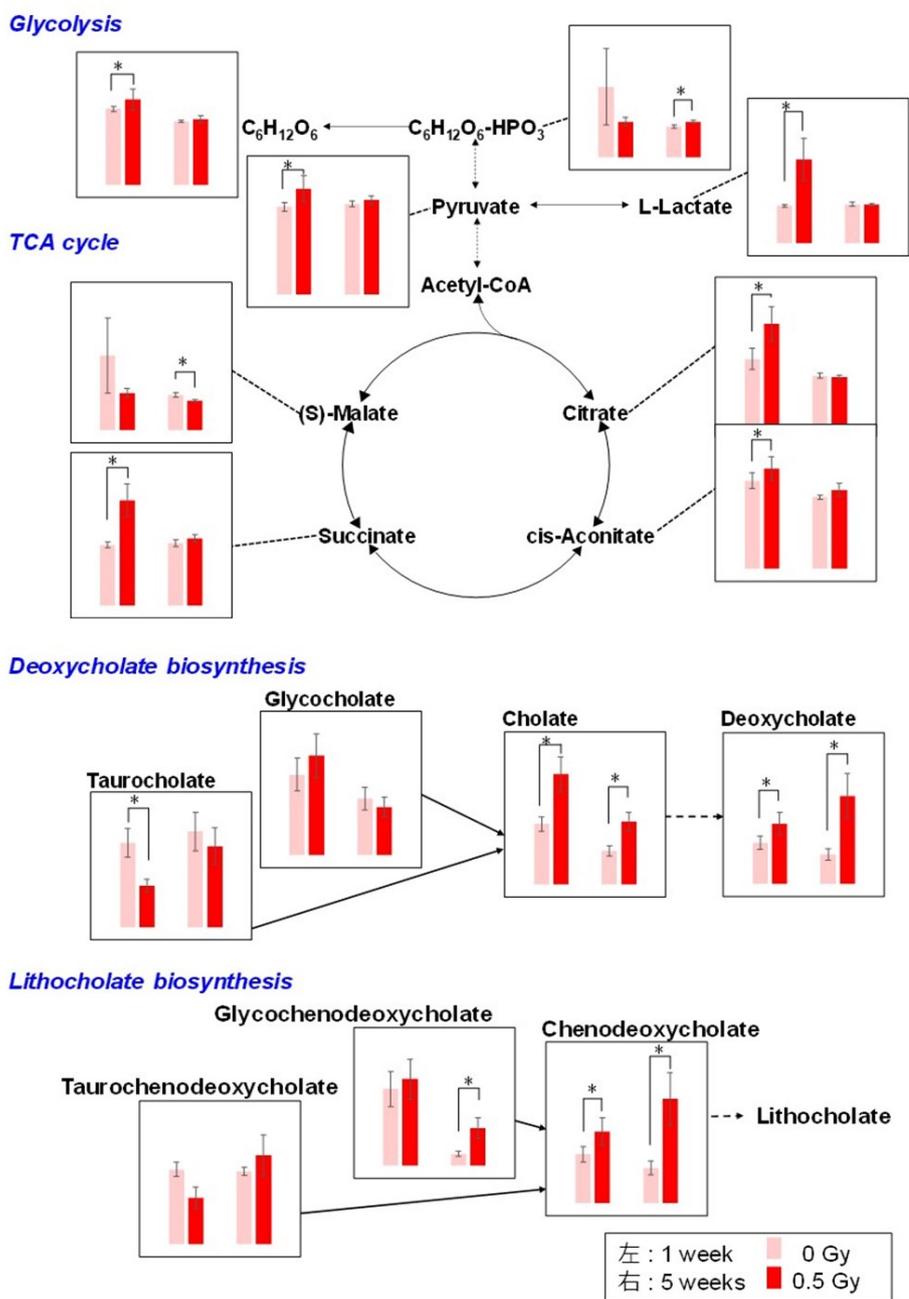


図 III-4 低線量放射線被照射したSHRSPの血清中の解糖系、TCAサイクル、および胆汁酸合成に関連する代謝物の変動。

IV. 考察

放射線被曝と循環器疾患リスクが相関することについては、高線量一括照射した SHR および SHRSP を用いた先行動物実験で、それがストレスなどの修飾要因ではなく放射線そのものの影響であることが有力に示唆された²。そこで、本プロジェクトではより低い線量の影響を観察した。100mGy 照射した SHRSP では非照射群に比べ脳卒中発症時期の有意な早期化が認められたのに対して、50mGy 照射群では早期化は認められなかった。このことより、この間にしきい値が存在することが示唆される。多細胞影響では、従来はしきい値の存在が考えられ、循環器疾患のしきい値は 0.5Gy としている。しかし、この値は被曝したヒトの1%が10年以上あとに循環器疾患を発症する線量から類推したもので実際の観察に由来するものではない。(ICRP Publication 118³) 原爆被曝者を対象とした疫学研究では、観察初期(被曝後 20 年目まで)では、0.5Gy 付近にしきい値が存在すると報告されているが、観察期間を変えた(被曝後 20 年目から 58 年目)解析では、しきい値なし直線仮説(LNT)に適合してくると報告されている。(小笹ら⁴) 更に Little ら⁵は、10 集団からなる医療被曝および職業被曝したヒトおよび原爆被曝者のうち被曝線量が 0.5Gy 以下から得た死亡率データを用いて循環器疾患のメタ解析を行ったところ、その相対リスクは LNT 仮説に適合していると考えられた。従って、この説に従えば、極めて低線量領域においても放射線量に比例して循環器疾患リスクが上昇することが示唆される。一方、今回我々が得た SHRSP を用いた実験結果では、少なくとも 50mGy 以下ではリスクの上昇は認められなかった。この結果の違いは、我々が用いたラットストレインに由来するのかもしれない。極めて興味深いところであるので、今後検討する必要があると考えられる。

低線量率放射線と循環器疾患のリスクの相関を調べた結果は、興味深いものである。即ち、0.5Gy および 1Gy の放射線が一括照射された SHRSP では脳卒中発症時期は非照射の発症時期に比べて有意に早期化していたのに対して、低線量率(100mGy/日および 50mGy/日)放射線を集積線量が 0.5Gy および 1Gy になるまで照射した SHRSP では、照射群の脳卒中発症時期と非照射 SHRSP の発症時期と間には全く差は認められなかった。一方、ICRP Publication 118³では、一括照射、分割照射、緩照射の間で、そのしきい値に差はないと仮定されている。このことは非常に重要なことと考えられるので、平成 30 年度では、SHRSP の個体数を増やした実験を行い、再現性の検証を行う。

測定した 12 種中 10 種のサイトカインの濃度は、照射後 1 週目、3 週目で得た血清中では非照射群のものより増加していたのに対して、5 週目では差異は認められなかった。放射線により生じた炎症にともない種々のサイトカインが分泌され、その濃度が上昇する。しかし、時間経過にともない炎症の修復が起こるので、その濃度は減衰すると考えられる。その修復過程でも、サイトカインなどが産生され、種々の細胞の線維化が起こることは良く知られている。このように炎症に伴い分泌されたサイトカインは循環器疾患の一因となっているものと考えられる。

SHRSP の血清代謝物分析により、放射線被曝後に様々な代謝物が増加していることが分か

った。即ち、照射 SHRSP では、細胞のエネルギー産生に關与する TCA 回路や糖代謝に關係する代謝物が、低線量照射後 1 週目という比較的短時間で大きく変動し、5 週目では非照射群とはほぼ同等の数値に回復した。照射後 1 週間では多くの代謝物が有意に変動したことから、ラット体内において、放射線照射により細胞損傷や修復などの劇的な変化が一時的に起こっていることが示唆された。一方、胆汁酸生合成に關連するコール酸などの代謝物は、照射後 1 週間で大きく変動し、その後 5 週間でも変化し続けていることから、ラット体内で慢性的な脂質やコレステロールの代謝変化が起き、これらが循環器疾患の発症の原因の一端を担っていることが示唆された。

分担研究者の中村らの研究の結果は、放射線照射された SHR では、腎臓で認められた二次的な DNA 損傷は炎症性サイトカインの上昇によるマクロファージの活性化、そして酸化ストレスの上昇に起因するものではないかと思われた。また、二次的な DNA 損傷レベルの上昇および細胞死の上昇は、腎機能障害を誘発していることが示唆された。以上の結果は、放射線誘発性腎機能障害が、循環器臓器への負荷を増大させ、高血圧を始めとする循環器疾患を誘発している要因の一つであることを示す重要な知見である。詳細は中村の報告を参照されたい。

V. 結論

この実験計画で用いているモデル動物は、我々の先行実験でも示されている通り、極めて高感度で放射線と循環器疾患の発症リスクとの関係を観察することができる。一方、このモデル動物は高血圧、脳卒中を発症するモデルであり、この成果が直ちに、ヒトにおける放射線と循環器疾患のリスクの相関を直接的に証明しているものではない。しかし、ヒトを用いた研究(例えば、疫学的研究)では、低線量・低線量率放射線の影響を証明することは極めて困難であり、また不確実性を伴っている。そのため動物実験で得られる情報も、大変有意義であると考えられている。平成 29 度の研究結果より、脳卒中発症時期を指標とした場合、50mGy と 100mGy との間にしきい値が存在することが推定された。

線量率の変化に伴う影響の評価には、今回用いたような高感度な動物実験は有効であると思われる。未だ未完了な段階ではあるものの、低い線量率で緩照射した SHRSP では集積線量が高い場合でも、脳卒中の発症時期の早期化は観察されなかった。このことは極めて興味深いことであるので、結果の再現性を平成 30 年度で確認する。

『どのような機序で放射線と循環器疾患リスクの上昇が相関するか?』と言う命題に関しては、種々の興味あるデータが得られた。即ち、線量の増加に伴う DNA 損傷レベルの上昇および細胞死の上昇が腎機能障害の亢進をもたらすこと、また炎症マーカーレベルおよび循環器疾患に相関する代謝産物の変化などである。平成 30 年度ではこれらの現象の確認およびより詳細な線量との相関を調べることにより、機序の解明に近づきたいと考えている。その過程で『放射線がいかなる機序で循環器疾患のリスクを上げているか?』の情報が得られれば、それを基にリスクを低減化する方法論のヒントが得られることが期待される。

