



Ⅱ－２ 低線量率・低線量放射線被ばくによる組織幹細胞の  
放射線障害の蓄積に関する研究



研究課題名：低線量率・低線量放射線被ばくによる組織幹細胞の

## 放射線障害の蓄積に関する研究

研究項目名：低線量率・低線量被ばくによる組織 DNA 障害の蓄積解析

鈴木啓司（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻・准教授）

### 研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所の事故を受けて、低線量放射線、とりわけ 100mSv 以下の放射線被ばくによる健康影響が懸念されている。疫学調査結果等では、このような低線量放射線による健康影響については明確な答えを得る事は極めて困難であるため、放射線防護の立場から、直線しきい値なし（Linear Non-Threshold: LNT）モデルを採用しているが、このことが逆に、一般住民の健康不安を醸成する原因にもなっている。そこで、本研究課題では、低線量率・低線量被ばくモデル動物において、被ばくによって誘発される DNA 損傷および発がん変異の組織における蓄積と排除を、組織幹細胞に着目しながら解析することを計画した。具体的には、公益財団法人環境科学技術研究所（環境研）において低線量率・低線量放射線（0.05～20mGy/日）を照射したマウスにおいて、累積線量が 1～100mGy の間で、甲状腺や生殖組織を含む 11 種の代表組織を採取し、長崎大学において DNA 損傷分子プローブおよび幹細胞マーカーあるいは増殖マーカーとの蛍光免疫二重染色を検討した。

まず、低線量率・低線量放射線照射マウスにおける標本の採取については、0.05mGy/日、1 mGy/日、20 mGy/日の線量率で蓄積線量 1mGy あるいは 20mGy を照射をしたマウスより、甲状腺、乳腺、脾臓、胸腺、消化幹、肝臓、肺、腎臓、膀胱および生殖腺を採取し、ホルマリン中で固定後にパラフィン包埋を行った。組織切片は、厚さを 4 ミクロンに固定して薄切し、スライドガラス上に固定した切片を脱パラフィン後、抗体賦活化処理を施して、抗 53BP1 および抗 Ki-67 抗体で蛍光免疫染色を行った。その結果、甲状腺、乳腺、消化幹などで 53BP1 フォーカスを検出した。また、400mGy の高線量率照射による DNA 損傷の動態解析から、400mGy の被ばくにより誘導されたフォーカスでも、照射後 72 時間までには、非被ばくの状態で観察される自然発生のフォーカス形成頻度と同等のレベルまで減少していることが明らかにした。さらに、Ki-67 陽性細胞におけるフォーカス数の評価から、照射直後のフォーカス数には、幹細胞に特徴的な傾向は認めなかった。

今後、低線量率・低線量放射線照射を継続して行い、また、採取した臓器・組織における DNA 損傷動態の解析を完了して、低線量率・低線量被ばくマウスの組織幹細胞における DNA 損傷の蓄積と排除について科学的知見をまとめ、これらの研究成果により、福島での原子力被災者などの健康管理・健康不安対策に資する低線量率・低線量被ばくの影響解明をめざす。

キーワード：低線量、低線量率、100mGy、組織幹細胞、DNA 損傷

### I. 研究目的

東京電力福島第一原子力発電所の事故を受けて、低線量放射線、とりわけ 100mSv 以下の放射線被ばくによる健康影響についての多くの議論が交わされている。しかしながら、広島・長崎の原爆被爆者の疫学調査結果等では、100 mGy よりも低い低線量放射線による

健康影響について明確な答えを得る事は極めて困難で、このため、放射線防護の立場から直線しきい値なし（Linear Non-Threshold: LNT）モデルが採用されているが、このことが逆に、一般住民の健康不安を醸成する原因にもなっている。福島復興再生に向けた住民（ひいては国民）の安心のためにも、100mGy を下回るような低線量域での被ばくの影響の機構論に依拠した説明が望まれている。加えて、現存被ばくの状態では生活を続けている福島県民の安心・安全のための健康管理において、その科学的妥当性をより一層高めるためにも、年間 20mSv や生涯累積線量 100mSv 等の、長期低線量率・低線量慢性被ばくの影響の有無について、とりわけ発がんや継世代影響の標的となる組織幹細胞における放射線障害の蓄積の有無という観点から、科学的に実証された真実を得る事が求められている<sup>1)</sup>。そこで本研究では、低線量率・低線量被ばくモデル動物において、被ばくによって誘発される DNA 損傷および発がん変異の蓄積と排除を、放射線発がんの標的となる臓器・組織や生殖組織の幹細胞、あるいはそこから単離した幹細胞において解析することを目的とした。

## II. 研究方法

低線量率・低線量放射線の照射は、環境研の極低線量率・低線量放射線照射施設において行った<sup>2)</sup>。具体的には、長崎大学で購入した B6C3F1 マウス（1 グループ 6 匹）を環境研に搬入し、検疫の後に、0.05mGy/日、1mGy/日および 20mGy/日の条件で、累積線量が 1mGy あるいは 20mGy になるまで照射を継続した。コントロールとして非照射群を同期飼育した。また、陽性コントロールとして、高線量率照射群（400mGy/日で累積線量が 100mGy および 400mGy）を同様の方法により照射した。1 日の照射時間は 22 時間に設定し、残りの 2 時間を動物飼育環境のメンテナンスにあてた。目的の累積線量に達したところで、甲状腺、乳腺、脾臓、胸腺、消化管、肝臓、肺、腎臓、膀胱、卵巣および精巣を採取し、ホルマリン中で固定後にパラフィン包埋した。その後、4 ミクロンの厚さで薄切標本を作成して、脱パラフィン処理後に、PBS 中に保存した。

標本は、賦活化液中で 95°C で 30 分処理して、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。一次抗体としては、抗 53BP1 抗体（Bethyl、A300-272）および抗 Ki-67 抗体（DAKO、TEC-3）を用いた。反応終了後、PBS でよく洗浄して、二次抗体を 37°C で 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa532（488）標識の抗ウサギ IgG 抗体及び Alexa647（594）標識の抗ラット IgG 抗体を用いた。標本は、1 μg/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。また、組織幹細胞の特定には、幹細胞マーカーとして GPCR49 などに対する抗体を、細胞培養系を用いて検討した。

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最低でも 500 個（非照射群では DNA 損傷の頻度に応じて 1000 個程度まで）の細胞について解析を行い、53BP1 の斑点状のシグナル（フォーカス）の出現頻度を算出することにより DNA 損傷の蓄積および排除を評価した<sup>3)</sup>。

（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. 低線量率・低線量放射線照射および標本の作成

B6C3F1 マウスを 5~6 週齢で入手し、環境研の低線量照射棟に搬入した。1 ケージあたり 3 匹のマウスを入れて、検疫の後、8 週齢になったところで照射を開始した。0.05mGy/日、1 mGy/日、20 mGy/日の各線量率で照射を継続し、累積線量 1mGy あるいは 20mGy になったところで照射を終了し、非照射マウスと共にマウスを搬出して、環境研先端分子生物科学研究センターに搬入し、解剖を行った。各臓器・組織は 10%中性緩衝ホルマリン中で 1 日振盪し、流水洗浄の後に 70%エタノールに浸漬し臓器の切り出しを行った。切り出した臓器は、カセットに入れて自動包埋装置によりパラフィン包埋した。採取した臓器は甲状腺、乳腺、脾臓、胸腺、消化管、肝臓、肺、腎臓、膀胱および生殖腺で、薄切切片はスライドグラス上に固定した。また、予備実験の段階で、様々な厚さの切片を作成して検討したが、最終的に、厚さを 4 ミクロンに固定することに決定した。

#### 2. 組織における DNA 損傷の検出

まず、400mGy の高線量率照射マウスから採取した組織の標本切片を脱パラフィン後、抗体賦活化処理を施して、抗 53BP1 抗体で蛍光免疫染色を行ったところ、甲状腺、乳腺、消化管など、ほとんどの臓器で 53BP1 フォーカスを検出した。また、非照射マウス由来の組織でも、低頻度ながらフォーカスを検出した。消化管における解析からは、非照射マウスの消化管における自然発生の DNA 二重鎖切断の頻度は、おおよそ細胞あたり 0.01 個程度と見積られた。400mGy 照射後は、細胞あたり約 0.12 個程度のフォーカスが観察されたが、照射後 72 時間までには、非照射マウスで観察される自然発生のフォーカス形成頻度と同等のレベルまで減少していることが明らかになった。また、400mGy 照射後のフォーカス陽性細胞中のフォーカス数の分布を調べてみると、90%以上の細胞が 1 個のフォーカスを有しており、その分布は、非照射マウスで観察された分布と同じであった。

#### 3. 組織幹細胞における DNA 損傷評価

組織内に存在する幹細胞を特定するために、Ki-67 抗体による組織染色を行った。従来、Ki-67 抗原の検出は、そのほとんどが発色法で行われているが、本研究では、抗 53BP1 抗体を Alexa532 (赤橙色蛍光) で検出し、抗 Ki-67 抗体を Alexa647 (遠赤色光) で検出する方法を確立した。解析の結果、消化管では、Ki-67 陽性シグナルがクリプトの下方に位置する細胞で観察されたが、多くの組織においては、Ki-67 陽性細胞は散在することがわかった。400mGy 被ばくマウスにおけるフォーカス数の評価から、照射直後のフォーカス数には、幹細胞に特徴的な傾向は認められなかった。また、照射後のフォーカス数の減少でも、Ki-67 陽性細胞と陰性細胞との間に明確な差は認められなかった。

### IV. 考察

本研究は、低線量率・低線量放射線を照射したマウスに由来する臓器・組織において、DNA 二重鎖切断の消長を、組織幹細胞に着目して追跡する事が目的であったが、極低線量率・低線量放射線の照射は、青森県六ヶ所村にある環境研においてのみ可能であったために<sup>2)</sup>、あらかじめ環境研と長崎大学大学院医歯薬学総合研究科との間で共同研究契約を締結し、その上で、環境研において照射を行い、組織標本を長崎大で解析する研究体制を構築した。その結果、組織切片を凍結状態で搬送するなどの工夫をすることによって、本研究計画を滞りなく推進する体制を確立する事ができた。

組織標本を用いた DNA 損傷の解析における技術的な要件の第一は、薄切切片の厚みを何ミクロンに設定するかという問題である。理論的には、核全体が含まれるような厚みの

切片を作成するのが理想的であるが、実際には、10 ミクロン程度の厚みの標本は染色性が極端に悪く、また、解析の際に Z 軸方向の細胞核の重なりが障害となって、より客観的な定量解析が困難である。そこで、検討の結果、最終的に厚さを 4 ミクロンとする事で固定し、様々な厚みで確率的に細胞核が切られることを考慮して、最低でも 500 個の細胞について解析する事とした。次に問題になったのが、DNA 損傷分子マーカーの 53BP1 フォーカスと Ki-67 の二重染色法の確立であった。従来、Ki-67 抗原の検出は、そのほとんどが発色法で行われているが、その理由は、通常の蛍光免疫染色法で多用される緑色蛍光が、組織からの自家蛍光として自然に検出されてしまうため、蛍光二重染色が不可能である事による。そこで本研究では、抗 53BP1 抗体を Alexa532 (赤橙色蛍光) で検出し、抗 Ki-67 抗体を Alexa647 (遠赤色光) で検出する方法を確立した。Alexa647 による蛍光は、人間の目では感知できないため、特殊な蛍光フィルターを通して取得した画像を疑似カラー化することにより可視化に成功した。

確立した手法により、まず、400mGy の高線量率照射マウスから採取した組織の標本切片を解析したところ、甲状腺、乳腺、消化幹など、ほとんどの臓器で 53BP1 フォーカスを検出した。しかしながら、非照射マウス由来の組織でも、低頻度ながらフォーカスを検出することができ、放射線被ばくを受けてない状態でも、恒常的に DNA 損傷が誘発されている事が確認された。低線量率・低線量放射線の健康影響を評価する際には、自然放射線に加算される追加被ばくによる影響として多くの議論がなされるが、今回の結果から、その際に、生体内で恒常的に生成している DNA 損傷のレベルも考慮すべきである事が明確になった。今後は、各臓器・組織に固有の定常状態の DNA 損傷レベルを定量的に評価しておくことが必要で、その上で、低線量率・低線量放射線による DNA 損傷の誘導を評価する事が肝要である。

抗 Ki-67 抗体による Ki-67 陽性細胞の検出により、消化管では、陽性細胞がクリプトの下方に層状に観察されたが、それ以外の多くの組織においては、Ki-67 陽性細胞は散在することがわかった。Ki-67 陽性細胞は、増殖相に入っている細胞であり、必ずしも組織幹細胞を反映しているわけではない。そこで、他の幹細胞マーカーを用いて、組織幹細胞の特定を試みたが、消化管の場合の GPCR49 (Lgr5) の様に、確定されているマーカーであっても、免疫染色に応用できる抗体はほとんどなく、残念ながら、今年度の検討では、組織幹細胞の特定に有用な抗体は見つからなかった。しかしながら、昨今の幹細胞研究の爆発的な広がりやを反映して、新しい抗体が次々と開発されている現状を考慮して、今後も免疫染色に耐え得る抗体の検索を継続して行う予定である。

組織幹細胞における DNA 損傷の消長を評価するために、Ki-67 陽性細胞における 53BP1 フォーカスの誘導を検討した。その結果、照射直後のフォーカス数には、Ki-67 陽性細胞に特徴的な傾向は認められなかった。また、照射後のフォーカス数の減少でも、Ki-67 陽性細胞と陰性細胞との間に定性的観察においては明確な差は認められなかった。一方、高線量 (12Gy 以上) では、小腸幹細胞の方がより効率的に DNA 損傷を修復したとする報告もあり<sup>4)</sup>、低線量あるいは低線量率・低線量放射線被ばくの DNA 損傷の排除について、定量的な解析の結果が待たれる。

## V. 結論

低線量率・低線量放射線被ばくマウスにおいて、採取した臓器・組織における DNA 損傷の蓄積と排除を解析する実験系を確立した。甲状腺、乳腺、消化管など、ほとんどの臓器で 53BP1 フォーカスの誘導を観察し、非照射マウスにおいても低頻度ながら生じている

DNA 損傷が、放射線被ばくにより増加する事を確認した。また、Ki-67 と 53BP1 との二重蛍光染色法を確立し、組織幹細胞における DNA 損傷の蓄積と排除に係わる解析が着実に進んでいる。

#### VI. 次年度以降の計画

平成 24 年度は、3 年の全体計画の中の初年度として位置づけられ、低線量率・低線量放射線照射を開始すると同時に、照射マウスから目的とする臓器・組織を採取し、DNA 損傷の定性的な観察を始めた。平成 25 年度は、累積線量 100mGy の低線量率・低線量放射線照射を開始すると同時に、平成 24 年度に採取した累積線量 1mGy および 20mGy の標本の定量的な解析を進める。そして、平成 26 年度までに、これら全ての標本の解析を終了して、低線量率・低線量放射線被ばくによる DNA 損傷の組織幹細胞における蓄積と排除に関する科学的知見を提示する。また、組織幹細胞における DNA 損傷の消長が、DNA 損傷修復によるものか、あるいは DNA 損傷を受けた幹細胞のアポトーシスによる排除の結果なのかを明確にするために、平成 25 年度からは、EdU の投与により組織幹細胞が一時的に標識されるのを利用して<sup>5)</sup>、DNA 損傷の消長と共に DNA 損傷を受けた幹細胞の運命を追跡する計画を策定した。

本研究に関する現在までの研究状況、業績  
なし

#### 引用文献

- 1) Niwa O. Roles of stem cells in tissue turnover and radiation carcinogenesis, *Radiat Res* 2010; 174: 833-839.
- 2) Tanaka S Tanaka IB III Sasagawa S ~. No lengthening of life span in mice continuously exposed to gamma rays at very low dose rates, *Radiat Res* 2003; 160: 376-379.
- 3) Suzuki K Nakashima M Yamashita S. Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue, *Radiat Res* 2010; 174: 415-423.
- 4) Hua G Thin TH Feldman R ~. Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant. *Gastroenterology* 2012; 143: 1266-1276.
- 5) Imaoka T Hisatsune H Sakanishi Y ~. Progesterone stimulates proliferation of a long-lived epithelial cell population in rat mammary gland. *J Endocrinol Invest* 2012; 35: 828-834.



# Analysis of DNA damage accumulation in tissues exposed to low dose and low-dose rate radiation

Keiji Suzuki

*Department of Radiation and Life Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences*

*Keywords:* Low-dose; Low-dose-rate; Dose-rate effect; 100 mGy; Tissue stem cells; DNA damage

## **Abstract**

After the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant in Japan, much attention has been paid for probable health risks associated with annual low-dose radiation exposure. While the epidemiological studies of A-bomb survivors from Hiroshima and Nagasaki have indicated a linear dose-dependent increase in cancer risk at doses above 100 mGy, it is quite difficult to estimate cancer risks stem from lower doses of radiation, e.g. less than 100 mGy. Thus, the LNT model has been adopted and used as the current standard for radiation protection. However, the LNT model does not always explain biological and epidemiological data. Although the LNT model assumes that accumulation of the initial radiation-induced damage in the target cells is associated with cancer development, this has not been proven in any of the experimental systems so far. Therefore, current study aimed to demonstrate whether DNA damage is accumulated in mouse tissues exposed to low-dose-rate radiation. B6C3F1 mouse were exposed to low-dose-rate gamma-rays until the total dose became 1 or 20 mGy, and several organs, including thyroid, mammary gland, intestine et al., were obtained. Then, tissue slices were incubated with anti-53BP1 and anti-Ki-67 antibodies to visualize DNA damage and proliferating cells, respectively. Obtained results show that 53BP1 focus are detectable in every tissues derived from exposed mouse, whereas they are also observed in the control mouse. The Ki-67-positive cells are identified in some of the tissues. For example, a lower half of the small intestinal crypts is mostly Ki-67-positive. These cells show similar levels of DNA damage compared with those observed in the Ki-67-negative crypt cells. The present study established an experimental system, by which accumulation and exclusion of DNA damage in the tissue and/or tissue stem cells can be determined. The results are anticipated to provide scientific evidences that should contribute to the scientifically acceptable estimation of cancer risks from low-dose-rate radiation exposure.

