

図 2. 放射線照射したマウスの骨髄細胞における O_2 ラジカルの経時的変化
○ : 1Gy 照射群、● : 3Gy 照射群

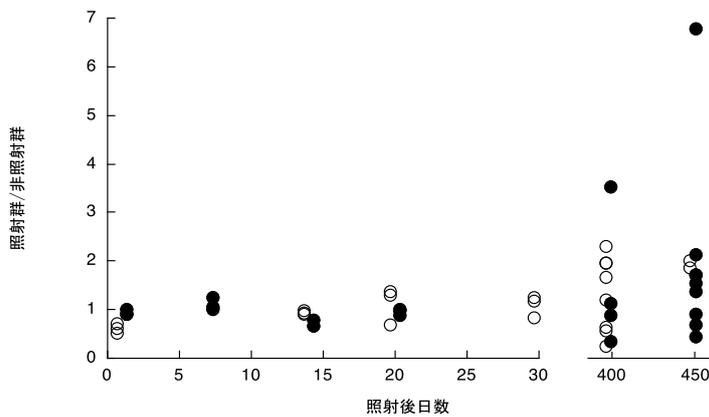


図 3. 放射線照射したマウスの骨髄細胞における OH ラジカルの経時的変化
○ : 1Gy 照射群、● : 3Gy 照射群

An emerging picture of radiation cancer risk at low doses and dose rates brought
by systematic review and experimental analysis on cell turnover

Michiaki Kai^{*1}, Mitsuaki Ojima^{*1}, Atsuhisa Hirouch^{*2},
Nobuhiko Ban^{*3}, Shizue Izumi^{*4}

Oita University of Nursing and Health Sciences

Institute for Environmental Sciences

Tokyo Healthcare University

Department of Computer Science and Intelligent Systems, Oita University

Keywords: radiation, cell turnover, aging, active oxygen, DNA damage, AML

Abstract

Radiation cancer risk is of much concern after the Fukushima accident. Current radiation cancer risk is estimated based on the LNT model. The latest epidemiological studies at low dose support the LNT model. The gap between biology and epidemiology is increasing with increasing cellular mechanistic understanding. This study conducts a systematic review and preliminary experiment in mice in order to analyze the role of cell turnover in carcinogenesis. In particular, we examined the change over time of DNA damages and active oxygen species in hematopoietic stem cells (HSC) of total-body irradiated C3H/He Njcl mice. The preliminary results suggested promotion of aging in HSC due to cell division, ROS accumulation in aged HSC and induction of chromosome aberration by ageing. We therefore propose a model for murine acute myeloid leukemogenesis. Radiation causes cell death of peripheral lymphocyte that leads induction of the cell division of HSC. This triggers acceleration of HSC aging with increase in active oxygen species. The incidence of radiation-induced acute myeloid leukemia (AML) in some strains of mice increases with doses up to 3 Gy. This may be related with the genetic changes such as a deletion of chromosome 2 and mutation of the *Sfp1* gene on the retained homologue. To predict the incidence rate in low doses and dose rates, we will conduct an in-vivo experiment investigating some indicators of HSC ageing following cell turnover, and construct a model for murine acute myeloid leukaemogenesis.

II-5 低線量被曝の血液動態への影響の解析
(東電検診データをマウス実験を通して)

低線量被曝の血液動態への影響の解析（東電健診データとマウス実験を通して）

岡崎 龍史（産業医科大学医学部放射線衛生学講座講師）

研究要旨

福島第一原子力発電所（原発）事故により、放射線被曝した東電原発労働者の健康診断の血液検査のデータを生活習慣も考慮して低線量放射線の血液影響を多変量解析する。同時にマウスに低線量照射し、メタボローム解析をおこない、低線量放射線のバイオマーカーの発見などを目的し、低線量影響の科学的データを提示できるか検討する。

キーワード：低線量被曝、血液動態、メタボローム解析、東電健診データ

I 研究目的

低線量放射線の影響のデータをとることは非常に困難であり、科学的証明することは難しい。また人体に対して被曝実験を行うことは倫理上できない。今回の目的は、福島原発事故にて低線放射線に被曝した多くの原発従事者の健康診断データを解析することにより、低線量放射線影響の明らかにすることにある。またマウスに低線量照射を行い、何を解析するべきか、ヒトへ応用できるかを検討する。マウス実験は約3年で結果が出るので、長期に渡るヒトへの影響を科学的に解析する上で、貴重な結果となりうると考えられる。血液の解析にはメタボローム解析を行う予定で、これは表現形として何が代謝しているのかを少ない試料で多くの情報が得られる。メタボローム解析は、表現系に近く直接原因を探しやすいので、低線量被曝の影響をみるには有用な方法になると思われる。

II 研究方法

東京電力社員の放射線業務従事者の原発事故以前及び事故後の健康診断の間診票、被曝線量および採血結果を提供してもらい多変量解析をする予定であるが、開示の許可を得られていない。今後も交渉し次年度には開示してもらうよう努力する。

C57BL/N マウスに低線量を1回照射する。照射線量は0Gy、10mGy、100mGy、1Gyとする。各群10匹ずつ。低線量照射装置並びに γ 線照射装置は当大学RIセンターに既存のものを使用する。照射後2日後（白血球数減少が見られる

時期)並びに100日後(赤血球減少がみられる時期)及び2年後に解析を行う。採血し血球計算を外注で行った。今回、照射2日後に骨髓細胞を採取しメタボローム解析を行った。特徴的な代謝がみられないか、バイオマーカーとなる代謝物がないか評価した。

(倫理面への配慮)

東電での健診データは連結不可能匿名化とし、産業医科大学で解析する際、対象者は特定できないので個人情報公表されない。また、健診データはいかなる形でも本研究の研究者以外の外部の者に触れられないように、研究者の道義的責任に基づき厳重に保管するものとする。いまだに研究の可否は東電にて審査をして頂いていて、時間がかかっている状況である。東電としても第三者組織に評価をしてもらえるので、データの開示には好意的である。また東電の既定のルールに則って行う。

さらに健康診断データ解析並びにマウス実験は産業医科大学倫理委員会にも審査を受け、許可を得ている。

Ⅲ 研究結果

東電の健康診断の解析は、未だ開示の許可が得られていないためできていない。

マウスに0Gy, 10mGy, 100mGy, 1Gy照射後、血球計算とメタボローム解析をおこなった。照射2日目に解剖した。血球計算では、1Gy照射群のみ白血球、赤血球及びヘモグロビンに有意な減少をみた。骨髓細胞をメタボローム解析したところ、ほとんど全ての代謝産物で10mGyのみ有意な増加をみた。また馬尿酸が線量依存的に増加していた。

Ⅳ 考察

これまで低線量の影響を科学的に証明することは難しかったが、今回のメタボローム解析により、低線量放射線の影響を科学的に出せる可能性を示唆した。また馬尿酸がバイオマーカーになる可能性を示唆した。

Ⅴ 結論

メタボローム解析は低線量放射線影響をみる上で有用な手法と成りうると示唆された。

VI次年度以降の計画

東電とは何度も交渉を重ね、健診データの開示をお願いしているところであり、次年度以降には、開示して頂けるものと思われる。開示して頂ければ、多変量解析を行い、生活習慣を除いた放射線のみ血液動態に対する影響を検討する。

マウス実験は、今年度に照射したマウスを経時的に血球計算及びメタボローム解析を行う予定である。照射後 100 日目のデータを取る予定であるが、今年は骨髓細胞を解析したため、データのばらつきがあった。おそらく採取に時間がかかったためと思われる。将来的にヒトでは血液サンプルによる測定が必要となると考えられるので、次年度は血液を血球計算の試料とし、脾臓を末梢血の代用としてメタボローム解析を行う。血液のみでは、両方を解析するのに十分な量がとれないことと、脾臓の方が短時間に採取でき、データのばらつきを抑制できる可能性があるからである。赤血球は糖代謝のみであるので、脾臓細胞において赤血球の割合をフローサイトで確認する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績
なし

The analysis of the effects of low-dose irradiation on dynamics of blood cells

Ryuji Okazaki

Department of Radiation Biology and Health, University of Occupational and Environmental Health, Japan

Keywords: low-dose irradiation, dynamics of blood cells, metabolome, Data of medical examination in Tokyo electric power company

Abstract

The purpose of this study is to evaluate the effects of low-dose irradiation, C57BL/N mice were irradiated a whole-body dose of 0Gy, 10mGy, 100mGy and 1Gy gamma rays at 8 weeks of age. These mice were sacrificed at 2 days after irradiation. The cytometry and the metabolome were analyzed. Leucocytes, erythrocytes and hemoglobin were significantly decreased in the 1Gy irradiated mice group compared to the other groups. Almost all metabolome in bone marrow cells were significantly increased in the 10mGy irradiated mice group compared to the other groups. Hippuric acid increased in dose-dependently. We suggest to show the scientific data of the effects of low-dose irradiation and the biomarker of low-dose irradiation.

Data of medical examination in Tokyo electric power company have not been opened. We will try to negotiate to see the data of their exposed dose and medical examination with them next year.

Ⅱ－6 放射線の非がん影響の解明

放射線の非がん影響の解明

放射線による循環器障害に関する分子機構の解明

近藤 隆（富山大学大学院医学薬学研究部・放射線基礎医学講座・教授）

柏倉 幾郎（弘前大学大学院保健学研究科・放射線生命科学・教授）

稲波 修（北海道大学大学院獣医学研究科・放射線生物学・教授）

研究要旨

放射線による発がん影響に関する研究は歴史も古く、研究情報の集積も膨大で、被ばくにおける発がんリスクも周知されている。一方、放射線による非がん影響の研究は著しく遅れており、その分子機構の解明については殆ど進んでいない。このため、本研究では非がん影響の分子機構を解明することを目的とした。主な研究対象は骨髄・造血系への影響と心・血管系への影響とし、弘前大学および富山大学が担当した。また、これらの影響のメカニズム解析の一環として、放射線による細胞内酸化ストレスの増加に着目し、放射線感受性とミトコンドリア機能との関連についての研究を北海道大学が担当した。その結果

- 1) ヒト臍帯血静脈内皮細胞に対する 2Gy 照射後の 24 時間までの経時的遺伝子発現解析で 4 つのクラスターが明らかとなった。この中の発現上昇した遺伝子群のネットワーク解析により、IRF7 および Mx1 が係るインターフェロン関連情報伝達の関与を示した。
- 2) ヒト造血幹細胞で 2 Gy 照射後、約 360 遺伝子に変動(非照射細胞比>2.0)が認められた。この中で、細胞増殖を G1 期で停止させ DNA 合成阻害作用を示すタンパク質である p21 をコードする遺伝子発現が最も高い増加率を示した。また、遺伝子のネットワーク解析から、c-Myc が有意に高い発現を示した。
- 3) 放射線照射後にミトコンドリア由来 ROS の生成の亢進の機構として、正常のミトコンドリア生合成過程によらず、膜電位の上昇とミトコンドリア量の増加によることを示した。

が明らかとなった。今後は、より低い線量および生体での応答の解明に繋がりたいと考えている。

キーワード: ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト造血幹細胞、細胞応答、細胞内酸化ストレス、ミトコンドリア、炎症

研究協力者及び研究参加者の氏名(所属・役職)

服部裕一(富山大学大学院医学薬学研究部・分子薬理学講座・教授)、田口久美子(富山大学大学院医学薬学研究部・分子薬理学講座・助教)、田渕圭章(富山大学生命科学先端研究センター・遺伝子実験施設・准教授)、趙 慶利(富山大学大学院医学薬学研究部・放射線基礎医学講座・助教)

I 研究目的

最近、放射線による非がん影響についても国民の関心が高まっており、この未解明な領域で、細胞および生体応答の機構を分子レベルで解明し、また、線量応答を明らかにすることは、極めて重要と思われる。放射線による発がん影響に関する研究は歴史も古く、発せられた研究情報の集積も膨大で、被ばくにおける発がんリスクも周知されている。一方、放射線による非がん影響の研究は著しく遅れており、特に分子機構の解明については殆ど進んでいない。このため、本研

究では非がん影響の分子機構を解明することを目的とした。主な研究対象は骨髄・造血系への影響と心・血管系への影響とし、弘前大学および富山大学が担当した。また、これらの影響のメカニズム解析の一環として、放射線による細胞内酸化ストレスの増加に着目し、放射線感受性とミトコンドリア機能との関連についての研究を北海道大学が担当した。

富山大学では、心・血管系への放射線影響について、その分子・細胞水準で機構解明を目的とした。主にヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用い、その放射線応答を明らかにするため、照射後の遺伝子発現変化を解析し、また、NO が関係する情報伝達機構について調べた。

II 研究方法

材料として、主にヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を使用した。

RNA の分離と網羅的遺伝子発現解析の方法は以下の通りである。

放射線照射後、経時的に QIAGEN 社の精製キットを用いて total RNA を分離した。DNA の混在を極力避けるために DNase で処理した。次に、Agilent 社の Bioanalyzer を用いて RIN (RNA integrity number) 値が 9.5 以上の RNA をアレイ実験に用いた。Affymetrix 社の GeneChip 網羅的遺伝子発現解析プロトコルに従って、RNA から cRNA を合成し、54,675 個のプローブセットが搭載された Human Genome U133-plus 2.0 アレイ(Affymetrix)を用いて、遺伝子の発現の有無とそのレベルを測定した。バイオインフォマティクスツールである Genespring®ソフトウェアを用いて、発現変動する遺伝子の抽出と階層解析を行った。さらに、Ingenuity® Knowledge Base を基にした解析を行い、遺伝子集団の生物学的な機能の解釈や遺伝子間の相互作用を表現した遺伝子ネットワークを構築した^{1,2)}。

細胞死については、主にアポトーシスを指標に、常法に従って調べ、細胞内情報伝達については、Western Blot 法にて蛋白質およびリン酸化を調べ、解析した^{3,4)}。

倫理面への配慮

当該研究遂行にあたり、本学での研究内容は培養細胞を用いた実験であり、倫理面の問題がないと判断した。

III 研究結果

HUVEC に放射線 10 Gy を照射し、時間依存的な細胞死についてアポトーシスを指標に調べたところ照射 48 時間後において、約 20%であった。また、細胞内活性酸素の増加も認めた。

HUVEC に 10 Gy の放射線を照射し、時間依存的な NO 産生と NO 合成酵素(eNOS および iNOS) 発現および活性化を検討したところ、照射後 72 時間まで時間依存的な NO 産生の増加と eNOS(Ser1177)リン酸化の増大が観察されたが、iNOS 発現は有意な増加を示さなかった。その中で 10 Gy 照射 6 時間後において NO₃ 量激増と eNOS (Thr495)の脱リン酸化が認められた。