VI. 次年度以降の計画

- ① 平成 29 年度に得た機序に関する研究は、放射線被曝がどのような機序で循環器疾患リスクを上げるかに関して興味あるデータを示している。即ち、放射線によりもたらされた DNA 損傷が炎症マーカー、酸化損傷、アポトーシス、代謝物の量的変化をもたらし、それが総合的に循環器疾患のリスクを上昇させているという機序が考えられる。そこで、平成 30 年度は、種々の線量を照射した WKY(Wister-Kyoto)、SHR および SHRSP を用いるとともに、照射後の期間を変えた実験を行いこの仮説を検証する。WKY は SHR および SHRSP のもとになったラットで、循環器疾患に高感受性を有さないモデルラットとして加える。これらから得た血液試料を用いて、代謝物及び代謝経路の網羅的な調査、サイトカインの濃度測定、血球成分の分析、生化学検査などを行う。また凍結組織試料は中村分担研究者により DNA 損傷、老化レベル、炎症反応などの検査が行われる。この結果と、先行研究において得た SHR および SHRSP につき同じ指標を調べた結果を比較し、放射線がいかにして循環器疾患のリスクを上昇させるかの機序を検証する。この違いをもたらしている可能性のある指標を見つけ、平成 29 年度に構築した機序の検証を行う。
- ② 低線量率放射線を照射した実験より平成 29 年度に得られた結果、即ち『低線量率(50mGy/日および 100mGy/日)の放射線を集積線量(0.5Gy および 1Gy)で照射しても、同じ線量を一括照射した時に認められた発症時期の早期化が認められない』の再現性を検証する。指標としては前回と同様に、脳卒中症状の発症時期を時間の経過に伴うリスクの推移を考慮に入れながら、暴露の効果を解析する際に広く利用されている Kaplan・マイヤー法を用いて統計解析する。今回の結果を単独に統計解析するとともに平成 29 年度の結果と一緒にした解析も行う。非照射群と比べて、発症時期に早期化が観察されるかを検討する。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

- 1) 該当なし

B. 論文：査読なし

- 1) 該当なし

C. 学内学会発表

- 1) ○高橋規郎. 放射線被曝と循環器疾患の関係-動物モデル実験-. 第 198 回 原医研セミナー、July 20、2017、広島
- 2) ○津山尚宏、水野初、山本健太、植田一樹、三角宗近、村上秀子、大石和佳、長町安希子、稲葉俊哉、児玉和紀、高橋規郎 高血圧自然発症ラット (SHR) 血漿/血清を用いた放射線誘発高血圧の経時変動指標分子探索、日本放射線影響学会第 60 回大会、Oct 26-28、2017、千葉

- 3) ○朽木弥緒、佐藤未紗、高橋規郎、中村麻子 放射線量依存的な循環器疾患誘発メカニズムの解析、日本放射線影響学会第60回大会、Oct 26-28、2017、千葉
- 4) ○山本健太、上田一樹、水野 初、津山尚宏、三角宗近、村上秀子、大石和佳、長町安希子、稲葉俊哉、豊岡利正、高橋規郎、轟木堅一郎 高血圧自然発症ラット (SHR) 血清を用いた放射線と相関する高血圧症の経時変動指標分子探索、第7回新アミノ酸分析研究会第7回学術講演会、Dec. 12、2017、東京
- 5) ○山本健太、上田一樹、水野初、津山尚宏、三角宗近、村上秀子、大石和佳、長町安希子、稲葉俊哉、豊岡利正、高橋規郎、轟木堅一郎 低線量放射線被ばくによる血清中代謝変動解析と循環器疾患関連分子探索、日本薬学会第128年会、Mar. 28、2018、金沢

D. 国際学会発表

- 1) ○Kuchiki M, N Takahashi and Nakamura AJ. The radiation dose dependent cellular responses in spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of cardiovascular disease. 63rd Annual international meeting Radiation Research Society, Oct 15 - 18, 2017, Cancun, Mexico.
- 2) ○N. Takahashi, H. Murakami, Y. Niwa, W. Ohishi, M. Misumi, A. Nagamachi, T. Inaba, S. Tanaka, I. Braga-Tanaka, N. Tsuyama, A. J. Nakamura, K. Kodama. 63rd Annual international meeting Radiation Research Society, Oct 15 - 18, 2017, Cancun, Mexico.

E. 著書

- 1) 該当なし

F. 講演

- 1) 『施設公開(オープンハウス)で環境中に放射線に関する実験および説明』 Aug. 5-6、2017 放射線影響研究所、広島
- 2) 『出前授業』(主催; 広島市立沼田高校)、Sep. 23、2017、広島市立沼田高校、広島
- 3) 『放射線に関するデモンストレーションおよび講義』埼玉県立鶴ヶ島清風高校、Oct. 24、2017、放射線影響研究所、広島
- 4) 『出前授業』(主催; 広島市立古田中学)、Feb. 22-23、2018、広島市立古田中学、広島

G. 主催した研究集会

- 1) 該当なし

H. 特許出願・取得

- 1) 該当なし

I. その他

- 1) 該当なし

VIII. 参考文献

- 1) UNSCEAR 2012 Report. BIOLOGICAL MECHANISMS OF RADIATION ACTIONS AT LOW DOSES – A white paper to guide the Scientific Committee’s future programme of works.
- 2) Takahashi I, Ohishi W, Mettler FA Jr, Ozasa K, Jacob P, Ban N, Lipshultz SE, Stewart FA, Nabika T, Niwa Y, Takahashi N, Akahoshi M, Kodama K, Shore R. A report from the 2013 international workshop: radiation and cardiovascular disease, Hiroshima Japan. *J Radiol Prot.* 33(4):869-80, 2013. doi: 10.1088/0952-4746/33/4/869.,
- 3) ICRP, 2012. ICRP Statement on Tissue Reactions / Early and Late Effects of Radiation in Normal Tissues and Organs – Threshold Doses for Tissue Reactions in a Radiation Protection Context. ICRP Publication 118. *Ann. ICRP* 41(1/2).
- 4) Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, Kasagi F, Soda M, Grant EJ, Sakata R, Sugiyama H, Kodama K. Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950-2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiat Res.*;177(3):229-43, 2012
- 5) Little MP, Azizova TV, Bazyka D, Bouffler SD, Cardis E, Chekin S, Chumak VV, Cucinotta FA, de Vathaire F, Hall P, Harrison JD, Hildebrandt G, Ivanov V, Kashcheev VV, Klymenko SV, Kreuzer M, Laurent O, Ozasa K, Schneider T, Tapio S, Taylor AM, Tzoulaki I, Vandoolaege WL, Wakeford R, Zablotska LB, Zhang W, Lipshultz SE. Systematic review and meta-analysis of circulatory disease from exposure to low-level ionizing radiation and estimates of potential population mortality risks. *Environ. Health Perspect* 120: 1503–1511, 2012

The association between either low-dose or low-dose rate radiation exposure and increasing risk of circulatory diseases. - Attempt to infer potential mechanisms underlying the radiation associated circulatory diseases -

N. Takahashi¹, H. Murakami², W. Ohishi³, M. Misumi⁴, N. Tsuyama⁵, A. J. Nakamura⁶, H. Mizuno⁷

¹Consultant, ²Depts of ²Molecular Biosciences, ³Clinical Studies, and ⁴Statistics, Radiation Effects Research Foundation (RERF), ⁵Dept. of Radiation Life Science, Fukushima Medical University School of Medicine, ⁶Dept. of Biological Science, College of Science, Ibaraki University, ⁷Laboratory of Analytical and Bioanalytical Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Japan

Abstract

Previous epidemiological findings among atomic bomb survivors conducted at RERF indicated that radiation may be associated with increased risk of circulatory diseases (CD). On the other hand, inconsistencies have been observed among various studies, especially low-dose and low-dose rate occupational and environmental exposures. Given the uncertainties, studies using irradiated animals are being conducted to assess whether or not risk of CD is elevated associated with radiation exposure. We also have been obtaining information about biological mechanisms through animal model studies.

Irradiated stroke-prone spontaneous hypertensive rats (SHRSP), even at 0.1Gy, showed stroke symptoms significantly earlier than unirradiated rats. However, SHRSP irradiated with 0.05Gy did not show those effects. This suggested there a threshold in the radiation dose effect between 0.05 and 0.1Gy. With respect to dose rate exposure, preliminary examinations, where SHRSP rats were chronically irradiated with an accumulated dose of 0.5 or 1Gy (dose rate was 0.05 or 0.1Gy/day, respectively), did not show any significant radiation effects.

To elucidate mechanisms of radiation-associated CD, we have measure blood markers, such as cytokines, biochemical substances, and metabolites. We collected the biomarker data from SHRSP rats irradiated with 0.1, 0.25, or 0.5Gy and sequentially sacrificed at 1, 3 and 5 weeks after irradiation, and compared marker levels among groups.

Metabolome analyses for sera from SHRSP demonstrated that the levels of

some metabolites, such as bile acids, were altered with radiation doses. Moreover, various cytokines, such as IL-2 and IL6, were also altered. Those were closely related with cause of CD.

The introduction of various assay systems may provide valuable data for inferring mechanisms of CD at lower-dose radiation exposure and long-term, effects after irradiation.

Keywords

keyword1; circulatory diseases, keyword2; radiation effect

2-6-a 低線量放射線は循環器疾患のリスクを上げるか？低線量率放射線は？

放射線関連循環器疾患の機序の解明

放射線被曝後の DNA 損傷応答、炎症反応および細胞老化が

循環器疾患発生に与える影響の明確化

分担研究者：中村 麻子（茨城大学 理学部 放射線生物学 教授）

研究要旨

放射線誘発生物影響として最も社会的関心が高い疾患が癌であるが、原爆被爆者に対する調査などから、循環器疾患も放射線によってその発症リスクが線量依存的に上昇する疾患として考えられている。しかしながら、これまでの疫学的な調査では放射線以外の環境リスク因子の影響を排除することの難しさなどから、放射線が循環器疾患リスク上昇の直接的な因子であるという証明には至っていない。一方、高血圧自然発症ラット（SHR）や易脳卒中発症ラット（SHRSP）などの動物モデルを用いた先行研究では、放射線線量依存的に血圧上昇や脳卒中発生頻度上昇が認められることが分かっている。

そこで、本研究では放射線誘発性循環器系疾患の発症メカニズムの解明および、発症リスク低減のための分子標的同定を最終目的として、動物モデルを用いて様々な放射線応答反応を評価した。その結果、放射線被ばくにより腎臓では晩発的な DNA 損傷応答および糸球体特異的な細胞死などが誘導されるとともに、心臓組織の線維化が生じていることが明らかとなった。これらの結果は、放射線誘発循環器疾患発生メカニズムを理解する上で重要な知見となりうると期待する。

キーワード

H2AX、DNA 損傷、炎症反応、細胞老化、

研究参加者

朽木未緒（茨城大学 修士）

I. 研究目的

先行研究から放射線被ばくによって循環器系疾患のリスクが上昇することが示唆されている。しかしながら、循環器疾患リスク上昇と放射線線量・線量率との相関性や、発症の分子メカニズムについては全く不明である。現在懸念されている低線量率慢性放射線被ばくによる健康影響を評価するためには、放射線被ばくと循環器疾患リスクとの関係性を分子レベルで明確にし、リスク上昇の危険性がある場合にはその低減策を確立することが重要である。そこで本研究計画では、放射線による循環器疾患誘導を観察可能な動物モデル（SHR ラットモデルおよび SHRSP ラットモデル）を用いて、放射線被ばく後の経時的な細胞組織学的変化を様々な分子マーカーを用いて検討した。具体的には、放射線被ばく後の SHR ラットおよび SHRSP ラット由来の凍結臓器サンプルについて、薄切組織切片の作製し、DNA 二本鎖切断、細胞死酸化 DNA 損傷、活性マクロファージに対する分子マーカーを用いた免疫蛍光染色による組織応答反応の評価を行った。昨年度までに、放射線照射後 10 週目以降の SHR ラット由来腎臓において顕著な DNA 損傷の誘導が認められた一方で、解析したすべての臓器において細胞老化の上昇は認められなかった。本年度は、検出された晩発的な DNA 損傷応答の活性化がどのようなメカニズムによって誘発されているのかを解明するために、酸化損傷レベルや炎症反応レベルについて検討を行った。また、腎臓以外の循環器臓器に放射線照射によって機能障害が誘発されているかを検討するために、溶血反応の検証や、組織線維化レベルについても評価を行った。また、血清サンプルを用いて血中の炎症性シグナル分泌タンパク質であるサイトカインの定量を抗原抗体法の一つである Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法を用いて行った。