# 研究課題名：低線量率・低線量放射線被ばくによる組織幹細胞 の放射線障害の蓄積に関する研究

## 研究項目名：低線量率・低線量被ばくによる乳腺幹細胞への影響蓄積の評価

今岡達彦（放射線医学総合研究所放射線防護研究センター発達期被ばく影響研究プログラム反復被ばく研究チームチームリーダー）

### 研究要旨

環境の放射性物質汚染がもたらし得る健康リスクに関心が高まっていることから、リスク評価体系の基盤となる新たな科学的根拠を創出するため、組織幹細胞への放射線影響を評価することが本研究の目的である。本年度は、ラットより採取した乳腺幹細胞を用いて、細胞致死に放射線が及ぼす影響を評価し、また再生能及び分化能の評価実験系の確立を試みた。その結果、細胞凝集塊形成率の低下を指標とした幹細胞致死の感受性は比較的低いことがわかった。また、細胞凝集塊形成率を指標とした再生能評価系を確立し、分化誘導条件下での細胞凝集塊の分化マーカー発現を指標にした分化能評価系を確立した。次年度以降は、この評価系を利用した放射線影響の評価、及び、放射線が DNA 損傷生成に及ぼす効果を評価するための予備実験ならびにデータ収集を実施する。

キーワード： 組織幹細胞、乳腺、放射線影響、再生、分化

### I 研究目的

東北地方太平洋沖地震に伴う原子力発電所の事故により放出された放射性物質による環境の汚染を受けて、低線量率・低線量放射線被ばくによる障害への関心が高まっている。原子力被災者の健康管理の礎となる現行放射線リスク評価体系の根幹は LNT 仮説であるが、その根拠をなす科学的推論のうち、放射線が発がんのイニシエーションのみに関わっているという部分については、科学的根拠が不足している<sup>1-3)</sup>。また、近年の幹細胞生物学の進展が放射線リスク評価の成立基盤に及ぼす潜在的インパクトは大きい<sup>4)</sup>、放射線分野で基礎的幹細胞研究は重点的に取り組まれてこなかった。

そこで本研究では、組織加重係数の最も高い組織のひとつである乳腺に注目して、発がんの起源である組織幹細胞に放射線が及ぼす DNA 損傷生成、細胞致死、再生能及び分化能への影響を定量的に解明し、もって直線しきい値なし (LNT) 仮説の根拠となる推論が成り立つかどうかを例証することを目的とする。本年度は、放射線が乳腺幹細胞の致死に及ぼす効果を解明し、さらに再生能及び分化能を評価する実験系を確立することを目的とした。

### II 研究方法

幹細胞致死効果の検討：12～15 週齢の成体雌 LEW 系統ラットを麻酔下で放血によって安楽死させた後、解剖して下腹部乳腺を採取した。採取した組織を眼科用剪刀にて細断し、0.1% コラゲナーゼ III 処理を数時間行って遠心することにより、乳腺上皮組織塊を得た。さらに、これを 0.25% トリプシン及び DN アーゼ I で処理して単一細胞に解離し、実験に用いた。実験ではセシウム 137 ガンマ線を非照射もしくは 100mGy から 8Gy で急照射（約 0.5Gy/分、室温）した。100mGy に関しては、セシウム 137 ガンマ線低線量率照射（1mGy/分、100 分、室温）も行った。照射の後、幹細胞を濃縮する培養条件（成長因子等添加物を含む MammoCult 培地）にて 1 週間培養し、形成された細胞凝集塊数（先行研究<sup>5)</sup> によって幹細胞数を反映するとされる。）を顕微鏡下で評価して、幹細胞致死への影響を検討した。

再生能評価系の開発：上記と同様に単離した乳腺上皮細胞を、幹細胞を濃縮する培養条件にて 1 週

間培養し、幹細胞の凝集塊を得るとともに、形成された細胞凝集塊数を評価した。また、この細胞凝集塊を解離し、同じ条件で1週間再培養して、再び形成された細胞凝集塊数を評価した。

分化能評価系の開発：上記と同様に単離した乳腺上皮細胞を、幹細胞を濃縮する培養条件にて培養し、幹細胞の凝集塊を得た。次にこの細胞凝集塊を、分化を誘導する条件に移して1週間再培養し、細胞をホルマリン固定したのち、筋上皮細胞への分化をサイトケラチン14の免疫細胞化学的染色によって、内腔上皮細胞への分化をサイトケラチン18の免疫細胞化学的染色によって、それぞれ評価した。

(倫理面への配慮)

実験動物を使用する部分に関しては、放射線医学総合研究所動物実験委員会にて承認された実験計画に基づき、動物愛護法ならびに放射線医学総合研究所「動物実験等実施に関する規程」「実験動物取扱者の健康管理等に関する基準」及び「実験動物の衛生管理等に関する基準」を遵守して実施した。

### III 研究結果

#### 1. 幹細胞致死効果

酵素処理によって単離したラット乳腺上皮細胞にガンマ線を100mGyから8Gyで急照射し、幹細胞を濃縮する培養条件での細胞凝集塊の形成を評価したところ、100mGyでは線量率(0.5Gy/分もしくは1mGy/分)に関わらず細胞凝集塊の形成率に変化は見られなかった。線量が増すに従って細胞凝集塊の形成率が低下する傾向が見られたが、8Gyでも0Gyの場合の50%程度までにはしか低下しなかった。このように、細胞凝集塊形成率を指標とした場合、幹細胞は比較的放射線の細胞致死作用に対して耐性であった。

#### 2. 再生能評価系の開発

非照射の乳腺上皮細胞を $1 \times 10^5$ 細胞/ウェルで播種してから1週間後の細胞凝集塊の形成率は約0.1%であった。この細胞凝集塊を解離して得られる細胞数は初期の10分の1以下と少なかったが、 $1 \times 10^4$ 細胞/ウェルで播種して1週間培養することで再び細胞凝集塊を形成させると、細胞凝集塊の形成率はやはり約0.1%であった。これにより細胞凝集塊の再生能評価系を開発できた。

#### 3. 分化能評価系の開発

非照射の乳腺上皮細胞から作成した細胞凝集塊を、マトリゲルにより薄層コートしたチャンバースライド上で1週間培養することで分化誘導した。各細胞凝集塊に由来する個々の細胞は、集積した状態でマトリゲルに接着し、2次元の細胞コロニーを形成した。これをホルマリン固定した後、筋上皮細胞への分化をサイトケラチン14、内腔上皮細胞への分化をサイトケラチン18の蛍光二重免疫染色によって評価した。サイトケラチン14陽性及びサイトケラチン18陽性細胞が混在するコロニーや、サイトケラチン14及びサイトケラチン18二重陽性細胞から成るコロニーが確認できた。これにより分化能評価系を開発できた。

### IV 考察

幹細胞致死効果に関しては、細胞凝集塊の形成を指標として評価した場合、8Gyまでの急照射で比較的良好に生存することがわかった。このことは、この細胞が照射後も比較的良好に生存して発がんの原因となることを示唆している。実際、ラット乳腺に1~8Gyを局所照射しても線量依存的に発がんが誘発される<sup>9)</sup>。また、低線量率での100mGy照射による有意な影響は観察されなかった。本指標による放射線感受性が高くなかったため、低線量率で統計学的に有意な致死効果を見るためには5日以上(8Gyの場合)も照射する必要があると見られ、実験に適さない。今後、高い感受性を示す指標が発見された場合、その指標について低線量率の効果を見る実験を実施したい。

再生能及び分化能の評価系の開発に関しては、次年度以降、これを利用した放射線影響の評価を行う。本年度の実験により幹細胞が照射後も比較的良好に生存することが示唆されたが、この幹細胞が再生能及び分化能を非照射の場合と同程度に有しているかどうかは不明である。本年度開発した評価系を用いることで、この点を明らかにすることができる。我々が過去に調べた結果では、細胞凝集塊自体は筋上皮細胞あるいは内腔上皮細胞の分化マーカーをほとんど発現していない（未発表の観察）。細胞凝集塊を分化誘導条件に移すと、サイトケラチン 14 陽性細胞（すなわち筋上皮細胞）及びサイトケラチン 18 陽性細胞（すなわち内腔上皮細胞）が混在するコロニーが確認された。このようなコロニーは、両方向に分化する能力を有する細胞に由来すると考えられる。またサイトケラチン 14 及びサイトケラチン 18 二重陽性細胞から成るコロニーも確認された。このような二重陽性の細胞はヒトや実験動物の乳腺上皮組織中にも観察されているが<sup>7)</sup>、その正体はよくわかっていない。今回の観察においては、この細胞は分化誘導条件でも筋上皮細胞や内腔上皮細胞（単一陽性の細胞）にまでは分化していないことから、両方向に分化する能力を有する細胞とは異なるものであると考えられる。

## V 結論

乳腺の幹細胞に対する放射線の致死効果を評価し、感受性が比較的低いことを明らかにした。また再生能及び分化能の評価系を開発した。

## VI 次年度以降の計画

次年度以降は、本年度に開発した評価系を利用して、放射線照射が再生能、分化能に及ぼす効果を解明する実験を実施する。また、放射線が DNA 損傷生成に及ぼす効果を評価するための予備実験を行い、データの収集を開始する。具体的には、細胞凝集塊における DNA 損傷の評価と、個体内に生成された DNA 損傷の運命の評価に関する実験を行う。加えて、組織幹細胞を *in vivo* で EdU で標識することにより、DNA 損傷を受けた幹細胞の運命を追跡する実験系を確立し、DNA 損傷の組織からの排除の分子基盤を解明する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

なし

## 引用文献

- 1) International Commission on Radiological Protection. Low-dose Extrapolation of Radiation-related Cancer Risk, *Annals of ICRP* 2005; 35
- 2) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Biological mechanisms of radiation actions at low doses. A white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work, United Nations, 2012
- 3) National Council on Radiation Protection and Measurements. Uncertainties in the estimation of radiation risks and probability of disease causation, NCRP Report No. 171, 2012
- 4) Niwa O. Roles of stem cells in tissue turnover and radiation carcinogenesis, *Radiation Research* 2010; 174: 833-839
- 5) Dontu G Abdallah WM Foley JM et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells, *Genes and Development* 2003; 17: 1253-1270
- 6) Bond VP Shellabarger CJ Cronkite EP et al. Studies on radiation-induced mammary gland neoplasia in the rat. 5. Induction by localized irradiation, *Radiation Research* 1960; 13: 318-328

- 7) Joshi PA Khokha R. The mammary stem cell conundrum: is it unipotent or multipotent?, Breast Cancer Research 2012; 14: 305

# Evaluation of accumulation of low dose/low dose rate radiation effects on mammary stem cells

Tatsuhiko Imaoka<sup>\*1</sup>, Ayaka Hosoki<sup>1</sup>, Kazuhiro Daino<sup>\*1</sup>, Isao Kawaguchi<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup>*National Institute of Radiological Sciences*

*Keywords:* Tissue stem cells; Mammary gland; Cellular radiation effect

**Abstract** (400 語以内)

The Fukushima Daiichi nuclear power plant accident has provoked a nationwide concern about health risks of radiation from contaminated environmental radionuclides. The goal of the present project is to offer a novel scientific basis of estimating radiation risks and, specifically, the study aims at evaluating radiation effects on tissue stem cells. This year, mammary stem cells were collected from rats and used for evaluating the effect of radiation on their lethality and for establishing systems to evaluate their self-renewing and differentiating capabilities. As results, the sensitivity of mammary stem cells to the killing effect of radiation was relatively small as indicated by the rate of sphere formation in culture. Experimental systems were established to evaluate self-renewal with sphere-forming efficiency as an indicator and to measure differentiating activity of sphere-forming cells by marker protein expressions. The subsequent years will be devoted to evaluation of radiation effects using these established systems and, further, to preliminary and actual experiments to evaluate generation of DNA damage by radiation.

研究課題名「低線量率・低線量放射線被ばくによる組織幹細胞の  
放射線障害の蓄積に関する研究」

研究項目名「消化管幹細胞に対する放射線応答の線量率効果の評価」

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

低線量率放射線被ばくによるがんリスクの推定は、高線量率放射線のがんリスクをもとに推定せざるをえないが、生物学的には同じ集積線量でも線量率が異なれば生物効果が異なる「線量率効果」が知られており、そのため低線量率・低線量放射線による発がんリスクを考えるにあたっては、発がんの標的細胞における線量率効果の機構を生物学的に理解することが必要である。近年、発がんの標的が組織幹細胞であることが報告されたことから、本研究では、組織幹細胞に対する線量率効果を、幹細胞への障害の蓄積性の観点から明らかにすることを目的とした。消化管幹細胞マーカーとして知られる *Lgr5* 幹細胞と、その子孫細胞を標識させる幹細胞系譜追跡法によって幹細胞ターンオーバーに対する高線量率および低線量率放射線による影響を調べたところ、高線量率放射線で観察されたターンオーバーが低線量率放射線では検出されず、線量率効果があることを確認した。また、組織幹細胞における DNA 損傷の蓄積の有無を評価するために、DNA 損傷修復タンパクの一つである *53BP1* の集積を指標にしたところ、消化管幹細胞における DNA 損傷の蓄積が評価可能であることが明らかとなった。これらの成果は、低線量率放射線の組織レベルの応答の解明や、100 mGy 以下の放射線による健康影響を推定するために重要である。

キーワード: 低線量、低線量率、線量率効果、消化管、組織幹細胞、DNA 損傷

I 研究目的

低線量率放射線被ばくによる発がんリスクの推定は、疫学単独では統計学的な制約から限界があるため、高線量率放射線のがんリスクをもとに推定せざるをえない。しかしながら、生物学的には同じ集積線量でも線量率が異なれば生物効果が異なる「線量率効果」があることが知られている。そのため、低線量率・低線量放射線による発がんリスクを推定する際には、(1) 発がんの標的細胞に対して線量率効果が観察されるのかを確認すること (2) 線量率効果が観察される場合にはその機構を生物学的に理解することが重要な課題である。近年、固形がんが突然変異を起こした正常な組織幹細胞に由来すること、すなわち、発がんの標的細胞が組織幹細胞であることが報告された<sup>1)</sup>。また、組織幹細胞は組織細胞を維持するために生涯にわたって組織に存在するため、組織幹細胞に対して放射線障害がどの程度蓄積するのか、そして蓄積しない場合に放射線障害が組織からどのように排除されるのかを明らかにすることが、放射線発がんのリスクを評価するための直接の指標になると考えられる<sup>2)</sup>。そこで、本研究では、組織幹細胞に対する線量率効果を、幹細胞への障害の蓄積性の観点から明らかにすることを目的とした。

## II 研究方法

組織幹細胞に対する放射線影響を評価するために、消化管幹細胞マーカーとして知られる *Lgr5* 幹細胞において、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*) で標識させる幹細胞系譜追跡法 (Lineage tracing<sup>1)</sup>) が適用可能なマウス (*Lgr5-cre/ROSA26-LacZ* マウス) を用いて、摘出した組織に対して  $\beta$ -gal の発色を行い、大腸のクリプト断面の切片を作製した (図 1)。幹細胞のうち標識されたものは *LacZ* 遺伝子の作用で細胞が青く染まる。青い細胞をもつクリプトの頻度 (測定したクリプトあたりの *LacZ* 陽性細胞を持つクリプトの比率、%) を測定した。我々は、*Lgr5-cre/ROSA26-LacZ* マウスを用いたこれまでの研究で、1 Gy の高線量率 X 線照射によって大腸幹細胞が消失し、その後、新しい *Lgr5* 幹細胞が作られる (すなわち、ターンオーバーが刺激される) ことを見出した<sup>3)</sup>。そこで本研究では、100 mGy の低線量放射線を照射したマウスでターンオーバーの刺激が検出可能かを評価した。線量率は将来 100 mGy 以下の照射を行うことを見越し、実験精度を高めるために 0.5Gy/分で行うことを計画したが、陽性コントロールとした 1 Gy の検出には 1.5 Gy/分が良いことが判明したため、統計学的な検出感度を優先し、本実験では高線量率照射を 1.5 Gy/分とした。*Lgr5-cre/ROSA26-LacZ* マウスに 4OHT を投与 30 日後に、高線量率 X 線を 100 mGy 照射し、マウスの大腸において観察される *LacZ* 陽性クリプト率を調べた。また、*Lgr5-cre/ROSA26-LacZ* マウスに 4OHT を投与 30 日後に、低線量率 (3 mGy/時) のガンマ線を集積線量が 1 Gy になるように約 2 週間連続照射し、マウスの大腸において観察される *LacZ* 陽性クリプト率を調べた。低線量率照射は、当所が保有する低線量率長期照射施設 (クリーンルーム内に動物飼育ラックと <sup>137</sup>Cs のガンマ線源を設置した連続照射ができる施設) にて行った。低線量率ガンマ線の線量測定は、蛍光ガラス線量計素子 GD-301 (旭テクノグラス株式会社) を用いて行った。線量率は、あらかじめ照射条件と同じマウスケージ (前後左右、合計 4 か所) にガラス線量計を貼り付け、照射後の線量計の読み値から空間線量率が平均 3 mGy/時になるケージ位置を決定した。陽性コントロールとして、4OHT 投与 30 日後に高線量率 X 線 1 Gy を照射したマウスで大腸幹細胞ターンオーバーの頻度を調べた。次に、組織幹細胞のターンオーバーのメカニズムを細胞の増殖と排除 (アポトーシス) および DNA 損傷蓄積性から明らかにするための実験を行った。細胞の増殖は、BrdU の取り込みおよび Ki67 の染色性で確認した。アポトーシスについては、1 Gy 照射後の腸管に対して TUNEL 法を用いて解析した。DNA 損傷の有無を評価するために、DNA 損傷修復タンパクの一つである 53BP1 に着目した。53BP1 は DNA 損傷部位に集積 (フォーカス形成) して、損傷修復後に消失する (修復されるまで細胞に残存する) ため、組織細胞における DNA の修復能を反映する良い指標であることが報告されている<sup>4)</sup>。そこで、幹細胞における DNA 損傷の蓄積を、消化管幹細胞あたりの 53BP1 のフォーカス形成頻度とその修復動態によって評価可能かを検討した。まず、マウスに高線量率 X 線を 1 Gy を照射し、6 もしくは 24 時間後に解剖し、消化管 (小腸および大腸) 組織のパラフィン包埋切片を作製した。また、組織幹細胞における 53BP1 のフォーカス形成を観察するため、幹細胞マーカーとして知られる *Lgr5* 遺伝子を発現する幹細胞でタグ (EGFP) を発現するマウス (以下、*Lgr5-EGFP* マウス) を用い、EGFP と 53BP1 の共染色が可能かを検討した。

(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

Lgr5-cre/ROSA26-LacZ マウスに 4OHT を投与 30 日後に、100 mGy, 1 Gy の高線量率照射および 3 mGy/時の低線量率ガンマ線を 14 日間 (330 時間)、集積線量が 1 Gy に到達するまで低線量率照射を行い、大腸組織の幹細胞ターンオーバー頻度を測定した結果を表 1 に示す。非照射マウス (n = 8) では、LacZ 陽性クリプトの頻度が  $2.48 \pm 0.95\%$  となり、これまでの実験結果とほぼ同じ値を示した。1 Gy の X 線照射マウス (n = 2) では、 $1.34 \pm 0.98\%$  となり、高線量率 1 Gy が幹細胞ターンオーバーを誘導することを確認した。高線量率 X 線を 100 mGy 照射したマウス (n = 8) では、 $1.48 \pm 0.91\%$  となり、ターンオーバー頻度の低下が認められたが、非照射群との t 検定では有意差は認められなかった ( $P = 0.084$ )。低線量率ガンマ線を 1 Gy まで連続照射したマウス (n = 5) では、 $2.12 \pm 0.52\%$  となり、非照射とほぼ同程度の頻度であった。次に、放射線による 53BP1 のフォーカス形成頻度、その組織内の部位による分布、およびその細胞増殖活性との相関を明らかにするため、消化管組織サンプルに対して、53BP1 および細胞増殖マーカーである Ki67 の蛍光染色を行った。図 2 は非照射、1 Gy 照射 6 時間後、および 1 Gy 照射 24 時間に解剖したマウス小腸および大腸における 53BP1 (赤) および Ki67 (緑) を蛍光染色した結果を示す。1 Gy の照射によって、消化管クリプト部分に多くの 53BP1 のフォーカスが形成されることを確認した。このフォーカスは、非照射ではほぼ観察されなかった。また、照射 6 時間後より 24 時間後の 53BP1 フォーカス数が減少する傾向が観察された (図 3)。Ki67 の発現を指標とした細胞増殖活性を調べたところ、小腸では照射後にも Ki67 陽性細胞が多く観察されたが、大腸では観察される頻度が低下していた。各細胞における 53BP1 のフォーカスの有無と、Ki67 の発現の有無で細胞を分類した (表 2)。Ki67 発現細胞の頻度は、放射線照射によって小腸よりも大腸で顕著に低下し、これまでの研究データと一致した<sup>3)</sup>。また、1 Gy 照射 6 時間後に観察された 53BP1 フォーカスは、予想通り、小腸、大腸とも、Ki67 陰性細胞に多い結果が得られた。次に、消化管幹細胞における 53BP1 フォーカスを評価するため、Lgr5-EGFP マウスに、1 Gy の高線量率放射線を照射し、6 時間後に解剖し、Lgr5-EGFP マウスの小腸および大腸のホルマリン固定パラフィン包埋切片を 4  $\mu\text{m}$  厚で作製した。図 4 は小腸のクリプト円周断面像に GFP (緑)、53BP1 (赤)、および細胞核 (青) の蛍光共染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察を行った結果を示す。本実験系で Lgr5 幹細胞マーカーと照射後の 53BP1 フォーカスを同時に検出可能であることが確認できた。

### IV 考察

大腸はヒトでも放射線発がんの重要な標的臓器であるため<sup>5)</sup>、大腸における Lgr5 幹細胞のターンオーバー動態は、放射線発がんのリスクを生物学的に解明する重要な指標であると考えられる。著者らは、これまでに Lgr5 幹細胞の細胞系譜追跡法によって大腸で 1 Gy の放射線誘発ターンオーバーが検出可能であることを明らかにしている<sup>3)</sup>。本研究において、我々は 100 mGy の高線量率 X 線によっても、大腸の幹細胞ターンオーバーが検出される傾向を認めた。これは非照射群との間で統計学的には有意な差は認められなかったため、今後実験数を重ねることで 100 mGy の影響が観察可能かを明らかにする必要がある。本研究結果は、予備的考察ではあるが、低線量では大腸幹細胞のターンオーバーが刺激されにくい可能性を示している。これは、高線量率 1 Gy 照射の場合に幹細胞プールが失われる結果<sup>3)</sup>とは異なり、幹細胞に対する影響が線量依存的であることを示している。一方、低線量率照射の場合、3 mG/時 (72 mGy/日に相当) で 1 Gy を照射しても幹細胞ターンオーバーの刺激は検出されず、線量率効果があることを示した。これまでも個体の線量率効果に