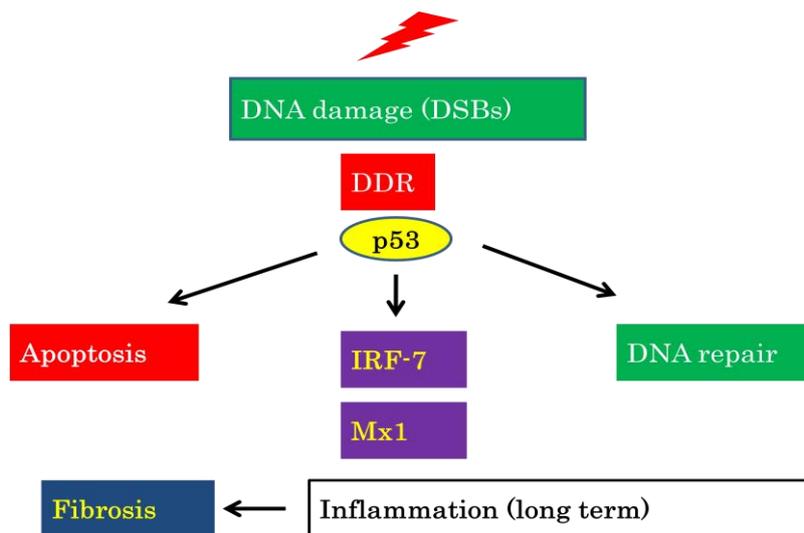
HUVEC に 2 Gy の放射線を照射し、時間依存的な遺伝子発現変化を網羅的に調べた。階層解析と機能解析により、4 つの Cluster に分類できた。このうち発現減少が認められる Cluster I の分子群は細胞周期に関連する放射線照射による G1 期、G2 期チェックポイントの活性化の結果、S 期および M 期に発現する分子について減少が認められた。発現上昇が認められた Cluster IV の分子群は細胞死、炎症に関連する分子群で IRF-7(interferon regulatory factor-7)や Mx1 (Interferon-induced GTP-binding protein Mx1) 等の増加が認められ、遺伝子ネットワーク解析の結果、転写因子 IRF-7 を中心とした Interferon signaling の活性化が示された。

IV 考察

HUVEC について放射線誘発アポトーシスを調べたが、その割合は少なく、細胞死に関するアポトーシスの寄与は少ないと思われる。

NO 産生の増加と eNOS(Ser1177)リン酸化増については、10 Gy 照射 6 時間で NO 産生を増大させ血管内皮機能を回復させようとする機構が働いている可能性を示すもので、今後さらに NOS 活性とその上流の細胞内シグナリング機構の変化を詳しく検討するとともに、1 Gy 以下の低線量も含めた線量依存性についても検討する必要がある。

発現上昇が認められた Cluster IV の分子群が細胞死、炎症に関連する分子群で IRF-7 や Mx1 等が関与することが示され、後者は病態として、線維化との関連が示されており、以下の分子—病態関係が示唆される。今後は、ミトコンドリア機能の変化およびヒト冠動脈内皮細胞との応答の比較および、動脈硬化のモデルマウスを用いて、生体での放射線による循環器・血管系の炎症に注目して解析し、病態を把握することが必要となる。特に疫学調査による循環器障害の線量応答が直線的であることに関しては、線量により異なる応答が報告されており、今後、線量応答の比較検討をすることが重要となる^{5,6)}。



V 結論

本研究では放射線の非がん影響の分子機構を解明することを目的とし、三大学共同研究を行い骨髄・造血系への影響と心・血管系への影響および、これらの影響のメカニズム解析の一環として、放射線による細胞内酸化ストレスの増加に着目し、放射線感受性とミトコンドリア機能との関連について研究を実施した。その結果、

- 1) ヒト臍帯血静脈内皮細胞に対する 2Gy 照射後の 24 時間までの経時的遺伝子発現解析で 4 つの Cluster が明らかとなった。この中の発現上昇した遺伝子群のネットワーク解析により、IRF7 および Mx1 が係るインターフェロン関連情報伝達の関与を示した。
- 2) ヒト造血幹細胞で 2 Gy 照射後、約 360 遺伝子に変動(非照射細胞比>2.0)が認められた。この中で、細胞増殖を G1 期で停止させ DNA 合成阻害作用を示すタンパク質である p21 をコードする遺伝子発現が最も高い増加率を示した。また、遺伝子のネットワーク解析から、c-Myc が有意に高い発現を

示した。

- 3) 放射線照射後にミトコンドリア由来 ROS の生成の亢進の機構として、正常のミトコンドリア生合成過程によらず、膜電位の上昇とミトコンドリア量の増加によることを示した。が明らかとなった。これらの研究成果を基盤として、より低線量（率）および生体での応答の解明に繋げ、放射線の非がん影響を明らかにする一助としたいと考えている。

VI 次年度以降の計画

本研究では非がん影響、骨髄・造血系への影響と心・血管系への影響の分子機構について低線量での応答を細胞に加えて生体レベルでも解明することを目的とする。即ち、線量(低(<0.2 Gy)、中(0.2~1.0 Gy)、高線量(1 Gy 以上) 応答を、細胞および実験動物水準で調べ、遺伝子応答と病態を明らかにし、その分子機構を解明する。

富山大学では、静脈・冠動脈の血管内皮細胞を対象に放射線による細胞損傷を検討するとともに、遺伝子応答を網羅的に解析する。動物実験では、動脈硬化のモデルマウスを用いて、放射線による循環器・血管系の炎症に注目して解析し、病態を把握するとともに、免疫組織学的にその解析を行う。

細胞内での活性酸素種（ROS）の生成は放射線影響を考える上で、普遍的な重要課題であるが、照射による直接生成よりも照射後の細胞内代謝修飾により生成する ROS が、その後の病態形成に関係することが知られている。ミトコンドリアは ROS 生成に係る主要小器官であり、放射線照射後の機能解析を行うことで、血管系および骨髄系細胞での細胞内酸化ストレス増加の機構解明に寄与するとともに、慢性炎症成因の解明の一助となる。次年度以降は今までに得られた知見をもとに、三大学の連携をより密なものとして、細胞および動物実験を進めるとともに、低線量率、長時間照射後の応答の研究へと展開する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Kondo T. Radiation-induced cell death and its mechanism, *Radiation Emergency Medicine* 2013; 2: 1-4.
- 2) Tabuchi Y Furusawa Y Kariya A Wada S Ohtsuka K Kondo T. Common gene expression patterns responsive to mild temperature hyperthermia in normal human fibroblastic cells, *Int J Hyperthermia* 2013; 29: 38-50.
- 3) Hosoki A Yonekura SI Zhao, QL Wei, ZL Takasaki I Tabuchi Y Wang LL Hasuike S Nomura T Tachibana A Hashiguchi K Yonei S Kondo T Zhang-Akiyama QM. Mitochondria-targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells, *J Radiat Res* 2012; 53: 58-71.
- 4) Yu DY Zhao QL Furuta M Todoroki S Izumi K Yamakage K Matsumoto K Nomura T Kondo T. Molecular mechanisms of apoptosis induction by 2-dodecylcyclobutane, a radiolytic product of palmitic acid, in human lymphoma U937 cells, *Apoptosis* 2012; 17: 636-645.
- 5) Furusawa Y Wei ZL Sakurai H Tabuchi Y Li P Zhao QL Nomura T Saiki I Kondo T. TGF-beta-activated kinase 1 promotes cell cycle arrest and cell survival of X-ray-irradiated HeLa cells dependent on p21 induction but independent of NF-kB, p38 MAPK and ERK phosphorylations, *Radiat Res* 2012; 177: 766-774.
- 6) Morii A Ogawa R Watanabe A Kakutani S Zhao QL Kume K Kondo T Fuse H. Regulation of gene

expression in prostate cancer cells with an artificially constructed promoter responsive to radiation, *Gene Ther* 2012; 19:219-227.

- 7) Furusawa Y Fujiwara Y Campbell P Zhao QL Ogawa R Hassan MA Tabuchi Y Takasaki I Takahashi A Kondo T. DNA double-strand breaks induced by cavitational mechanical effects of ultrasound in cancer cell lines, *PLoS ONE* 2012; 7: e29012.
- 8) Nomura T Li XH Ogata H Sakai K Kondo T Takano Y Magae J. Suppressive Effects of continuous low dose-rate gamma-irradiation on diabetic nephropathy in type II diabetes mellitus model mice, *Radiat Res* 2011; 176: 356-365.
- 9) Hori T Kondo T Kanamori M Tabuchi Y Ogawa R Zhao QL Ahmed K Yasuda T Seki S Suzuki K Kimura T. Ionizing radiation enhances Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulations of death receptor 4 (DR4) and death receptor 5 (DR5) in human osteosarcoma cells, *J Orthopadeic Res* 2010; 28: 739-745.
- 10) Yu DY Zhao QL Wei ZL Ahmed K Nomura T Kashiwakura I Kagiya TV Kondo, T. Enhancement of radiation-induced apoptosis of human lymphoma U937 cells by sanazole, *Apoptosis*, 2009; 14: 655-664.
- 11) Furusawa Y Tabuchi Y Takasaki I Wada S Ohtsuka K Kondo T. Gene networks involved in apoptosis induced by hyperthermia in human lymphoma U937 cells, *Cell Biol Int* 2009; 33: 1253-1262.
- 12) Ogawa R Lee SI Kagiya G Hirano H Fukuda S Kondo T Kodaki T. Construction of X-ray inducible promoters through cis-acting element elongation and error-prone PCR, *J Gene Med* 2008; 10: 316-324.

引用文献

- 1) Tabuchi Y Furusawa Y Kariya A *et al.* Common gene expression patterns responsive to mild temperature hyperthermia in normal human fibroblastic cells, *Int J Hyperthermia* 2013; 29: 38-50.
- 2) Tabuchi Y Wada S Furusawa Y *et al.* Gene networks related to the cell death elicited by hyperthermia in human oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells, *Int J Mol Med* 2012; 29: 380-386.
- 3) Zhang XH Yokoo H Nishioka H *et al.* Beneficial effect of the oligomerized polyphenol oligonol on high glucose-induced changes in eNOS phosphorylation and dephosphorylation in endothelial cells, *Br J Pharmacol* 2010;159:928-938.
- 4) Taguchi K Matsumoto T Kamata K *et al.* G protein-coupled receptor kinase 2, with β -arrestin 2, impairs insulin-induced Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling in ob/ob mouse aorta, *Diabetes* 2012;61:1978-1985.
- 5) Shimizu Y Kodama K Nishi N *et al.* Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003, *Brit Med J* 2010; 340:b5349.
- 6) Stewart FA. Mechanisms and dose-response relationships for radiation-induced cardiovascular disease, *Ann ICRP* 2012; 41:72-79.

Elucidation of the mechanisms of radiation-induced non-cancerous effects -Molecular mechanisms of radiation-induced cardiovascular diseases-

Takashi Kondo^{*1}, Qing-Li Zhao^{*1}, Yuichi Hattori^{*2}, Kumiko Taguchi^{*2}, Yoshiaki Tabuchi^{*3}

*^{*1}Department of Radiological Sciences, ^{*2}Department of Molecular and Medical Pharmacology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama*

*^{*3}Division of Molecular Genetic Research, Life Science Research Center, University of Toyama*

Keywords: Human umbilical endothelial cells; Gene expression; Bio-informatics; Inflammation; Signal transduction

Abstract

Cardiovascular disease has been considered as a major health-risk factor after radiation exposure such as A-bomb survivors. Recently, the association of radiation dose with cardiovascular disease mortality in the life span study cohort of 86,000 A-bomb survivors with estimated doses was reported. Although chronically produced reactive oxygen species and inflammation are thought to be a pathogenic mediator of atherosclerosis, the mechanism has been unclear. Here, for better understanding the molecular mechanisms underlying the inflammatory reaction frequently encountered in vascular system post exposure to ionizing radiation, we carried out global scale microarray and computational gene expression analyses in human umbilical endothelial cells (HUVEC). Global scale microarray gene expression analysis of irradiated HUVEC (2 Gy) identified 1,128 genes that were up- or down-regulated by a factor 1.8 or greater at 6, 12, or 24 hr after irradiation. Hierarchical cluster analysis of the differentially expressed genes identified four clusters. The analysis of bio-informatics using ingenuity pathway analysis tools revealed that the down-regulated genes in cluster I were associated with cell cycle regulation whereas the up-regulated genes in cluster IV were associated with inflammatory responses. The analysis also identified a gene network containing interferon response factor 7 (IRF7) and its transcriptional target interferon-induced transcripts (IFITs) and Mx1, which have been known to be associated with inflammation in endothelial cells. The up-regulated genes and the gene network identified here may explain the inflammatory response induced by X-irradiation. These findings uncover some of the molecular basis of the mechanisms of the inflammatory disorder in response to X-irradiation in human umbilical vein endothelial cells.

放射線の非がん影響の解明 放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割

稲波 修

(北海道大学大学院獣医学研究科・教授)

研究要旨

放射線による細胞死は古くからゲノムDNA障害が細胞死には重要であると考えられてきたが、近年、ミトコンドリア機能修飾による活性酸素（ROS）生成が関与する酸化ストレスが重要であるとの報告がある¹⁾。しかし、その詳細については全く知られていない。本研究の初年度では放射線によるミトコンドリア機能修飾とミトコンドリアDNA修復機構の解明を多角的に行い、非がん損傷誘引の共通メカニズムの一つであるアポトーシス、炎症反応やバイスタンダー効果とミトコンドリア機能修飾との関連を明らかにすることを目的に培養細胞を用いて研究を行った。その結果、放射線照射後にミトコンドリア由来ROSの生成が多く細胞で共通した事象であること、それは膜電位の上昇とミトコンドリア量を伴うが、正常のミトコンドリア生合成過程によって起きている事象では無いことが明らかとなった。また、ミトコンドリアのDNAの塩基修復機構には細胞の核のAPE1がミトコンドリアに存在しないこととミトコンドリアには独自のAPエンドヌクレアーゼ活性を持つことが示されたことから、APE1以外のAPエンドヌクレアーゼが関与することが明らかとなった。

キーワード：ミトコンドリア、活性酸素（ROS）、アポトーシス、ミトコンドリアDNA修復機構
研究協力者：山盛 徹（北海道大学大学院獣医学研究科・准教授）

安井博宣（北海道大学大学院獣医学研究科・助教）

I 研究目的

本研究は放射線による心臓血管障害や骨髄障害などの非がん影響に共通するメカニズムとしてゲノムDNA損傷とともに重要な放射線によるミトコンドリア機能修飾を解明し、それに伴うROS生成機構ならびにそれによる酸化ストレスとアポトーシス誘導炎症応答やバイスタンダー効果との関連を明らかにする。そのためにミトコンドリア電子伝達システムに影響を与え、結果としてO₂などのROSの生成上昇の関与が指摘されているミトコンドリアDNA損傷修復機能について評価する。次にROS生成の詳細なメカニズムをミトコンドリア量、細胞周期との関連性、電子伝達系の機能異常の状態などを生化学的、分子生物学的手法により解析する。さらには照射後に上昇する活性酸素が酸化ストレスとなりアポトーシス、炎症応答やバイスタンダー効果に関与するかを明確にする。本研究でミトコンドリア機能障害を明らかにし、ROS生成機序、アポトーシスとの関連等を明らかにすることは新たな放射線誘発非がん損傷の機構を解明することを目的とする。

II 研究方法

研究の対象としてはNIH3T3、A549細胞あるいはSCCVII細胞などの培養細胞系を用い、初年度平成24年度は次の放射線によるミトコンドリア修飾(1)とミトコンドリアDNA修復(2)の研究を開始する。次年度の平成25年度は低線量でのこれらに対する影響についてそれぞれ引き続き評価する。