II. 研究方法

昨年度に引き続き、主任研究者より冷凍宅配便にて送付された放射線被ばく後の SHR ラットおよび SHRSP ラット由来の Optimal Cutting Temperature (OCT) コンパウンド包埋凍結臓器サンプルについて、薄切組織切片の作製を茨城大学にて行った。作製された薄切組織切片は DNA 二本鎖切断 (分子マーカーとして γ -H2AX)、アポトーシス (分子マーカーとして annexin V)、酸化 DNA 損傷 (分子マーカーとして 8-OHdG)、活性マクロファージ (分子マーカーとして RM-1) に対する分子マーカーを用いた免疫蛍光染色による組織応答反応の評価を行った。さらに、臓器の機能障害を検討するために、ベルリンブルー染色法による溶血反応の検証や、組織線維化レベル (分子マーカーとしてコラーゲン I) についても評価を行った。また、血清サンプルを用いて血中の炎症性サイトカイン (CCL2) の定量を ELISA 法により行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、主任研究者 (高橋規郎) より送付された血液および臓器サンプルにて行うものである。従って、茨城大学では新たな動物実験は実施しない。

III. 研究結果

1. SHR ラット由来腎臓および心臓組織における放射線照射後の DNA 損傷応答

昨年度までの解析で放射線照射 SHR ラットの腎臓組織では線量依存的に晩発的 DNA 損傷が誘導されることが明らかとなっているが、この変化が SHR 特異的なものではないことを確認するために循環器疾患非発症コントロールとして放射線照射 Wister-Kyoto ラット (WKY) 由来の腎臓組織での DNA 損傷レベルを検討した。その結果、WKY ラット由来の腎臓ではいずれの線量被ばくに対しても DNA 損傷の誘導は認められなかった (図 III-1)。同様の実験を、心臓組織で行ったところ、SHR ラット由来心臓組織では線量依存的な DNA 損傷の上昇傾向が認められるものの、有意な変化ではなかった (図 III-2)。WKY ラットについては腎臓同様に DNA 損傷の誘導は全く認められなかった。

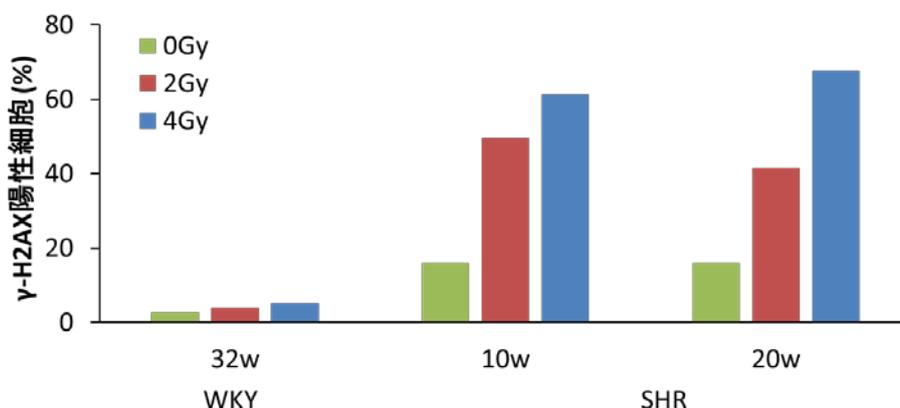


図 III-1 腎臓組織における放射線照射後の DNA 損傷誘導。薄切切片を γ -H2AX で染色し、 γ -H2AX 陽性細胞の比率をグラフ化したもの。

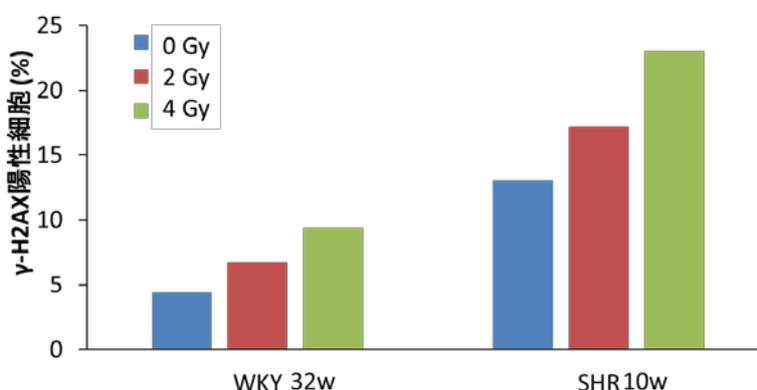


図 III-2 心臓組織における放射線照射後の DNA 損傷誘導。薄切組織切片を γ -H2AX で染色し、 γ -H2AX 陽性細胞の比率をグラフ化したもの。

2. 放射線照射 SHR 由来腎臓組織におけるアポトーシスレベルの解析

検出された晩発的な DNA 損傷応答の活性化がどのようなメカニズムによって誘発されているのかを解明するために、腎臓組織におけるアポトーシスレベルおよび酸化損傷レベルを検討した。その結果、DNA 損傷応答と同様に SHR 特異的かつ線量依存的な上昇が認められた (図 III-3 および III-4)。興味深い事に、アポトーシスは腎臓における血液ろ過装置である糸球体に特異的に生じていた。

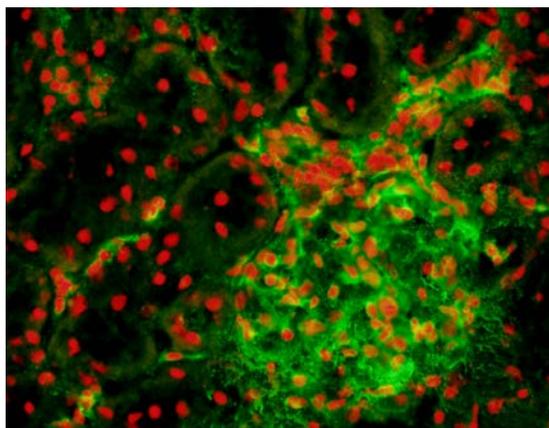


図 III-3 腎臓組織におけるアポトーシス誘導。4Gy の放射線照射後 20 週目の SHR ラット由来腎臓から作成した薄切組織切片をアポトーシスマーカーである annexin V によって染色した図。緑：annexin V、赤；核、を示す。

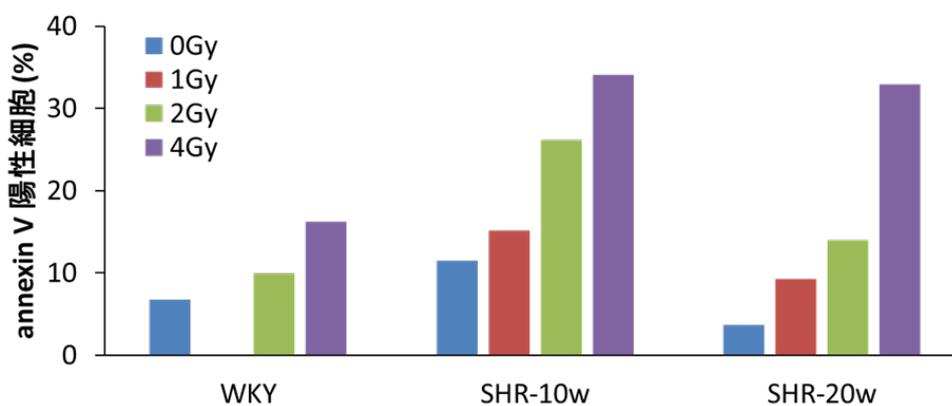


図 III-4 腎臓組織におけるアポトーシス誘導。Annexin V の陽性細胞の比率をグラフ化したもの。

3. 放射線照射 SHR 由来腎臓組織における溶血反応

放射線照射によって誘導された晩発的な DNA 損傷応答反応やアポトーシス反応は腎臓の機能障害を誘発している可能性が考えられる。そこで、組織障害の指標として組織の溶血反応を評価した。その結果、SHR ラット特異的かつ線量依存的な溶血反応の上昇が認められた (図 III-5)。

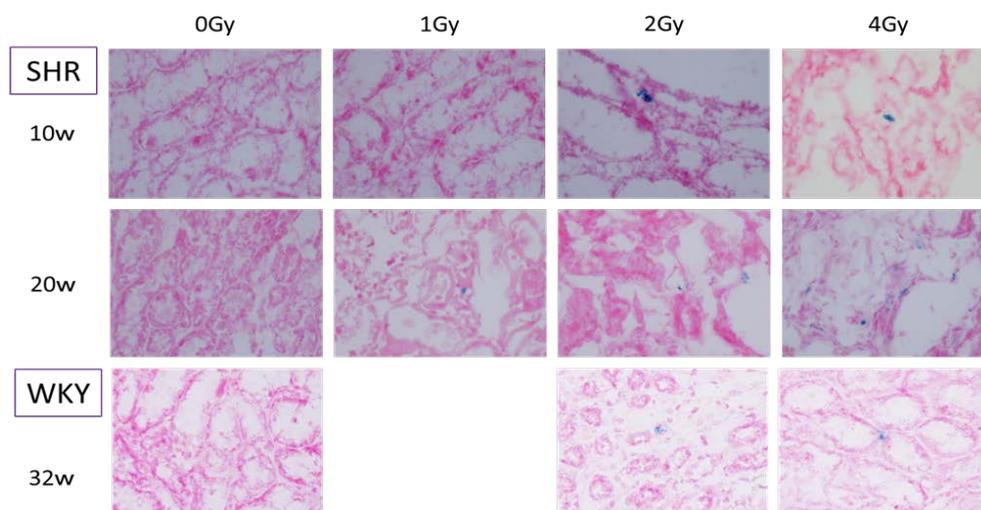


図 III-5 腎臓組織における溶血反応誘導。放射線照射後の SHR および WKY ラット由来の腎臓組織から薄切切片を作成し、ベルリンブルー染色を行った。ベルリンブルー染色は溶血によって露出したヘモデジリン (血鉄素) と反応することで青色を呈する原理を利用して溶血反応を検出する方法である。青色：溶血反応を示す。