関しては複数の報告があった。古くは精子の突然変異頻度を様々な線量率で比較した Russell らの研究があり、10-100 mGy/分と 12 mGy/日では突然変異頻度が変わらず<sup>6)</sup>、線量率効果には下げ止まりがあると考えられた。一方、消化管上皮細胞の突然変異における線量率効果は、Russell らの報告よりも低線量率 (6 mGy/日) で観察されており<sup>7)</sup>、さらに低い 1 mGy/日の線量率では、20 mGy/日の線量率と比べてリンパ球の染色体異常頻度が小さくなることが明らかになった<sup>8,9)</sup>。これらの結果から、低線量率では障害の蓄積の寄与は極めて小さいものと考えられる。低線量率放射線によるターンオーバーの刺激効果が小さかったため、低線量率照射下で細胞増殖や細胞死の誘発刺激が小さい可能性があり、細胞増殖や細胞死の組織動態を解析する手法については今後の課題であると考えられた。また、本実験では低線量率照射群は、2 週間の照射期間終了直後に解剖してターンオーバーを観察したが、高線量率照射群は照射終了から 7 日後に評価したことから、低線量率放射線の照射終了からさらに時間が経過した後に LacZ 陽性クリプト頻度を測定することで、遅延的なターンオーバーが検出された可能性がある。従って、低線量率照射の場合、今後は幹細胞ターンオーバーの遅延を考慮して、LacZ 陽性クリプト頻度の照射終了後の時間経過を調べる必要があるだろう。本研究結果が示唆するように、低線量率放射線が消化管幹細胞のターンオーバーを刺激せず、幹細胞プールが維持されることは、低線量率連続被ばくによって組織幹細胞に DNA 損傷が蓄積するかを評価することの生物学的な重要性をより浮き彫りにした。本実験では、高線量率 1 Gy 照射 6 時間後で 53BP1 のフォーカス頻度が顕著に増加することを確認したが、フォーカスが特定の部位に局在することはなかった。ただし、小腸の場合はクリプト中間部で 53BP1 フォーカス頻度が小さい傾向が認められた。小腸ではクリプト中間部は、増殖能が亢進していることが知られており<sup>10)</sup>、Ki67 を発現する細胞では DNA 損傷修復が速やかに起こっている可能性が考えられた。一方、大腸の場合は、クリプトのどの位置にも同程度にフォーカスが認められたため、幹細胞と前駆細胞の間に DNA 損傷修復能の違いはない可能性がある。今後は、さまざまな線量、およびさまざまな時間経過後のフォーカス数を評価することで修復動態を明らかにし、また Lgr5 幹細胞 (EGFP 発現細胞) における修復動態を詳しく解析することで、幹細胞における放射線照射後の DNA 損傷応答動態を明らかにすることが必要である。

## V 結論

本研究により、幹細胞ターンオーバーの線量率効果や、その機構として DNA 損傷の蓄積に関する議論を生物学的に進められるようになった。線量率が異なる場合に幹細胞の放射線発がんリスクへの寄与を科学的に推定できれば、高線量被ばくの外挿で放射線発がんリスクを推定することの正当性に対する問いかけとなり、また、100 mGy を下回る低線量域での最適な放射線防護を考えることに役立つことが期待される。

## VI 次年度以降の計画

本年度の成果をもとに、次年度以降は幹細胞ターンオーバーについて高線量率放射線の 100 mGy の影響について統計学的な精度を高める。また、低線量率放射線 (3 mGy/時) の照射終了から解剖までの時間を置くことで低線量率・低線量放射線でターンオーバーの刺激が遅延的に観察されるかを確認する。また、放射線障害の蓄積の観点から、DNA 損傷の消長と合わせて、EdU 等の標識による組織動態を、放射線障害の排除の観点から、幹細胞のアポトーシスによる排除について、低線量率・低線量放射線の寄与を明らかにする。以上の課題を進めながら、障害蓄積性に関するデータを網羅的に集積する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績  
なし

#### 引用文献

- 1) Barker N Ridgway RA van Es JH, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer, *Nature* 2009; 457: 608-611.
- 2) Niwa O. Roles of stem cells in tissue turnover and radiation carcinogenesis, *Radiat Res* 2010; 174: 833-839.
- 3) Otsuka K Hamada N Magae J, *et al.* Ionizing radiation leads to the replacement and de novo production of colonic Lgr5<sup>+</sup> stem cells, *Radiat Res in press*.
- 4) Suzuki K Nakashima M Yamashita S. Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue, *Radiat Res* 2010; 174: 415-423.
- 5) Preston DL Ron E Tokuoka S, et al. Solid Cancer Incidence in Atomic Bomb Survivors: 1958–1998, *Radiat Res* 2007; 168: 1-64.
- 6) Russell WL Kelly EM. Specific-locus mutation frequencies in mouse stem-cell spermatogonia at very low radiation dose rates, *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 539-541.
- 7) Tucker JD Sorensen KJ Chu CS, et al. The accumulation of chromosome aberrations and Dlb-1 mutations in mice with highly fractionated exposure to gamma radiation, *Mutat Res* 1998; 400: 321-335.
- 8) Tanaka K Kohda A Satoh K, et al. Dose-rate effectiveness for unstable-type chromosome aberrations detected in mice after continuous irradiation with low-dose-rate, *Radiat Res* 2009; 171: 290–301.
- 9) Tanaka K Kohda A Satoh K. Dose-rate effects and dose and dose-rate effectiveness factor on frequencies of chromosome aberrations in splenic lymphocytes from mice continuously exposed to low-dose-rate gamma-radiation, *J Radiol Prot* 2013; 33: 61-70.
- 10) Potten CS. Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine, *Radiat Res* 2004; 161: 123-136.

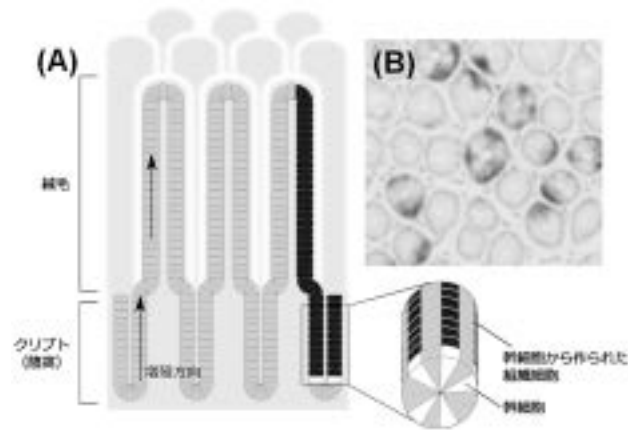


図1 消化管幹細胞ターンオーバーの解析方法

(A) 消化管構造の模式図。消化管は栄養や水分を吸収する役割の絨毛（小腸のみ）と、絨毛細胞を常に供給しているクリプト（陰窩）から構成される。消化管組織は入れ替わり（ターンオーバー）が早いため、クリプトでの細胞増殖は著しい。クリプト底部には、組織細胞を供給する幹細胞が存在し、ターンオーバーの早い組織を支持している。消化管幹細胞は *Lgr5* タンパクを有しているが、*Lgr5* を持つ細胞で *EGFP* が発現する遺伝子組換えマウスを用いて幹細胞の場所を特定することが可能である。また、*Lgr5* を持つ細胞でタモキシフェンの投与に依存してレポーター遺伝子の発現を誘導することができる遺伝子組換えマウスを用いると、幹細胞で組換えを起こした子孫細胞すべてにレポーター遺伝子が発現するため、幹細胞由来であることを追跡して可視化できる。本研究では、*X-gal* の発色によって組織中で青く染まる *LacZ* 遺伝子をレポーターとして導入したマウスを使用しており、組換えを起こした幹細胞とその子孫細胞が青くラベルされる。(B) クリプトの円周方向に組織を薄切すると（円形をしているのが各クリプト断面）、*LacZ* の発現でラベルされたクリプトが可視化できる（図中の濃い色）ため、*LacZ* で標識されたクリプトの頻度を指標に、幹細胞のターンオーバーを評価することが可能である。

表 1 大腸における LacZ 陽性クリプト頻度の線量率による違い

照射条件	No.	測定した クリプト数	LacZ 陽性 クリプト数	LacZ 陽性 クリプト頻度 (%)	平均値 ± 標準偏差			
非照射	1	625	16	2.56	2.48	±	0.95	
	2	838	14	1.67				
	3	734	32	4.36				
	4	1,190	13	1.09				
	5	882	25	2.83				
	6	1,154	26	2.25				
	7	1,597	43	2.69				
	8	1,092	26	2.38				
1 Gy	1.5Gy/分	1	1,401	9	0.64	1.34	±	0.98
		2	1,232	25	2.03			
	3mGy/時	1	1,855	53	2.86	2.12	±	0.52
		2	2,389	54	2.26			
		3	2,671	40	1.50			
100 mGy	1.5Gy/分	1	646	19	2.94	1.48	±	0.91
		2	1,023	12	1.17			
		3	1,351	9	0.67			
		4	1,206	9	0.75			
		5	881	8	0.91			
		6	875	19	2.17			
		7	398	3	0.75			
		8	278	7	2.52			

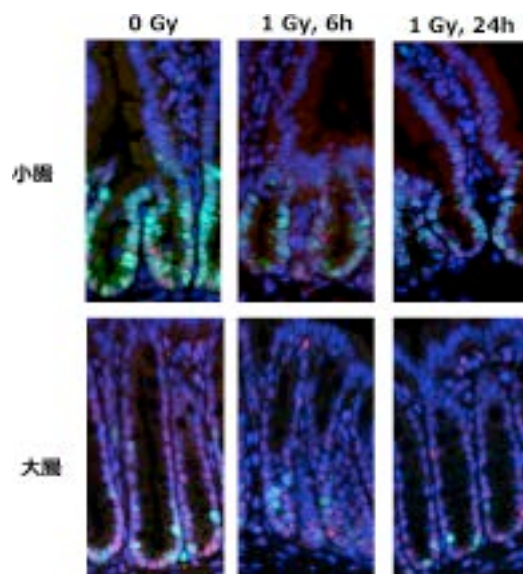


図2 消化管切片における放射線誘発 53BP1 の集積および Ki67 の分布

マウスに高線量率 X 線 1 Gy を照射し、6 もしくは 24 時間後に解剖した。マウス消化管のパラフィン包埋切片 (4  $\mu\text{m}$  厚) を作製し蛍光免疫組織化学染色を行った。53BP1 を赤、Ki67 を緑、細胞核を青で示す。

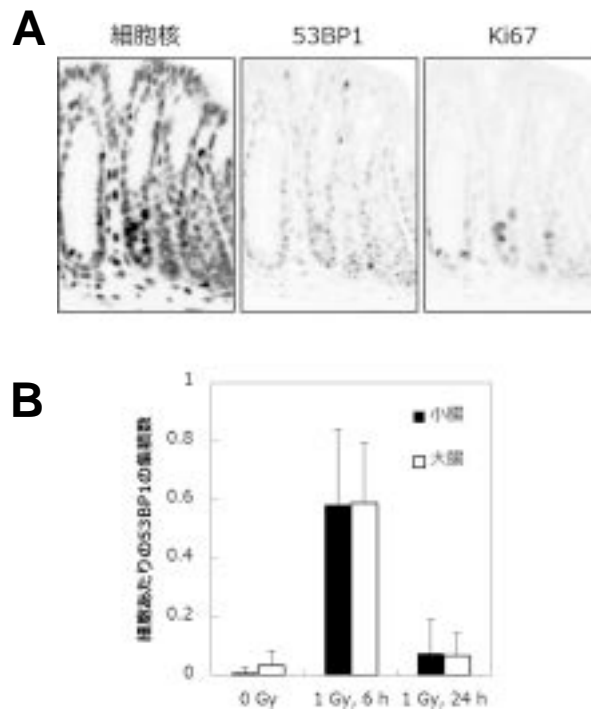


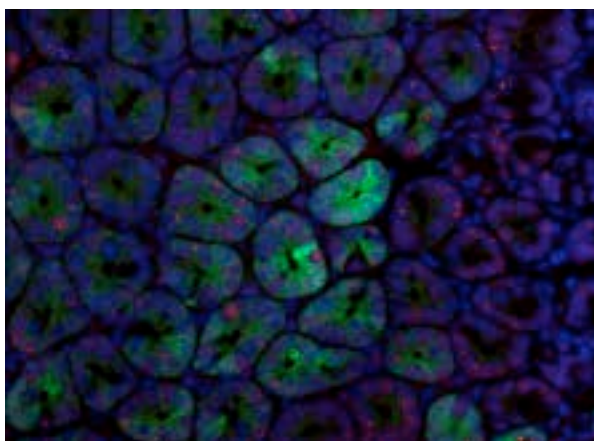
図 3 組織切片の蛍光画像の解析と DNA 損傷修復タンパクの経時変化

(A) 腸管組織切片の蛍光染色画像を ImageJ を用いて処理した。細胞核 (青), 53BP1 (赤), Ki67 (緑) を Split Channels フィルタでそれぞれのシグナル像に分割した。(B) 小腸、および大腸のクリプトを構成する組織で X 線 1 Gy 照射 6 時間後、および X 線 1 Gy 照射 24 時間後に観察される 53BP1 の細胞あたりのフォーカス数。

表 2 照射組織の Ki67 発現の有無とそれぞれに対応する 53BP1 フォーカスの有無

組織部位	照射条件	細胞の頻度 (%)			
		Ki67 <sup>+</sup>		Ki67 <sup>-</sup>	
		53BP1 <sup>+</sup>	53BP1 <sup>-</sup>	53BP1 <sup>+</sup>	53BP1 <sup>-</sup>
小腸	0 Gy	0.0	71.8	0.9	27.3
	1 Gy, 6h	14.3	23.4	32.5	29.9
	1 Gy, 24h	5.9	58.8	2.4	32.9
大腸	0 Gy	1.6	19.3	1.6	77.5
	1 Gy, 6h	4.8	6.9	37.2	51.1
	1 Gy, 24h	0.0	6.2	6.2	87.6





細胞核  
幹細胞  
DNA 損傷部位

図4 クリプト断面における幹細胞と DNA 損傷の同時検出  
消化管組織をクリプトの円周方向に薄切し、細胞核（青）、幹細胞（緑）、DNA 損傷修復タンパク（赤）で共染色した。

# Evaluation of dose-rate effects on turnover and DNA damage repair in intestinal stem cells

Kensuke Otsuka

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

*Keywords:* Low-dose; Low-dose-rate; Dose-rate effect; Intestine; Tissue stem cell; DNA damage

## **Abstract**

The risk of cancer induced by low-dose-rate radiation is estimated on the basis of the frequencies induced by high-dose-rate radiation. However, it is well known that the biological consequences after irradiation depend on the dose-rate (Dose-rate effects). To estimate the risk of cancer induced by low-dose-rate or low-dose radiation, it is important to understand the biological mechanisms of the dose-rate effects on the cell-of-origin of cancer. Recent studies demonstrated that the tissue stem cells (Lgr5-positive cells) can develop into cancer using Lgr5-dependent lineage tracing system. Using the lineage tracing system, we evaluated the turnover frequency of the intestinal stem cells after low-dose-rate and high-dose-rate irradiation. We found that high-dose-rate X-rays (100 mGy) can slightly accelerate the turnover frequency of colonic Lgr5<sup>+</sup> stem cells, but showed no statistical significance. We also found that 1 Gy of low-dose-rate (3 mGy/h) gamma-rays did not induce the turnover frequency of Lgr5<sup>+</sup> stem cells. To evaluate whether residual DNA damage can be found in the irradiated stem cells, we tried to detect DNA damage in the intestinal stem cells in terms of the accumulation of the DNA repair protein, 53BP1. We could detect the accumulation of the 53BP1 proteins after 1 Gy of X-ray irradiation in the Lgr5<sup>+</sup> stem cells. These findings are useful for understanding tissue responses and future assessment for health effects induced by low-dose and low-dose-rate radiation.

研究課題名  
低線量率・低線量放射線被ばくによる組織幹細胞の  
放射線障害の蓄積に関する研究

研究項目名  
低線量被ばくによる神経幹細胞に蓄積する放射線損傷の影響

白石一乗（大阪府立大学・大学院理学系研究科・生物科学専攻・放射線生物学・助教）

研究要旨

幹細胞は個体内で生涯維持されるという特性を持つ。このことから、低線量放射線の長期被ばくに対して、幹細胞では、その損傷が蓄積される可能性がある。しかしながら、低線量放射線曝露後の幹細胞への影響は明らかにされていない。本年度は組織幹細胞の一つである、神経幹細胞の放射線への影響を検出する系を確立するために、1) DNA 損傷応答の蓄積、2) 染色体構造変化について検証した。密度勾配法によるミエリン除去及び幹細胞マーカーCD133による細胞濃縮を行うことで、被ばく脳組織から神経幹細胞を分離した。この細胞を用いることで、2日の細胞培養、あるいは細胞培養を行うことなく、2GyでDNA損傷、染色体異常が検出可能となった。今年度は急性照射（0.5Gy/min）で検証を行ったが、次年度には低線量率放射線（20～200mGy/min）で生じる神経幹細胞への放射線損傷を明らかにする。

キーワード：神経幹細胞、 $\gamma$ -H2AX フォーカス、染色体転座

研究協力者 児玉靖司 大阪府立大学・大学院理学系研究科・生物科学専攻・放射線生物学・教授

I 研究目的

組織幹細胞は個体の恒常性を維持するために必須であり、生涯、生体中に保持される。放射線影響を考える上で、幹細胞研究は2つの重要な意味を持つ。1つは生涯維持される幹細胞は、長期低線量率放射線の標的となる可能性があることである。もう一つは、幹細胞をがん細胞の起源とする「がん幹細胞起源説」の存在である。本研究の目的は低線量放射被ばくで、神経幹細胞に、1) 放射線損傷が蓄積するのか、2) 染色体構造異常が出現するのか、である。これらの成果は幹細胞、特に神経系組織への低線量（率）放射線影響を明らかにする上で重要な知見となる。さらに、放射線による神経系組織への影響は、放射線被ばくによる脳機能障害や知能障害発症の分子基盤となるため、福島での原子力被災者などの健康管理・健康不安対策に資する学術的な基盤を提供できると期待される。

II 研究方法

大阪府立大学・地域連携研究機構の所有するX線照射施設にて、B6C3F1マウス（6週齢）に、～2Gyの照射を行った。マウスを安楽死させた後、全脳組織を回収し大脳側脳室下帯より神経幹細胞を含む領域を回収した。酵素処理により単個細胞化した後、6% percolを含む緩衝液に重層、遠心処理によってミエリンを分離した。さらに、神経幹細胞マーカーCD133陽性細胞抗体を用いたポジティブセレクションを行った。この細胞を用いて、放射線損傷を評価した。DNA損傷については $\gamma$ -H2AXを指標とした。染色体異常については1番、3番染色体をプローブとしたWhole chromosome painting (WCP)

FISH を指標とした。

(倫理面への配慮)

実験動物の取扱において「大阪府立大学実験動物指針」に則って行った。

### III 研究結果

#### 1) 神経幹細胞の濃縮

これまで、神経幹細胞の障害評価に neurosphere 形成細胞が用いられてきた。これは、回収した脳組織は雑多な細胞を含むので (図 1. A)、培養系による純化作業が必要なためである。しかし、neurosphere 形成は胎児由来組織で数日、成体組織では 10 日程度の培養期間を必要とした。そのため、DNA 修復過程のような早期の生体反応を評価することができなかった。特に、組織分散溶液中に含まれるミエリンは抗体と非特異的に結合するため(図 1. C)、幹細胞マーカー CD133 によるポジティブセレクションもできなかった。これまでに、0.9M ショ糖遠心分離によるミエリン除去が報告されているが、大きな効果は認められなかった。今回、単核球細胞を回収する手法である、6% percol による密度勾配遠心法を用いることで、ミエリンの混入が改善された(図 1. B)。さらに、この細胞に CD133 ポジティブセレクションを行うことで、幹細胞分画を得た(図 1. D)。この細胞を用いて、 $\gamma$ -H2AX のフォーカス形成を指標とした DNA 損傷評価を行った。

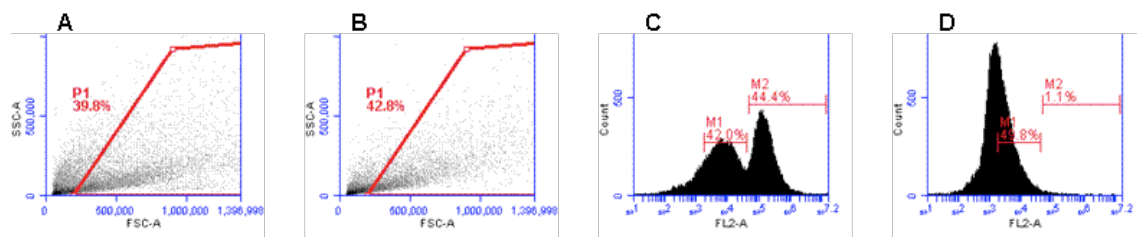


図 1. 脳組織からの神経幹細胞濃縮

A:未処理細胞、B:percol 処理細胞、C:遠心前 CD133 陽性細胞、D:遠心後 CD133 陽性細胞、P1:生細胞分画、M1:CD133 陽性分画、M2:CD133 擬陽性分画

#### 2) $\gamma$ -H2AX による DNA 損傷評価

脳組織から分離された CD133 陽性細胞は PFA 固定後、 $\gamma$ -H2AX 抗体と Alexa488 蛍光 2 次抗体を用いて染色され、フローサイトメトリー法で検出した(図 2. 左)。放射線量依存的にフォーカス形成細胞が増加した。また、短期(2 日間)培養で、これまでの蛍光顕微鏡観察でも DNA 損傷応答が確認できた(図 2. 右)。