1) ミトコンドリア量、形態ならびに機能について。

初年度は上記の細胞の大量培養を行い、X線を照射後にミトコンドリア機能を評価する。ミトコンドリア量はミトコンドリア集積性蛍光色素によるフローサイトメトリーと COX2、ND2、CytC、CoxII や CoxVII などの組織特異的遺伝子の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法で定量した。さらにミトコンドリア生合成に関与する PGC1a、TFAM、TFB2M、NRF1 ならびに NRF2 についても同様に mRNA の発現を評価した。

2) ミトコンドリア DNA 修復機構の解明

近年、核 DNA の修復のみならず、ミトコンドリア DNA の修復も細胞死を考える上で重要であると考えられて来ている。ミトコンドリア DNA の修復では遺伝子の塩基除去修復 (BER) が重要な役割を演じていると言われているが、その過程に必須である AP endonuclease (APE) のミトコンドリアにおける実体は明らかになっていない。そこで初年度の平成 24 年度はマウスの肝臓からミトコンドリアを生化学的に単離し、精製法を精査し、APE のミトコンドリアの存在の有無、また、ミトコンドリアにおける塩基除去修復能が存在するのか、存在するとすれば核の遺伝子の修復能と何が違うのかを明らかにした。

III 研究結果

図 1 に示すように既に私達の研究室では多くのがん細胞で放射線照射した後、ミトコンドリア DNA の増加、細胞あたりの ROS の 1.5 倍~2 倍の上昇、ミトコンドリアの膜善意の上昇、酸素呼吸の増大を明らかにしてきた^{2, 3)}。本研究ではこれらの現象がミトコンドリアの生合成の上昇によって起こっているかどうかを明らかにする目的で研究を行った。核 DNA は $\beta 2$ マクログロブリン遺伝子を、ミトコンドリア DNA は ND6 遺伝子 (NIH3T3 細胞) あるいは CoxII (A549 細胞) に対してサイバークリーンを用いた定量的 PCR を行い、ミトコンドリア DNA 量について検討した。図 2 の左に示すように NIH3T3 細胞では 10Gy 照射するとミトコンドリア量は 8 時間から有意に増加するとともに、図 2 の右に示すように照射後 24 時間でミトコンドリア DNA 量は有意に増加した。この現象は図 3 に示されたように A549 細胞や SCCVII 細胞でも同様の反応を示した。

以上のように放射線照射後のミトコンドリア量の上昇はミトコンドリアの生合成が関わっていると考えられたので、通常ミトコンドリア生合成系が動いているか否かを評価した。通常はミトコンドリア生合成で発現が増加する事が知られている事から、転写共役因子や転写因子について放射線照射後の影響を定量的 PCR により評価した。図 4 には NIH3T3 細胞で 10Gy 照射後のミトコンドリア生合成に関連する転写共役因子と転写因子の発現量を調べた結果である。転写共役因子である PGC1a は 24 時間で有意に発現増加を起し、72 時間では最初の 4 倍にまで発現量が増加した。しかしながら、TFAM、TFB2M、NRF1 ならびに NRF2 などの転写因子では照射後にその mRNA の発現は全く見られなかった。さらに、ミトコンドリアを構成するタンパク質である mRNA について、チトクローム C (Cyt c) とチトクロームオキシゲナーゼ IV (COXIV) についてその発現を PCR により評価した。図 5 に示すように COXIV では 24 時間から増加をしたのに対して、Cyt c では全く増加せず、むしろ有意に低下することが明らかとなった。

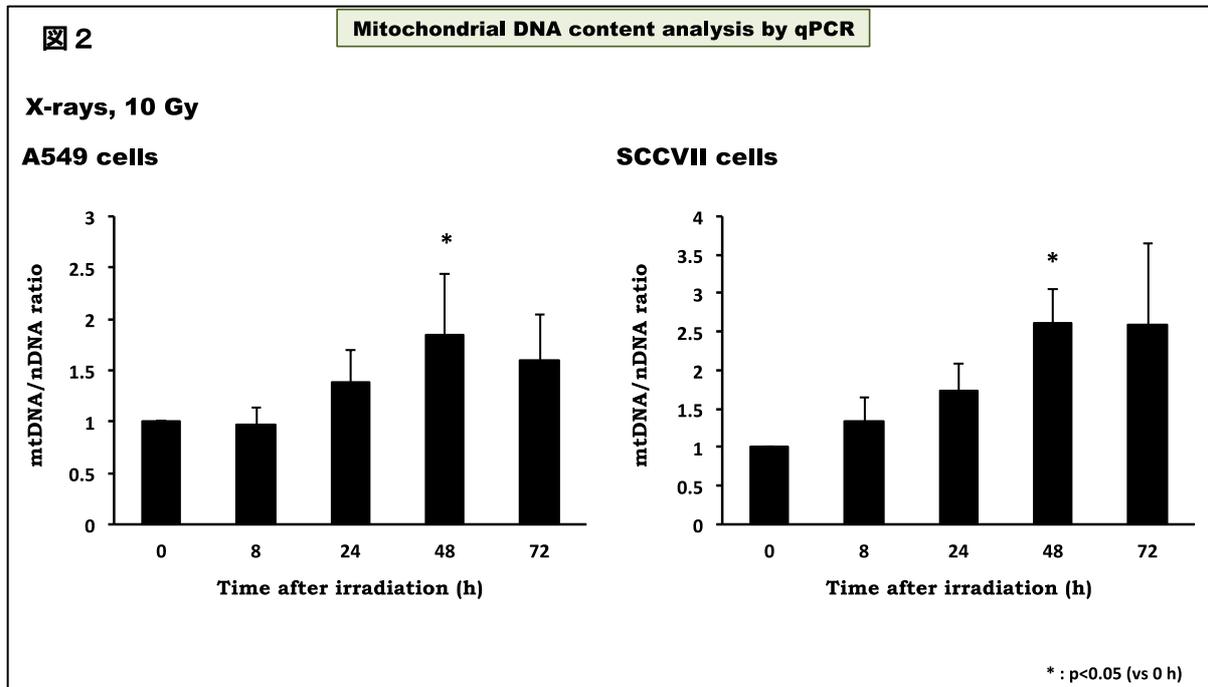
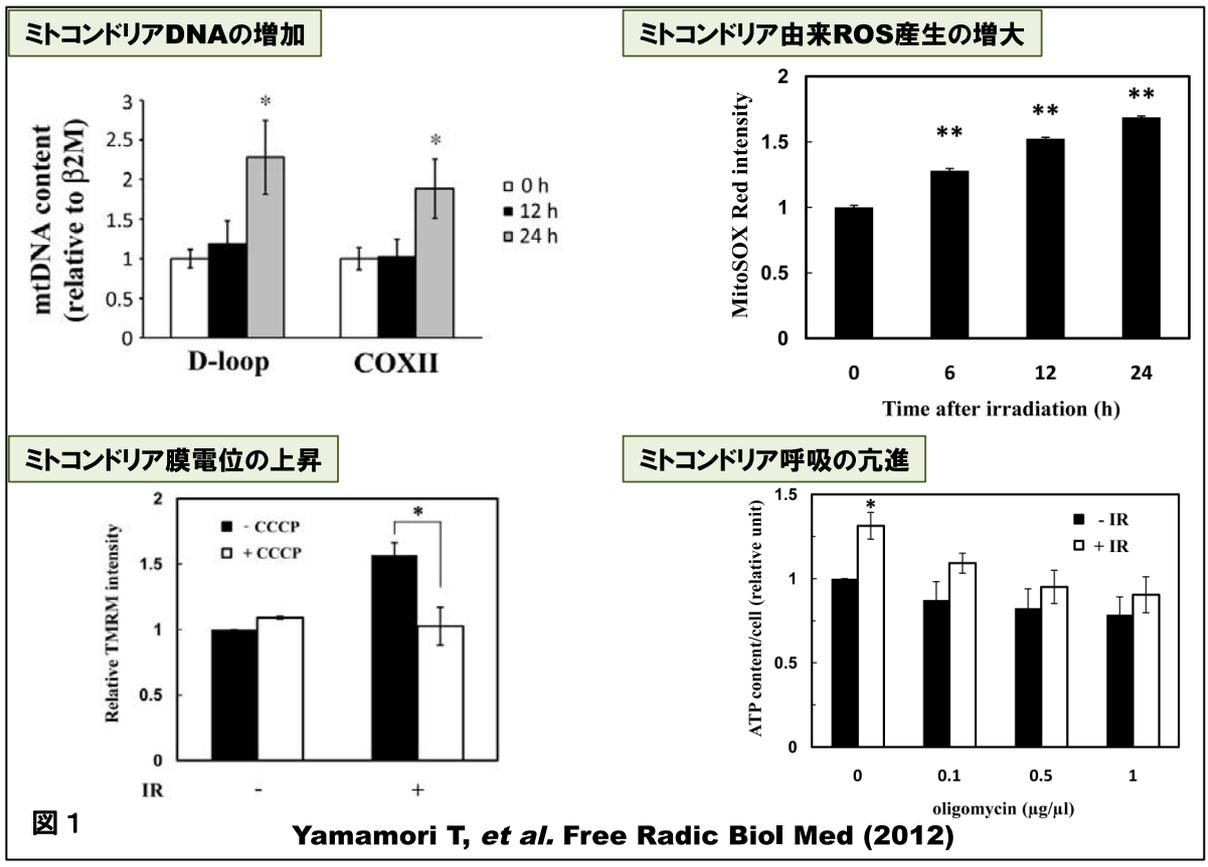
ミトコンドリア DNA 増加を導く因子を検索する為に、DNA 損傷から活性化するシグナル分子が関与している可能性を考えた。DNA の損傷シグナルにおいて ataxia telangiectasia 原因遺伝子産物 ATM がシグナルを細胞内に伝える重要なキナーゼ活性を持ったタンパク質であることが知られている。従ってそのキナーゼ活性を阻害するインヒビターである Ku60019 を用いて検討した。

その結果、図6の左に示すように 1000 nM という高濃度でも放射線によるミトコンドリア DNA 増加の阻害効果は見られず、ATM がミトコンドリア DNA の増加には関与していないことが明らかになった。また、図6の右に示すように放射線によりミトコンドリア由来の ROS が増加するが、ROS を消去する N アセチルシステイン(NAC)を存在させてもミトコンドリアの増加反応には影響を及ぼさなかった。

次にミトコンドリア DNA の塩基除去修復系の研究を開始した。今までの研究はミトコンドリアの生成が十分でなくミトコンドリア結合性の ER 膜 (Mitochondria-associated ER membrane(MAM)) が混在し、核由来のタンパク質を巻き込んで正確な評価がされてきていないという背景があった。本研究ではまず、この問題を解決するためにラットの肝臓から粗ミトコンドリア分画を単離した後、パーコール上に重層、遠心し、ミトコンドリアと MAM との比重差による分離を試みた。図7の上に示すようにこうして高純度に精製したミトコンドリア分画(pure mito)には、粗抽出ミトコンドリア分画 (crude mito) に見られるアクチンや核でエンドヌクレアーゼとして作用することが知られている APE1 は存在しなかった。ミトコンドリアには無く、APE1 は MAM 側に存在することが明らかとなった。次に活性について検討した。方法は図8に示すように蛍光物質である FAM でラベルした 7 mer の場所にウラシルを挿入した 30 mer のオリゴヌクレオチドを作成し、それにウラシル DNA グリコシラーゼを作用させ AP 部位を作成した。これに高純度で精製したミトコンドリア生成物を反応させ、電気泳動で分離し 7-3' dRP、7-3' OH ならびに 7-3' P の末端構造をもつ断片を分離し、検討した。その結果を図9に示す。Mg²⁺の存在下で精製した APE1 では 7-3' OH、Nth では 7-3' dRP、EndoVIII では 7-3' P が理論通り、観察された。精製されたミトコンドリア抽出物で反応させると、7-3' OH がメインのいくつかのバンドの断片が観察された。また、Mg²⁺の非存在下で反応させると 7-3' dRP がメインのバンドとなり、これは核でいうところの Nth1Z や OGG1 の様な AP lyase 活性を持つ酵素が存在することが明らかとなった (図10)。

(倫理面への配慮)

実験動物の使用に関して倫理的な問題があるが、本研究では動物実験に際して「動物の愛護及び管理に関する法律」(平成18年6月1日施行)、並びに、「動物実験等の実施に関する基本方針」(平成18年文部科学省告示第71号)に基づき、適正に実施している。また、実験動物倫理を審議する動物委員会が分担者の所属する大学に設置されており、本研究では本委員会を経て承認後行なわれている。細胞レベルの研究では倫理的に配慮すべき問題はないと判断できる。



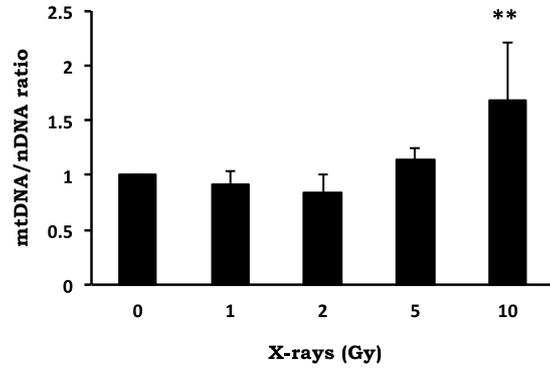
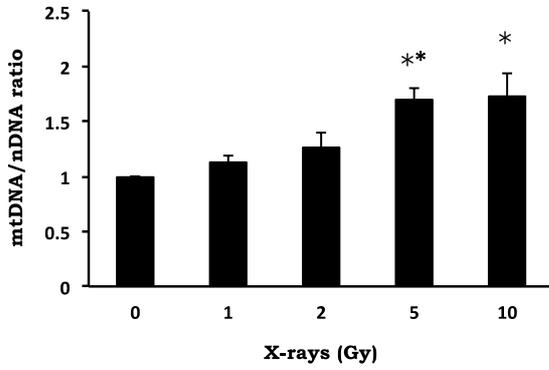
3

Mitochondrial DNA content analysis by qPCR

72 h after irradiation

NIH3T3 cells

A549 cells



*,P<0.05,**:P<0.01 (vs 0 Gy)

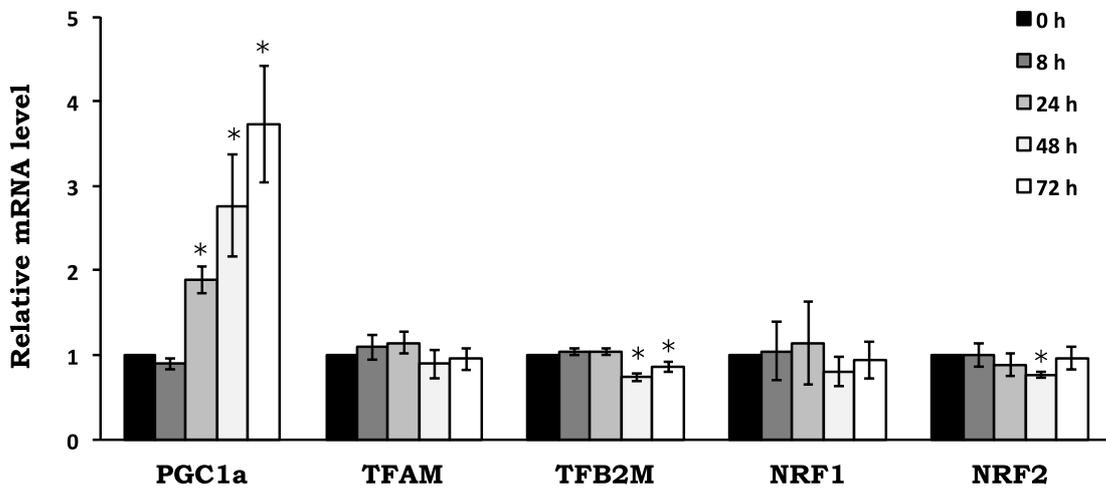
** :P<0.01 (vs 0 Gy)