4. 放射線照射 SHR 由来心臓組織における線維化

SHR ラットでは放射線照射後 10 週目から線量依存的な血圧上昇が認められ、高血圧リスクが極度に上昇する。高血圧発症においてこれまでの研究から心臓の線維化誘導を伴う心機能障害が大きな要因の一つであることがわかっている。そこで、放射線照射 10 週以降の心臓組織における線維化レベルを検討した。その結果、放射線線量依存的に組織の線維化レベルが上昇していることが明らかとなった (図 III-6)。

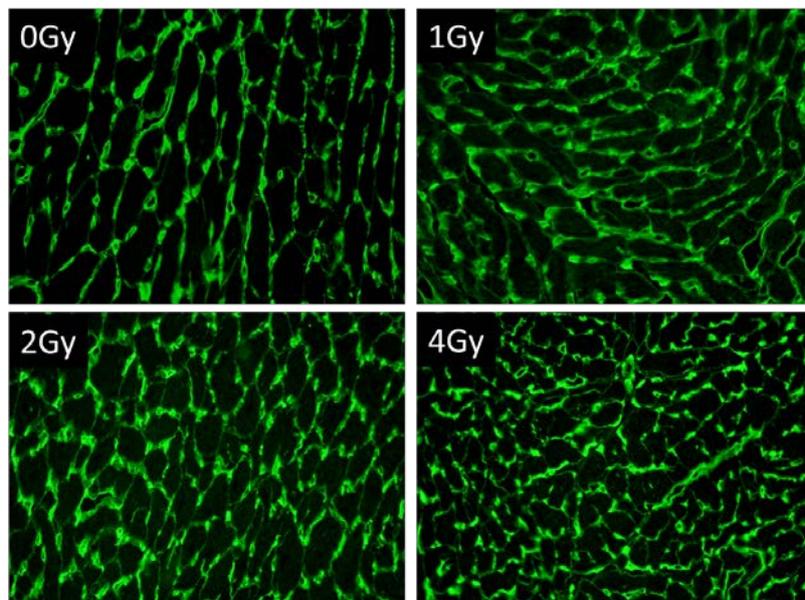


図 III-6 心臓組織における線維化誘導。SHR ラット由来心臓組織から薄切組織切片を作成しコラーゲン I で染色した。緑：コラーゲン I を示す。

5. 放射線照射後の血中サイトカインレベルの検討

放射線照射後の晩発的な DNA 損傷応答の活性化や酸化ストレスの上昇には放射線照射によって誘導される炎症反応が関与しているかどうかを検討するために、放射線照射後の SHR 血清中の炎症性サイトカイン CCL2 レベルを検討した。その結果、放射線照射後 1 週間で線量依存的な CCL2 の上昇が検出された (図 III-7)。また、放射線誘発性 CCL2 レベルは、照射後 10 週、20 週の血清中でも検出された (data not shown)。

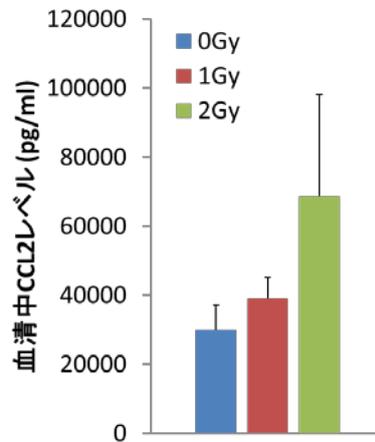


図 III-7 血清中に含まれる炎症性サイトカイン CCL2 レベル。放射線照射後 1 週の SHR ラットから採取した血清中に含まれる CCL2 レベルを示す。

IV. 考察

本年度は、腎臓組織で検出された晩発的な DNA 損傷応答の活性化がどのようなメカニズムによって誘発されているのかを解明するために、様々な分子マーカーを用いてそのシグナル経路の解明に挑んだ。その結果、DNA 損傷応答の活性化に相関して、放射線照射後 10 週、20 週の腎臓組織では、線量依存的な酸化損傷およびアポトーシスの誘導が認められた。このことは、放射線照射により直接的に誘導された DNA 損傷が修復されたのちに、酸化ストレスの上昇による DNA 損傷の誘導および細胞死誘導が生じていると考えられた。興味深いことに、アポトーシスは糸球体特異的に生じており、腎臓機能障害が予想された。そこで、腎臓機能障害の指標として腎臓の溶血反応を検討したところ、線量依存的な溶血反応が誘導されており、糸球体の機能不全あるいは腎臓機能の障害が示唆された。このような腎臓機能障害は、腎臓以外の循環器臓器に対しても影響を与えていることが心臓の線維化評価によって明らかとなった。線量依存的な線維化の上昇は、心臓機能障害に大きく関与すると予想される。最後に、腎臓で認められた組織応答変化に対して放射線誘発性サイトカインレベルの検討を行ったところ、血清中に含まれる炎症性サイトカイン CCL2 の線量依存的な上昇傾向が認められた。このことは、放射線照射によって誘発される炎症反応（慢性炎症）が循環器臓器、特に腎臓での組織応答を誘導していることを示唆している。

V. 結論

本研究の結果、放射線照射後 10 週および 20 週の SHR ラット由来の腎臓で検出された二次的な DNA 損傷は炎症性サイトカインの上昇によるマクロファージの活性化、そして酸化ストレスの上昇に起因するものではないかと考えられた。また、二次的な DNA 損傷レベルの上昇および細胞死の上昇は、腎機能障害を誘発していることが溶血反応評価からも示唆された。さらに興味深いことに、心臓組織では放射線量依存的な組織の線維化が認められた。以上の結果は、放射線誘発性腎機能障害が、循環器臓器への負荷を増大させ、高血圧をはじめとする循環器疾患を誘発している要因の一つであることを示す重要な知見である。

VI. 次年度以降の計画

放射線誘発性の腎機能障害が循環器疾患に重要な役割を果たしていることが明らかとなる一方で、その低線量域における組織応答はいまだ不明である。そのため、次年度以降は低線量放射線・低線量率放射線照射ラットサンプルを用いて、これまでに確立した放射線誘導循環器疾患誘発モデルの検証を行う。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

該当なし

B. 論文：査読なし

該当なし

C. 学内学会発表

- 1) ○中村麻子 “ヒストン H2AX のバイオロジー：DNA 損傷修復から上皮間葉転換まで” 第 5 回ヒストンバリエーション研究会, 2018.2.10 (八王子)
- 2) ○中村麻子、手塚諒哉、笹谷めぐみ、志村勉、神谷研二 “抗酸化剤による高 LET 放射線に対する DNA 損傷防護効果の検討” 日本宇宙生物科学会 第 31 回大会, 2017.9.21-22 (前橋)
- 3) ○石原将治、中村麻子, “上皮間葉転換 (EMT) 経路における H2AX の機能解析”, 日本放射線影響学会第 60 回大会, 2017.10.26-28 (千葉)
- 4) ○手塚諒哉、平山亮一、下川卓志、中村麻子, “Piceatannol による放射線防護効果の検討”, 日本放射線影響学会第 60 回大会, 2017.10.26-28 (千葉)
- 5) ○朽木弥緒、佐藤未紗、高橋規郎、中村麻子, “放射線量依存的な循環器疾患誘発メカニズムの解析”, 日本放射線影響学会第 60 回大会, 2017.10.26-28 (千葉)
- 6) ○大泉昂之、丸山里奈、中村麻子, “老化に伴う DNA 損傷修復能力低下の原因解明”, 日本放射線影響学会第 60 回大会, 2017.10.26-28 (千葉)
- 7) ○来栖圭介、島田義也、森岡孝満、西村まゆみ、柿沼 志津子、中村麻子, “Enrich

環境による放射線誘発性 DNA 損傷応答および炎症反応への影響”，日本放射線影響学会第 60 回大会, 2017.10.26-28 (千葉)

- 8) ○高橋健太、田村隆大、鈴木孝明、中村麻子，“PDMS チップを用いた DNA 損傷モニタリングシステムの開発”，日本放射線影響学会第 60 回大会, 2017.10.26-28 (千葉)

D. 国際学会発表

- 1) ○Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Yamashiro H, Abe Y, Takahashi S, Fukuda T, Isogai E, Bonner WM, Fukumoto M. “The Causal Relationship between DNA Damage Induction in Bovine Lymphocytes and the Fukushima Nuclear Power Plant Accident”. 2nd International Symposium of Quantum Beam Science at Ibaraki University, 2017.12.8-10 (Ibaraki, Japan)
- 2) ○Oizumi T and Nakamura AJ. “Analysis for mechanism of age-associated decline in DNA damage repair capacity”. 2nd International Symposium of Quantum Beam Science at Ibaraki University, 2017.12.8-10 (Ibaraki, Japan)
- 3) ○Nakamura AJ, Tetsuka R, Takahashi K, Tamura T, Suzuki T and Hirayama R. “Evaluation of novel radioprotective drug and development of DNA damage monitoring micro-nano device for triage of radiation exposure”. 63rd Annual international meeting Radiation Research Society, 2017.10.15-18Oct (Cancun, Mexico)
- 4) ○Oizumi T and Nakamura AJ. “Analysis for mechanism of age-associated decline in DNA damage repair capacity”. 63rd Annual international meeting Radiation Research Society, 2017.10.15-18Oct (Cancun, Mexico)
- 5) ○Kuchiki M, N Takahashi and Nakamura AJ. “The radiation dose dependent cellular responses in spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of cardiovascular disease”. 63rd Annual international meeting Radiation Research Society, 2017.10.15-18Oct (Cancun, Mexico)
- 6) ○Nakamura AJ. “Establishment of a technique for combining γ -H2AX detection with telomere-FISH for assessment of acute radiation syndrome risk” International Symposium on LIVING IN SPACE 2017, 2017.5.9 (Tokyo, Japan)

E. 著書

該当なし

F. 講演

該当なし

G. 主催した研究集会

該当なし

H. 特許出願・取得

該当なし

I. その他

該当なし

VIII. 参考文献

なし

The radiation dose dependent cellular responses in spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of cardiovascular disease.

Asako J Nakamura¹, Mio Kuchiki¹, Norio Takahashi²

¹*Department of Biological Sciences, College of Science, Ibaraki University, Ibaraki, Japan*

²*Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima, Japan*

The epidemiological studies of atomic bomb survivors, such as the Adult Health Study (AHS) and the Life Span Study (LSS) of Radiation Effects Research Foundation (RERF), revealed the causal link between radiation exposure and cardiovascular disease including stroke, heart failure, and myocardial infarction. In addition, the dose dependent increase of systolic blood pressure (SBP) in spontaneously hypertensive rats (SHR) model was demonstrated. These findings strongly suggest that radiation exposure associates cardiovascular disease. However, the molecular mechanisms of dose dependent effect and risk in cardiovascular disease have not been investigated in detail. Therefore, in this study, we aimed to clear the relationship between dose dependent cellular responses and cardiovascular disease in SHR rats and reveal the molecular mechanisms to identify the efficient clinical targets. The radiation-induced responses, such as DNA damage response, cellular senescence response and hemolysis response were evaluated by monitoring of γ -H2AX foci formation, the senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) level and Berlin blue staining, respectively. Our data shows the tissue specific responses on DNA damage response and hemolysis responses dose-dependent manner.