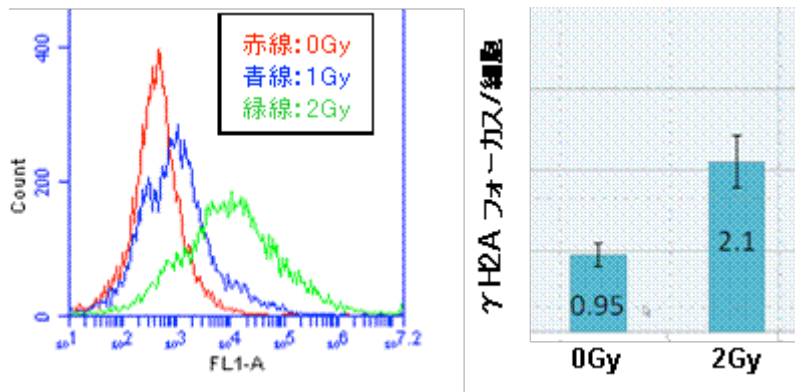


図2. 神経幹細胞の放射線応答

放射線照射後、脳組織から CD133 陽性細胞を回収したものを  $\gamma$ -H2AX 抗体で検出した。左図：照射3時間後、ローサイトメトリー法で測定。右図：照射後、2日間培養したものを蛍光顕微鏡によりフォーカスを測定。

### 3) WCP FISH による染色体安定性評価

1番、3番染色体をプローブとした WCP FISH を行った(図3.)。マウス全身に 2Gy 照射し、6週間後に安定型染色体転座を測定した。未照射群(図3. A)では転座が検出されなかった一方、照射群(図3. B)では  $2.2 \pm 0.8\%$  の頻度で転座が観察された。この染色体異常は全て転座を伴う安定型であった。

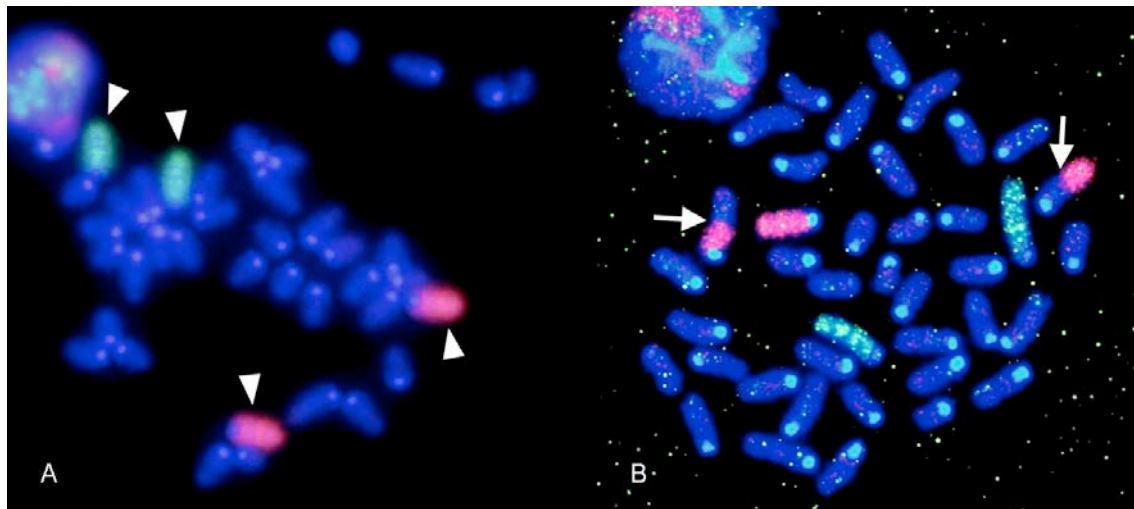


図3. WCP FISH による染色体転座検出

転座は1番染色体(緑)と3番染色体(赤)を染め分けることで測定された。

## IV 考察

今回、培養期間を最小限にするために、ミエリン除去と CD133 陽性細胞のポジティブ選択をおこなった。特にミエリンは CD133 抗体とも親和性が高いため、除去なしで神経幹細胞の障害評価を行うことは、誤った結果を得る可能性がある。今回、この分離細胞を用いて、放射線障害の評価をおこなった。neurosphere を形成させずに直接、少量の細胞を評価するため、フローサイトメーター法で測定した。この方法で、神経幹細胞の  $\gamma$ -H2AX フォーカス形成は線量依存的に増加したので、この評価法は有効であると判断した。また、従来の neurosphere 形成による方法でも培養期間を2日に短縮できた(従来は1~2週間)。数時間以内で消失する  $\gamma$ -H2AX フォーカスも存在することから、培養期間が長くな

ると初期損傷を評価できなくなる可能性があり、今回の培養期間の大幅な短縮は、組織内神経幹細胞の DNA 損傷評価に重要な意味を持つ。実験をより簡便化するために、2 次抗体を使わない蛍光標識リン酸化 53BP1 抗体を用いて同様に実験を行ったが、フローサイトメーター法では線量依存性が認められなかった。これは、蛍光強度が低いためであると思われ、蛍光 2 次抗体を使えば  $\gamma$ -H2AX を指標とした場合と同様の結果が得られると思われる。また、今回 WCP FISH による神経幹細胞の転座評価法の確立にも成功した。2Gy 被ばく後、6 週間経過した神経幹細胞において染色体転座頻度が有意に上昇していた。このことは被ばくした神経幹細胞において、安定型転座を持つものは組織内から排除されないことを示唆している。この細胞が分化細胞を生産できるかなど、中枢神経組織での意味を明らかにすることは今後の課題である。

## V 結論

今回、percol 密度勾配遠心法と CD133 抗原選択を組み合わせることで、脳組織内の神経幹細胞を分離できた。この細胞を用いることで、培養過程を経ずに放射線損傷を評価することが可能となった。しかし、かなりのミエリン混入が認められるので、さらなる改善が必要であると思われる。

## VI 次年度以降の計画

平成 24 年度は評価法の確立に重点を置いたが、次年度は、更に幹細胞分離法を改善するとともに、 $\gamma$ 線 1.5~20mGy/min の分割照射で積算線量 200m~2Gy の 60Co $\gamma$ 線被ばくによる損傷評価を行う。また、本年度の結果から、安定型染色体転座を持つ幹細胞は脳組織内に保持されることが予想されたので、この細胞が正常な分化を行うのか否かを検証する。さらに、被ばく損傷を受けた神経幹細胞は組織中で排除されるのか、保持されるのかを脳組織内で検証する。そのために、神経幹細胞とその系譜細胞を組織内で視覚化できる遺伝子組換えマウスを導入する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

なし。

引用文献

なし

# The accumulation of DNA damage in neural stem cell by low dose irradiation

Kazunori Shiraishi<sup>\*1</sup>, Seiji Kodama<sup>\*1</sup>

*<sup>\*1</sup>Laboratory of Radiation Biology, Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University.*

*Keywords:* neural stem cell, CD133, gamma-H2AX, chromosome aberration

Tissue stem cells have specific roles of maintaining and repairing tissues in living organisms. Because of the characteristics, DNA damage in stem cells may be accumulated during long-term exposure to low-dose radiation, though it has not been elucidated yet. In this study, to assess the effects of radiation on the neural stem cells (NSCs), one of the adult tissue stem cells, we verified the accumulation of DNA damage response and chromosome aberrations. In order to remove myelin from the samples, we applied a percol density gradient centrifugation. Also, the cells were concentrated by positive selection using the CD133 stem cell marker. So that the NSC was purified from brain tissue consisting of various differentiated cells. We estimated DNA damage and chromosome exchange in purified NSCs obtained from irradiated mouse, with a 2-day culture or without a cell culture. The frequency of gamma-H2AX foci increased in a dose dependent manner. Chromosome exchange was still detectable in mouse NSCs on 6 weeks after 2Gy irradiation. The results show that purified NSCs allow estimating genomic damage *ex vivo*, and chromosome rearrangements could be retained at least for 6 weeks in mouse central nervous system.

Ⅱ－3 低線量率放射線被ばくの影響－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





## 低線量率放射線被ばくの影響

### —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—

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・予防医学教授）

床次眞司（弘前大学被ばく医療総合研究所放射線物理学部門教授）

#### 研究要旨

本研究の目的は、内部被ばくの影響や線量推定の不確実性を考慮したうえで、低線量率放射線の外部被ばくによる健康・疾病リスクが中・高線量率と異なるか（どの程度異なるか）を明らかにすることである。本研究では、インド・ケララ州カルナガパリでのがん罹患率調査、中国広東省陽江地域の死亡率調査で、自然放射線への外部被ばくにより過剰ながんリスクが確認できないことを確認した。また、インド・ケララ州での調査で得られた白血病を除くがんの線量当たりの過剰相対リスクを原爆被爆者の固形がんリスクと比較し、前者が統計学的に有意に低いことを明らかにした（ $P=0.011$ ）今後、非がんリスクについても同様の検討を行う。また、線量推定における内部被ばくの影響を検討するために、ラドン・トロンとその壊変核種による呼吸器の内部被ばく、食物の摂取による内部被ばくの調査が必要である。さらに、外部被ばく線量推定値の不確実性検討、医療被ばくの評価を行う必要があると考える。分担研究者である床次眞司は、そのための調査を屋内外でのラドン・トロンとその壊変核種測定、食物の摂取による内部被ばくの評価、のための調査を開始した。

キーワード：高自然放射線、インド・ケララ州カルナガパリ、中国広東省陽江、線量当たりの過剰相対リスク、固形がん

#### I 研究目的

**背景：**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。広島・長崎の原爆被曝は高い線量率での被ばくであったが、低い線量率の放射線被ばくの疫学調査で重要なのが、高自然放射線地域・Techa 川流域・台湾のコバルト 60 で汚染された鋼材を用いたビルなどの住民や原子力作業者を対象とした調査である。この中でもインドの高自然放射線地域住民のコホート調査は、がん罹患の情報が得られていること、線量が対象者全員について推定されていること、生活習慣が得られていることなどから、特に重要であり<sup>1)</sup>、近年、国際的な注目を集めつつある。主任研究者秋葉澄伯と分担研究者床次眞司は、(公財)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た。これまでの調査結果によると、高自然放射線地域住民で、放射線の外部被ばくによるがんリスク等の過剰はなく、仮にあっても高線量率での被ばくより、線量当たりのリスクがかなり低い可能性が高い。しかし、これらの調査で内部被ばく線量の定量的な評価は十分なものとは言えなかった。予備的調査結果から、インド・中国の高自然放射線地域住民での内部被ばくは殆ど無視できると考えるが、この点を確認する必要がある

ある。

**目的：**本研究の目的は、内部被ばくの影響や線量推定の不確実性を考慮したうえで、低線量率放射線の外部被ばくによる健康・疾病リスクが中・高線量率と異ならないか（どの程度異なるか）を明らかにすることである。具体的には、インド・中国の高自然放射線地域で、内部被ばく線量の推定を行い、その上で、被ばく（外部被ばく、外部被ばく+内部被ばく）による健康影響（主にがん罹患・死亡、非がん死亡）を定量的に評価する。さらに、外部被ばく線量推定値の評価を行い、線量推定の不確実性を考慮した線量当たりのリスク評価を行う。また、調査で蓄積されたデータを詳細に検討するとともに、これを原爆被爆者の追跡調査を含む他の主要研究から得られた結果と比較して、被ばく線量が同じでも、線量率が異なると健康影響の大きさが異なる可能性を検討する。本研究の成果は、福島第一原発の事故で、主に低線量率の放射線被ばくを受けた可能性がある緊急作業員や住民の健康影響を考える上でも重要である。

## II 研究方法

インド・ケララ州カルナガパリでのがん罹患率調査を Nair らの報告<sup>2)</sup>より5年間延長し、2010年末までのがん罹患率と外部被ばくによる累積被ばく線量との関連を検討した。また、中国広東省陽江地域の死亡率調査を Tao らの報告<sup>3)</sup>より4年間延長し、2002年までのがん死亡率とデータを用いて、がん死亡率と外部被ばくによる累積被ばく線量との関連を検討した。得られた結果を原爆被爆生存者の追跡調査結果と比較した。

分担研究者（床次眞司）は、インド・ケララ州カルナガパリで走行サーベイによる外部被ばく線量の評価と内部被ばくの調査を行った。外部被ばく線量調査は、コントロール地域として Oachira 地区、高自然放射線地域として Alappad 地区において実施した。また、内部被ばく線量調査として60軒の家屋に設置したラドン・トロン測定器を回収して分析を行った。詳細は、分担研究者（床次眞司）の報告書に記載した。

## III 研究結果

### 1)インドでのコホート研究

インド・ケララ州カルナガパリでのがん罹患率調査を Nair らの報告<sup>2)</sup>より5年間延長し、2010年末までのがん罹患率と外部被ばくによる累積被ばく線量との関連を検討した。Nair らの論文に示されている白血病を除くがんの線量当たりの過相対リスクは、0.13/Gy (95% CI: 0.58, 0.46)であったが、追跡期間を5年間延長しても、推定値は殆ど変らなかった。しかし、95%信頼区間は半分程度の幅となった。Inhalation や ingestion による内部被ばくを評価する必要がある。

### 2)中国でのコホート研究

また、中国広東省陽江地域の死亡率調査を Tao らの報告<sup>3)</sup>より4年間延長し、2002年末までのがん死亡率とデータを用いて、がん死亡率と外部被ばくによる累積被ばく線量との関連を検討した。固形がんの線量当たりの過剰相対リスクは-0.07/Gy(95%CI=-0.62, 0.71)であった。

### 3)原爆被爆生存者のがん罹患調査結果との比較

Nair らの論文に示されている白血病を除くがんの線量当たりの過相対リスクと原爆被爆者のデータ（固形がん）の比較を行った。両者から得られる線量当たりの過剰リスクを比較する際には、

修飾因子である性、被ばく時年齢、到達年齢を調整する必要がある。原爆被爆者のがん罹患調査では、固形がんの線量当たりの過剰相対リスクが 0.47/Gy と報告されている<sup>4)</sup>。これは、線量に比例するように過剰相対リスクが増加するいわゆる LNT モデルを仮定してポアソン回帰分析を行って得られた被ばく時年齢 30 歳、到達年齢 70 歳における男女の平均値である。公開されている原爆被爆者の層別データとポアソン回帰モデルを用いて、この値が得られることを確認した。Nair らが解析対象としたカルナガパリコホートの平均年齢は 57.7 歳である。このコホートの被ばく時年齢は、被曝が仮にゼロ歳から始まったと考えてゼロ歳とすることも考えられるが、到達年齢の半分とするのが妥当と考えた。その場合、28.9 歳となる。原爆被爆者で到達年齢 57.7 歳、被ばく時年齢 30 歳として、固形がんの線量当たりの過剰相対リスクを計算すると 0.65/Gy (95% CI: 0.54, 0.76) という値が得られた。この値は Nair らの報告した -0.13/Gy (95% CI: -0.58, 0.46) に比べて統計学的に有意に高かった (P=0.011)。

#### 4) 線量測定の結果

**走行サーベイによる外部被ばく線量の評価：**ケララ州内の 2 か所において走行サーベイを行い、外部被ばく線量を測定した。空気カーマ率の最大値は、Alappad 地区では 509 nGy/h であり、Oachira 地区では 116 nGy/h であった。また、それぞれの地区での幾何平均値は、それぞれ 360 nGy/h および 115 nGy/h であり、両者には有意な差が認められた (p<0.05)。評価手法を単純にするために 1 年間を 8760 時間 (24 時間 × 365 日) としそれぞれの地域での年間の空気カーマを計算した。Alappad 地区では、全 49 データを取得し、最小値、最大値および幾何平均値はそれぞれ 1.3 mGy/y、4.1 mGy/y および 3.0 mGy/y であった。一方、Oachira 地区では、全 62 データを取得し、最小値、最大値および幾何平均値はそれぞれ 0.71 mGy/y、1.4 mGy/y および 1.0 mGy/y であった。結果の詳細は分担研究者の報告書に示した。

**内部被ばく線量評価：**60 軒の家屋に設置したラドン・トロン測定器については、既に測定器を回収して分析が終了した。ラドン濃度については、60 軒中 29 軒が検出限界以下、トロン濃度については 60 軒中 9 軒が検出限界以下であった。さらに、ラドン・トロン測定器を設置した 60 軒のうち、10 軒の家屋について、屋内外の空間線量率を測定した。ラドン濃度は概して低く、平均値 3.5 Bq/m<sup>3</sup>、中央値 3 Bq/m<sup>3</sup>、最大値は 11 Bq/m<sup>3</sup> という結果であった。トロン濃度は平均値 42 Bq/m<sup>3</sup>、中央値 32 Bq/m<sup>3</sup>、最大値 212 Bq/m<sup>3</sup> という結果であった。結果の詳細は、分担研究者の報告書に示した。

#### IV 考察

##### 1) リスク評価について

インド・ケララ州カルナガパリ・中国広東省陽江の高自然放射線地域住民を対象として行われた疫学調査 (コホート調査) で、がんの過剰リスクは確認できなかった。また、インド・カルナガパリ住民のコホート調査で得られた白血病を除く全がんの線量当たりの過剰相対リスクは原爆被爆者での推定値より有意に低かった。本年度は、外部被ばくによる累積線量とがんリスクとの関連を検討したが、非がんリスクについても同様の検討が必要である。また、線量推定における内部被ばくの影響を検討するために、ラドン・トロンとその壊変核種による呼吸器の内部被ばく、食物の摂取による内部被ばくの調査を行う必要があると考える。さらに、外部被ばく線量推定値の不確実性や医療被曝の影響の検討も必要である。

原爆被爆者以外の固形がん(または白血病を除く全がん)に関する重要な調査として、インド・中国などの高自然放射線地域住民の外に、Techa 川住民(固形がん)、Chernobyl 事故の復旧作業員、原子力作業員、台湾の Co-60 汚染建材を使ったビルの住民などを挙げることができる<sup>4)</sup>。これらの調査結果のうち、線量率の高い被ばくを取り扱った調査では、線量当たりの過剰相対リスクが原爆被爆者の追跡調査結果と似ており、一方、線量率の低い被ばくでは、原子力作業員のデータのプール解析を行った IARC (国際がん研究機関) 15ヶ国解析を除けば、比較的低い値が得られている。IARC15ヶ国では、15ヶ国の原子力作業員のデータをプールして解析が行われた<sup>5,6)</sup>。しかし、用いられたデータのうち、カナダのデータには問題点があったことが分かっており、また、喫煙の交絡も疑われている。そこで、主任研究者らは別にメタ解析を行った<sup>7)</sup>。IARC15ヶ国では、米国、英国、カナダ、フランスの原子力作業員のデータが人数・線量から考えて主要な部分と考えられるが、この四か国の原子力施設(IARC15ヶ国解析に含まれたこれら四か国の原子力施設を全て含む)の作業員の最新の結果を用いてメタ解析を行ったところ、線量当たりの過剰相対リスクは 0.14/Gy (95%CI = -0.12, 0.41)であった。IARC15ヶ国解析で得られた値とは大きく異なる。高線量率における線量当たりの固形がんリスクと低線量率のその比を計算すれば、2以上になる可能性が高い。

本研究では、白血病に関しては、検討しなかった(できなかった)。白血病の線量反応関係は原爆被爆者の調査結果から線型 2次と考えられている。実際、原爆被爆者では、1Gy で白血病の過剰相対リスクが 3程度と報告されており、これを単純に 100mSv に外挿すれば 0.3 となるが、観測された値は 0.15程度である。最近、米国の研究者が行ったメタ解析の結果が報告された<sup>8)</sup>。この解析では以下の研究から得られたリスク推定値が用いられた。

- ①原子力作業員、
- ②Chernobyl 事故の復旧作業員、
- ③インド・ケララ州などの高自然放射線地域住民、
- ④事故などにより生じた高バックグラウンド放射線地域 (Chernobyl 施設周辺地域、ロシア南ウラルの Techa 側流域、台湾の コバルト 60 で汚染された建材を使ったビル)

対象となった研究は主に低線量被ばくを対象としたもので、メタ解析で得られた 100mSv での白血病の過剰相対リスクの推定値は 0.19 (95% 信頼区間: 0.07, 0.32)であった。この値は、原爆被爆者で報告されている値に近い。また、IARC15ヶ国解析も 100mSv での白血病の過剰相対リスクの推定値を 0.19 (90% 信頼区間: <0, 0.85)と報告している<sup>5,6)</sup>。最近米国の原子力作業員の追跡調査の結果が公表されたが、この調査では、100mSv での白血病の過剰相対リスクの推定値は 0.09 (95% 信頼区間: -0.17, 0.65)であった<sup>9)</sup>。結論として、低線量域での白血病の線量値の過剰相対リスクは高線量域の半分程度の値になると推測される。しかし、線量率効果に関しては、十分なデータがなく検討できない。