4

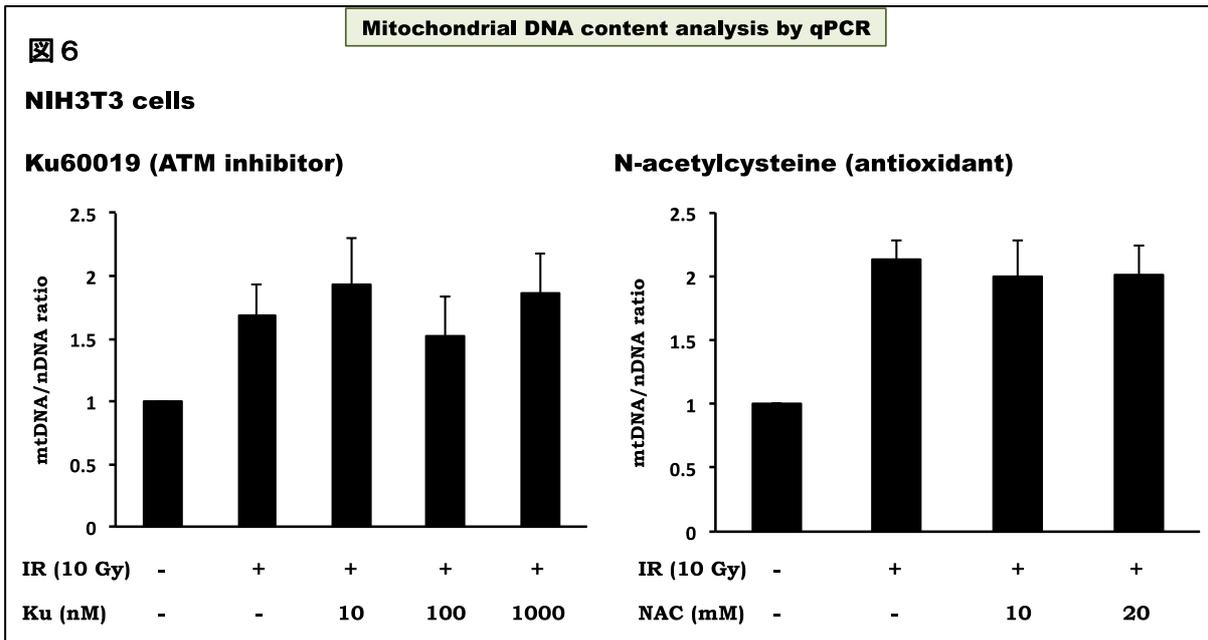
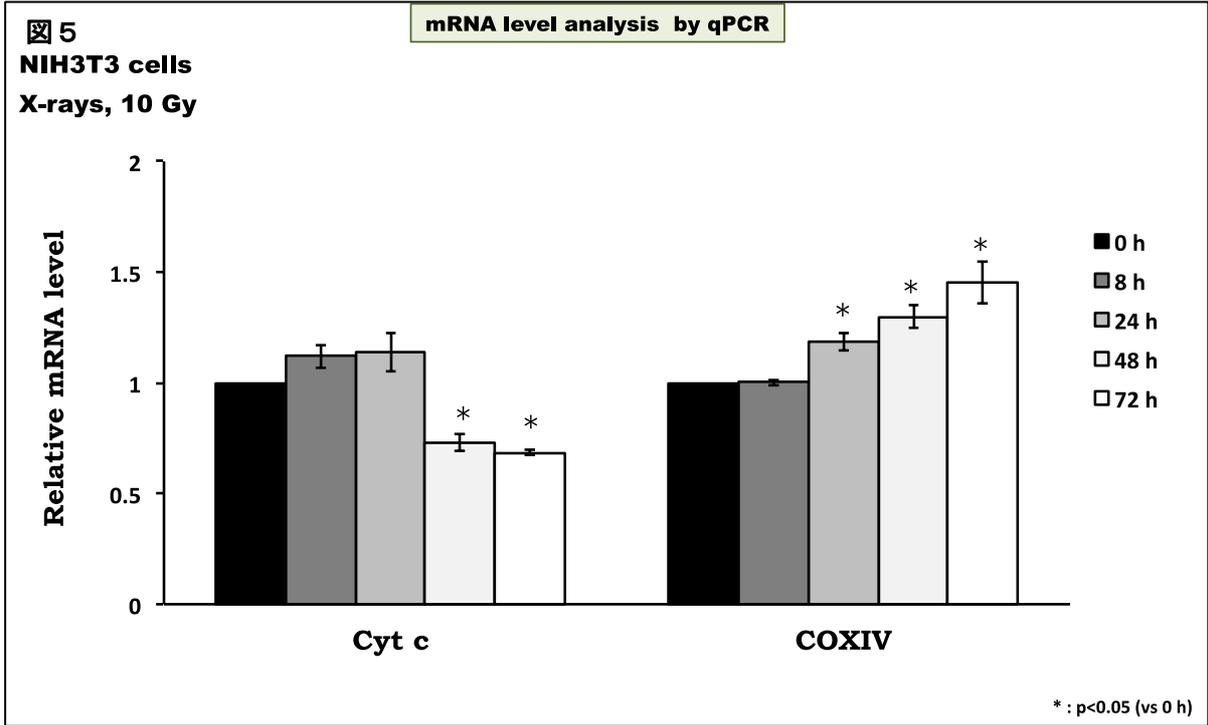
mRNA level analysis by qPCR

NIH3T3 cells

X-rays, 10 Gy

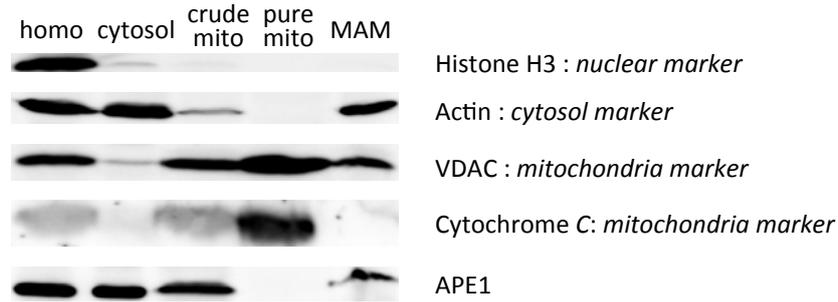


* : p<0.05 (vs 0 h)

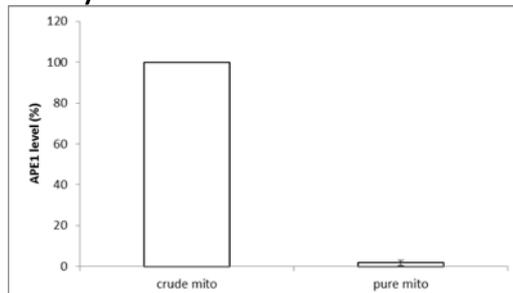


Western blotting

図 7



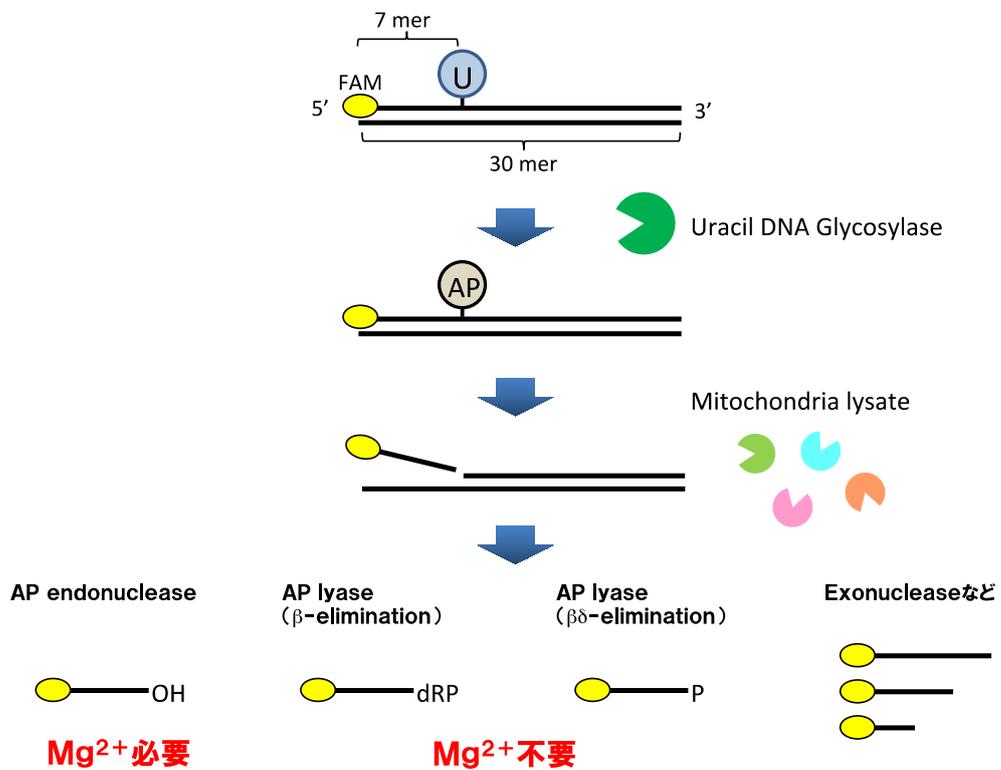
Band Intensity



少なくともmitochondria
では核と同じAPE1は存在
しない

AP site Incision Assay

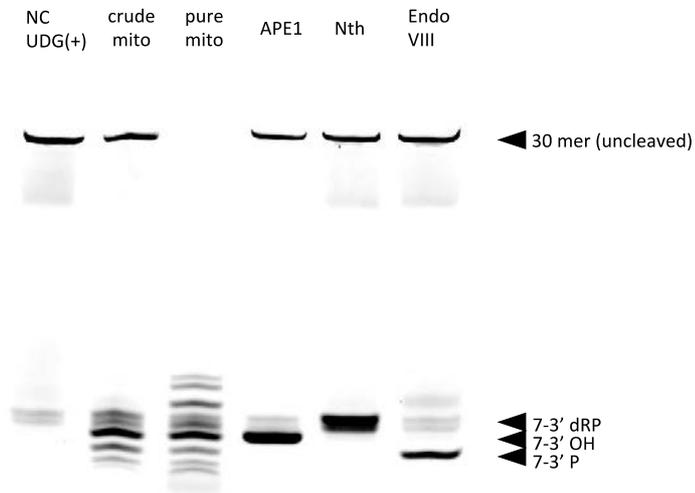
図 8



AP endonuclease活性

図9

Mg²⁺含有buffer

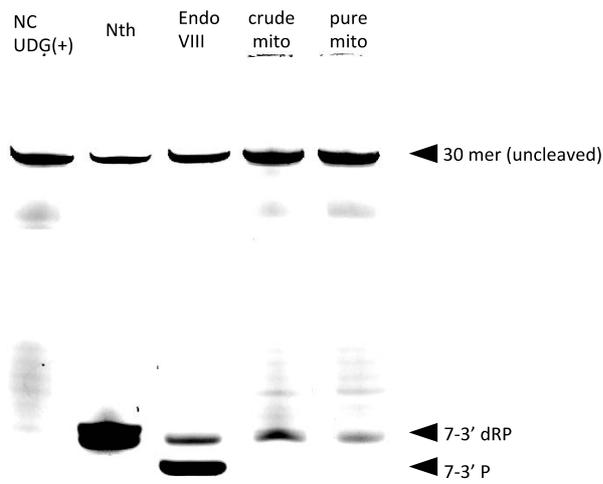


mitochondriaでは核と同じAPE1ではないが、APE1様の活性を持つ、エンドヌクレアーゼは存在する可能性が示唆される。

pure mitochondria において AP lyase活性が観察された。

図10

Mg²⁺非含有buffer



mitochondria において 核で言うところのOGG1やNth1のようなAP lyase活性を持つ

IV 考察

まず、放射線照射により多くの細胞でミトコンドリアの膜量が増加する現象が観察され、正常に近い NIH3T3 細胞でも同様の現象が観察された。また、この増加現象は通常のみトコンドリア生合成とは違い、生合成に関与する転写補助因子である PGC1a は有意に発現増加を示したものの、TFAM, TFB2M, NRF1 ならびに NRF2 などの転写因子は全く活性化しなかったことや、ミトコンドリア構成タンパク質の中に増加しないタンパク質があるなどのことから異常な放射線に対するミトコンドリアの応答であることが示唆された。今後、こういったシグナルがこの様な現象を引き起こしているのか、また、今回は 10 Gy という高線量での実験であったが、低線量でもこの様な現象が起きるのか検討することが必要である。また、ミトコンドリアにも DNA 塩基損傷に応答する塩基除去修復機構の存在が示唆された。しかしながら、核と同じシステムが作用しているかどうかについては未だ不明である。少なくとも今回の研究でミトコンドリアでの AP エンドヌクレアーゼとして核と同じ APE1 が作用している可能性は小さいと考えられる。今後はミトコンドリアでの修復酵素の同定を進めることと、放射線照射によって生じる障害についてこの様な修復系が作用しているかどうか明らかにすることが重要であると考えられる。

V 結論

結論は以下の 3 点である

- 1) 放射線照射された細胞のミトコンドリアはその量の増加を引き起こすとともに、細胞内 ROS を増加させる。
- 2) このミトコンドリアの応答は正常時見られる生合成が促進したためで無く、放射線に対する異常な応答によるものである。
- 3) ミトコンドリアの DNA 塩基除去修復作用には核で中心的に働いている AP エンドヌクレアーゼである APE1 は関与せず、別の同じ作用を持つ酵素の存在が示唆された。

VI 次年度以降の計画

研究の対象としては NIH3T3、A549 細胞、HeLa 細胞あるいは SCCVII 細胞などの培養細胞系を用い、初年度平成 24 年度は次の放射線によるミトコンドリア修飾とミトコンドリア DNA 修復の研究を推進し、普遍的に照射後の細胞ではミトコンドリア由来の活性酸素 (ROS) 増加を明らかにすると共にミトコンドリアの量の増加を起し、これは DNA 損傷に伴う ATM やミトコンドリアタンパク質等の生合成を伴わない事象であることを明らかにした。また、ミトコンドリアの塩基損傷修復機構は核とは違う機構が存在することを明らかにした。本年度は下記に詳細を示したように、1) 引き続きそのメカニズムを明らかにすると同時に、2) 実際の生体で同様のことが起きているのか、マウスを中心とした実験動物を用いて検討し、さらには低線量でもこれらのことが起きうるのかを明らかにする目的で研究を推進する。また、3) 他班で行われている炎症サイトカインの産生や前炎症応答に対して、本班の研究目的であるミトコンドリア機能の障害が関与しているかについても明らかにする。