Keywords

H2AX, DNA damage, inflammation, cellular senescence

2-7 DNA 損傷・修復に基づく放射線・化学物質影響の統合と個人差の評価 に関する研究

主任研究者：松本 義久（東京工業大学 科学技術創成研究院 先導原子力研究所 准教授）

研究要旨

放射線影響は、環境や生活習慣に起因する内因・外因性の物質との複合曝露の結果として現れ、また、遺伝的要因による個人差も放射線の影響を大きく左右すると考えられる。本研究は、DNA 損傷、特に DNA 二重鎖切断の生成と修復に注目することにより、(1)放射線影響と化学物質影響の統合、(2)個人差の評価を行うことを目的として行った。

本年度、項目(1)に関しては、ヒト線維芽細胞、リンパ球細胞、大腸がん細胞、及びこれらから作製された DNA 損傷応答・修復関連遺伝子欠損細胞等を用いて、低線量率放射線及び化学物質の生存率、突然変異頻度等への影響を定量的に解析した。また、DNA 損傷応答・修復関連遺伝子及びタンパク質の発現量や存在状態の変化を解析し、比較検討を行った。その結果、100 μ Sv/h までの線量率の放射線では、細胞生存率低下や突然変異上昇などの影響は認められないことが分かった。また、得られたデータの分析と考察により、放射線と化学物質の影響を統合するための数理的モデルを考案した。

項目(2)に関しては、平成 30 年度の DNA 損傷応答と放射線・化学物質感受性の相関解析に備えて、日本人由来リンパ球細胞株 500 種類の中から、健常人由来のもの、がん患者由来のもの 20 種類ずつ、計 40 種類を入手し、パネルを作成した。

キーワード

DNA 損傷、DNA 修復、タンパク質リン酸化、DNA-PK、ATM、ATR

研究協力者

Young Rok SEO（東国大学校環境医学研究所（韓国）教授）

Ravindra Mahadeo SAMARTH（Bhopal Memorial Hospital & Research Centre
（インド） Assistant Professor）

Mukesh Kumar SHARMA (S.P.C.Government College (インド) Lecturer)

研究参加者

島田 幹男（東京工業大学 科学技術創成研究院 先導原子力研究所 助教）

Ali Reza AMIRI MOGHANI（東京工業大学 大学院理工学研究科 大学院生）

土屋 尚代（東京工業大学 環境・社会理工学院 大学院生）

Anie Day ASA De Castro（東京工業大学 環境・社会理工学院 大学院生）

加瀬 直也（東京工業大学 環境・社会理工学院 大学院生）

塚田 海馬（東京工業大学 環境・社会理工学院 大学院生）

山崎 あかね（東京工業大学 環境・社会理工学院 大学院生）

I. 研究目的

放射線影響は、環境や生活習慣に起因する内因・外因性の物質との複合曝露の結果として現れ、また、遺伝的要因による個人差も放射線の影響を大きく左右すると考えられる。本研究は、DNA 損傷、特に DNA 二重鎖切断の生成と修復に注目することにより、放射線影響と化学物質影響の統合、個人差の評価を行うことを目的とする。

放射線影響は一般的には単独で現れるわけではなく、環境や生活習慣に起因する内因・外因性の物質との複合曝露の結果として現れると考えられる。また、遺伝的要因による個人差も放射線の影響を大きく左右すると考えられる。本研究は、DNA 損傷の生成と修復に注目することにより、放射線影響と化学物質影響の統合、個人差の評価を行うことを目的とする。

放射線と化学物質の複合曝露影響の重要性は広く認識され、疫学研究、動物実験が行われているが、ほとんどは定量的解析結果の記述を主としており、放射線と化学物質の影響を統合するための原理の探索が目的ではない。本研究で目指す統合とは、共通の「横軸」をもって、放射線影響と化学物質影響を比較したり、その複合影響を評価したりすることである。これまでは、主に、放射線については線量、化学物質については濃度および処理時間を横軸の変数として、生物学的効果（たとえば、細胞生存率、突然変異頻度など）の比較や複合曝露影響の評価が行われてきた。しかしながら、長期連続曝露状況を考える場合においては、放射線については線量率、化学物質については濃度が横軸の変数として適切であると考えた。これらはいずれも時間あたりの DNA 損傷の生成量に比例すると考えられるからである。ただし、さまざまな DNA 損傷の種類やそれぞれの割合は、放射線と化学物質の間で、また、それぞれの種類によって異なると考えられる。培養細胞を用いた実験は生体内の環境や異種細胞との相互作用などを反映するものではないが、一方で、基本原理を明らかにする上では適していると考えられる。将来的には、時間あたりの DNA 損傷生成能を指標として、さまざまな種類の放射線、化学物質の換算係数を求めて、データベース化して行くことにより、放射線、化学物質影響を統一的に評価でき、複合曝露影響も個々の要素の加算として評価できるようになることが期待される。

放射線感受性の個人差もまた広く認識され、cDNA アレイによる遺伝子発現解析などが行われている。本研究は、リンパ球は一部の組織の DNA 修復特性、ゲノム安定性、ひいてはがんリスクを反映するものと捉えている(1,2)。本研究では予算、期間の観点から約 40 種類の解析を計画しているが、理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室(RIKEN BRC Cell Bank)には日本人由来の不死化リンパ球細胞 500 種類とさまざまな人種に由来する不死化リンパ球細胞 159 種類(園田・田島コレクション)が保有されていることから、本研究が契機となって、年齢や人種による違いなども含めたより大規模な研究に発展する可能性がある。

本研究では、損傷認識に関わるタンパク質リン酸化酵素 DNA-PK、ATM、ATR に特に注目する。DNA-PK は、触媒サブユニット DNA-PKcs と二本鎖 DNA 末端に特異的に結合す

る Ku (Ku86 (Ku80 ともいう) と Ku70 のヘテロダイマー) から構成され、DNA 二本鎖切断を認識する。ATM は、Nbs1/Mre11/Rad50 複合体を介して DNA 二本鎖切断を認識する。ATR は、RPA (Replication protein A, RPA70、RPA34、RPA14 の 3 成分からなる)、ATRIP (ATR interacting protein) を介して、一本鎖 DNA を認識する。これらは一部重複しながら、DNA 損傷に应答して、約 1,000 種類のタンパク質をリン酸化することが明らかになっている(3)。そのうち、代表的なものとして、XRCC4、H2AX、Nbs1、Chk1 が挙げられる。また、それぞれ、自らをリン酸化することが知られ、その中で重要な部位が明らかになっている(4)。XRCC4 については、主任研究者が以前の研究で、放射線照射後に DNA-PK によってリン酸化を受けることを初めて示した。さらに、独自に XRCC4 の 4 カ所のリン酸化部位を同定し、うち 3 カ所が DNA 二重鎖切断修復に重要であることを見出した。また、以前報告されたものの(5,6)、細胞内でリン酸化が起こるかどうか不明であった XRCC4 Ser320 のリン酸化が DNA 損傷に应答して DNA-PK 依存的に起こることを示した(7)。今後、XRCC4 Ser320 のリン酸化状態が DNA-PK 活性指標として広く用いられることが予想される。

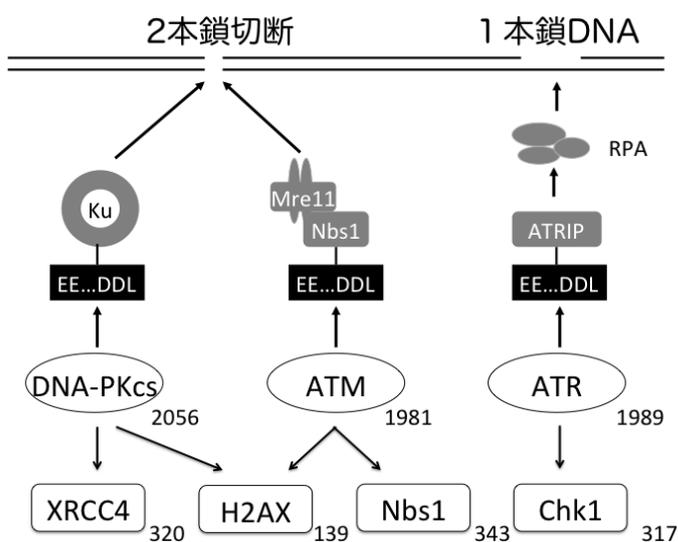


図 I-1 DNA 損傷を認識する DNA-PK、ATM、ATR

平成 28 年度は、正常な DNA 修復機能を有するヒト線維芽細胞、リンパ球細胞を用いて、放射線と化学物質の影響の量的等価関係、加算性を調査した。平成 29 年度は、ヒト DNA 修復欠損細胞を用いて同様の解析を行い、正常細胞で得られた結果と比較検討することにより、損傷の種類や修復の難度を明らかにすることを目的として、研究を実施した。また、放射線および化学物質に対する感受性の個人差やがん罹患性との関連の調査の準備として、RIKEN BRC Cell Bank から健常者あるいはがん患者由来のヒトリンパ球細胞を 40 種類程度入手し、パネル(ヒトの放射線・化学物質感受性の多様性を反映するように抽出された細

胞のセット)を作成し、主要な DNA 修復関連タンパク質の発現の検討を行った。

II. 研究方法

平成 29 年度の研究は以下のように実施した。

1. XRCC4 Ser320 のリン酸化状態特異的モノクローナル抗体の反応性の確認

平成 28 年度に XRCC4 Ser320 のリン酸化状態特異的モノクローナル抗体 Anti-phospho-XRCC4-S320(M)を株式会社蛋白精製工業に委託して作製した。また、この抗体の反応性を ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法によって確認した。本年度は、ウェスタン・ブロッティング法における適用可能性について検討した。

ウェスタン・ブロッティング法は我々がこれまでに発表した論文に記載した方法で行った(7)。細胞はヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を用いた。放射線(γ 線)照射は細胞を培養液に懸濁した状態で、本学コバルト 60 照射施設にて行った。照射後、290 g、5 分の遠心によって細胞を塊として沈澱させ、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 2 回洗浄した。この細胞塊を細胞抽出液(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100、タンパク質分解酵素および脱リン酸化酵素の阻害剤を添加した)に懸濁し、30 分間 4°C に保持後、20,000 g、10 分の遠心を行い、上清を得た。この上清のタンパク質濃度を揃えた後、等量の 2XSDS-PAGE 試料用緩衝液(125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% w/v sodium lauryl sulfate, 20% v/v glycerol, 5% v/v β -mercaptoethanol, 0.02% w/v bromophenolblue, 0.01% crystalviolet)と混合し、100°C、10 分加熱したものを試料とした。この試料を 10% アクリルアミドを含むゲルで電気泳動を行って展開し、polyvinylidene difluoride の膜に写し取った。この膜を 1% のスキムミルクを含むトリス緩衝生理食塩水(TBS)に浸した後、抗 XRCC4 抗体、XRCC4 Ser320 リン酸化状態特異的ウサギポリクローナル抗体およびマウスモノクローナル抗体、さらに対照として抗 PCNA 抗体と一晩 4°C で反応させた。次に、ペルオキシダーゼ標識されたウサギあるいはマウス免疫グロブリンに対する抗体と反応させた。最後に、PerkinElmer 社 Western Lightning キットあるいは LiCOR 社 Western Sure Substrate キットを用いて発色させ、LiCOR digit を用いて画像を取得した。