## 2) 線量測定

今回の走行調査では車体の遮蔽係数は 2か所の測定データを用いて算出したが、遮蔽係数の精度を上げるためにはより多くの場所において実測する必要がある。また、ケララ州内の線量マップを作成するためには、より詳細な走行ルートを選択が必用となる。さらに、舗装上での線量評価のみではなく、土壌上での評価も重要なり、その場合には土壌上も調査ルート(走行サーベイもしくは歩行サーベイ)に含める必要がある。

ラドン・トロンによる内部被ばくは、今年度の予備調査の結果から外部被ばくに関して小さいものであると予想されるが、今後、測定家屋数を増やしたり、季節変動を観察したりして、より詳細な線量評価を行う必要がある。

## V 結論

本研究の結果は、低線量率の放射線被ばくの線量当たりの固形がんリスクは、高線量率の場合に比べて高いことを示唆している。しかし、今後、内部被ばく等の影響を検討しながら、さらに慎重に検討を進める必要がある。

## VI 次年度以降の計画

中国・インドのデータを用いて、外部被ばく線量当たりのがんリスクを定量的に評価するとともに、他の主要研究と比較して、中・高線量 vs 低線量、中・高線量率 vs 低線量率の観点で比較する。また、内部被ばくの定量的評価を行う。具体的には、以下に示す項目を実施することを考えている。

- (1) 線量当たりのリスク推定における内部被ばくや医療被ばくの影響を検討する。また、低線量率の外部被ばくによる累積被ばく線量と動脈硬化などの非がん疾患死亡率の関連をインド・ケララ州カルナガバリでの 2010 年末までの死亡率、中国広東省陽江での 2002 年末までの死亡率調査の結果を用いて検討する。得られた結果を原爆被爆生存者の追跡調査結果や Techa 川流域住民や原子力作業員の追跡調査結果と比較し、線量当たりの非がんリスクが線量率により影響されるかを検討する。
- (2) 放射性エアロゾル分析(ウラン・トリウム粉塵、ラドン・トロン子孫核種など)、食物を含む環境試料中の放射能測定などを行って内部被ばくを定量的に評価する。

## 引用文献

- 1) Boice JD Jr, Hendry JH, Nakamura N, et al. Low-dose-rate epidemiology of high background radiation areas. *Radiat Res.* 2010;173(6):849-54.
- 2) Nair RR, Rajan B, Akiba S et al. Background radiation and cancer incidence in Kerala, India-Karanagappally cohort study. *Health Phys.* 2009;96(1):55-66.
- 3) Tao Z, Akiba S, Zha Y et al. Cancer and non-cancer mortality among Inhabitants in the high background radiation area of Yangjiang, China (1979-1998). *Health Phys.* 2012;102(2):173-81.
- 4) Akiba S. Cancer risk associated with low dose and low dose-rate ionizing radiation exposure. *Genes and Environment.* To be published.
- 5) Cardis E, Vrijheid M, Blettner M et al. Risk of cancer after low doses of ionizing radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *BMJ* 2005;331:77- 82.
- 6) Cardis E, Vrijheid M, Blettner M et al. The 15-country collaborative study of cancer risk among radiation workers in the nuclear industry: estimates of radiation related cancer risks. *Radiat Res* 2007;167:396-416.
- 7) Akiba S, Mizuno S. The third analysis of cancer mortality among Japanese nuclear workers, 1991-2002: estimation of excess relative risk per radiation dose. *J Radiol Prot.* 2012;32(1):73-83
- 8) Daniels RD, Schubauer-Berigan MK. A meta-analysis of leukaemia risk from protracted exposure to

low-dose gamma radiation. *Occup Environ Med.* 2011;68(6):457-64.

- 9) Daniels RD, Bertke S, Waters KM et al. Risk of leukaemia mortality from exposure to ionising radiation in US nuclear workers: a pooled case-control study. *Occup Environ Med.* 2013;70(1):41-8.

# Health risk associated with exposure to low-dose-rate ionizing radiation – risk evaluation mainly based on epidemiological studies of residents in high natural background radiation areas in India and China

Suminori Akiba<sup>\*1</sup>, Shinji Tokonami<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> *Department of Epidemiology and Preventive Medicine, Kagoshima University graduate School of Medical and Dental Sciences.*

<sup>\*2</sup> *Department of Radiation Physics, Institute of Radiation Emergency Medicine, Hirosaki University*

**Keywords:** high natural background radiation; Karunagapally in Kerala State, India; Yangjiang in Guandong Province, China; excess relative risk per dose; solid cancer

## **Abstract**

The purpose of this study is to examine whether magnitude of health effects associated with external exposure to low-dose-rate radiation is different from those related to medium-high dose-rate exposure. In this study, we confirmed the absence of excess cancer risk in relation to external exposure to high background natural radiation among residents in Karunagapally in Kerala State, India and Yangjiang in Guandong Province, India. In addition, this study has shown that the Indian estimate of excess relative risk per gray of cancer excluding leukemia is significantly lower ( $P=0.013$ ) than that of solid cancer among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki. Similar analyses of non-cancer diseases will be conducted. It is also necessary to examine the internal exposure of respiratory organs and internal exposure from ingestion. It is also necessary to evaluate uncertainties involved in estimating doses from external exposure, and evaluate medical exposure. Shinji Tokonami, the co-investigator of this project started those surveys involved in dosimetry.

1) *n Med.* 2013;70(1):41-8.



# 低線量率放射線被ばく健康影響 —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—

床次眞司（弘前大学被ばく医療総合研究所放射線物理学部門教授）

## 研究要旨

本研究の目的は、内部被ばくの影響や線量推定の不確実性を考慮したうえで、低線量率放射線の外部被ばくによる健康・疾病リスクが中・高線量率と異なるか（どの程度異なるか）を明らかにすることである。本研究では、主任研究者である鹿児島大学大学院・秋葉教授がインド・ケララ州カルナガパリでのがん罹患率調査、中国広東省陽江地域の死亡率調査を行っている。これと対応する形で、分担研究者は両地域における外部・内部被ばく線量評価を行っている。これらの地域における従来の線量評価では、内部被ばくがあまり考慮されていなかった。そこで、これらの地域における内部被ばくの影響を検討するために、ラドン・トロンとその壊変生成核種の吸入による内部被ばく、食物の摂取による内部被ばくの調査を行う計画である。さらに、外部被ばく線量推定値の不確実性検討のため、当該地域における詳細な空間線量率マップの作成を行う計画である。この計画に沿って今年度は、ラドン・トロンとその壊変生成核種の測定、灰化した食事試料の測定、及び詳細な空間線量率マップ作成のための自動車走行サーベイを開始した。

キーワード：高自然放射線、インド・ケララ州カルナガパリ、中国広東省陽江、内部被ばく、ラドン・トロン、外部被ばく、走行サーベイ

研究協力者及び研究参加者：石川徹夫（放射線医学総合研究所福島復興支援本部環境動態・影響プロジェクト）、サファー・サラタ・クマール（放射線医学総合研究所福島復興支援本部環境動態・影響プロジェクト）、反町篤行（弘前大学被ばく医療総合研究所）、細田正洋（弘前大学大学院保健学研究科医療生命科学領域）

## I 研究目的

背景：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。広島・長崎の原爆被曝は高い線量率での被ばくであったが、低い線量率の放射線被ばくの疫学調査で重要なのが、高自然放射線地域・Techa 川流域・台湾のコバルト 60 で汚染された鋼材を用いたビルなどの住民や原子力作業者を対象とした調査である。この中でもインドの高自然放射線地域住民のコホート調査は、がん罹患の情報が得られていること、線量が対象者全員について推定されていること、生活習慣が得られていることなどから、特に重要であり<sup>1)</sup>、近年、国際的な注目を集めつつある。主任研究者秋葉澄伯と分担研究者床次眞司は、(公財)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た。これまでの調査結果によると、高自然放射線地域住民で、放射線の外部被ばくによるがんリスク等の過剰はなく、仮にあっても高線量率での被ばくより、線量当たりのリスクがかなり低い可能性が高い。しかし、これらの調査で内部

被ばく線量の定量的な評価は十分なものとは言えなかった。予備的調査結果から、インド・中国の高自然放射線地域住民での内部被ばくは殆ど無視できると考えるが、この点を確認する必要がある。さらに、当該地域ではホットスポットが局在化して、線量が高い場所と低い場所が複雑に入り組んでいるため、外部被ばくをより詳細に評価するために空間線量率マップの作成が必要である。

目的：本研究の目的は、内部被ばくの影響や線量推定の不確実性を考慮したうえで、低線量率放射線の外部被ばくによる健康・疾病リスクが中・高線量率と異ならないか（どの程度異なるか）を明らかにすることである。このため分担研究者としては、より詳細な外部被ばく、内部被ばく線量評価を行うことを目的としている。本研究の成果は、福島第一原発の事故で、主に低線量率の放射線被ばくを受けた可能性がある緊急作業員や住民の健康影響を考える上でも重要である。

## II 研究方法

### 1) 外部被ばく線量評価

分担研究者である床次眞司は、インド・ケララ州カルナガパリで走行サーベイによる外部被ばく線量の評価を行った。調査は、コントロール地域として Oachira 地区、高自然放射線地域として Alappad 地区において実施した。なお、Oachira 地区の面積は 12.86 km<sup>2</sup>、人口は 23,267 人であり、Alappad 地区の面積は 7.38 km<sup>2</sup>、人口は 22,778 人である。測定には、3 インチ × 3 インチ NaI(Tl) シンチレーションスペクトロメータ (EMF-211, EMF Japan Co.) を用い、車内に測定器を搭載して走行しながら 30 秒間隔で計数率を取得した。この測定器には GPS も搭載されており、空気カーマ率に加えて同時に測定地点の緯度・経度も取得する事が可能である。この手法によって得られる計数率は車内での値であるため、車体による  $\gamma$  線の遮蔽効果を評価する必要がある。今回の調査では、ホテルおよびがんセンターの駐車場において車内外の計数率を測定し、遮蔽係数を求めた。30 秒間の測定で得られる波高分布をアンフォールディングして出した空気カーマ率の精度は低い。そこで、得られた計数率から空気カーマ率への換算係数を求めた。換算係数の算出は、ケララ州内および弘前大学において実施した。それぞれの測定場所において 600 秒間の測定を行い、計数率と空気カーマ率を比較した。なお、本調査で使用した測定器は、22 行 × 22 行の応答行列法によって空気カーマ率を算出している。したがって、30 秒間の計測によって得られた計数率に換算係数と遮蔽係数を乗じる事によって車外の空気カーマ率が算出できる。なお、本調査は平成 25 年 1 月 9 日から 11 日にかけて実施したが、走行サーベイ中の天候は全て晴天であり、測定値に降雨の影響は受けていない。さらに、走行サーベイを補うために、10 軒の家屋を訪問し、屋内・屋外で空間ガンマ線線量率を測定した。

### 2) 内部被ばく線量評価

内部被ばくは経口摂取によるものと吸入摂取によるものがある。経口摂取としては、飲食物の摂取、吸入摂取としてはラドン・トロン吸入が主要な要因として考えられる。前者に関しては、ケララ州から灰化された試料を 3 種類入手した。これらを高純度ゲルマニウム半導体検出器で測定している。インドでは、既に 60 軒の家屋にラドン・トロン測定器を設置し、解析を終了した。これらの家屋のうち 10 軒程度の家屋では、上述のように屋内外の空間ガンマ線も測定した。またトロンとトロン子孫核種との相関などを検討する予定であり、1 月に現地研究者と打ち合わせを行った。なお、線量評価において正確を期するため当該地域住民の行動調査を実施する予定であり、1 月に現地の研究者と打ち合わせを行った。また、2013 年 1 月に 9 軒の家屋で、フィルタ捕

集装置を用いて屋内空気試料を採取し、アクティブ法でラドンとトロンを測定した。

### III 研究結果

#### 1) 走行サーベイによる外部被ばく線量の評価

ケララ州内の 2 か所において実施した車内外の計数率の比の平均値 ± 標準偏差は  $1.48 \pm 0.14$  であった。測定は 11 か所で実施し、(1) 式に示す回帰式が得られた。

$$y = 0.121x + 13.8 \quad (1)$$

したがって、車内で得られた計数率を  $n_{in}$  とすると、車外の空気カーマ率  $K_{out}$  は (2) 式によって求められる。

$$K_{out} = 1.48(0.121 n_{in} + 13.8) \quad (2)$$

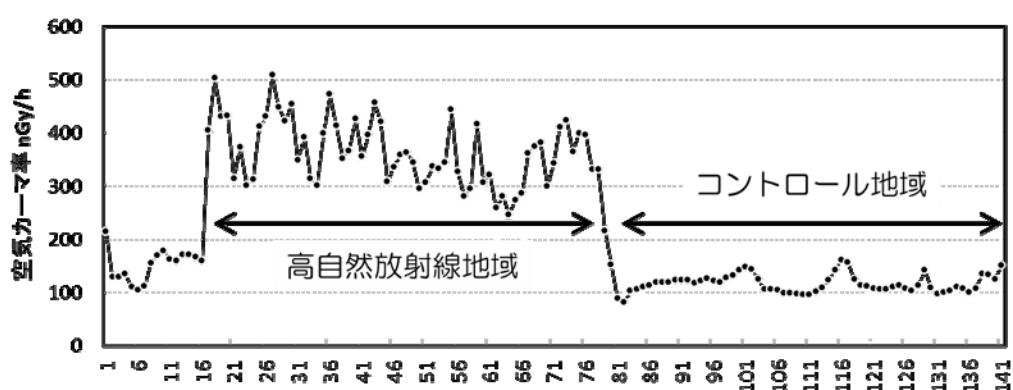


図 1 高自然放射線地域とコントロール地域での空気カーマ率

図 1 に高自然放射線地域 (Alappad 地区) とコントロール地域 (Oachira 地区) での空気カーマ率を示す。空気カーマ率の最大値は、Alappad 地区では 509 nGy/h であり、Oachira 地区では 116 nGy/h であった。また、それぞれの地区での幾何平均値は、それぞれ 360 nGy/h および 115 nGy/h であり、両者には有意な差が認められた ( $p < 0.05$ )。

図 2 にそれぞれの地域での年間の空気カーマのヒストグラムを示す。ここでは、評価手法を単純にするため、1 年間を 8760 時間 (24 時間 × 365 日) とした。Alappad 地区では、全 49 データを取得し、最小値、最大値および幾何平均値はそれぞれ 1.3 mGy/y、4.1 mGy/y および 3.0 mGy/y であった。一方、Oachira 地区では、全 62 データを取得し、最小値、最大値および幾何平均値はそれぞれ 0.71 mGy/y、1.4 mGy/y および 1.0 mGy/y であった。

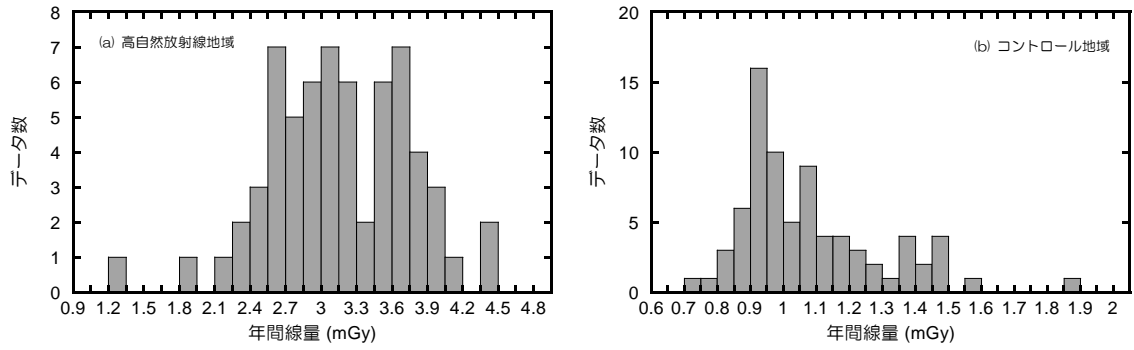


図2 高自然放射線地域とコントロール地域での年間空気カーマのヒストグラム

## 2) 内部被ばく線量評価

60軒の家屋に設置したラドン・トロン測定器については、既に測定器を回収して分析が終了した。ラドン濃度については、60軒中29軒が検出限界以下、トロン濃度については60軒中9軒が検出限界以下であった。検出限界を超えた値について濃度のヒストグラムを図3に示す。

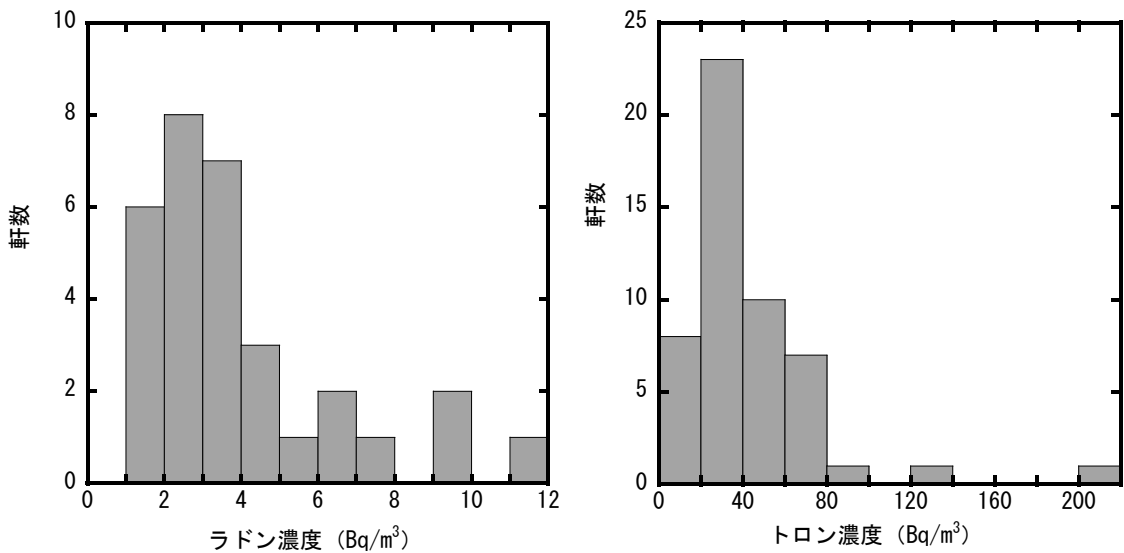


図3 屋内ラドン・トロン濃度に関するヒストグラム

さらに、ラドン・トロン測定器を設置した60軒のうち、10軒の家屋について、屋内外の空間 $\gamma$ 線量率を測定した。結果を図4に示す。

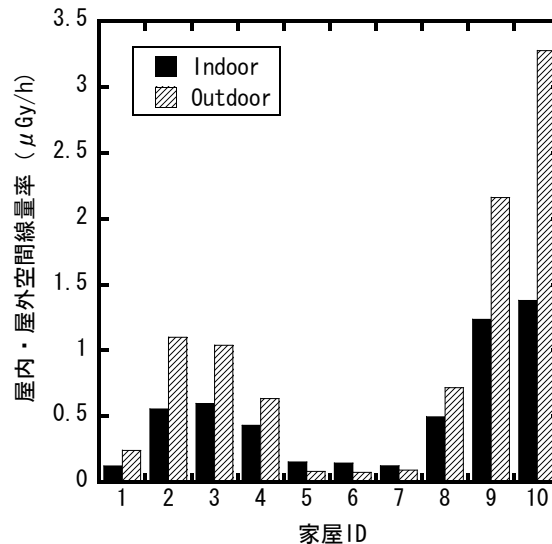


図4 10軒の家屋について測定した屋内・屋外の空間ガンマ線量率

#### IV 考察

##### 1) インド・カルナガパリでの走行サーベイによる外部被ばく線量の評価

今回の調査では車体の遮蔽係数は2か所の測定データを用いて算出したが、遮蔽係数の精度を上げるためにはより多くの場所において実測する必要がある。また、ケララ州内の線量率マップを作成するためには、より詳細な走行ルートを選択が必要となる。さらに、舗装上での線量評価のみではなく、土壌上での評価も重要なり、その場合には土壌上も走行ルートに含める必要がある。

##### 2) 屋内・屋外の空間線量率の測定

図4に示したように、概して屋内より屋外の空間線量率のほうが高かったが、10軒中3軒は屋内のほうが高かった。これはおそらく建材の影響と考えられる。このような事例を考えると、走行サーベイによる屋外の空間線量率の調査のみならず、屋内の空間線量率も測定し、さらには個人の屋内・屋外の滞在時間も考慮した被ばく線量評価も必要である。また、屋外の線量率の最高値は約3 μGy/hであった。これは今回の走行サーベイによる最高値(約0.5 μGy/h)よりだいぶ高い値で、ホットスポットのように線量率が高い地域が存在することを示唆している。これに関してもさらなる調査が必要である。