1) ミトコンドリア機能ならびにミトコンドリア DNA 修復機構の解析

初年度は正常細胞の培養細胞で機能集積性蛍光色素によるフローサイトメトリーによって照射後 12 時間以降の細胞でミトコンドリア膜量の増大と ROS の増大を明らかにした。阻害剤を

用いた研究でタンパク質の生合成には関与しないことが明らかとなった。今後、形態について共焦点レーザー顕微鏡と透過型電顕による観察を行い、fission と fusion の形態を分類し、ミトコンドリア数を定量する。また、DNA 切断からのシグナルである ATM シグナルの関与や細胞周期との関連性が示唆されるので、細胞周期関連キナーゼによる fission と fusion の制御システム調節に放射線が影響を与えているかどうか等を検討する。ミトコンドリア DNA 修復に関しては、塩基除去修復 (BER) に核では重要な AP endonuclease (APE) の関与していないことが示唆された。そこで、次年度はミトコンドリア BER に関与する修復システムに関与するタンパク質を質量分析計を用いて明らかにすることを旨とする。また、放射線によるこれらの修復システムについて誘導されるか否かについても検討する。こうした現象が低線量で起きるか否かを明らかにする為に高線量 (1Gy 以上)、中線量 (0.2~1Gy)、低線量 (<0.2Gy) でのミトコンドリア機能変化の違いが生じるかも検討する。

2) 放射線によって誘導されるミトコンドリア由来 ROS 生成の in vivo での評価

動物実験を通じて、上記の細胞レベルでの放射線照射後数時間から 1 日後に起きるミトコンドリア由来の ROS 上昇が起きているか明らかにすると共に、その役割を他班で注目している炎症性サイトカインの上昇ならびに前炎症応答に関与しているか否かについて明らかにする目的で研究を行う。妊娠マウスを照射し、経時的にと殺し、マウス胎児から神経細胞あるいは線維芽細胞を採取し、ミトコンドリア量ならび ROS 量を評価する。また、成熟マウスは照射後、経時的にと殺し血液を採取し、比重遠心法でリンパ球を採材する。これらの細胞について、膜電位や ROS 等の機能依存性蛍光色素による解析、ATP 量、酸素消費率等の動態の測定を行い、in vivo でも細胞レベルで観察された事象と同様に起きているかどうかを明らかにする。また、組織のミトコンドリアの形態に着目し電子顕微鏡観察を行い、in vivo でミトコンドリア形態変化が起きているかについても検討する。現在、ミトコンドリアの照射後の ROS 上昇は細胞レベルでは 10 Gy 等の高線量照射で起きることが確かめられているが、in vivo で低線量照射でも同じ現象が起きるかどうかが明らかにする為に高線量 (1Gy 以上)、中線量 (0.2~1Gy)、低線量 (<0.2Gy) での照射し、同様の実験を行う。

3) 炎症性サイトカイン生成とミトコンドリア由来 ROS との関連性 (多分班の共通メカニズム解明)

初年度の他班の研究成果で心臓血管系障害や造血幹細胞系の線維化などに結びつく IRF7 を中心としたインターフェロンシグナルの活性化やアポトーシスの関与が示唆されている^{4, 5)}。照射後の時間経過から考えて直接的な障害というよりも照射後の炎症性サイトカインの生成の関与が考えられ、一般的に ROS は炎症性サイトカイン生成の誘導物質であることが知られていることから、照射後にミトコンドリアから生じる ROS の関与も考えられる。そこで、マウスを照射した後、組織と同様に経時的に血液を採取し、血清からの炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、腫瘍壊死因子 (TNF) 等) を ELISA 等の手法で測定し、増加するか否かを評価する。また、照射後に抗酸化物質を投与し、照射後生じる ROS を消去したときの炎症性サイトカインの動態を明らかにし、他班で行われている腎臓血管系障害、造血系障害に対する共通の基礎メカニズムの解明を行う。

以上の研究を通じて、ミトコンドリアの機能修飾を明らかにし、非がん損傷で共通的に重要なミトコンドリア機能修飾ならびにそれに伴う酸化ストレスの細胞死への役割について明らかに

する。更に、この様に他班との連携の中で in vivo での ROS の非がん損傷のメカニズムを明らかにする。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, and Inanami O. (2012) Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic. Biol. Med.*, 53:260.
- 2) Indo HP, Inanami O, Koumura T, Suenaga S, Yen HC, Kakinuma S, Matsumoto K, Nakanishi I, St Clair W, St Clair DK, Matsui H, Cornette R, Gusev O, Okuda T, Nakagawa Y, Ozawa T, and Majima HJ. (2012) Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. *Free Radic. Res.*, 46:1029.

引用文献

- 1) Solaini G, Sgarbi G and Baracca A 2011 Oxidative phosphorylation in cancer cells *Biophys. Biochem. Acta - Bioenergetics* 1807 534.
- 2) Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, and Inanami O. (2012) Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic. Biol. Med.*, 53:260.
- 3) Indo HP, Inanami O, Koumura T, Suenaga S, Yen HC, Kakinuma S, Matsumoto K, Nakanishi I, St Clair W, St Clair DK, Matsui H, Cornette R, Gusev O, Okuda T, Nakagawa Y, Ozawa T, and Majima HJ. (2012) Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. *Free Radic. Res.*, 46:1029.
- 4) Schae D, Kachikwu E L and McBride W H 2012 Cytokines in Radiobiological Responses: A Review *Radiation Research* 178 505.
- 5) Yang H J, Youn H, Seong K M, Yun Y J, Kim W, Kim Y H, Lee J Y, Kim C S, Jin Y-W and Youn B 2011 Psoralidin, a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX, regulates ionizing radiation (IR)-induced pulmonary inflammation *Biochemical Pharmacology* 82 524.

Radiation-induced modification of mitochondrial function and radiosensitivity

Osamu Inanami, Hironobu Yasui, Tohru Yamamori

*Laboratory of Radiation Biology, Department of Environmental Veterinary Sciences,
Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University*

Key Words: Mitochondria, Reactive oxygen species (ROS), Apoptosis, Mitochondrial DNA repair

Abstract

The reactive oxygen species (ROS) derived from mitochondria in the cells exposed to X-rays were reported to be involved in apoptosis, inflammation reaction and bystander effects. In this research, to clarify the mechanism of these effects, the radiation-induced modification of mitochondrial function was examined in the human tumor cell lines. In human lung adenocarcinoma A549 cells, fibroblast NIH3T3 cells and human squamous-cell carcinoma SCCVII cells, X-irradiation (10 Gy) induced a time-dependent increase in the mitochondrial mass and mitochondrial DNA level, indicating that ionizing radiation increased the mitochondrial content of the cell. To examine whether this radiation-induced up-regulation of mitochondrial DNA content is associated with upregulated normal biosynthesis in mitochondria, we estimated the expression of mRNA of mitochondria-related transcription factors and coactivator such as TFAM, TFB2M, NRF1, NRF2 and PGC1a by using real-time PCR technique. The expressions of TFAM, TFB2M, NRF1 and NRF2 did not increase after irradiation, although that of PGC1a significantly increased after irradiation. It is also demonstrated that the expression of mRNA for mitochondrial cytochrome C was decreased after irradiation. These results indicated that mitochondrial mass and mitochondrial DNA increased through unknown abnormal system but not normal biosynthesis in the cells exposed to X-rays. In addition, we investigated that the mitochondrial base-excision repair (BER) system in mice and found that there is unknown BER system unlike the nucleus to mitochondria. These findings in this experiments, which were related with radiation-induced modification of mitochondrial function, is important to understand the radiation-induced apoptosis, inflammation and bystander effects in the cells exposed to ionizing radiation.

放射線の非がん影響の解明 造血幹細胞の放射線感受性関与遺伝子の探索

柏倉幾郎（弘前大学大学院保健学研究科・教授）

研究要旨

本研究は、放射線に対して感受性が高い造血システムを評価モデルとして、標的となるヒト造血幹細胞の発現因子及び遺伝的特徴を解明し、これらが個体差感受性とどう関わっているか、個々の感受性を左右する因子は何であるかを解明し、最終的には放射線感受性の予測診断や新たな治療方法への応用へと繋げる。

キーワード:造血幹細胞、放射線感受性、CD34 陽性細胞、c-Myc

研究協力者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

廣内篤久（環境科学技術研究所・主任研究員）,真里谷靖（弘前大学大学院保健学研究科・教授）, 門前暁（弘前大学大学院保健学研究科・助教）,吉野浩教（弘前大学大学院保健学研究科・助教）

I 研究目的

全ての血球を生み出す「造血幹細胞」は、多分化能と自己複製能を有する特異な細胞であるが、その高い増殖能ゆえに放射線の標的細胞となる。しかしながらヒト造血幹細胞の放射線感受性、特に関与する遺伝子情報については殆ど不明である。本研究では、ヒト造血幹細胞の放射線感受性に関与する遺伝子の網羅的解析を行い、放射線に対する個体差感受性との関わりや個々の感受性を規定する因子を解明し、最終的には放射線感受性の予測診断や新たな治療方法への応用へと繋げることを目的とする。

II 研究方法

本研究では、ヒト造血幹細胞の遺伝的特徴と放射線感受性との関連性を解明する。具体的な検討項目は下記の通りである。

- 1) ヒト造血幹細胞の放射線応答遺伝子の解析
- 2) ヒト造血幹細胞の放射線感受性と放射線応答遺伝子の関連性
- 3) ヒト造血幹細胞の酸化ストレス応答システムと放射線感受性との関連性解析
- 4) 放射線応答遺伝子相互のネットワーク解析

これらの項目は下記の実験方法にて検討、解析した。

1. ヒト CD34 陽性細胞の分離精製：国立病院機構弘前病院もしくは弘前大学医学部附属病院より供与されたヒト臍帯血から、比重遠心法で有核細胞を分離し、磁気ビーズ法（EasySep®）により CD34 陽性細胞を精製する。これらの研究は弘前大学倫理委員会の承認を得た。
2. 表面抗原解析:細胞は各種モノクローナル抗体によって 4°C 遮光下で 30 分間染色後、洗浄し、各細胞について、それぞれの表面抗原の発現率をフローサイトメーター（EPICS® XL, BeckmanCoulter Inc, Orange County, CA, USA）で測定した。それぞれの実験は、アイソタイプ抗体を陰性コントロールとする。

3. 放射線照射：放射線照射は、X線発生装置（MBR-1520R, HITACHI MEDICAL, Tokyo, Japan）を用いて行った。照射条件は、管電圧を 150 kVp、管電流を 20 mA、照射距離を 45 cm、フィルターを 0.5 mmAl/0.3 mmCu にセットし、線量率は約 0.9 Gy/min で行った。線量評価は、電離箱式測定器で行った。
4. 生存を規定する因子の探索：細胞周期、表面抗原発現、活性酸素量解析、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析、コメットアッセイによる DNA2 本鎖切断の検出等について評価解析した。
5. 遺伝子発現解析：遺伝子発現レベルの評価は、放射線を照射した CD34 陽性細胞をサイトカイン含有もしくは非含有無血清培地で液体培養後、一定時間経過後 total RNA を抽出し、定量 RT-PCR をインターカレーション法で行なった。遺伝子の網羅的解析にはマイクロアレイ法を用いた。

(倫理面への配慮)

主任研究者である柏倉幾郎は、所属機関の弘前大学医学研究科倫理委員会に対し、【申請実験・研究課題名】「臍帯血由来造血幹細胞の分化・増殖ならびに制御因子に関する研究」でヒト細胞の使用に関し申請を行い、既に承認を得ている。同承認に基づき、臍帯血は弘前大学医学部附属病院及び国立病院機構・弘前病院において、担当医師から提供者及びその家族に対し臍帯血採取に関するインフォームドコンセントを行い、分娩後安全に採取可能な場合のみ臍帯血を採取する。臍帯血は、正期産、正常妊娠分娩後に娩出される胎盤および臍帯より採取し、比重遠心法・磁気ビーズ法により有核細胞・造血幹細胞を分離精製する。遺伝子解析については厚生労働省のガイドラインに基づき承認を受けており、本研究課題を遂行する上で問題は無い。また、研究参加者の真里谷靖、門前暁及び吉野浩教も同承認を得ている。

III 研究結果

本研究課題を検討した結果、次の3点が明らかになった。

1. 2 Gy 照射ヒト造血幹細胞ではおよそ 360 遺伝子に変動（非照射細胞比>2.0）が見られた。
2. 2 Gy 照射ヒト造血幹細胞で最も変動した遺伝子は、細胞増殖を G1 期で停止させ DNA 合成阻害作用を示すタンパク質である p21 をコードする遺伝子発現が最も高い増加率を示した。
3. 変動遺伝子のネットワーク解析から、c-Myc が有意に高い発現を示すことが示された。c-Myc はヒトの腫瘍形成に関与するがん関連転写因子の一つであり、山中伸弥教授らがマウス iPS 細胞を作る際に細胞の初期化因子として用いた 4 つの因子の 1 つでもある。

IV 考察

ヒト造血幹細胞の放射線感受性には、ヒトの腫瘍形成に関与するがん関連転写因子の一つである c-Myc が大きな役割を担っている可能性が示唆された。

V 結論

今後は、c-Myc が関与する遺伝子が関わる遺伝子発現を中心に解析し、得られた知見をもとに、造血幹細胞発現抗原、遺伝子と放射線感受性との関連性解明、短鎖干渉性 RNA による個体の放射線感受性制御、最終的には、放射線感受性の予測診断法へ繋げる。

VI 次年度以降の計画

次年度は、低線量 (< 0.2) から高線量 (> 1.0) にわたる造血幹細胞の放射線応答機構を *in vitro* および *in vivo* で評価すると共に、応答に関わる遺伝子とその相互関係を解明する。造血幹細胞は、全ての血球を生み出す能力を有する増殖能の高い細胞故に放射線の標的細胞の1つであるが、生体内に極めて少数しか存在しないため、その放射線感受性や応答機構の解明は十分とは言えず、特にヒト造血幹細胞では不明な点が多い。しかしながらこれら応答機構の解明は、事故や医療での放射線被ばくに伴う骨髄死や晩発影響等を考えるうえで極めて重要な課題である。本研究では、ヒトおよびマウスの造血幹細胞を用い、低線量および致死高線量での放射線感受性評価、放射線応答分子の変動、DNA 損傷修復や酸化ストレス応答システムの評価、放射線応答遺伝子と遺伝子相互のネットワーク解析を行う。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

原著論文等

ア) 雑誌

S. Monzen, H. Yoshino and I. Kashiwakura. Radiosensitivity of myeloid progenitor cells against X-irradiation and heavy ion beam. *PLoS One*, *in press*.

K. Kato, M. Kuwabara and I. Kashiwakura. The influence of gender- and age-related differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood. *J Radiat Res*, 52(3):293-299 (2011).