2. ヒト DNA 修復欠損細胞に対する放射線・化学物質の単独及び複合曝露影響の解析

① 細胞：正常ヒト線維芽細胞 HF19、NB1RGB、1BR3、正常ヒトリンパ球細胞 TK6、DNA 修復遺伝子欠損疾患患者由来細胞、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法によって作製された DNA 修復・DNA 損傷応答遺伝子欠損細胞を用いた。このうち、HF19、NB1RGB は国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室 (RIKEN BRC Cell Bank) から、TK6 は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 (JCRB) 細胞バンクから入手した。1BR3 は英国・サセックス大学の Penny A. Jeggo 博士から頂いた。また、Jeggo 博士とスウェーデン・カロリンスカ研究所の Qiang Pan-Hammerstrom 博士から XRCC4 などの DNA 修復遺伝子に変異を持つ患者由来の線維芽細胞を頂いた。当研究室においてヒト結腸癌由来 HCT116 細胞あるいはヒト骨肉腫細胞 U2OS 細胞から p53、XRCC4、XLF 欠損細胞を CRISPR/Cas9 法によって作製した。また、京都大学・武田俊一教授、笹沼博之准教授から DNA-PKcs、DNA ligase IV、Smarc11、ATM の欠損細胞を頂いた(8)。

② 培養条件：ヒト線維芽細胞の培養には、DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 液体培地 (4.5 g/l グルコース、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム含有)を用い、牛胎児血清(FBS)を 20%容 (HF19、1BR3、DNA 修復遺伝子欠損患者由来細胞)または 10%容 (NB1RGB の場合)添加した。ヒトリンパ球細胞の培養には、RPMI1640 液体培地 (L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム含有)を用い、10%容の FBS を添加した。いずれも、1%容のペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液 (各 10,000 U/ml、10,000 μ g/ml)、1%の非必須アミノ酸溶液を添加した。リンパ球の培養に際しては、抗酸化剤として、50 μ M の 2-メルカプトエタノールを添加した。培養は 37°C、5% CO₂濃度、湿度 95%以上の条件で行った。継代の際には、ディッシュまたはフラスコから培地を除去した後、ハンクス平衡塩溶液で洗浄し、2.5 g/L-トリプシン/1 mM EDTA 溶液で 37°C、2~3 分処理し、培地で 15 ml 遠心管に回収した。これを適当な濃度に希釈して、新しいディッシュまたはフラスコに播種した。継代は 3~7 日に一度行った。FBS は HyClone 社から、それ以外の試薬はナカライテスク社から購入した。

③ 放射線照射：高線量率での照射は、東京工業大学コバルト照射実験施設において行った。また、低線量率照射のために、平成 28 年度(平成 29 年 2 月 8 日)に、東京工業大学放射線総合センター大岡山放射線実験施設に新たに放射線源を導入した。導入した線源は、 ^{60}Co 放射能標準 γ 線源 (日本アイソトープ協会、C0401CE、1 MBq、表示付認証機器)4 個である。この線源と細胞を大岡山放射線実験施設内の CO_2 インキュベータ内に置いて培養を行った (図 II-1)。線源は 4 個を格子状に互いに接するように、棚板の中心に配置した (図 II-1 中)。細胞は直径 10cm の培養ディッシュに播種し、その上下の棚板に正六角形状に配置した (図 II-1 下)。棚板の間隔は 9.3 cm である。 ^{60}Co の実効線量率定数は $0.305 \mu\text{Sv} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{MBq}^{-1}$ であるから、導入時における線量率は平均 (ディッシュの中央) で $65 \mu\text{Sv}/\text{h}$ 、最大 (ディッシュのうち、最も中央に近い位置) で $109 \mu\text{Sv}/\text{h}$ 、最小 (ディッシュのうち、最も中央から遠い位置) で $39 \mu\text{Sv}/\text{h}$ であり、 ^{60}Co の半減期は 5.27 年であることから、平成 30 年 3 月 8 日において導入時の 87% の線量率になると見積もられた。さらに、京都大学放射線生物研究センターの小林純也博士の協力を得て、低線量率長期照射装置での照射を行った。

④ コロニー形成法による生存率測定：ヒト線維芽細胞については、直径 10 cm の組織培養ディッシュに 300-500 個の細胞を播種し、放射線照射または化学物質処理を行った。2~3 週間培養した後、形成されたコロニーを数えた。具体的には、まず、培地を除去し、99.5%エタノールで固定した後、クリスタルバイオレットで染色し、50 個以上の細胞を含むコロニーの数を数えた。また、ヒトリンパ球については、②に記載した培養液にて FBS 濃度を 15%としたものに 0.2% w/v のアガロースを添加した軟寒天培地中で形成された球状のコロニーを数えた。いずれも、以下の計算でプレーティング効率 (P. E.) および生存率 (S. F.) を求めた。

P. E. = (形成されたコロニーの数) / (播種した細胞の数) × 100 (%)、

S. F. = (放射線照射または化学物質処理を行った場合の P. E.) / (対照の P. E.)。

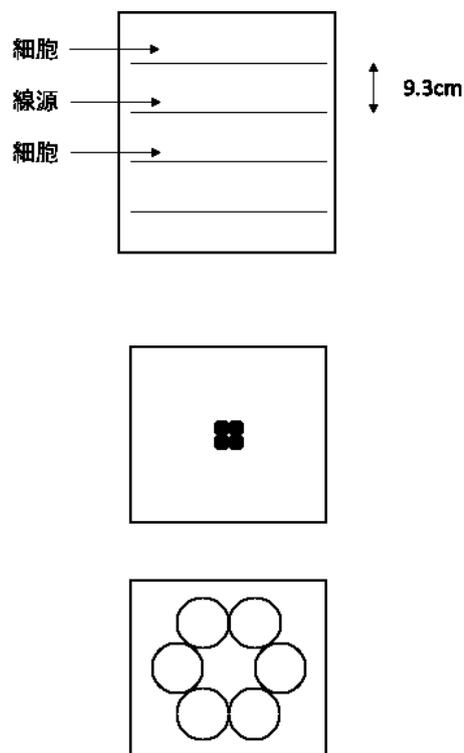


図 II-1 低線量率照射における線源と細胞の配置 上は正面から見た図。中、下はそれぞれ、線源、ディッシュの配置を上から見た図。

⑤ 突然変異率の測定：1 個の細胞から 10^7 個程度の細胞集団になる過程での突然変異頻度の計測を試みた。具体的には、96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり平均 0.3 個となるように TK6 細胞およびその DNA 修復遺伝子欠損細胞を播種し、低線量率放射線照射下およびホルムアルデヒド (0.0033 mM) あるいは N-エチル-N-ニトロソ尿素(ENU) (0.033 mM) 存在下で培養した。播種時点においてあるウェルに 1 個の細胞が入る確率はポアソン分布に従うと考えると $0.22 (=e^{-0.3} \cdot 0.3^1/1!)$ 、細胞が 1 個も入らない確率は $0.74 (=e^{-0.3} \cdot 0.3^0/0!)$ であるから、細胞が 1 個以上入っているウェルの中で細胞が 1 個だけ入っているウェルの割合は $0.86 (=0.22/(1-0.74))$ となる。細胞が増殖したウェルはほとんど 1 個の細胞から増殖が起こったと考え、培養体積を増やしながらか培養し、 10^7 程度の細胞数とした。これを 6-チオグアニン (6-TG) あるいはトリフルオロチミジン (TFT) を添加した軟寒天培地中で培養し、④と同様にコロニーを形成させた。6-TG、TFT 非存在下でのコロニー形成率で補正して、それぞれ HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 遺伝子、TK (Thymidine kinase) 遺伝子の突然変異率とした。

⑥ 低線量率放射線に対する遺伝子発現の応答の解析：細胞を低線量率放射線照射下で培養後、日本ジェネティクス社の Fast Gene キットを用いて RNA を精製した。この RNA をタカラバイオ社に送付し、次世代シーケンサー (NGS) による配列解析を行った。

3. ヒトリンパ球細胞感受性パネルの作成

① 細胞：40 種類のエプスタイン・バー・ウイルスで不死化した日本人由来リンパ球細胞を RIKEN BRC Cell Bank から入手した。培養条件は、上記の 2. ②に記載した TK6 の条件と同じとした。入手後、直ちに培養を開始し、凍結ストックとウェスタン・ブロットティング用のサンプルを調整した。

② ウェスタン・ブロットティング：ウェスタン・ブロットティングに用いた一次抗体およびその入手元は以下の通りである。Anti-DNA-PKcs：ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製¹⁾； Anti-DNA-PKcs (Ab-4)：マウスモノクローナル抗体、Neomarkers； Anti-Ku86：ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製²⁾； Anti-Ku70：ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製²⁾、Anti-XRCC4：ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製； Anti-ATM (NB100-104)：ウサギポリクローナル抗体、Novus Biochemicals； Anti-ATR (ab184137)：ウサギポリクローナル抗体、Abcam； Anti-ATR (ab4471)：マウスモノクローナル抗体、Abcam； Anti-53BP1 (A300-272A)：ウサギポリクローナル抗体、Bethyl Laboratories； Anti-XLF (3757-100)：ウサギポリクローナル抗体、Biovision； Anti-PAXX (ab126353)：ウサギポリクローナル抗体、Abcam； Anti-PCNA (sc-7907)：ウサギポリクローナル抗体、Santa Cruz。二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グロブリンブタポリクローナル抗体(P0399、Dako)、同抗マウス免疫グロブリンヤギポリクローナル抗体(P0447、Dako)を用いた。発色は、

PerkinElmer 社 Western Lightning キットあるいは LiCOR 社 Western Sure Substrate キットを用い、LiCOR digit を用いて画像を取得した。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞は理化学研究所バイオリソースセンター細胞開発技術室、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所(JCRB)細胞バンクあるいは国内外にて細胞を樹立した研究者から入手し、使用条件を遵守して、研究を行った。放射線源の導入や取扱いは放射線障害防止法および関連法令を遵守して行った。CRISPR/Cas9 システムを用いた DNA 二重鎖切断修復遺伝子欠損細胞作製については研究開始時点で本学にて承認が得られており、ガイドラインを遵守して行った。