##### 3) インド・ケララ州でのラドン・トロン測定

ラドン濃度は概して低く、平均値3.5 Bq/m<sup>3</sup>、中央値3 Bq/m<sup>3</sup>、最大値は11 Bq/m<sup>3</sup>という結果であった。トロン濃度は平均値42 Bq/m<sup>3</sup>、中央値32 Bq/m<sup>3</sup>、最大値212 Bq/m<sup>3</sup>という結果であった。仮にこの平均濃度の環境下に1日中滞在すると仮定すると、ラドン・トロンからの年間被ばく線量は、それぞれ次のように計算される。

$$D(\text{Rn}) = 3.5 \times 0.4 \times 9 \times 24 \times 365 = 0.1 \text{ mSv} \quad (3)$$

$$D(\text{Tn}) = 42 \times 0.05 \times 40 \times 24 \times 365 = 0.7 \text{ mSv} \quad (4)$$

なお、平衡ファクタとして、ラドンは0.4、トロンは0.05を仮定し、線量換算係数はUNSCEAR

報告書<sup>2)</sup>の値（ラドン：9 nSv/(Bq m<sup>3</sup> h)、トロン：40 nSv/(Bq m<sup>3</sup> h)）を使用した。特に、トロン（壊変生成核種）からの線量はラドンに比べて高く、今後は測定家屋数を増やすとともに、季節変動も含めてさらなる調査を行う必要がある。

## V 結論

今年度の予備的な調査から、ラドン・トロンによる内部被ばくは、外部被ばくに関して小さいものであると予想されるが、今後、測定家屋数を増やしたり、季節変動を観察したりして、より詳細な線量評価を行う必要がある。また、外部被ばくに関しては、走行サーベイと歩行による調査とを組み合わせ、より詳細な線量評価を行っていく必要がある。

## VI 次年度以降の計画

中国・インドのデータを用いて、外部被ばく線量当たりのがんリスクを定量的に評価するとともに、他の主要研究と比較して、中・高線量 vs 低線量、中・高線量率 vs 低線量率の観点で比較する。また、内部被ばくの定量的評価を行う。具体的には、以下に示す項目を実施することを考えている。

(1)調査地域を拡大して、走行サーベイを行い、放射線量が局地的に高いホットスポットの確認を行うことにより、外部被ばく線量をより詳細に評価する。

(2)走行サーベイでカバーできないような地域（自動車が入れない路地等）では、測定器を持参して徒歩で調査を行い、屋内・屋外の空間線量率を調査する。特に、砂浜等の裸地上でのデータを取得する。

(3)放射性エアロゾル分析(ウラン・トリウム粉塵、ラドン・トロン子孫核種など)、食物を含む環境試料中の放射能測定などを行って内部被ばくを定量的に評価する。

## 引用文献

- 1) Boice JD Jr, Hendry JH, Nakamura N, et al. Low-dose-rate epidemiology of high background radiation areas. *Radiat Res.* 2010;173(6):849-54.
- 2) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: Sources and effects of ionizing radiation, UNSCEAR 2000 report to the general assembly, with scientific annexes, Volume I, Sources, United Nations, New York, 2000

# Dosimetric studies of residents in high natural background radiation areas in India and China

Shinji Tokonami<sup>\*1</sup>, Tetsuo Ishikawa<sup>\*2</sup>, Masahiro Hosoda<sup>\*3</sup>, Atsuyuki Sorimachi<sup>\*1</sup>,  
Sarata K. Sahoo<sup>\*2</sup>, Suminori Akiba<sup>\*4</sup>

<sup>\*1</sup> *Department of Radiation Physics, Institute of Radiation Emergency Medicine, Hirosaki University*

<sup>\*2</sup> *National Institute of Radiological Sciences*

<sup>\*3</sup> *Department of Radiological Life Sciences, Hirosaki University Graduate School of Health Sciences*

<sup>\*4</sup> *Department of Epidemiology and Preventive Medicine, Kagoshima University graduate School of Medical and Dental Sciences*

*Keywords:* high natural background radiation; Karunagapally in Kerala State, India; Yangjiang in Guandong Province, China; internal exposure; radon and thoron; external exposure; car-borne survey

## **Abstract**

The purpose of this study is to examine whether magnitude of health effects associated with external exposure to low-dose-rate radiation is different from those related to medium-high dose-rate exposure. In collaboration with a principal investigator, Dr. Akiba, we are going to investigate internal and external exposure to high background natural radiation among residents in Karunagapally in Kerala State, India and Yangjiang in Guandong Province, India. Regarding internal exposure, it is necessary to estimate inhalation dose due to radon and thoron. Ingestion dose through food will also be estimated. Regarding external exposure, we conducted a preliminary car-borne survey in Karunagapally in Kerala State.

Ⅱ-4 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がんリスクの描写





# 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がんリスクの描写

甲斐倫明（大分県立看護科学大学看護学部看護学科教授）

## 研究要旨

低線量における科学的にリスクの実態を理解していくためには、放射線によるがん化のプロセスに関わる生物学的な個々の現象の線量および線量率との関係を明らかにしていく必要がある。とくに、低線量・低線量率における染色体異常などの細胞レベルでの作用は、線量率効果が総線量に応じて異なっていることが明らかになりつつある。そこで本研究では低線量・低線量率放射線による細胞動態の変化をシステマティックレビューと実験を組み合わせて明らかにすることを目的として、本年度は（１）これまで実施されてきた細胞レベルの細胞動態（細胞死、細胞増殖、細胞分化、変異）に関する学術報告のシステマティックレビュー、（２）放射線を全身照射したマウスの造血系細胞における DNA 損傷数および活性酸素産生量の経時的変化の検討をそれぞれ行い、放射線発がんの代表例である急性骨髄性白血病（AML）の発症機構を考えた。その結果、（１）細胞分裂が HSC に老化を促進させること、（２）老化した HSC に ROS の蓄積が生じること、（３）老化に伴い HSC に DNA 損傷の蓄積が生じること、（４）老化に伴い HSC に染色体異常、遺伝子変異が生じることがそれぞれ分かった。

以上の本研究結果より、放射線による AML の発症メカニズムとして下記のような仮説を立てた。マウスの全身に放射線を照射すると末梢血リンパ球の減少が生じる。すると大腿骨内の HSC は減少した末梢血リンパ球を補うために分裂増殖を開始する。これが引き金となって HSC の老化が促進され、徐々に活性酸素の蓄積が生じる。活性酸素は DNA に損傷を引き起こす因子の一つである。よって、放射線による HSC の老化が活性酸素の蓄積を生じ、AML に必須な 2 番染色体の欠失型異常や対立する 2 番染色体上の *Sfp1* 遺伝子の点突然変異を引き起こすのではないかと考えた。

キーワード：放射線、細胞動態、老化、活性酸素種、DNA 損傷、急性骨髄性白血病（AML）  
研究協力者：廣内篤久（環境科学技術研究所）、伴信彦（東京保健医療大学東が丘看護学部看護学科教授）、和泉志津恵（大分大学工学部知能情報システム工学科准教授）

## I. 研究目的

放射線によってヒトに引き起こされる代表的ながんとして、急性骨髄性白血病（AML）があげられる。これまでにヒトの AML のモデルマウスである C3H/HeNjcl マウスを用いた実験で、AML の発症には（１）放射線照射後平均して約 1~2 年の潜伏期間があること<sup>1-5)</sup>、（２）2 番染色体の中間部分の欠失型異常<sup>6-10)</sup>と対立する 2 番染色体上の *Sfp1* 遺伝子の点突然変異<sup>11-13)</sup>が必須であることが分かっている。では、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だろうか？染色体異常の生成に関しては 2 つの可能性が考えられる。

1 つ目の可能性としては、放射線が直接引き起こした DNA 二重鎖切断（DSB）が原因となって生じるというものである。AML を発症させやすい線量（3Gy）の放射線は、細胞内の DNA にクラスター型の DNA 損傷を引き起こす。この DNA 損傷は自然発生、もしくは他の化学物質等により生成されるものとは異なり、修復の過程で遺伝子の欠失を起こしやすい。このことを考えると

AMLの発症に必須の2番染色体の欠失型異常は、放射線照射後比較的早い段階で生じるものと考えられる。現に、(1) 同型の染色体異常が骨髄および脾臓細胞中に放射線照射後1~4ヶ月の時点で観察されていること、(2) 照射後24時間の時点でも骨髄細胞中に同様の異常が存在していたことが挙げられる<sup>7,14,15)</sup>。

2つ目の可能性としては放射線が間接的に2番染色体の欠失型異常を生じさせるというものである。近年、放射線が遺伝的不安定性を誘導することが報告された。これは放射線照射を受けた細胞のゲノムが不安定化し、その子孫細胞に染色体異常や突然変異が生じるという現象である<sup>16-18)</sup>。RithidechらはマウスにX線を照射後、経時的に屠殺して骨髄細胞中の2番染色体異常を調べた結果、照射後9ヶ月くらいまでは末端部近傍の切断による転座の頻度が高いが、AMLの発症が見られる時期になると中間部分の欠失が多くなったと報告している<sup>19)</sup>。Boufflerらが行った実験でも、照射後1年以上経つと2番染色体の中間部分の欠失の割合が多くなったことを報告している<sup>20)</sup>。これらの結果は、放射線が造血系の細胞にゲノムの不安定化を引き起こし、AMLの原因となる2番染色体の欠失型異常を間接的に引き起こしている可能性を意味している。しかし、現時点において、上記のどの可能性によってマウスAMLに必須な染色体異常が生じるのか結論は得られていない。

ではSfp1遺伝子の点突然変異についてはどうだろうか？Banらは放射線照射後の造血系の細胞動態に関する解析を行なった。その結果、未熟な造血細胞の数が照射後数ヶ月経っても回復しないことを明らかにした。さらに、そのデータに基づいて数理モデルによる解析を実施した結果、未熟な細胞の回復が遅れるのは成熟血球の回復が優先されるためであり、造血幹細胞(HSC)の分裂活性は長期にわたって上昇することが示唆された<sup>21,22)</sup>。分裂活性が高まるということは老化が促進される可能性が考えられる<sup>23)</sup>。細胞は老化するとミトコンドリアの抗酸化機能が低下することが知られている<sup>24,25)</sup>。このため細胞内に活性酸素種(ROS:  $\cdot O_2$ ,  $\cdot OH$ 等)が蓄積される。活性酸素はDNAに損傷を作る因子の引き起こす因子の一つであることから、細胞の老化がSfp1遺伝子に点突然変異を起こすのではないかと考えられる。しかしまだ実験的には証明されていない。このように放射線が直接的ではなく間接的に細胞動態を変化させることでがん化のプロセスを促進させている可能性はAMLに限らず、甲状腺がんや胸腺リンパ腫等でも考えられている<sup>26,27)</sup>。よって放射線による細胞動態を詳細に解析することが高線量・高線量率を基礎にした放射線のがんリスクを考察し、科学的事実を下にしたリスクの全体描写を考える上で非常に重要である。そこで本研究では低線量・低線量率放射線による細胞動態の変化をシステムティックレビューと実験を組み合わせて明らかにすることを目的として、本年度は(1) これまで実施されてきた細胞レベルの細胞動態(細胞死、細胞増殖、細胞分化、変異)に関する学術報告のシステムティックレビュー、(2) 放射線を全身照射したマウスの造血系細胞におけるDNA損傷数の線量反応関係および活性酸素産生量の経時的変化の検討をそれぞれ行なった。

## II. 研究方法

### II-I. 細胞動態に関する文献レビュー

PubMedにより、細胞動態、老化、活性酸素、DNA損傷、染色体異常、突然変異、AMLをキーワードとして文献検索を行なった。そして、細胞動態の変化による生物影響の関係を検討した。

## II-II. 放射線を全身照射したマウスの造血系細胞における DNA 損傷数の線量反応関係

### <マウス>

8週齢の雌の C3H/HeNjcl マウスを日本クレアから購入し、温度、湿度、室内照明 12 時間ごとの点灯消灯サイクルで管理された飼育室中で飼育した。マウスは 1~2 匹ずつ飼育ケージに收容し、固形飼料（日本クレア製 CE-2）と水を自由に摂取させた。

### <X 線の照射>

X 線照射は X 線装置 HF320（島津メクテム）を使用した。マウスを非照射群（0Gy）、1Gy 照射群、3Gy 照射群の 3 群に分けて、照射群のマウスに管電圧 200kV、管電流 18mA、フィルターに 0.5mm 厚の銅板と 0.5mm 厚のアルミニウム板を使用し、0.47mGy/min の線量率で X 線を全身照射した。

### <EasySep Mouse PE Selection Kit による造血幹細胞含有骨髓細胞の分離>

ドラフトチェンバー内でマウスにエーテル麻酔をかけ、頸椎脱臼により屠殺した。その後、両側の大腿骨を切断し、 $\phi 30$  シャーレ内で PBS with 2% FBS 溶液に浸した。大腿骨の両側を数 mm 切断し、23G の注射針を付けた 1ml のシリンジを用いて両側から 1ml ずつ、計 2ml の PBS with 2% FBS 溶液を大腿骨内に勢よく注入し、10ml の遠心管チューブに骨髓細胞含有 PBS with 2% FBS 溶液を作成した。本研究では骨髓細胞中の造血幹細胞の含有量を高めるために、EasySep Mouse PE Selection Kit（VERITAS）を用いた磁気細胞分離を行った。まず、骨髓細胞含有 PBS with 2% FBS 溶液を、セルストレイナー（BD Falcon）を用いて濾過し、その後 10ml 遠心管チューブに入れ、1400rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、200 $\mu$ l の PBS with 2% FBS 溶液を入れ、よく攪拌した。攪拌後、2 $\mu$ l の FcR blocking antibody（VERITAS）を入れ、よく攪拌した。その後、1 $\mu$ l の PE-conjugated antibody（VERITAS）を入れ、よく攪拌し 15 分静置した。静置後、10 $\mu$ l の PE-selection cocktail（VERITAS）を入れ、よく攪拌し 15 分静置した。その後、10 $\mu$ l の Magnetic nanoparticles（VERITAS）を入れ、よく攪拌し 10 分静置した。静置後、2.5ml の PBS with 2% FBS 溶液を入れ、よく攪拌した後にマグネット用チューブに全量注入した。その後、マグネット用チューブをマグネットにセットし、5 分間静置した。静置後、チューブをマグネットにセットしたままの状態、容器を傾け上澄み液を捨てた。マグネットからチューブを取り外し、2.5ml の PBS with 2% FBS 溶液を入れ、よく攪拌した後、10ml 遠心管チューブに入れ、1400rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、2ml の PBS 溶液を入れ、よく攪拌した。これらの操作を行うことで、EPCR(+)細胞（造血幹細胞特有の細胞膜タンパク質<sup>28)</sup>の含有量を高めた骨髓細胞含有 PBS 溶液を作成した。

### <密度勾配遠心法による末梢血リンパ球の単離および標本の作製>

ドラフトチェンバー内でマウスにエーテル麻酔をかけ、頸椎脱臼により屠殺した。その後、ヘパリン（ノボヘパリン注1000、アベンティスファーマ株式会社）混合の注射器を使用し、心臓採血により、末梢血リンパ球含有の血液を採取した。採血した血液は、5 $\mu$ l のヘパリンが含有した 1.5ml チューブの中に入れ、よく攪拌した。その後、ヘパリン含有の血液を PBS 溶液と同量（1:1 の割合）になるように加え、よく攪拌した。攪拌後、2ml の ficoll-Paque 液（Pharmacia Biotech）を 10ml の遠心管チューブに入れ、その上から ficoll-Paque 液の境界面を乱さないように慎重に PBS 混合の血液を重層させた。重層後、400rcf で 30 分間遠心した。遠心後、リンパ球の層のみをマイクロピペットで回収し、10ml の遠心管チューブ内で、6ml の PBS 溶液と混合させ、100rcf で 10 分間遠

心した。遠心後、上澄み液を捨て、2mlのPBS溶液を入れ、100rcfで10分間遠心した。その後、上澄み液を捨て、500  $\mu$ lのPBS溶液を入れ攪拌し、4%パラフォルムアルデヒド500  $\mu$ lを静かにいれ攪拌し、20分間静置した。静置後、300rcfで5分間遠心し、上澄み液を捨て、PBS溶液を500  $\mu$ l入れよく攪拌し、再度300rcfで5分間遠心した。この作業を2回繰り返した後、500  $\mu$ lのPBS溶液を加えてよく攪拌し、シランコートスライドガラス（マツナミ）をセットしたチェンバー内に全量注入した。このチェンバーをオートスメア（サクラ精機）にセットし、800rpmで5分間遠心することにより、スライドガラス上に末梢血リンパ球を塗抹した。遠心後、スライドガラスをコプリンジャー瓶内70%エタノール溶液に浸し、細胞を固定した。

#### <リン酸化ATM免疫蛍光抗体染色>

DNAに二重鎖切断が生じると、切断部位にリン酸化したATMが集積し、フォーカスを形成する。このフォーカスは、可視化することが可能であるため、DNA二重鎖切断の指標となる。そこで、本研究では53BP1フォーカスを下記の方法で可視化し、DNA二重鎖切断を観察した。

固定した細胞が塗抹されているスライドガラスのふちから余分な溶液を拭き取った後、0.2%トライトンX/PBS溶液に浸し、20分間静置した。静置後、スライドガラスを取り出し、スライドガラスのふちから、余分な溶液を吸い取った。その後、100  $\mu$ lの一次抗体溶液（Anti-ATM protein kinase Rabbit-Poly, (RCK) : 3%/BSA/TBS溶液=0.2  $\mu$ l : 99.8  $\mu$ l) を細胞面上に滴下し、パラフィルムで封入した後、37°Cの湿潤環境、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で1時間培養した。一次抗体処理後、コプリンジャー瓶内にPBS溶液を満たし、スライドガラスを2回洗浄した。洗浄後、スライドガラスのふちから、余分な溶液を吸い取った後、100  $\mu$ lの二次抗体溶液（Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (H+L) , (Life Technologies) : 3%/BSA/TBS溶液=0.2  $\mu$ l : 99.8  $\mu$ l) を細胞面上に滴下し、パラフィルムで封入した後、37°Cの湿潤環境、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で1.5時間培養した。培養後、コプリンジャー瓶内にPBS溶液を満たし、スライドガラスを5回洗浄した。洗浄後、スライドガラスのふちから、余分な溶液を吸い取った後、細胞面上に10  $\mu$ lのDAPI II counterstain (Vysis) を滴下し、22×22mmのカバーガラスで封入した。

#### <リン酸化ATMフォーカスの観察>

リン酸化ATMフォーカスは、DSカメラコントロールユニットDS-U2 (Nikon) を装備した蛍光顕微鏡DS-Ril (Nikon) を用いて観察した。骨髄細胞と末梢血リンパ球の細胞核は、青色の蛍光像として映り、リン酸化ATMフォーカスは赤色の粒状に見える。1匹のマウスあたり、末梢血リンパ球のスライドと骨髄細胞のスライド計2枚作製し、1つのスライドから50個以上の末梢血リンパ球および骨髄細胞を観察し、細胞1個あたりのリン酸化ATMフォーカス数を算出した。

### II-III. 放射線照射したマウスの造血系細胞における活性酸素産生量の経時的変化

使用するマウス、X線の照射条件、骨髄細胞の単離の方法は、研究方法 II-II と同じであるため省略する。

#### <MitoSOX Red (invitrogen) によるミトコンドリア内 $\cdot\text{O}_2^-$ の測定>

細胞内のミトコンドリアは酸素を取り込み、細胞分裂などに必要なエネルギーを生成している。活性酸素はその副産物として産生されることが知られている。そのため、ミトコンドリア内 $\cdot\text{O}_2^-$ 検出用蛍光試薬である MitoSOX Red (invitrogen) を用いてミトコンドリアで産生される $\cdot\text{O}_2^-$ の測定を行った。

1.5ml チューブ内でPBS溶液1ml中に $1.0 \times 10^5$ 個の細胞を入れた後、6000rpmで30秒遠心した。

遠心後、上澄み液を捨て、1 $\mu$ Mに希釈した MitoSOX Red (invitrogen) を 1ml 注入し、攪拌した後、37.0 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分静置した。静置後、6000rpm で 30 秒遠心し、上澄み液を捨て、PBS 溶液 400 $\mu$ l を注入し、攪拌した。攪拌後、6000rpm で 1 分遠心し、上澄み液を捨て、PBS 1ml を注入し攪拌したものを、励起波長 510nm、蛍光波長 580nm の分光蛍光光度計を用いて測定した。

#### <APF (積水メディカル) による細胞質内 $\cdot$ OH の測定>

放射線は細胞中の水分子を電離させ、 $\cdot$ H と  $\cdot$ OH を発生させる。発生した  $\cdot$ H と  $\cdot$ OH が再び結合し、水分子に戻ると何も問題は生じないが、ラジカルは非常に結合しやすい性質を持っているため、他の分子と結合した場合、結合した分子の性質を変えてしまう可能性が考えられる。そのため、 $\cdot$ OH 検出用蛍光試薬である APF (積水メディカル) を用いて、細胞質内で産生される  $\cdot$ OH の測定を行なった。