K. Kato, K. Takahashi, S. Monzen, H. Yamamoto, A. Maruyama, K. Ito and I. Kashiwakura. Relationship between radiosensitivity and Nrf2 target gene expression in human hematopoietic stem cells. *Radiat Res*, 174 (2): 177-184 (2010).

K. Takahashi S. Monzen, N. Hayashi and I. Kashiwakura. Correlations of cell surface antigens with the individual differences of radio-sensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Radiat Res*, 173(2):184-90 (2010).

イ) 単行本

なし

Search for genes involved in radiosensitivity of hematopoietic stem cells

Ikuo Kashiwakura^{*1}, Tokuhisa Hirouchi^{*2}, Yasushi Mariya^{*1}, Satoru Monzen^{*1}, Hironori Yoshino^{*1}

^{*1} *Hirosaki University Graduate School of Health Sciences*

^{*2} *Department of Radiobiology, Institute for Environmental Sciences*

Keywords : Hematopoietic stem cells; Radiosensitivity;

Abstract

To clarify the mechanisms of radiation-induced hematopoietic stem cell death, we investigated the effects of excessive ionizing radiation on the clonogenic potential of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) obtained from human umbilical cord blood in cytokine-free conditions. The CD34⁺ cells were 0–2 Gy X-irradiated and were cultured during 0–48 h in cytokine-free conditions. At each time, the CD34⁺ cells were investigated survival, clonogenic potential, generation of mitochondrial superoxide, and more. The present study revealed the following three points. First, approximately 360 genes were changed in human hematopoietic stem cells exposed 2 Gy X-irradiation (a more than twofold alteration in expression levels after X-irradiation). Second, the gene most altered by X-irradiation was the cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A) which codes p21. The p21 protein is a regulator of cell cycle progression at G1 and plays a regulatory role in S phase DNA replication. Third, the gene network analysis suggested that c-Myc has an important role in the radiation response of hematopoietic stem cells. c-Myc is one of a regulator gene that codes for a cancer-related transcription factor and is one of an initialization factor that induced mouse pluripotent stem (iPS) cells founded by Prof. Yamanaka group. Based on the above findings, further approaches with respect to hematopoietic stem cell surface antigens, relationship of genes and radiosensitivity and individual radiosensitivity by using of small interfering RNA (siRNA) will be required. Finally, we would like to establish the presumptive diagnosis method for individual radiosensitivity.

II-7 低線量率放射線長期被ばくによる生体影響の低減化

低線量率放射線長期被ばくによる生体影響の低減化に関する研究

山内 一己（公益財団法人 環境科学技術研究所）

研究要旨

高線量率放射線照射によるマウスの生体影響が、総摂取カロリーの制限により低減化できることが報告されている。しかしながら低線量率放射線長期照射による生体影響の低減化の効果が見られるかは明らかでない。

そこで本研究は、マウスの低線量率 γ 線長期間連続照射による生物影響である寿命短縮と腫瘍の発生を指標として、総摂取カロリーを減少させたカロリー制限で飼育を行うことで、低線量率 γ 線長期連続照射の生体影響がカロリー制限により低減化できるかを明らかとする。

また、肝臓と脾臓においてそれぞれ遺伝子発現と染色体異常頻度を解析するため、連続照射開始前、照射 200 日目、照射 400 日目、照射終了後 200 日目にマウスを解剖し、染色体異常と遺伝子発現解析を行うことで、低線量率 γ 線長期連続照射による染色体異常発生と遺伝子発現がカロリー制限によってどのように抑制されるかを明らかにする。

本研究は福島での原発事故による長期被ばくの障害を低減化するための方法を探る上で貴重な情報になる。

キーワード：低線量率放射線長期連続照射 マウス カロリー制限 発がん 環境科学技術研究所 染色体異常

研究協力者 田中 公夫・環境科学技術研究所 生物影響研究部 部長、田中 聡・環境科学技術研究所 副主任研究員

I 研究目的

高線量率高線量放射線照射によるマウスの生体影響が、照射後の総摂取カロリーの制限により低減化できることが報告されているが¹⁻²⁾、総摂取カロリーの制限により低線量率放射線長期照射による生体影響で低減化の効果が見られるかは明らかでない。

本研究は低線量率 γ 線長期連続照射による生体影響の低減化の実証を目的として、低線量率 γ 線長期連続照射中から餌のカロリーを約 30%減らして飼育を行う事で、低線量率 γ 線長期連続照射により生じる生体影響の低減化の有無を明らかにする。

本研究は福島での原発事故による長期被ばくの障害を低減化するための方法を探る上で貴重な情報になる。

II 研究方法

(1) カロリー制限による低線量率 γ 線長期連続照射による生体影響の低減化の実証実験

生後 8 週齢の雄の B6C3F1 マウスに、放射線を照射しない非照射群と、一日当たり 20 mGy（以下、20 mGy/day）を 400 日間照射する照射群の 2 つを設定する。このとき照射群と非照射群に、通常のカロリーである一週間当たり 95kcal（通常食）と、約 30%カロリーを減らした一週間当たり 65kcal（カロリー制限食）の 2 つの餌を与える群を設定する。20 mGy/day で 400 日間の照射終了後は通常の飼育室で飼育し、寿命とがんの発生を照射の有無とカロリー制限の有無で比較するこ

とにより、低線量率 γ 線長期連続照射の生体影響のカロリー制限による低減化の有無を解析する。

(2) カロリー制限による染色体異常と遺伝子発現に対する影響解析

(1)と同様に、4つのマウス実験群を設定し、照射前、照射開始200日後、照射開始400日後（照射終了時）、照射終了後200日にそれぞれマウスを解剖し、脾臓細胞の染色体異常と肝臓の遺伝子発現解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は、公益財団法人 環境科学技術研究所 動物実験委員会に申請を行い、苦痛の軽減、代替法の活用可否および動物数の減少などの倫理面および計画の妥当性等の審査を受けたのち行った（環境科学技術研究所 平成24年度 動物実験計画書 整理番号24-23号）。

III 研究成果

平成24年度は、研究方法の(1)、(2)のマウスの照射とカロリー制限実験を開始した。研究方法(1)で使用するマウスは一群当たり60匹で、放射線照射の有無とカロリー制限の有無で4実験群を設定したため、合計240匹のマウスを用いた。また(2)の実験に使用するマウスは一群当たり10匹で、4つの実験群を設定したため、合計40匹のマウスを用いた。また、すべてのマウスは1ケージ当たり1匹で飼育しているため、闘争による傷害はなく、個体ごとのケージ内での体重のばらつきなどは見られていない。

これまで4週間の照射が終了しており、今のところ腫瘍などで死亡したマウスは見られていない。通常食で飼育した群では照射の有無にかかわらず体重の増加が見られており、カロリー制限食で飼育した群では照射の有無にかかわらず体重増加の抑制が生じていることが明らかとなった。

IV 考察

平成24年度は、マウス実験のための実験群を設定した。研究方法(1)に必要なマウスは設定できたが、照射エリアの不足から研究方法(2)に使用するすべてのマウスを設定できなかったため、平成25年度より追加実験を開始する。また、照射群と非照射群ともにカロリー制限食を摂餌したマウスで体重増加の抑制が見られたため、適切にカロリー制限が行われていると考えられた。

V 結論

本年度は、低線量率 γ 線長期連続照射とカロリー制限を行うためのマウス実験を開始した。マウスの発がんや寿命を指標とした生物影響を解析するためには長期間の飼育が必要であり、またカロリー制限実験を安定して行うためには、摂餌方法や体重測定、摂餌量の測定など多岐にわたる実験を行う必要があることから、本年度は実験群の設定と飼育方法の安定に集中して研究を行った。これまでの結果より通常食とカロリー制限食で体重増加の違いが見られたことから、飼育方法としては問題ないと考えられる。このため、本方法で飼育することにより、カロリー制限による低線量率 γ 線長期連続照射による生体影響の低減化の実証実験が可能であると結論した。

VI 次年度以降の計画

平成 25 年度末までに低線量率 γ 線長期連続照射が終了する。これまでの研究より 20 mGy/day の 400 日間照射の雄マウスでは、照射終了より悪性リンパ腫を含む造血系腫瘍の発生が見られ、次に肝臓や肺での腫瘍が観察されている³⁻⁴⁾。このため、平成 25 年から平成 26 年度においては、主に悪性リンパ腫の発生についての解析結果が得られると考えられる。また平成 26 年度末までには、20 mGy/day の 400 日間照射の平均寿命である生後 800 日までの観察結果を得ることが出来ることから、カロリー制限による寿命と発がんに対する影響を明らかにできると考えられる。

脾臓細胞における染色体解析と肝臓の遺伝子発現解析においては、平成 25 年度に照射開始 200 日後と 400 日後のサンプルが得られる。20 mGy/day で 200 日もしくは 400 日照射した脾臓では染色体異常が増加していることが分かっている⁵⁻⁶⁾。染色体異常におけるカロリー制限の影響は、平成 25 年度に照射開始 200 日と、平成 26 年度初旬までに照射開始 400 日後の解析結果を得ることが出来る。また、照射終了後 200 日のサンプル解析は、平成 26 年度末に終了する予定である。

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) Yoshida K, Inoue T, Nojima K,他. Calorie restriction reduces the incidence of myeloid leukemia induced by a single whole-body radiation in C3H/He mice, Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(6): 2615-9.
- 2) Yoshida K, Inoue T, Hirabayashi Y,他. Radiation-induced myeloid leukemia in mice under calorie restriction, Leukemia. 1997 ; Suppl 3:410-2
- 3) Tanaka S, Tanaka IB 3rd, Sasagawa S,他. No lengthening of life span in mice continuously exposed to gamma rays at very low dose rates, Radiat Res. 2003; 160(3): 376-9.
- 4) Tanaka IB 3rd, Tanaka S, Ichinohe K 他. Cause of death and neoplasia in mice continuously exposed to very low dose rates of gamma rays, Radiat Res. 2007; 167(4): 417-37.
- 5) 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(1): 61-70.
- 6) Tanaka K, Kohda A, Satoh K, 他. Dose-rate effectiveness for unstable-type chromosome aberrations detected in mice after continuous irradiation with low-dose-rate gamma rays, Radiat Res. 2009; 171(3): 290-301.

Effect of calorie restriction on life span and tumor incidence in long-term gamma irradiated mice at low-dose-rate

Keywords: low-dose-rate gamma irradiation; long-term irradiation; mouse; calorie restriction; tumor; chromosome aberration

Kazumi Yamauchi, Satoshi Tanaka and Kimio Tanaka.

Department of radiobiology, Institute for environmental Sciences

Abstract

Calorie restriction (CR), that is, the reduction of calorie intake to 50–70% of *ad libitum* levels over a lifetime, is known to increase life span and suppress tumors in mice. CR also suppresses high dose irradiation-induced solid tumors and leukemia. However, it is not known if the tumors and shortened life span induced by long-term exposure to low-dose-rate gamma-irradiation are reduced by CR. Therefore, in this study, mice were exposed at low-dose-rate (20 mGy/day) gamma rays from 8 weeks of age for 400 consecutive days fed with normal calorie or CR diets, and their life span and the incidence of tumors were analyzed. One male B6C3F1 mouse was housed per cage. One group was fed on 95 kcal/week diets (normal calorie levels) and others on 65 kcal/week diets (CR). After the mice received the predetermined total dose of radiation (8,000 mGy), mice were transferred to animal rooms and were housed until they died spontaneously. Another two groups were fed 95 kcal/week with non-irradiated and fed 65 kcal/week with non-irradiated. This assay was performed on 60 mice per group. Splenocytes and liver cells were collected from mice every 200 days after starting of CR and irradiation to observe the incidence of chromosome aberrations in splenocytes and gene expression in the liver. Experiments are going, and at four weeks after starting of irradiation and CR began, the body weight of mice fed normal calorie diets increased, but the body weight of mice fed 65 kcal/week suppressed. No significant difference was observed in the life span of the CR and normal-diet groups.

Ⅱ－8 低線量放射線は心血管疾患発症の原因と成りうるか？

－動物実験による検証－

低線量放射線は心血管疾患発症の原因と成りうるか？ —動物実験による検証—に関する研究

丹羽 保晴 (公益財団法人 放射線影響研究所・副主任研究員)

研究要旨

原爆被爆者に代表される高線量被曝した集団で、放射線被曝が心血管病変のリスクの上昇と相関していると報告されている。本研究では、モデル動物(SHR；高血圧自然発症ラットおよび SHRSP；脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット)を用いた実験により上記エビデンスが低線量放射線被曝でも生じるかを検証する。指標としては、SHRSP を用いた実験では線量と寿命の関係を、また SHR では線量と血圧値の上昇の関係を調べる。さらに、両系統のラットを病理検索することにより、線量と病理形態的、生理学的変化との相関を調べる。また、原爆被爆者の調査の結果を基に選んだ血液バイオマーカーを指標として用いることにより放射線が如何なる機序で心血管病変をもたらすかを明らかにする。これらのデータを総合して、放射線量と心血管病変との関係および放射線がいかんして心血管病変を起こすか、その機序について調べる。その結果より、線量の増加と病変の発症とがどのような関係にあるかを解明すると共に心血管病変と有意に相関する最低線量(閾値)が在れば、それを推定する。

キーワード：動物モデル、高血圧、脳卒中、心疾患、放射線影響、放射線被曝

研究者協力者・高橋 規郎・公益財団法人 放射線影響研究所 顧問

- ・ 大石 和佳・公益財団法人 放射線影響研究所 部長代理
- ・ 三角 宗近・公益財団法人 放射線影響研究所 研究員
- ・ 村上 秀子・公益財団法人 放射線影響研究所 来所研究員

I 研究目的

放射線の被曝線量の増加と心血管病変リスクの増加が相関するか否かをモデル動物を用いた実験系で検証する。さらにその線量効果のパターン、その発症するまでの機序を解明する。

これらの結果は、福島原発事故に伴い生じた環境汚染地区の住民、その除染作業、核施設復旧作業に対する放射線防護に関して有用な情報を提供できるものと期待している。

II 研究方法

放射線影響の調査にあたっては、SHRSP をヒト循環器疾患のモデル動物として用いる。5週齢のオスのラットに 0.25 Gy、0.5 Gy、および 1.0 Gy のガンマ線を照射する。非照射ラットを対照群として用いる。この研究は以下の二通りの手順により実施される。1) 寿命を指標とする実験；ラットを自然死するまで飼育する。2) 放射線に相関する心血管病変の発

生機序を推定するための実験；病理解析および血液バイオマーカー測定を実施する。これに使用する新鮮標本を得るため、ラットは一定期間(照射後8週間)飼育後、麻酔下で全血を採取し、安楽死させる。広島大学でラットの放射線照射および飼育を行い、環境科学技術研究所で病理解析を実施する。測定対象とする血液バイオマーカーは放影研で被爆者を対象として実施されている成人健康調査(AHS)で放射線量と有意な相関を示した 36 種である。