III. 研究結果

1. XRCC4 Ser320 のリン酸化状態特異的モノクローナル抗体の反応性の確認作製

平成 28 年度に作製した XRCC4 Ser320 リン酸化状態特異的マウスモノクローナル抗体 (α -XRCC4-pS320M)を用いて、ウェスタン・ブロッティング法によってヒト細胞内での XRCC4 Ser320 のリン酸化状態を検出できるか、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を用いて検討した。その結果、マウスモノクローナル抗体、ウサギポリクローナル抗体とも、予想される 55 kDa の位置にバンドが確認された。このバンドは、siRNA(small interfering RNA、目的遺伝子の塩基配列の一部に対応する短い 2 本鎖 RNA で、これを導入することにより目的遺伝子の mRNA が分解される)を用いて XRCC4 をノックダウンすると消失したことから、XRCC4 であることが確認された。また、哺乳類細胞発現用 pCMV~~β~~ベクターを用いて正常 XRCC4 を発現させると再びバンドが現れたが、Ser320 をリン酸化されないアラニンに置換した変異体 (S320A) ではバンドが著しく減弱していた。このことから、いずれの抗体も XRCC4 の Ser320 におけるリン酸化状態特異的に反応していることが確認された。一方、Ser320 を負電荷を持つアスパラギン酸に置換して、リン酸化状態を模擬した変異体(S320D)の場合、マウスモノクローナル抗体は正常 XRCC4 の場合より弱いものの反応を示したが、ウサギポリクローナル抗体は反応を示さなかった。このことから、平成 28 年度に作製したマウスモノクローナル抗体は負電荷によってリン酸化状態を識別している可能性が高いと考えられた。

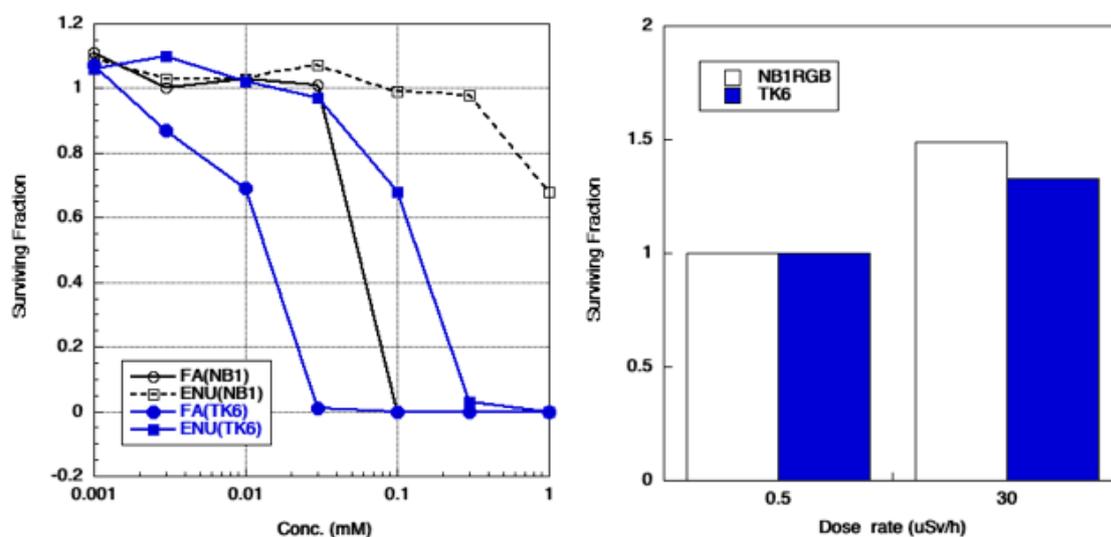
2. ヒト DNA 修復欠損細胞に対する放射線・化学物質の単独及び複合曝露影響の解析

① 生存率に対する影響

まず、正常なヒト線維芽細胞 NB1RGB およびヒトリンパ球 TK6 の低線量率放射線、化学物質 (ホルムアルデヒド、N-エチル-N-ニトロソ尿素 (ENU)) 感受性をコロニー形成法によって調べた (図 III-1)。ホルムアルデヒドについては、NB1RGB は 0.03 mM-0.1 mM の間、TK6 は 0.01 mM-0.03 mM の間で生存率が激減し、コロニーが全くできなくなった。ENU については、NB1RGB は濃度の上限である 1 mM でも対照の 50%以上の生存率を示し、TK6 は 0.1 mM-0.3 mM の間で生存率の激減が見られた。一方、低線量率放射線照射下 (30 μ Sv/h) で培養した場合、いずれの細胞も対照 (線源の影響で 0.5 μ Sv/h の線量率となる) に比べ、若干高いコロニー形成率を示した。この結果から、30 μ Sv/h までの線量率では生存率低下の影響はなく、むしろ細胞増殖が促進される可能性があることが示唆された。

次に、DNA 修復欠損細胞での影響評価を試みた。細胞増殖特性などを評価した結果、TK6 由来の遺伝子欠損細胞が放射線・化学物質の影響解析に最適と考えられた。DNA-PKcs、ATM 欠損細胞とも、0.911 Gy/min および 1 mGy/min の放射線に対しては正常細胞より高感受性を示したが、100 μ Sv/h の照射場でのコロニー形成率は対照と違いが見られなかった。また、FA および ENU に対しては正常細胞と同等の感受性を示した。

これらのデータの分析と考察により、放射線と化学物質の影響を統合するための数理的モデルを考案した (IV. 考察)。



図III-1 ヒト線維芽細胞 NB1RGB およびヒトリンパ球細胞 TK6 の低線量率放射線および薬剤感受性

NB1RGB(NB1)およびTK6をホルムアルデヒド(FA)、N-エチル-N-ニトロソ尿素(ENU)存在下、あるいは低線量率放射線照射下で培養し、コロニー形成法による生存率測定を行った。

② 突然変異率に対する影響

TK6 細胞およびこれに由来する DNA-PKcs、ATM 遺伝子欠損細胞が 1 個の細胞から 10^7 個程度の細胞集団に増殖する過程での突然変異頻度の計測を試みた。放射線非照射・化学物質非処理群においては、いずれも突然変異不検出であった（表 III-1）。ホルムアルデヒド（0.0033 mM）処理群においても突然変異は検出されなかった。ENU（0.033 mM）処理群においては、 10^{-6} - 10^{-5} の範囲の突然変異が検出された。低線量率照射群においては、HPRT 遺伝子の突然変異は検出されなかったが、野生株の 1 クローンで TK 遺伝子の突然変異が検出された。これらの結果から、低線量率放射線照射による突然変異頻度の上昇は認められず、あったとしても 0.033 mM の ENU より影響が小さいと考えられた。

今回の計測において検出できなかった点については、今後、感度や精度をあげる必要がある。まず、1 個の細胞から増殖を開始することにしたが、それぞれの細胞種、処理条件で得られたクローンが多いもので 5 個と少なく、1 個も得られなかったものがあった。相当数のクローンを確実に得るためには、多くのウェルに細胞を播種することが必要になる。薬剤処理については問題はないものの、低線量率照射場の場合、線源から等距離に置くことができるプレートの数に限界があるため、工夫や繰り返しが必要となる。

なお、今回の計測による検出下限突然変異頻度は、約 10^7 個を播種し、選択薬剤非存在下での P.E. が約 30-60%であったことから、約 $1.5-3 \times 10^{-7}$ と見積もられた。しかし、実際の検出下限はこれより高く、感度が低かった可能性が考えられる。一因として、6-TG、TFT 含有培地に播種した際の細胞濃度などの影響で、選択薬剤非存在下より P.E. が 1 桁程度低かった可能性が考えられる。これもまた、培養スペースなどの制約もあるが、工夫や繰り返しによる精度向上が必要と考えられる。

③ 低線量率放射線に対する遺伝子発現の応答の解析

TK6 細胞およびこれに由来する DNA-PKcs、ATM 遺伝子欠損細胞を低線量率放射線照射下で 48 時間培養後、RNA を精製し、次世代シーケンサーによる配列解析（RNAseq 解析）を実施し、それぞれ約 4,000 万リード（約 4,000 万個の DNA 断片の塩基配列）のデータを得た。これにより、低線量率放射線に対する遺伝子発現の応答とその制御における DNA-PKcs と ATM の役割についての情報が得られた。

表 III-1 突然変異頻度の計測結果

1 列目の CTL は放射線非照射・化学物質非処理。FA はホルムアルデヒド。2 列目の WT は野生株（遺伝子を欠損させていない元の TK6）、CS は DNA-PKcs 欠損細胞、AT は ATM 欠損細胞。3 列目の 1-5 の数字はクローンの番号。N.D. は測定を行わなかったことを示す。5 列目はプレート 1 枚あたり播種した細胞の数。6 列目、8 列目の 6TG、TFT はそれぞれの選択薬剤を含むプレートに形成されたコロニーの実数で、7 列目、9 列目の M.F. はそれから計算された HPRT 遺伝子および TK 遺伝子の突然変異頻度。

			P.E.	Cells/plate	6-TG	M.F.	TFT	M.F.
CTL	WT	1	60.9	1.18E+07	0		0	
CTL	WT	2	66.6	1.21E+07	0		0	
CTL	WT	3	62.5	1.17E+07	0		0	
CTL	CS	1	41.2	1.24E+07	N.D.		0	
CTL	AT	1	47.1	9.69E+06	0		0	
FA	WT	1	48.4	1.04E+07	0		0	
FA	WT	2	61.6	1.18E+07	0		0	
FA	WT	3	77.0	1.15E+07	0		0	
ENU	WT	1	67.8	1.23E+07	27	3.25E-06	0	
ENU	CS	1	39.1	1.19E+07	28	6.00E-06	61	1.31E-05
ENU	CS	2	43.8	1.17E+07	24	4.68E-06	31	6.05E-06
ENU	AT	1	53.1	9.99E+06	7	1.32E-06	0	
LDR-L	WT	1	45.7	1.28E+07	0		8	1.37E-06
LDR-L	CS	1	46.6	1.18E+07	0		0	
LDR-L	AT	1	50.1	1.13E+07	0		0	
LDR-L	AT	2	53.6	1.05E+07	0		0	
LDR-H	WT	1	31.3	1.10E+07	0		0	
LDR-H	WT	3	56.9	1.23E+07	0		0	
LDR-H	WT	5	41.5	1.20E+07	0		30	6.02E-06
LDR-H	CS	1	45.6	1.18E+07	0		0	
LDR-H	AT	2	45.3	9.85E+06	0		0	

3. ヒトリンパ球感受性パネルの作成

平成 30 年度の DNA 損傷応答と放射線・化学物質感受性の相関解析に備えて、理研細胞銀行の日本人由来リンパ球細胞株約 500 種類(9)の中から、健常人由来のもの、がん患者由来のもの 20 種類ずつ、計 40 種類を入手し、パネルを作成した (表 III-2)。

次に、これらの細胞における DNA 修復関連タンパク質の発現をウェスタン・ブロッティング法にて検討した。非相同末端結合修復に関わる DNA-PKcs、Ku86、Ku70、DNA ligase IV、XRCC4、XLF、Artemis、PAXX、DNA 修復の経路選択に関わる 53BP1、チェックポイントに関わる ATR、ローディング・コントロールとして PCNA の発現量を検討した。また、JCRB から入手した TK6 を標準とした。XRCC4、53BP1、PCNA については全ての細胞で発現を確認できた。Ku86、Ku70 については、一部発現が見られなかった細胞もあったが、抗体の反応が均一でなかった可能性が考えられる。それ以外のタンパク質については、ゲルに添加する量や抗体濃度を増減することによって至適条件での検討が必要と考えられた。また、XRCC4 については、中国の南部において一塩基多型 (A247S) が報告されている。この違いは今回のウェスタン・ブロッティング法で見出すことは不可能であり、DNA 塩基配列の解析などが必要と考えられた。