1.5ml チューブ内で PBS 溶液 1ml 中に  $1.0 \times 10^5$  個の細胞を入れた後、6000rpm で 30 秒遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、5 $\mu$ M に希釈した APF (積水メディカル) を 1ml 注入し、攪拌した後、37.0 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分静置した。静置後、6000rpm で 30 秒遠心し、上澄み液を捨て、PBS 溶液 400 $\mu$ l を注入し、攪拌した。攪拌後、6000rpm で 1 分遠心し、上澄み液を捨て、PBS 溶液 1ml を注入し攪拌したものを、励起波長 490nm、蛍光波長 515nm の分光蛍光光度計を用いて測定した。

### III. 研究結果

#### III-I. 細胞動態に関する文献レビュー

PubMed から細胞動態、老化、活性酸素、DNA 損傷、染色体異常、突然変異、AML をキーワードとして 106 件の文献<sup>24-130</sup>を収集した。その中から、まず、HSC の老化の特徴に関する文献を調べた。代表的な実験としては 2012 年の Florian らの報告が挙げられる<sup>29</sup>。彼らは若齢マウスと高齢マウスの HSC をそれぞれ他のマウスに移植して、移植した HSC 由来の血球数の割合を調べた。その結果、高齢マウスの HSC 由来の血球細胞の割合が著しく低下していることを報告した。この報告は高齢マウスの HSC は分化する能力が低下していることを示している。また、1999 年に de Haan らはマウスの系統に差はあるが高齢マウスでは HSC の数が減少するという報告をしている<sup>30</sup>。これらの報告をまとめると高齢マウスの HSC、つまり老化した HSC は、分裂増殖と分化の能力が低下していることが分かった。

次に老化のメカニズムに関する文献を調べた。老化のメカニズムに関してはヒトの正常線維芽細胞を用いた実験でよく調べられている。代表的な実験としては 2004 年の Olga らの報告が挙げられる<sup>23</sup>。彼らは細胞の継代数と老化の関係を調べた。その結果、細胞の継代数が 25 を超えると細胞老化の指標の一つである SA- $\beta$ -gal を発現している細胞の割合が急激に増加し始め、継代数が 30 では 60%、継代数が 32 では 100%になることを報告した。2006 年の Wang らの報告も重要である<sup>31</sup>。彼らはまず 6.5Gy の  $\gamma$  線をマウスの全身に照射し、HSC の数の経時的変化を調べた。その結果、放射線照射後 3 日目以降に HSC の数が急激な増加をし始め、60 日目まで増加し続けることを観察した。次に彼らは HSC の数が増え続けている時期 (照射後 14 日目) で p16<sup>lnk4a</sup> (細胞老化のマーカー) を発現している HSC の割合を調べた。その結果、非照射群と比較して有意に

p16<sup>Ink4a</sup> を発現している HSC の割合が増加していることを観察した。これらの報告をもとめると細胞の分裂が老化の促進につながっていることが分かった。

次に老化による生物影響に関する文献を調べた。2010年に Wang らは 6.5Gy の  $\gamma$  線を全身照射したマウスの HSC における ROS 量の経時的变化を調べた。その結果、ROS が非照射群と比較して照射後 14 日目では約 2.5 倍、28 日目では約 1.5 倍、56 日目では約 1.5 倍増加していることを報告した<sup>32)</sup>。照射後 14 日目は p16<sup>Ink4a</sup> を発現している HSC の割合が増加している<sup>31)</sup> ことから、老化した HSC 中に ROS の蓄積が生じていることが分かった。ROS は DNA に損傷を引き起こす代表的な因子である。では老化した HSC には DNA 損傷が生じているのだろうか？ヒトの正常線維芽細胞を用いた実験であるが Olga らは継代数と DNA 損傷の関係を調べている。その結果、継代数の増加に伴い DNA 損傷数 ( $\gamma$ -H2AX を指標) が指数関数的に増加していくことを報告している<sup>23)</sup>。また、Wang らは 6.5Gy を全身照射したマウスの HSC における DNA 損傷数 ( $\gamma$ -H2AX フォーカス数を指標) の経時的变化を調べている。その結果、照射後 14 日目では非照射群と比較して HSC 一個あたりの DNA 損傷数が約 2.5 倍増加していることを報告している<sup>31)</sup>。さらに、2011 年に Rube らは健常人から HSC を採取し、年齢と DNA 損傷数 ( $\gamma$ -H2AX フォーカス数を指標) の関係を調べている。その結果、年齢に依存して HSC に DNA 損傷数が蓄積していることを報告している<sup>33)</sup>。DNA 損傷以外でも老化した細胞に様々な影響が生じていることが報告されている。2011 年に Okazaki らは 8 週齢のマウスに 3Gy を全身照射し脾臓細胞における 11 番染色体の転座の割合の経時的变化を調べている。その結果、11 番染色体の転座の割合は 10 週齢では約 6%、30 週齢では約 3%と 30 週齢までは週齢に依存して減少傾向を示していたが、70 週齢になると 10%まで増加することを報告した。また、彼らは非照射群でも 10 週齢では約 0%であったが、70 週齢になると 1%になることも報告している<sup>34)</sup>。2012 年に Xu らはマウスの年齢と生殖細胞における突然変異の関係を調べている。その結果、年齢に依存して突然変異の発生頻度が増加していくことを報告している<sup>35)</sup>。これらのことから細胞の老化が ROS の蓄積を生じ、DNA に損傷を引き起こすことで染色体異常や突然変異につながる可能性が分かった。

### III-II. 放射線を全身照射したマウスの造血系細胞における DNA 損傷数の線量反応関係

X線を全身照射したマウスの骨髄細胞および末梢血リンパ球におけるリン酸化ATMフォーカス数の線量反応関係を図1に示す。図1より、末梢血リンパ球における細胞1個あたりのリン酸化ATMフォーカス数は、非照射群では約10個、0.5Gy照射群では約20個、1Gy照射群では約23.7個、2Gy照射群では約32.8個、3Gy照射群では約59個となった。これに対して骨髄細胞では、非照射群では約4.4個、0.5Gy照射群では約5個、1Gy照射群では約9.3個、2Gy照射群では約15.1個、3Gy照射群では約12.5個となった。末梢血リンパ球と比較すると0.5Gyでは約1/4倍、1Gyでは約1/2.5倍、2Gyでは約1/2倍、3Gyでは約1/5倍となることが分かった。

### III-III. 放射線照射したマウスの造血系細胞における活性酸素産生量の経時的变化

#### <放射線によるミトコンドリア内 $\cdot\text{O}_2$ 産生の長期的変化>

図2に MitoSOX の測定値の経時的变化を示す。図2より、照射後1日目の MitoSOX の値は、非照射群と比較して 1Gy 照射群では約 1.5 倍、3Gy 照射群では約 3 倍増加していることが分かった。その後、MitoSOX の値は減少傾向を示し、照射後 20 日目には、両照射群ともに非照射群と差が見られなくなった。しかし、照射後 400 日が経過すると、マウスの個体間でばらつきがある

ものの、1Gy 照射群では約 1.3 倍、3Gy 照射群では約 1.5 倍増加していることが分かった。

<放射線による細胞質内・OH 産生の長期的変化>

図 3 に APF の測定値の経時的変化を示す。図 3 より、細胞質内の・OH は 1Gy 照射群および 3Gy 照射群ともに照射後 30 日まで非照射群と差が見られなかった。しかし、照射後 400 日以上が経過するとマウスの個体間でばらつきがあるものの、1Gy 照射群では約 1.4 倍、3Gy 照射群では約 1.7 倍増加していることが分かった。

#### IV. 考察

##### IV-I. 細胞動態に関する文献レビュー

HSC が老化するの否かここ数年多くの研究者によって議論されてきたが、近年、高齢マウスの HSC は分裂・分化する能力が著しく低下すること<sup>29,30)</sup>から老化は起きると考えられる。ではなぜ老化がおきるのだろうか？Olga らはヒト正常線維芽細胞を用いて、細胞の継代数に依存して SA- $\beta$ -gal (細胞老化の指標) を発現している細胞が増加することを報告している<sup>23)</sup>。また、Wang らはマウスを用いた実験で、HSC の数の増加と共に p16<sup>lnk4a</sup> (細胞老化の指標) を発現している HSC の割合も増加してくることを報告している<sup>31)</sup>。HSC の数が増加するということは HSC の細胞分裂の活性が上がっていることを意味しているので、HSC も細胞分裂によって老化が促進されると考えられた。では老化が起きると生物学的にどのような影響が生じるのだろうか？細胞は分裂する際エネルギー代謝の副産物として活性酸素種 (ROS:  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$  等) を生成する。この ROS は DNA に損傷を引き起こす因子であるが、通常はミトコンドリアに備わった抗酸化能により除去される。しかし、老化した細胞ではこの抗酸化能が低下することが知られている<sup>24,25)</sup>。現に Wang らは老化状態にある HSC の ROS 量が非照射群と比較して約 2 倍増加していることを報告している<sup>32)</sup>。よって老化した HSC には ROS の蓄積が生じることが分かった。また、彼らは ROS の蓄積が見られている HSC に DNA 損傷数が非照射群の約 2.5 倍増加していることも報告している<sup>32)</sup>。老化した細胞に DNA 損傷数が増えるという報告は、Rübe らの年齢毎に健常人の HSC を用いた実験<sup>33)</sup> や、Olga らのヒトの正常線維芽細胞を用いた実験<sup>23)</sup> でも見られている。また、DNA 損傷以外にもマウスの週齢と共に染色体異常<sup>34)</sup>や遺伝子突然変異<sup>35,36)</sup>の発生頻度が増えてくることも報告されている。よって、老化が ROS の蓄積を生じ、これが原因となって DNA 損傷を引き起こして、染色体異常や遺伝子突然変異を生成する可能性があることが分かった。

従来、細胞の老化は生存に必要な機能やエネルギー代謝の効率が低下した細胞を組織から排除し、より効率よく生体を維持していくための現象であると思われてきたが、今回の文献レビューによって、放射線が老化を促進させる可能性や老化が DNA に損傷を引き起こしがん化につながる可能性があることが分かった。

以上の文献レビューにより、放射線が細胞動態の変化を引き起こし細胞に老化を引き起こすことが AML に繋がる 2 番染色体の欠失型異常や Sfp1 遺伝子の突然変異を引き起こす可能性が考えられた。

##### IV-II. 放射線を全身照射したマウスの造血系細胞における DNA 損傷数の線量反応関係

X線を全身照射したC3H/HeNjclマウスの骨髓細胞および末梢血リンパ球におけるDNA損傷の



線量反応関係をリン酸化ATMフォーカスを指標として調べた。その結果、骨髄細胞に生じたリン酸化ATMフォーカス数は末梢血リンパ球と比較すると、0.5Gyでは約1/4倍、1Gyでは約1/2.5倍、2Gyでは約1/2倍、3Gyでは約1/5倍になることが分かった。この結果は、骨髄細胞は末梢血リンパ球よりも放射線感受性が低いことが分かった。ではなぜ骨髄細胞は放射線に対して感受性が低いのだろうか？X線は細胞内の $H_2O$ を電離して $\cdot H$ および $\cdot OH$ を生成することが知られている。これらのラジカルは生成されても再結合してしまえば $H_2O$ に戻るだけだが、DNAと結合してしまうと塩基が変わってしまいDNA損傷になる可能性がある。この現象は間接効果といい、X線による生物影響を引き起こすメカニズムである。しかし、この効果は細胞の置かれている環境によって左右される。20%と0.1%の酸素濃度でそれぞれ培養したCHO細胞(チャイニーズハムスターの卵細胞)を用いて、6.5GyのX線照射後の生存率を比較した研究がある。その結果、20%で培養した細胞の方が生存率が1/50に減少することが報告されている。このような現象は細胞死だけでなく染色体異常や突然変異でも見られており、一般的に低酸素環境下で細胞を培養した方が放射線に抵抗性になる<sup>128)</sup>。ではなぜ酸素濃度によってX線の感受性が変わるのだろうか？高酸素状態だと、X線によって細胞内に生じた $\cdot H$ が酸素分子と再結合してしまうため、フリーになった $\cdot OH$ 数が増加する。しかし、低酸素状態だと $\cdot OH$ は $\cdot H$ と結合する確率が増えるためフリーの活性酸素の数は減少する。つまり、低酸素状態の方が活性酸素とDNAが結合してDNA損傷になる確率が小さくなるということである。これにより低酸素下では放射線に抵抗性になる。大腿骨内は0.1~1%、血管内は7%の酸素濃度であることが報告されている<sup>129)</sup>。よって、骨髄細胞は末梢血リンパ球よりも放射線によるDNA損傷数が少なくなったのだろうと考えられた。

#### IV-III. 放射線照射したマウスの造血系細胞における活性酸素産生量の経時的変化

放射線を照射したマウスの骨髄細胞における $\cdot O_2^-$ および $\cdot OH$ 産生量の経時的変化を実験的に観察した。まず、MitoSOX Redを用いてミトコンドリア内の $\cdot O_2^-$ の値を測定した。その結果、照射後1日目での $\cdot O_2^-$ の産生量は非照射群と比較して1Gy照射群では約1.5倍、3Gy照射群では約3倍に増加した。その後は減少していき、照射後20日には両照射群とも非照射群と差がみられなくなった。しかし、400日が経過すると、マウス個体間でばらつきがあるものの、1Gy照射群では約1.3倍、3Gy照射群では約1.5倍に増加した。ミトコンドリアは細胞の活動に必要なATPを酸素を使って生成する。その際、副産物として $\cdot O_2^-$ が産生される。これまでの研究で細胞が分裂期に入ると $\cdot O_2^-$ のレベルが徐々に増えていき、 $G_0$ 期に移行するとミトコンドリアが持っている抗酸化能が活性化して $\cdot O_2^-$ は徐々に減少していくことが報告されている<sup>130)</sup>。よって、本研究で見られた放射線照射後20日目まで見られた $\cdot O_2^-$ の増加は、放射線照射によってアポトーシスが起きた血液系の細胞を補うために、骨髄細胞中の造血幹細胞が分裂期に入っていた結果ではないかと考えられる。そして、十分な量の血液が補えると徐々に分裂期から $G_0$ 期に移行していき、照射後20日にはほとんどの造血幹細胞が $G_0$ 期になることで、 $\cdot O_2^-$ のレベルが非照射群と同様になるのだろうと考えられた。この考えを示唆する結果として、放射線照射後の造血幹細胞の細胞動態の変化をシュミレーション計算で調べた結果、照射を受けた造血幹細胞は照射直後から分裂期に入る割合が増加するということが報告されている<sup>21)</sup>。では照射してから400日以降に再び見られた $\cdot O_2^-$ の増加はどう考えればいいのか。これまでの研究で、細胞が老化するとミトコンドリアの抗酸化能が低下し、細胞中に活性酸素種が蓄積するということが報告されている。例えば、高齢のマウスから取り出したミトコンドリアは、若齢のマウスのミトコンドリアよりも多くの活性酸

素種を産生している<sup>24,25)</sup>。これを踏まえて一つの可能性を考えた。放射線照射によって引き起こされた血液系の細胞の損出を補うために、骨髄細胞中の造血幹細胞は分裂期に入る。これにより、細胞の老化が促進され、ミトコンドリアの抗酸化能が低下していき、照射後 400 日以上経過したマウスの骨髄細胞に $\cdot\text{O}_2^-$ の増加が生じたのではないかと考えた。

次に、本研究では APF を用いて細胞質内の $\cdot\text{OH}$ も測定した。その結果、 $\cdot\text{OH}$ のレベルは照射後 30 日まで 1Gy 照射群および 3Gy 照射群ともに非照射群と差がみられなかった。しかし、照射後 400 日目では 1Gy 照射群で約 1.4 倍、3Gy 照射群で約 1.7 倍に増加した。 $\cdot\text{OH}$ は放射線が細胞内の水分子を分解することによって生じる。しかし、この $\cdot\text{OH}$ は非常に反応性が高いため、他のフリーラジカルと結合して消滅してしまう。よって、 $\cdot\text{OH}$ を検出するためには放射線照射直後か持続的に産生されている状態にあることが必要になる。今回、放射線照射後 1 日目から測定を開始したため、 $\cdot\text{OH}$ の産生量に非照射群と違いがなかったのかもしれない。では照射してから 400 日目以降になぜ $\cdot\text{OH}$ は増加したのだろうか。一つの可能性としては先にも挙げた細胞の老化が関係していると考えられる。2010 年に Cadet らはミトコンドリア内で生成された $\cdot\text{O}_2^-$ が $\text{H}_2\text{O}_2$ に変換されて核まで到達し、核内で $\cdot\text{OH}$ になることを報告した<sup>131)</sup>。このことから、本研究で見られた $\cdot\text{OH}$ の増加は、放射線によって老化が促進された造血幹細胞中のミトコンドリアが盛んに $\cdot\text{O}_2^-$ を産生することで、 $\text{H}_2\text{O}_2$ を生じ、核内に移行して $\cdot\text{OH}$ になっているのではないかと考えた。では $\cdot\text{OH}$ が生成されると生物学的にどのような影響が生じるのだろうか。 $\cdot\text{OH}$ は DNA の塩基と結合しやすく、その結果、シトシンがウラシル、グアニンが 8 ヒドロキシグアニン等になってしまう。これらを塩基損傷という。通常、塩基損傷は塩基除去修復によってほぼ 100%元通りに修復されるが、塩基損傷の数が多くなると修復しきれず、点突然変異の原因となってしまう。よって、細胞内で $\cdot\text{OH}$ が増加するという事は点突然変異が生じるチャンスも増えることを意味している。従って、本研究結果より、放射線が骨髄細胞中の造血幹細胞に老化を引き起こすことで、照射後 400 日目以降にミトコンドリアで産生される $\cdot\text{O}_2^-$ が増加し、それが核内で $\cdot\text{OH}$ となって点突然変異を起こす可能性が示唆された。この点突然変異が AML に必須な 2 番染色体の Sfp1 遺伝子で生じる可能性が十分考えられる。従って、放射線による造血幹細胞の老化が間接的に AML の発症につながる事が示唆された。

#### IV-III. 放射線による AML 発症機構仮説

本研究で行った文献レビューおよび実験結果から放射線による AML の発症機構として下記のような仮説を立てた。マウスの全身に放射線を照射すると末梢血リンパ球の減少が生じる。すると大腿骨内の HSC は減少した末梢血リンパ球を補うために分裂増殖を開始する。これが引き金となって HSC の老化が促進され、徐々に活性酸素の増加が生じる。活性酸素は DNA に傷を引き起こす因子の代表例である。よって、放射線による HSC の老化の促進に伴う活性酸素の増加が AML に必須な 2 番染色体の欠失型異常や対立する 2 番染色体上の Sfp1 遺伝子の点突然変異を引き起こすのではないかと考えた。

#### 結論

本研究では細胞動態に関する文献のレビューと放射線を全身照射したマウスの造血系細胞における DNA 損傷数および活性酸素産生量の経時的変化の解析から放射線誘発 AML の発症メカニズ

ムを考えることを目的とした。その結果、放射線が HSC の細胞動態を変化させることで (1) 老化の促進、(2) ROS の蓄積、(3) DNA 損傷の誘発、(4) 染色体異常および遺伝子突然変異の誘導をそれぞれ引き起こす可能性が分かった。

以上の本研究結果より、放射線が間接的に誘発した細胞老化が AML 発症に関与する可能性が示唆された。

## V. 次年度以降の計画

今年度の研究成果により、放射線を全身照射したマウスの末梢血リンパ球は大腿骨内の造血系細胞と比較して放射線によるダメージを受けやすいことが分かった。また照射したマウスを長期飼育すると造血系細胞内に活性酸素の増加が見られることも分かった。これらの結果から次のような仮説を立てた。マウスの全身に放射線を照射すると末梢血リンパ球の減少が生じる。すると大腿骨内の造血系細胞は減少した末梢血リンパ球を補うために分裂増殖を開始する。これが引き金となって造血系細胞の老化が促進され、徐々に活性酸素の増加が生じる。活性酸素は DNA に傷を引き起こす因子の代表例である。よって、放射線による造血系細胞の老化の促進に伴う活性酸素の増加が AML に必須な染色体異常や遺伝子変異を引き起こすのではないかと考えた。

そこで来年度以降では放射線による造血系細胞の細胞動態変化を文献レビューおよび実験で明らかにし、上記で立てた仮説を証明することを目的とする。具体的な方法は下記の通りである。

### <文献レビュー>

放射線照射したマウスの造血系細胞における生存率、染色体異常、遺伝子変異をエンドポイントとした学術論文をレビューし、線量・線量率反応関係を明らかにする。そして、データが不足している線量・線量率を明確にする。レビューによって得られたデータをメタアナリシスすることで、細胞動態の線量・線量率の応答を描く。システムティックレビューに基づいて、がん化に至るプロセスを図式化し、数学的な発がんモデル構築を行う。

### <実験>

平成 25 年度から平成 26 年度にかけて、環境科学技術研究所に設置してある低線量率照射装置を用いて、C3H 系マウスに 20mGy/day、200mGy/day、1Gy/day の線量率で $\gamma$ 線を集積線量が 1Gy または 3Gy まで長期連続照射しながら下記の実験を行う。

1) 照射期間中または照射後経時的にマウスを屠殺して、心臓採血および大腿骨の摘出を行う。その後、心臓採血で得た血液からは末梢血リンパ球 (フィコール液を用いた比重遠心法で) を、大腿骨からは各分化段階の造血系細胞 (HSC (造血幹細胞)、MPP (多能性前駆細胞)、CMP (骨髓球系造血前駆細胞)、CLP (リンパ系前駆細胞)) を Linage、Scal、CD34、c-kit 等の細胞膜表面マーカーの組み合わせを利用してイージーセップバイオレットマグネットおよびフローサイトセルソーター (環境科学技術研究所所有) でそれぞれ単離する。これらの操作により得られた末梢血リンパ球および各分化段階の造血系細胞を ApoFlamma PS (アポトーシス検出用蛍光標識ペプチド) で染色し、アポトーシスの発生頻度を調べる。

2) 照射期間中または照射後、造血系細胞に分裂増殖の活性化が生じるのかを検討するために、経時的に造血系細胞の細胞周期の移行割合をイメージベースサイトメーターで調べる。

3) 照射期間中または照射後に造血系細胞に老化が促進されているのかを検討するために、啓示的に細胞老化の代表的なマーカーである p16 遺伝子ならびに SA- $\beta$ -Gal の発現を調べる。

4) 老化に伴い造血系細胞内に活性酸素の増加が生じ、DNAに損傷が生じるのかを検討するために、照射期間中または照射後に経時的に造血系細胞内の活性酸素の濃度を MitoSox (ミトコンドリア内の $\cdot O_2$ 検出用蛍光試薬) および APF (細胞内 $\cdot OH$  検出用蛍光試薬) を用いて、その蛍光度からそれぞれ調べる。また、DNAの損傷は 53BP1 および $\gamma$ -H2AX (それぞれ DNA 二重鎖切断のマーカー) の免疫蛍光抗体染色で調べる。

5) 放射線誘発 AML に必須の異常の一つである 2 番染色体の欠失型異常が放射線照射後どのようなタイミングで生じるのか検討するために、照射期間中または照射後に啓示的に造血系細胞の染色体標本を作製し、2 番染色体の蛍光染色 (FISH 法) を行い調べる。

以上の実験から、放射線照射によって生体内の造血系細胞に細胞動態の変化が生じ、これにより老化が促進され、活性酸素が増加することで DNA に損傷が生じ、AML につながる異常が生成される可能性を明らかにする。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) 甲斐倫明.低線量・低線量率のリスク推定のための理論とデータ. 2012; 47: 379-393.
- 2) 小嶋光明.低線量域における線量率効果～二動原体染色体発生頻度に着目して～. 2012; 47: 347-360.