得られたデータは Kaplan-Meier 生存曲線、線形回帰モデル、Cox モデルなどを用いて統計解析を行い、低線量領域での放射線量と心血管病変との相関について推定するとともに、福島などで観測されている低線量放射線の影響について考察する。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトを研究対象として行うものではない。動物実験に関しては、法令及び広島大学動物実験指針に従い、「動物の愛護及び管理に関する法律」並びに「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に則って行うこととする。行う動物実験等は通常の実験範囲のものであり、特段、倫理的に問題のあるものとは思われない。

III 研究結果

我々は予備実験において、対照ラットに比べ、1 Gy 以上を照射したラットで顕著な寿命の短縮を観察した。更に、照射ラットに観察された脳、心臓、腎臓に生じた血管炎などの病変は非照射群に比べ重篤であることを明らかにした。従って、このモデル動物系は放射線被曝と心血管病変の相関を観察するには、最も適した系の一つと考えられる。本研究では、ネガコンとして非照射群を、ポジコンとして 1 Gy 照射群を、テスト線量として 0.25 および 0.5Gy の放射線を照射した群を用いて予備実験を行っている。現在、寿命調査を目的とした実験が進行しており、これまでに照射群において幾匹のラットの死亡を確認しているのに対して、非照射群では死亡は未だ確認されていない。もう一つの研究テーマである、『血液中のバイオマーカーを測定し放射線が如何なる機序で心血管病変をもたらすか』を解明するための実験は開始されたところである。25 年度初めまでには結果を得る予定である。

IV 考察

予備的研究結果は、本研究計画で使用するモデル動物系は 1 Gy 以下と言う比較的低線量の放射線と心血管疾患の相関を検証し、またその機序を調べるのに適していることを示している。本研究調査を通じて、低線量領域(0.25~0.5Gy)における放射線影響について興味深い追加データを入手できるかもしれない。この研究で、より低線量(0.25Gy 未満)の影響の検討が可能であることが判明すれば、現在福島地域で問題になっている環境汚染に関しても重要な知見が得られるかもしれない。

V 結論

本研究調査は極めて高感度で放射線の心血管系への影響を調べることが出来ると考えられる。

VI 次年度以降の計画

●25年度；本年度(24年度)、実施中の①寿命をエンドポイントとする実験、②バイオマーカーおよび病理検索を行うための実験を継続する。それでは上記の線量(0.25、0.5、1 Gy)を照射したラットおよび非照射ラットを使用している。①においては全てのラットの死亡時期を観察して線量の増加に伴い寿命が短縮するかを調査する。続いて②においては、多くのラットが脳卒中様症状を呈する照射後8週目(過去の実験より決定)に全てのラットの解剖を行い、病理形態的、生理学的変化が放射線により加速(減速)されるか否かを検証する。血液バイオマーカーを調べるとともに脳、腎臓、心臓、血管などの組織での病理学的変化を検証する。これらは、25年度前半で完了する。

●25年度後半および26年度；これまでの実験を基に確立した条件を用いて①および②を指標とした本格的実験を実施する。①寿命と放射線の関係につき、より確実なデータを得る。②の病理組織検査における組織化学的、組織形態学的分析は、放射線と相関する心血管病変の発症メカニズムの解明に重要な情報を提示できる。並行して、バイオマーカーの測定を行う。原爆被爆者の血液中のバイオマーカーの検査は、放射線被曝と動脈構造の変化を含む心血管病変の進展との関係についての機序の解明に有用であった。血清を用い、総コレステロールなど6種を調べる。血漿に関しては、マルチプレックスシステムのイムノアッセイ法によりIL-6、IFN-ガンマなど30種を調べる。

十分なデータが得られた段階で、寿命の変化、血圧値、バイオマーカー、病理検索から得た組織形態学的変化といった指標と放射線量との関係を統計的に解析する。①寿命に関してはKaplan-Meier生存曲線の推定値を比較する。②血圧値、組織形態学的変化の結果およびバイオマーカー値の線形回帰モデルは、放射線量の違いが各検査値にどのように影響するかを明らかにする。③心血管病変の発生率における放射線被曝のリスクはCoxモデルを用いて解析する。

●27年度では、SHRをモデル動物とした研究を新たに立ち上げる。このSHRを用いた実験により、放射線が血圧値におよぼす影響を調べるとともに、SHRSPと同様な指標を調べることにより、その機序を明らかにする。

本研究は、低線量(0.1Gy未満)領域の放射線の心血管病変への影響を考慮しながら実施される。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

引用文献

Whether lower-dose radiation can induce circulatory disease?

– -Assessment using animal models-

–

Yasuharu Niwa^a, Hideko Murakami^a, Waka Ohishi^b, Munechika Misumi^c and Norio Takahashi^d

^aDepartment of Radiobiology/Molecular Epidemiology, ^bClinical Study, ^cStatistics and ^dConsultant, Radiation Effects Research Foundation (RERF), Hiroshima

Keywords: Model animal, Hypertension, Stroke, Circulatory disease, Radiation effects

There are many reports that frequencies of cardiovascular diseases (CVDs) are increasing among atomic bomb survivors. Moreover, the same evidences are also observed among the patients irradiated with high dose during radiotherapy, nuclear workers, and individuals with environmental or occupational exposures. This issue is receiving considerable attention from the research scientists in the field of radiation protection, radiation biology and cardiology. Since uncertainty remained, we initiated this study in which we acutely irradiated model animals and compared their phenotypes to those from unirradiated animals, in order to assess whether or not risk of CVDs is elevated with increasing radiation dose. In this study plan, we are using stroke prone spontaneous hypertensive rats as the model animal.

Before starting this study, we conducted the preliminary study, in which the male rats were irradiated by gamma-ray of 1, 2 and 4Gy and unirradiated rats were used as a control. The results indicated that 1) the life span of irradiated rats was significantly shorter than that of unirradiated rats. 2) Pathological observation indicated that the early stages of perivascular changes in some organs of the irradiated rats were more advanced in terms of severity than those observed in the organs of the control rats.

We proposed this study, since our preliminary results supported that the study used by the rats irradiated with 1Gy or less may be an opportunity for providing us additional interesting data. We are currently conducting a new pilot study in which we evaluate effects of lower-dose (1, 0.5, and 0.25Gy in addition to 0Gy sham) radiation by observation of the life spans, the severity of pathological phenotype changes, and the assessment of blood biomarkers. After completion of the new pilot study, we will progress to larger studies using the experimental conditions modified by the results from the pilot studies. Statistical analysis for relationship between radiation dose and each endpoint, such as lifespan, pathological observations, and biomarkers, will be conducted.

From this animal model study, we expect to obtain somewhat clear evidence indicating whether or not radiation truly causes CVDs. The approach may also provide a novel way to seek possible mechanisms of CVDs-related by lower-dose radiation.

Finally, the evidences obtained through our studies might be able to provide some information for the relation between CVDs and low dose exposures of ionizing radiation from Fukushima Power Plant Accident.

テーマⅢ 放射線による健康不安対策の推進に関する研究

Ⅲ－１ 福島県における放射線健康不安の実態と効果的な
対策手法の開発に関する研究

福島県における放射線健康不安の実態把握と効果的な対策手法の開発に関する研究

川上憲人（東京大学大学院医学系研究科精神保健学分野教授）

研究要旨

本研究では平成 24～26 年度までの 3 年計画で、（1）福島原発事故に伴う避難住民、これ以外の福島県一般住民および福島県外住民を対象とし放射線健康不安の実態を把握し比較すること、（2）シアタープログラムおよび行動活性化技法を応用した放射線健康不安に関する情報提供、相談、心身の不調軽減の技術およびを新しく開発し、その効果を評価し、普及する方策を確立する。平成 24 年度は特に、1）福島県住民を対象とした予備調査を行い、放射線健康不安の評価法の開発と放射線健康不安の分布、関連要因を検討した。2）また放射線健康不安の改善プログラムの開発のために福島県自治体保健師および海外専門家のヒアリングを行って検討を進めた。その結果、以下の成果をあげた。

1. 放射線健康不安尺度の開発と福島市住民への予備調査：福島第一原発周辺地域からの避難住民の不安や困難を質的に収集して項目プールを作成し、7 項目からなる放射線健康不安尺度を作成した。福島市住民への予備調査（回答者 145 名）から、この尺度の信頼性、妥当性を確認した。この尺度を用いて 20-39 歳の若年住民に抑うつ・不安、放射線健康不安などが多いことを明らかにした。また放射線健康不安と抑うつ・不安との関連性を、震災後の活動性の低下および身体症状が大部分説明することを予備的に明らかにした。これらは放射線健康不安の改善プログラムの主要ターゲットの選定および有効なプログラムの開発に役立つ研究成果である。

2. 放射線健康不安の改善プログラムの開発：福島県自治体保健師等へのヒアリング、海外専門家との討議により、3 種類の放射線健康不安の改善プログラムの基本方針が固まった。これらは、①避難区域等住民を対象とした、情報提供（講義）とグループワークプログラム、②福島県自治体保健師または小さな子どもを持つ母親対象の情報提供（講義）とシアタープログラム、③福島県一般住民を広く対象とした行動活性化プログラムである。福島県の実情を踏まえて開発されるこれらのプログラムは、平成 25 年度におけるモデル事業において円滑に導入しその効果を評価できると期待される。

キーワード：放射線健康不安、抑うつ・不安、福島県、シアタープログラム、行動活性化、保健師

研究協力者 安村誠司（福島県立医科大学医学部公衆衛生学講座教授）、矢部博興（福島県立医科大学医学部神経精神医学講座教授）、秋山 剛（N T T 東日本関東病院精神科部長）、鈴木友理子（国立精神・神経医療研究センター成人精神保健部災害等研究支援室室長）、堀越直子（福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センター助手）、梅田麻希（東京大学大学院医学系研究科精神保健学分野大学院生）、関屋裕希（東京大学大学院医学系研究科精神保健学分野特任研究員）、堀越 勝（国立精神・神経医療研究センター認知行動療法センター教育研修部部長）、今村幸太郎（東京大学大学院医学系研究科精神保健学分野特任研究員）、北川砂織（東京大学大学院医学系研究科精神保健学分野科学術支援職員）

I 研究目的

1. 背景

放射線健康不安が住民に与える影響のうちもっとも懸念されるものは、心身の不調が何十年にもわたって持続し、そのために住民の生活の質が長期に低下することである。放射線健康不安により、精神疾患までは至らないが軽度の抑うつ・不安および身体的な不定愁訴が増加しこれが場合によっては何十年にも長期にわたって持続すること、そのために住民の生活の質が長期にわたって大きく低下することが、長崎県¹⁾、チェルノブイリおよびスリーマイル島原発事故周辺住民の調査^{2,3)}で明かになっている。福島第一原発事故にともなう避難住民については福島県放射線医学県民健康管理センターが実施する調査や相談が実施されているが、放射線健康不安の実態、心身の不調への影響、ハイリスク群の同定については十分に検討がなされておらず、特に仮設住宅以外で生活する者、福島県外への移転者における情報はわずかしか得られていない。また、福島県の一般住民もまた放射線被曝に対する不安を抱いていると想定されるが、その放射線健康不安の実態は不明である。福島第一原発事故に関連する放射線健康不安については、避難住民だけでなく福島県一般住民も含めてその実態を把握しハイリスク群を同定すること、心理療法の技術等を応用した放射線健康不安への情報提供・相談技術の開発が必要である。しかし放射線健康不安による心身の不調を改善する方法については国際的に見ても研究がない。健康診断や健康相談が放射線健康不安を改善できているかどうかについての科学的評価はなされていない。参加型のリスクコミュニケーションや心理療法の技術の応用など情報提供や健康相談の方法論には一層の工夫の余地がある。

2. 目的

本研究では平成24～26年度までの3年計画で、(1)福島原発事故に伴う避難住民、これ以外の福島県一般住民および福島県外住民を対象とし放射線健康不安の実態を把握し比較すること、(2)サイコドラマおよび行動活性化技法などを応用した放射線健康不安に関する情報提供、相談、心身の不調軽減の技術およびを新しく開発し、その効果を評価し、普及する方策を確立する。

平成24年度は特に、1)福島県住民を対象とした予備調査を行い、放射線健康不安の評価法の開発と放射線健康不安の分布、関連要因を検討した。2)また放射線健康不安の改善プログラムの開発のために、福島県自治体保健師および海外専門家のヒアリングを通じて検討を進めた。

3. 環境行政の課題との関連性

本研究により、(1)福島県の避難住民および一般住民における放射線健康不安とその心身の不調への影響が明らかになる。また着目すべきハイリスク群が明らかになり、今後の放射線健康不安軽減のための対策立案に有用な情報となる。(2)放射線健康不安を持つ住民に対する情報提供・健康相談の効果的な手法を科学的根拠に基づき確立することができ、放射線健康不安による長期の不調を予防するための住民向けサービスとして地域の保健医療福祉施策の中で活用できるようになる。放射線健康不安の心理的なメカニズム、その対策の科学的効果評価を行った例は世界的にもなく、学術的にもきわめて意義が大きい。

II 研究方法

1. 住民調査（予備調査）

仮設住宅以外居住の避難区域住民および福島県の一般住民を対象として放射線健康不安の実態を明かとする、特にケアの必要なハイリスク群を同定するために、本年度は放射線健康不安の標

準的な評価方法を開発した。また、福島県の一般住民調査への予備調査を実施し、放射線健康不安尺度の信頼性と妥当性を検討した。同時に、放射線健康不安による心身不調の行動モデルを検証し、放射線健康不安軽減プログラムの開発の基礎とした。

1) 放射線健康不安の評価尺度の開発

(1) 放射線健康不安の項目の抽出

福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センターでは、制限区域からの避難住民に対して「こころの健康度・生活習慣に関する調査」を郵送法により実施している。またストレス調査に高得点の回答をした住民に対しては、専門の職員が電話相談を実施している。この調査票の整理あるいは電話相談を行う事務局職員、心理相談員合計2名に研究協力者がインタビューを実施し、放射線健康不安と関連した記述を抽出した。インタビューでは、避難区域等住民に①多くみられる困難・不安（年齢や避難場所の違いによる特徴）、②特に印象に残った困難・不安、③その他の困難・不安（住環境、人間関係、差別や偏見、健康不安、保健医療福祉サービス、行政サービスについて）の有無を聴取した。また、「こころの健康度・生活習慣に関する調査」調査票に欄外記載されている自由記入を閲覧し、これからも放射線への不安と関連した不安や困難を抽出した。これらの抽出された内容を、KJ法により整理し、「地域社会の解体」、「差別・偏見」、「住環境」、「仕事」、「医療・健康」、「行政サービス」、「子ども」、「報道・調査」の8カテゴリーに関する困難・不安を抽出した。

さらにこれまでの調査で使用された質問項目を収集した。これらは、広島市原子爆弾被爆実態調査⁴⁾、被爆の影響に関する知識¹⁾、The Diagnostic Interview Schedule Disaster Schedule⁵⁾等である。これらから放射線健康不安の評価に適切な項目を抽出し、項目プールに追加した。例えば、放射線への曝露については、広島市⁴⁾から「不安（健康・次世代への影響）」と「偏見・差別に関する困難」を採用した。「報道」については、先行研究がなかったため、インタビュー・データから質問項目を作成した。