表 III-2 ヒトリンパ球感受性パネルの細胞一覧

健常人由来			乳癌患者由来		
細胞	性別	年齢	細胞	性別	年齢
HEV0012	女	46	HEV0135	女	53
HEV0013	女	42	HEV0157	女	58
HEV0100	女	55	HEV0261	女	47
HEV0160	女	38	HEV0272	女	50
HEV0190	女	21	HEV0303	女	55
HEV0195	女	59	HEV0312	女	37
HEV0236	女	34	HEV0317	女	62
HEV0311	女	50	HEV0337	女	41
HEV0333	女	29	HEV0345	女	52
HEV0401	女	27	HEV0378	女	68
HEV0011	男	27			
HEV0058	男	54	子宮頸癌患者由来		
HEV0091	男	21	細胞	性別	年齢
HEV0098	男	36	HEV0080	女	65
HEV0120	男	65	HEV0136	女	77
HEV0134	男	48	HEV0146	女	54
HEV0296	男	41	HEV0209	女	68
HEV0356	男	57	HEV0257	女	43
HEV0384	男	23	HEV0299	女	72
HEV0428	男	31	HEV0305	女	56
			HEV0352	女	36
			HEV0390	女	61
			HEV0438	女	48

IV. 考察

① 放射線と化学物質の影響を統合するための数理的モデル

III.2.①の化学物質存在下での生存率の測定結果や、化学物質影響分野での評価指標(2017年11月に韓国で開催されたICEM-ACEM2017で情報収集し、また、研究協力者Young Rok SEO博士から助言頂いた)を参考にしながら、下記の数理的モデルを考案した。

1回の分裂に成功する確率をP、無限に増殖する確率をQとすると、 $Q=2-1/P$ の関係がある。コロニー形成率(P.E.)はQの近似値であると考えられる。Pが対照に比べ0.37(e^{-1})倍に低下する線量率、濃度で1回の分裂あたり1個の致命傷が起こっていると考えられる。この線量率、濃度を単位とすることで、放射線と化学物質の影響を比較したり、加算したりすることができる可能性がある。細胞分裂1回あたりの致命傷の数を λ とすると、線量率、濃度をd、また、 α 、 β を定数として $\lambda=\alpha+\beta d$ と書ける。単位となる線量率や濃度は $1/\beta$ となる。これを用いると、放射線非照射・化学物質非処理時のコロニー形成率(P.E.)は、

$$P.E.=2-1/e^{-\alpha}$$

また、生存率(S.F.)は、

$$S.F.=\{2-1/e^{-(\alpha+\beta d)}\}/(2-1/e^{-\alpha})$$

となる。さらに、放射線量を横軸にとった生存率曲線に関する標的モデルやLQモデルと異なり、S.F.=0となる線量率・濃度が求められる($\alpha+\beta d=0.693$ を満たすd)。III.2.①において隣接する濃度間で生存率が激減し0またはほぼ0になるという特徴を捉えていると見受けられる。このモデルの妥当性を検証するために、さらなる実験データを収集し、モデルによる予測値との整合性を検討する必要がある。

②低線量率照射下での増殖促進効果はあるか

本研究で実施した実験の一部において、低線量率照射下で生存や増殖が促進される結果が得られた。これまでいわゆる「ホルミシス効果」が報告されてはいるものの、本研究の当初計画では注目していなかった。しかし、これまでの研究で傾向が見られていることから、再現性の確認などを行い、それでも見られた場合には、ノックアウト細胞を用いて関与する遺伝子を明らかにする。また、より高線量率(1 mGy/min程度以上)で生存や増殖が抑制される状況下での検討により、化学物質との線量率-濃度等価関係を見だすとともに、影響の相加性が成立するかどうかを明らかにしたいと考えている。

V. 結論

以上、本年度は、まず、ヒト線維芽細胞、リンパ球細胞、大腸がん細胞、及びこれらから作製された DNA 損傷応答・修復関連遺伝子欠損細胞等を用いて、低線量率放射線及び化学物質の生存率、突然変異頻度等への影響を定量的に解析した。また、DNA 損傷応答・修復関連遺伝子及びタンパク質の発現量や存在状態の変化を解析し、比較検討を行った。その結果、100 μ Sv/h までの線量率の放射線では、細胞生存率低下や突然変異上昇などの影響は認められないことが分かった。また、得られたデータの分析と考察により、放射線と化学物質の影響を統合するための数理的モデルを考案した。

さらに、DNA 損傷応答と放射線・化学物質感受性の相関解析に備えて、日本人由来リンパ球細胞株 500 種類の中から、健常人由来のもの、がん患者由来のもの 20 種類ずつ、計 40 種類を入手し、パネルを作成することができた。

VI. 次年度以降の計画

最終年度に当たる平成 30 年度においては、平成 28 年度、平成 29 年度の成果と課題を踏まえ、以下を行う。

まず、平成 29 年度に入手した日本人由来不死化細胞株(EBV でトランスフォームしたリンパ球細胞)コレクション中の 40 種類の細胞を用いて、放射線、化学物質に対する感受性や細胞応答に関する健常人の間での個人差や、健常人とがん患者間での違いを検討する。また、ウェスタン・ブロッティング等による検討でタンパク質の発現量、分子量、挙動などに異常が認められた細胞があれば、その細胞から当該タンパク質の cDNA を単離し、塩基配列解析を行う。これらの結果を比較検討することにより、DNA 損傷に対する修復、応答に関わる遺伝子群の変異、多型と放射線、化学物質に対する感受性の相関を明らかにする。

次に、平成 29 年度に構築した放射線と化学物質の影響の統合のためのモデルと実験データとの整合性の検証を行う。このモデルでは、生存率（コロニー形成率）をエンドポイントとし、細胞分裂 1 回あたり 1 個の致命傷を与える線量率あるいは化学物質濃度をパラメーターとしている。そこで、まず、ヒトリンパ球パネルや、ヒト DNA 修復欠損細胞などを用いて、低線量率放射線あるいは化学物質曝露下でコロニー形成実験を行う。得られた線量率/濃度と生存率の関係(曲線)がモデルの予想とどの程度一致するか、統計的解析も含めて検討するとともに、上記のパラメーターを求める。次に、モデルに基づいて単独曝露の場合の生存率から複合曝露の場合の生存率を予測し、実際の実験結果とどの程度一致するか、統計的解析も含めて検討する。

最後に、成果の取りまとめや発表を行う。発表は、国内、国際学会における発表のほか、論文投稿を行う。学会発表にあたっては、特に、放射線と化学物質の影響の統合のためのモデルに関する発表を積極的に行い、専門家の意見や批判を仰ぐようにする。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

- A. 論文：査読あり
なし
- B. 論文：査読なし
なし
- C. 学内学会発表(○は発表者)
 - 1) 土屋 尚代, 島田 幹男, 小林 純也, 松本 義久. DNA 二重鎖切断修復欠損細胞の低線量率放射線に対する感受性の解析. 日本放射線腫瘍学会第 56 回生物部会学術大会, 平成 30 年 7 月 13 日, 国立がん研究センター中央病院(東京), 要望演題：DNA 損傷 4).
- D. 国際学会発表(○は発表者)
 - 1) ○Yoshihisa Matsumoto. Implication of DNA double-strand break repair in cancer, aging and development. The 12th International conference & 5th Asian Congress on Environmental Mutagens, Songdo Convensia (Incheon, Korea), 12-16 November 2017, Symposium 1: Transcription-associated causes of genome instability in cancer and aging, SY1-4.
 - 2) ○Mukesh Kumar Sharma, Ali Reza Amiri Moghani, Mikoto Fukuchi, Shoji Imamichi, Anie Day Asa De Castro, Rujira Wanotayan, Mikio Shimada, Yoshihisa Matsumoto. XRCC4 phosphorylation as an in situ indicator for DNA-PK activity. The 12th International conference & 5th Asian Congress on Environmental Mutagens, Songdo Convensia (Incheon, Korea), 12-16 November 2017, OS02-8 (Oral). [Best presentation award 受賞]
 - 3) ○Ali Reza Amiri Moghani, Mukesh Kumar Sharma, Yoshihisa Matsumoto. Characterization of XRCC4 Ser260 and Ser320 phosphorylation by DNA-PK. 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University, Co-op Inn Kyoto (Kyoto), 4-5 December 2017, P-1.
- E. 著書
なし
- F. 講演
なし
- G. 主催した研究集会
なし
- H. 特許出願・取得
なし
- I. その他
なし

VIII. 参考文献

- 1) Someya et al. *Carcinogenesis*, 27, 117-122 (2006)
- 2) Someya et al. *Radiat. Res.*, 166, 577-582 (2006)
- 3) Matsuoka et al. *Science*, 316, 1160-1166 (2007).
- 4) Chen et al. *J. Biol. Chem.*, 280, 14709-14715 (2005).
- 5) Yu et al. *DNA Repair*, 2, 1239-1252 (2003).
- 6) Lee et al. *DNA Repair*, 3, 267-276 (2004).
- 7) Sharma et al. *J. Radiat. Res.*, 57, 115-120 (2016).
- 8) Keka et al. *Nucl. Acid Res.*, 43: 6359-6372 (2015)
- 9) Iwakawa et al. *Mutat. Res.* 588, 1-6 (2005)

Unification of effects of radiation and chemical substance and evaluation of personal variance in sensitivity

Yoshihisa Matsumoto

*Laboratory for Advanced Nuclear Energy, Institute of Innovative Research,
Tokyo Institute of Technology*

Abstract

Effects of radiation, in general, appears not by itself but as the consequence of combined exposure to endogenous and exogenous substances arising from environment and life style. In addition, personal variance in genetic factors is thought to modify the effects of radiation considerably. This study aimed to develop a method to unify the effects of radiation and chemical substance and evaluate the variance in sensitivity among individuals, based on the induction and repair of DNA damages.

In FY2017, cultured human cells, including normal fibroblasts and lymphocytes and their derivatives lacking DNA repair genes, were exposed to radiation of high dose rate and low dose rate and/or chemical substances, i.e., ENU and formaldehyde, and analyzed those effects on cell survival and mutation frequency. The results indicated that the low dose rate radiation up to 100 micro Sv/h did not decrease cell survival or increase mutation frequency even in DNA repair-deficient cells. Additionally, based on the results of cell survival measurement, a mathematical model for quantitative evaluation and unification of the effects of low dose rate radiation and chemicals was invented.

Toward the evaluation of personal variance in sensitivity toward low dose rate radiation and chemicals, a sensitivity panel, consisting of 40 Epstein-Barr Virus-transformed lymphocyte from Japanese population including healthy individuals and cancer patients, was established.

Keywords

DNA damage, DNA repair, protein phosphorylation, DNA-PK, ATM, ATR