引用文献

- 1) Upton AC, Wolff FF, Furth J, et al. A comparison of the induction of myeloid and lymphoid leukemias in X-irradiated RF mice. *Cancer Res.* 1958; 18: 842-848.
- 2) Major IR. Induction of myeloid leukemia by whole-body single exposure of CBA male mice to X-rays. *British Journal of Cancer* 1979; 47: 285-291.
- 3) Mole RH, Papworth DG, Corp MJ. The dose-response for X-rays induction of myeloid leukemia in male CBA/H mice. *British Journal of Cancer* 1983; 47: 285-291.
- 4) Resnitzky P, Estrov Z, Haran-Ghera N. High incidence of acute myeloid leukemia in SJL/J mice after X-irradiation and corticosteroids. *Leuk. Res.* 1985; 9: 1519-1528.
- 5) Seki M, Yoshida K, Nishimura M, et al. Radiation-induced myeloid leukemia in C3H/He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Radiat. Res.* 1991; 127: 146-149.
- 6) Hayata I, Seki M, Yoshida K, et al. Chromosome aberrations observed in 52 mouse myeloid leukemias. *Cancer Res.* 1983; 43: 367-373.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Clark DJ, Meijne EI, Bouffler SD, et al. Microsatellite analysis of recurrent chromosome 2 deletions in acute myeloid leukaemia induced by radiation in F1 hybrid mice. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 16: 238-246.
- 10) 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.

- 11) Cook WD. McCaw BJ. Herring C. et al. PU.1 is suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood* 2004; 104: 3437-3444.
- 12) Suraweera N. Meijne E. Moody J. et al. Mutation of the PU.1 Ets domain are specifically associated with murine radiation-induced, But not human therapy-related, acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 2005; 24: 3678-3683.
- 13) 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. *Exp. Hematol.* 2008; 36: 871-885.
- 14) Hayata I. Leukemogenesis and chromosomal abnormalities:experimental animals. *Acta. Haematol. Jpn.* 1985; 48: 1857-1863.
- 15) 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.
- 16) Ullrich LR. Ponnaiya B. Radiation-Instability and its relation to radiation carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998; 74: 747-754.
- 17) Morgan WF. Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 1996; 146: 247-258.
- 18) Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 397-404.
- 19) Rithdech K. Bond VP. Cronkite EP. Thompson MH. Bullis JE. Hypermutable of mouse chromosome 2 during the development of X-ray-induced murine myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 1152-1156.
- 20) Bouffler SD. Meijne EI. Huiskamp R. et al. Chromosomal abnormalities in neutron-induced acute myeloid leukemias in CBA/H mice. *Radiat. Res.* 1996; 146: 349-352.
- 21) Ban N. Kai M. Implication of replicative stress-related stem cell ageing in radiation-induced murine leukaemia. *Br. J. Cancer* 2009; 101: 363-371.
- 22) Ban N. Adachi N. Kai M. Long-term radiation effects on hematopoiesis in mice. *Proceedings of The Second Asian and Oceanic Congress for Radiation Protection (AOCR-2) 2006.*
- 23) Olga AS. Hirokawa I. Drazen BZ. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature Cell Biology* 2004; 6: 168-170.
- 24) Sohal RS. Orr WC. Relationship between antioxidants, prooxidants, and the aging process. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1992; 663: 74-84.
- 25) Garcia de la Asuncion J. Millan A. Pla R. et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* 1996; 10: 333-338.
- 26) Kominami R. Niwa O. Radiation carcinogenesis in mouse thymic lymphomas. *Cancer Sci.* 2006; 97: 575-581.
- 27) Suzuki K. Yamashita S. Low-dose radiation exposure and carcinogenesis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2012; 42: 563-568.
- 28) Iwasaki H. Arai F. Kubota Y. et al. Endothelial protein C receptor-expressing hematopoietic stem cells reside in the perisinusoidal niche in fetal liver. *Blood* 2010; 116: 544-553.
- 29) Florian MC. Dorr K. Niebel A. et al. Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 520-30.
- 30) de Haan G. Van Zant G. Dynamic changes in mouse hematopoietic stem cell numbers during aging. *Blood* 1999; 93: 3294-3301.

- 31) Wang Y. Schulte BA. LaRue AC. et al. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood* 2006; 107: 358-366.
  - 32) Wang Y. Liu L. Pazhanisamy SK et al. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 48: 348-356.
  - 33) Rube CE. Fricke A. Widmann TA. Accumulation of DNA Damage in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells during Human Aging. *Plos One* 2011; 6: e17487.
  - 34) Okazaki R. Ootsuyama A. Kakihara H. et al. Dynamics of delayed p53 mutations in mice given whole-body irradiation at 8 weeks. *Int. J. radiation Oncology Biol. Phys.* 2011; 247-254.
  - 35) Xu G. McMahan CA. Hildreth K. et al. Ionizing radiation-induced mutant frequencies increase transiently in male germ cells of older mice. *Mutation research* 2012; 744: 135-139.
  - 36) Hardwick RJ. Tretyakov MV. Dubrova YE. Age-related accumulation of mutations supports a replication-dependent mechanism of spontaneous mutation at tandem repeat DNA loci in mice. *Mol. Biol. Evol.* 2009; 2647-2654.
  - 37) Rossi DJ. Bryder D. Weissman IL. Hematopoietic stem cell aging: mechanism and consequence. *Exp. Gerontol.* 2007; 42: 385-390.
  - 38) Miller JP. Allman D. Linking age-related defects in B lymphopoiesis to the aging of hematopoietic stem cells. *Semin. Immunol.* 2005; 17: 321-329.
  - 39) Chen J. Astle CM. Harrison DE. Development and aging of primitive hematopoietic stem cells in BALB/cBy mice. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 928-935.
  - 40) Chen J. Astle CM. Harrison DE: Genetic regulation of primitive hematopoietic stem cell senescence. *Exp. Hematol.* 2000; 28: 442-450.
  - 41) Rossi DJ. Bryder D. Zahn JM. et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 9194- 9199.
  - 42) Beerman I. Bhattacharya D. Zandi S. et al. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107: 5465-5470.
  - 43) Chambers SM. Shaw CA. Gatz C. et al. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS. Biol.* 2007; e5.
  - 44) Morrison SJ. Wandycz AM. Akashi K. et al. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 1996; 2: 1011-1016.
  - 45) Sharpless NE. DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 703-713.
  - 46) Warren LA. Rossi DJ. Stem cells and aging in the hematopoietic system. *Mech. Ageing Dev.* 2009; 130: 46-53.
  - 47) Yin T. Li L. Fountain of Youth: aged blood-forming stem cells could be rejuvenated by young microenvironment. *Cell Res.* 2010; 20: 504-505.
- Wang J. Geiger H. Rudolph KL. Immunoaging induced by hematopoietic stem cell aging. *Curr. Opin. Immunol.* 2011; 23: 532-536.

- 48) Chen J. Hematopoietic stem cell development, aging and functional failure. *Int. J. Hematol.* 2011; 94: 3-10.
- 49) Sperka T. Wang J. Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2012; 13: 579-90
- 50) DePinho RA. The age of cancer. *Nature* 2000; 408: 248-254.
- 51) Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
- 52) Yang Y. Li T. Nielsen ME. Aging and cancer mortality: dynamics of change and sex differences. *Exp. Gerontol.* 2012; 47: 695-705
- 53) Hart C. Cohen R. Norwood M. et al. The emerging harm of antioxidants in carcinogenesis. *Future Oncol.* 2012; 8: 535-48.
- 54) Akushevich I. Veremeyeva G. Kravchenko J. et al. New stochastic carcinogenesis model with covariates: an approach involving intracellular barrier mechanisms. *Math. Biosci.* 2012; 236: 16-30.
- 55) Dorshkind K. Montecino-Rodriguez E. Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again?. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9: 57-62.
- 56) Sieber OM. Tomlinson SR. Tomlinson IP. Tissue, cell and stage specificity of (epi)mutations in cancers. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5: 649-655.
- 57) Fleenor CJ. Marusyk A. DeGregori J. Ionizing radiation and hematopoietic malignancies: altering the adaptive landscape. *Cell Cycle* 2010; 9: 3005-3011.
- 58) Degregori J. Evolved tumor suppression: why are we so good at not getting cancer?. *Cancer Res.* 2011; 71: 3739-3744.
- 59) Greaves M. Cancer stem cells: back to Darwin?. *Semin. Cancer Biol.* 2010; 20: 65-70.
- 60) Merlo LM. Pepper JW. Reid BJ. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 924-935.
- 61) Serrano M. Blasco MA. Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 715-722.
- 62) Blagosklonny MV. Oncogenic resistance to growth-limiting conditions. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 221-225.
- 63) Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell* 2005; 120: 437-447.
- 64) Chidgey A. Dudakov J. Seach N. Impact of niche aging on thymic regeneration and immune reconstitution. *Semin. Immunol.* 2007; 19: 331-340.
- 65) Linton PJ. Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 133-139.
- 66) Eliasson P. Rehn M. Hammar P. et al. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp. Hematol.* 2010; 38: 301-310.
- 67) Rossi DJ. Bryder D. Seita J. et al. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 2007; 447: 725-729.
- 68) Kollman C. Howe CW. Anasetti C. et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 2001; 98: 2043-2051.

- 69) Henry CJ, Marusyk A, Zaberezhnyy V, et al. Declining lymphoid progenitor fitness promotes aging-associated leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107: 21713-21718.
- 70) Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 2005; 106: 1479-1487.
- 71) Sudo K, Ema H, Morita Y, et al. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 1273-1280.
- 72) Cho RH, Sieburg HB, Muller-Sieburg CE. A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood* 2008; 111: 5553-5561.
- 73) Kuranda K, Vargaftig J, de la Rochere P, et al. Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Aging Cell* 2011; 10: 542-546.
- 74) Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 749-759.
- 75) Aspinall R, Andrew D. Thymic involution in aging. *J. Clin. Immunol.* 2000; 20: 250-256.
- 76) Signer RA, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Aging, B lymphopoiesis, and patterns of leukemogenesis. *Exp. Gerontol.* 2007; 42: 391-395.
- 77) Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Effects of aging on early B- and T-cell development. *Immunol. Rev.* 2005; 205: 7-17.
- 78) Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 2010; 464: 520-528.
- 79) Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature* 2007; 448: 767-774.
- 80) Pollyea DA, Kohrt HE, Medeiros BC. Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review. *Br. J. Haematol.* 2011; 152: 524- 542.
- 81) Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5: 172- 183.
- 82) Vickers M. Estimation of the number of mutations necessary to cause chronic myeloid leukaemia from epidemiological data. *Br. J. Haematol.* 1996; 94: 1-4.
- 83) Pui C-H, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 1535-1548.
- 84) Muller-Sieburg C, Sieburg HB. Stem cell aging: survival of the laziest?. *Cell Cycle* 2008; 7: 3798-3804.
- 85) Kim M, Moon HB, Spangrude GJ. Major age-related changes of mouse hematopoietic stem/progenitor cells. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 2003; 996: 195-208.
- 86) Ward JM. Background data and variations in tumor rates of control rats and mice. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1983; 26: 241-258.
- 87) Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005; 433: 760- 764.
- 88) Peto R, Roe FJC, Lee PN, et al. Cancer and ageing in mice and men. *Br. J. Cancer* 1975; 32: 411- 426.



- 89) Pui C-H. Relling MV. Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 1535-48.
- 90) Rowley JD. Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nature Rev. Cancer* 2001; 1: 245-250.
- 91) Mullighan CG. Miller CB. Radtke I. et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008; 453: 110-114.
- 92) Rolink A. Melchers F. B lymphopoiesis in the mouse. *Adv. Immunol.* 1993; 53: 123-156.
- 93) Gibbons DL. MacDonald D. McCarthy KP. et al. An  $E\mu$ -BCL-2 transgene facilitates leukaemogenesis by ionizing radiation. *Oncogene.* 1999; 18: 3870-3877.
- 94) Jang YC. Sinha M. Cerletti M. et al. Skeletal muscle stem cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2011; 76: 101-11.
- 95) Sohal RS. Ku HH. Agarwal S. et al. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 1994; 74: 121-133.
- 96) Mecocci P. Fano G. Fulle S. et al. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol. Med.* 1999; 26: 303-308.
- 97) Mutlu-Turkoglu U. Ilhan E. Oztezcan S. et al. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin. Biochem.* 2003; 36: 397-400.
- 98) Andreassi MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 2003; 543: 67-87.
- 99) Richardson RB. Age-dependent changes in oxygen tension, radiation dose and sensitivity within normal and diseased coronary arteries-Part C: oxygen effect and its implications on high-and low-LET dose. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008; 84: 858-865.
- 100) Van der Meeren A. Bertho JM. Vandamme M. et al. Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. *Mediators Inflamm.* 1997; 6: 185-193.
- 101) Hayashi T. Morishita Y. Kubo Y. et al. Long-term effects of radiation dose on inflammatory markers in atomic bomb survivors. *Am. J. Med.* 2005; 118: 83-86.
- 102) Hayashi T. Kusunoki Y. Morishita Y. et al. Acceleration of aging - associated increase in inflammatory markers and attenuation of the immune system among atomic- bomb survivors. *Cytokine* 2008; 43: 255-256.
- 103) Heissig B. Rafii S. Akiyama H. et al. Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 739-750.
- 104) Trosko JE. Chang CC. Upham BL. et al. Low-dose ionizing radiation: induction of differential intracellular signalling possibly affecting intercellular communication. *Radiat. Environ. Biophys.* 2005; 44: 3-9.
- 105) Shelke RR. Leeuwenburgh C. Lifelong caloric restriction increases expression of apoptosis repressor with a caspase recruitment domain (ARC) in the brain. *FASEB J.* 2003; 17: 494-496.

- 106) Naylor D. Amie J. Leeuwenburgh C. Sarcopenia: the role of apoptosis and modulation by calorie restriction. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2008; 36: 19-24.
- 107) Martin GM. Ogburn CE. Colgin LM. et al. Somatic mutations are frequent and increase with age in human kidney epithelial cells. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5: 215-221.
- 108) Vorobtsova I. Semenov A. Timofeyeva N. et al. An investigation of the age-dependency of chromosome abnormalities in human populations exposed to low-dose ionising radiation. *Mech. Ageing Dev.* 2001; 122: 1373-1382.
- 109) Bauchinger M. Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis. *Mutat. Res.* 1995; 339: 177-189.
- 110) Ramsey MJ. Moore DH 2nd. Briner JF. et al. The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutat. Res.* 1995; 338: 95-106.
- 111) Saul RL. Ames BN. Background levels of DNA damage in the population. *Basic Life Sci.* 1986; 38: 529-535.
- 112) Druzhyna NM. Wilson GL. LeDoux SP. Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mech. Ageing Dev.* 2008; 129: 383-390.
- 113) Goukassian D. Gad F. Yaar M. et al. Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J.* 2000; 14: 1325-1334.
- 114) Sedelnikova OA. Horikawa I. Zimonjic DB. et al. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 2004; 6: 168-170.
- 115) Takubo K. Izumiyama - Shimomura N. Honma N. et al. Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp. Gerontol.* 2002; 37: 523-531..
- 116) Cawthon RM. Smith KR. O' Brien E. Sivatchenko A. et al. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003; 361: 393-395.
- 117) Walkley CR. Fero ML. Chien WM. et al. Negative cell-cycle regulators cooperatively control self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 2005; 7: 172-178.
- 118) Janzen V. Forkert R. Fleming HE. et al. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 2006; 443: 421-426.
- 119) Wang Y. Schulte BA. LaRue AC. et al. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood* 2006; 107: 358-366.
- 120) Liu Y. Sanoff HK. Cho H. et al. Expression of p16INK4a in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Ageing Cell.* 2009; 8: 439-448.
- 121) Martin K. Kirkwood TB. Potten CS. Age changes in stem cells of murine small intestinal crypts. *Exp. Cell Res.* 1998; 241: 316-323.
- 122) Rossi DJ. Bryder D. Seita J. et al. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 2007; 447: 725-729.
- 123) Nijnik A. Woodbine L. Marchetti C. et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 2007; 447: 686-690.
- 124) Meng A. Wang Y. Van Zant G. et al. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Res.* 2003; 63: 5414-5419.

- 125) Sohal RS. Agarwal S. Candas M. et al. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech. Ageing Dev.* 1994; 76: 215-224.
- 126) Adelman R. Saul RL. Ames BN. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85: 2706-2708.
- 127) Wodarz D. Effect of stem cell turnover rates on protection against cancer and aging. *J. Theor. Biol.* 2007; 245: 449-58.
- 128) Hirayama R. Furusawa Y. Fukawa T. et al. Repair Kinetics of DNA-DBS Induced by X-rays or Carbon Ions under Oxidic and Hypoxic Conditions. *J. Radiation Res.* 2005; 46: 325-332.
- 129) Richardson RB. Stem cell niches and other factors that influence the sensitivity of bone marrow to radiation-induced bone cancer and leukaemia in children and adults. *International Journal of Radiation Biology* 2011; 87: 343-359.
- 130) Redpath JL. Gutierrez M. Kinetics of induction of reactive oxygen species during the post-irradiation expression of neoplastic transformation in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 2001; 77: 1081-1085.
- 131) Cadet J. Douki T. Ravant J-L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biol. Med.* 2010; 49: 9-21.

☒

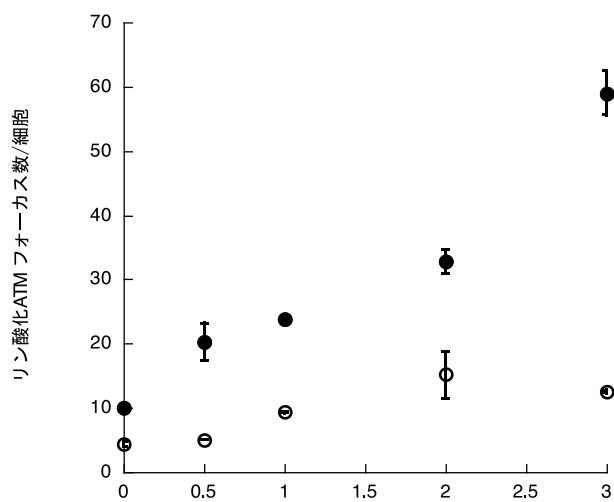


図 1. 放射線照射したマウスの骨髄細胞 および末梢血リンパ球における

リン酸化 ATM フォーカス数の線量反応関係

● : 末梢血リンパ球、○骨髄細胞