(2) 放射線健康不安の評価尺度

作成された尺度案研究グループで討議し項目プールから最終的に7項目を選定して、放射線健康不安の評価尺度最終案とした。「原子力発電所の事故による放射線の影響について感じていらっしゃることや、経験されたことについて伺います。それぞれの文章を読んで、あてはまるものに○をつけてください。」と教示し、以下の9項目について、項目ごとに、とてもそう思う（4点）、ややそう思う（3点）、あまりそう思わない（2点）、全くそう思わない（1点）の5件法で回答を求め、項目得点を合計して放射線健康不安の強さの程度とした（7～28点）。

1. 将来、放射線の影響で深刻な病気にかかるのではないかと心配している。
2. 体の具合が悪くなるたびに、放射線を浴びたせいではないかと不安になる。
3. 放射線の影響が子どもや孫など次の世代に遺伝するのではないかと心配している。
4. 原子力発電所の事故に関する報道を見ると、とても不安、または不快になる。
5. 自分が福島県に住んでいたために、他の人から差別された(不公平な扱いを受けた)経験がある。
6. 福島県の住民であることを、なるべく人に話さないようにしている。
7. 放射線が健康に与える影響について、家族と意見が対立して、もめた経験がある。

2) 予備調査

(1) 調査対象

福島市一般住民から住民台帳を用いて無作為に 300 名を抽出した。これらに平成 25 年 2 月 7 日に自己記入式調査票を郵送し、2 月末までに 145 名 (48%) から回答を得た。研究にあたっては東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会で研究計画を審査し承認されている。

(2) 調査方法

自己記入式調査票では、基本的属性の他、放射線健康不安、震災後の活動の変化、精神的健康(抑うつ、不安)、身体症状を主に調査した。

①放射線健康不安

上記で開発した放射線健康不安尺度を使用した。合計点数を求め、点数が高いほど放射線健康不安が強いとした。

②震災後の活動の変化

先行研究などを参考に、外出、趣味、人つきあいなどの 9 つの日常活動について、震災前にくらべて、現在、以下のような活動をすることは減ったか、増えたかを、減った (−2 点)、どちらかといえば減った (−1 点)、変わらない (0 点)、どちらかといえば増えた (1 点)、増えた (2 点) の 5 段階で評定してもらった。

1. 食品や日用品などの買い物に出かけること
2. デパートにゆくなど楽しみのための買い物に出かけること
3. 散歩や運動のために外出すること
4. 趣味(音楽鑑賞、読書など)をすること
5. 自宅での活動(盆栽、庭や畑の手入れ、季節ごとの行事、お茶やコーヒーを飲む、アロマなど)をすること
6. 身だしなみ(お風呂、お化粧、アイロンかけ、着替えなど)をすること
7. 家族や知人と外出すること
8. 親戚や知人に会いに外出すること
9. 一泊以上の旅行にでかけること

合計点数がマイナスであればあるほど、震災前にくらべて活動が減少していることを意味している。

③精神的健康

精神的健康(抑うつ、不安)は K6 調査票で評価した。K6 は 2002 年に Kessler ら⁶⁾の手により開発された尺度であり既存の 18 個のスクリーニング尺度から得られた 612 個の項目を候補とし、その中から 5 段階の大規模疫学研究を経て吟味された 6 項目により構成されている。質問項目は付録に示すとおりであり、回答選択肢は「全くない」、「少しだけ」、「ときどき」、「たいてい」、「いつも」の 5 件法である。各回答選択肢に 0 から 4 点までの点数を与え、これを 6 項目で合計した尺度得点 (0~24 点) を心理的ストレス反応の指標として使用する。日本語版⁷⁾は、古川、川上、金により作成されており、その信頼性および気分・不安障害の診断に対する妥当性が一般住民⁷⁾および精神科外来患者⁸⁾において検証されている。

④身体症状

職業性ストレス簡易調査票⁹⁾から身体的ストレス反応の尺度 (10 項目) を用いて身体症状を測

定した。項目は、以下のものであり、ほとんどなかった（1点）、ときどきあった（2点）、しばしばあった（3点）、いつもあった（4点）で採点して合計得点を身体症状の指標とした。これらの項目は、めまいがする、体のふしぶしが痛む、頭が重かったり頭痛がする、首筋や肩がこる、腰が痛い、目が疲れる、動悸や息切れがする、胃腸の具合が悪い、食欲がない、便秘や下痢をするである。

3) 海外専門家からのヒアリング

住民調査について、2013年2月27日に Evelyn Bromet 博士との打ち合わせを東京で実施した。

2. 放射線健康不安の改善に関するプログラムの開発

1) 住民参加型情報提供プログラム

福島県内自治体保健師および海外専門家にヒアリングを行った。福島市および周辺市町村保健師合計5名からのヒアリング、良好実践事例の収集を2012年12月6日、20日、2013年1月13-14、27日に実施した。また、放射線健康不安への対策に関する海外専門家ヒアリングとして、2013年2月21-22日に、Kathleen Pike 博士との打ち合わせを福島医大で実施した。

2) 行動活性化プログラム

行動活性化(behavioral activation)は、認知行動療法と呼ばれる心理療法の1つである¹⁰⁾。行動レパートリーを増やし、ポジティブな活動を増加させること、回避に陥らずに活動することで抑うつ・不安を改善すると考えられており、実際に多数の臨床試験でその効果が確認されている¹¹⁾。行動活性化は、他の心理療法とくらべて必要な技術や経験が少なく導入しやすい。住民に対して、医師・保健師による保健指導、グループワーク、セルフケア教材など多様な形態で提供することが可能である。本研究では、参加型プログラムと平行して行動活性化によるプログラムの開発を行うこととした。

放射線健康不安を持つ住民では、図1のようにさまざまな外的刺激により、「放射線は身体に悪い」という考え(スキーマとよぶ)が活性化すると考えられる。こうした考えは、抑うつ、不安を増加させ、また体調に注意を向けるという結果を生じると考えられる。体調への注意集中は、さらに身体症状を増大させ、さらに体調に注意が向くという悪循環を生じる。一方、抑うつ、不安および体調への注意集中は活動性の低下につながる。例えば、放射線に対して何もできないので、一日寝て過ごすとか(回避)、あるいはこれまでなら楽しみのために外出していたことを控える(快行動の減少)とかである。こうした活動性の低下は、その結果として一層抑うつ、不安を増大させ、また身体症状も増加させる。その結果、いっそうの活動性の低下が生じるという悪循環が生じている可能性がある。このような放射線健康不安による心身不調モデル(仮説)の上に立って、行動活性化プログラムを開発する。行動活性化プログラムが提供されることにより、図2のように活動性の上昇と回避行動の低下がおき、その結果抑うつ、不安が減少し、身体症状・身体症状への注目も緩和される。その結果、放射線は身体に悪い」という考え(スキーマ)があったとしても、抑うつ、不安や身体的不調が改善され、自分らしい生活を送ることができるようになる」と期待される。

本年度研究では、住民調査(予備調査)を利用して、上記の放射線健康不安による心身不調モデル(仮説)を一部検証し、また行動活性化プログラムを応用した元気プログラムの素案を作成した。

Ⅲ 研究結果

1. 住民調査（予備調査）

回答者 145 名のうち、男性は 49 名（34%）、女性は 96 名（66%）であった。また年齢層は、20-39 歳が 32 名（22%）、40-54 歳が 35 名（24%）、55-64 歳は 39 名（27%）、65 歳以上は 39 名（27%）であった。各尺度によって無回答者数が異なるため、解析では人数が異なる場合があるので留意されたい。

表 1 には、放射線健康不安、精神健康（抑うつ、不安）、震災後の活動変化、身体症状の性別、年齢層別の平均値を示した。放射線健康不安は男女で差はなく、有意ではないがいくらか 20-39 歳で高い傾向にあった。精神健康については有意ではないが女性がやや高く、20-39 歳で高い傾向にあった。震災後の活動変化は全体平均がマイナス 4.6 であり、平均として活動量が減少していた。性差、年齢差は明確でなかった。身体症状は、現在治療中の疾患のある者についてしか質問していない。性差はなく、若年者に多い傾向が見られた。

表 2 には、放射線健康不安の項目ごとの回答分布を示した。原発に関する報道による不安を「とてもそう思う」とする者が約半数と多かった。次いで、放射線影響の遺伝についての心配に「とてもそう思う」とする者が 40%と多かった。将来の病気の不安、体調不良が放射線のせいではないかと考える、福島県に住んでいることによる差別についてとてもそう思う」とする者が 10-20%みられた。

表 3 には、放射線健康不安の項目および合計得点と精神健康（抑うつ、不安）、震災後の活動変化、身体症状との相関係数を示した。まず、各項目とその項目を除いた合計得点との相関（項目全体相関）は 0.48 以上であり高かった。放射線健康不安尺度（合計得点）のクロンバック α 係数は 0.812 であった。項目 1～6 および合計得点は精神健康と危険率 5% で有意な相関を示した。項目 2, 5, 6 および合計得点は震災後の活動変化との間で有意な相関を示した。項目 1, 2, 3, 4, 6 および合計得点は身体症状との間で有意な相関を示した。

放射線健康不安の 7 項目の主成分分析では固有値 1 以上の因子が 2 つ抽出され、第一因子の寄与率は 47.6%、第二因子の寄与率は 16.8% であった。バリマックス回転後の因子成分行列では、項目 1～4 までが高い因子負荷量（0.669-0.875）を示す第一因子（放射線健康影響への不安）と項目 5～7 が高い因子負荷量（0.726-0.820）を示す第二因子（放射線と関連した社会的問題）とが同定された。

表 4 には、放射線不安、活動性の変化、身体症状と精神健康（抑うつ、不安）との関連性を段階的重回帰分析で解析した結果を示した。身体症状を投入すると対象者数が減少するため、身体症状を入れない解析（133 名、上段）と身体症状を入れた解析（90 名、下段）の 2 つの解析を行った。結果は類似していた。まずモデル 1 では、放射線健康不安が精神健康と強い有意な正の関連性を示した。活動性の変化をモデル 2 で投入すると、放射線健康不安の回帰係数は 28%（上段）あるいは 22%（下段）減少し、活動性の変化は精神健康と有意な負の関連性を示した。これは活動性の変化（特に低下）が放射線健康不安と精神健康との関連性を約 2～3 割説明していることを意味している。さらに身体症状の回答者については、身体症状を投入したモデル 3 の解析を行った。その結果、放射線健康不安の回帰係数は約半分となって有意ではなくなった。このことは身体症状により放射線健康不安と精神健康との関連性が約 5 割説明できることを意味している。モデル 3 では身体症状が精神健康と有意な正の相関を、活動性の変化が有意な負の相関を示し、

放射線健康不安の精神健康との関連性の大部分はこの2つの要因によって説明できると考えられた。

2. 放射線健康不安の改善に関するプログラムの開発

1) 住民参加型情報提供プログラム

(1) 保健師ヒアリングから

①住民の多様な背景状況

避難住民は、家族が別々に居住していて、土日遠い距離を家族のところに帰るために、休めない。県外に避難した人には、サービスが届きにくい。この中には、放射線への反応が強い人もいる。人によって避難経路が異なり、体験が異なる。

②実施中の事業事例

予算化された事業として、「放射線への理解促進」「ただしくこわがろう」という働きかけを行っている。また、医師の講演会、特に小児科医による講演会を20回程度行った。昨年度は参加者が多かったが、今年になって、参加者数が減っている。福島医大が「出前講座」＋グループワークをしてくれている。グループワークの中での癒しがある。家族の中での意見の違いで悩んでいる母親もいる。催しものとしては、「(栄養士による)免疫力を高める食事」、「親子遊び」のセッションも行った。1才6ヶ月の検診のときに、母親がどんなところで悩んでいるかアンケートを行い、それに基づいて心理士が相談に入った。積算線量計を貸し出して、1週間の記録をつけてもらう。回収時に面接をして、「こういうことを知りたいらしい」と把握する。放射線は目に見えないので、数字として目に見えるのは入りやすい。一方、「放射線」と冠がついていると、「もういやだ」という反応がある。しかし、こういった通常の相談のなかで、3/11の当時と同じように、理解がないまま生活している住民が見つかることもある。

③住民への働きかけについて

情報提供も大切だが、リスクコミュニケーションが重要であり、相手がどう受け止めて、自分の中に落とし込んでいけるかが重要。方法論については、模索中である。訴えをよく聞くのは、大切で、表面的には同じ訴えでも、その背景には、個人差がある。健康教育をすると、放射線の知識について聞くとほとんど知らない人もいる。さらに、資料に基づいて説明した後に、「洗濯物は、おもてで干していいですか？子供を、外で遊ばせてよいのですか？砂をなめたら、どこに相談したらよいですか？」と、同じ質問を繰り返す人がいる。働きかけした後は、「安心した」というけれども、すぐに心配が戻ってきて、「やはり福島の食材はいや」という状況になる。しかし、「話を聞いたときは安心するけれども、家に帰ると心配になるのよね」という話ができれば、それでよいと思う。

④複雑な住民感情

いろいろな情報が錯綜しているので、「どれを信じたらよいか分からない」という状態である。「自分の見方は行き過ぎているか」という話し合いも必要かもしれない。中には、まだ子供を外で遊ばせていない親もいる。放射線情報を、いくら「正しく」専門家が説明しても、入らない。「それは、あなたの立場でしょう」という反応であり、同じ住民同士で話し合う中で、納得できればよいと思う。避難先で、「福島に戻ってお産する」と言ったら、(一緒に避難していた人から)「裏切るの」と言われた人もいる。「あなたは原発賛成派なの？」と責められる。一般的に、放射線ストレス緩和の話をする、「原発賛成なの？やっぱり市役所はそうなのね」といった発言があ

る。「放射線の座談会」が、「行きつ戻りつ」の状態が続いている。過激な発言をする人が多いが、福島医大の生が、何回か話をしてくれている。県外に避難している住民の中には、「やり場のない怒り」がしばしばみられるが、「家族が分かれて暮らしていることのデメリットと、放射線のリスクのバランス」を、少し冷静に考えられるようになってきている人も出てきている。

⑤保健師の困難

住民のやり場のない怒りのターゲットになって、保健師が傷つく場合もある。保健師の仕事と家族の安全との葛藤もある。「避難するな」という圧力もあったという。

(2) 海外専門家ヒアリングから

Kathleen Pike 博士との打ち合わせ会議から、サイコドラマの手法、特にシアタープログラム (Theater program、朗読による活性) 技法について情報を収集した。Pike 博士の主宰するコロンビア大学 Global Mental Health Program (GMHP) における「朗読による活性」の経験を共有するために、一般的なプログラムの構成要素などについて説明を受けた。

シアタープログラムの主要な構成要素は、以下の4つである。

①対象の精神保健ニーズに合致するテキスト (既存の小説や詩、戯曲などから) を抜粋し、それを役者が朗読する。例えば Out of Wire グループから、Theater of War、Rum and Vodka、Job in Joplin などのテキストがすでに準備されている。

②当事者、家族、カウンセラーなど (プログラムごとに選択) からなるパネルが数分ずつ話す。

③参加者が発言、ディスカッションする。

④相談窓口や関連する資料などに関する情報を提供する。

これまでのプログラムでは参加者からは高い評価を得ている。スティグマが減少し、感情的な問題に関する認識は向上した。しかし、50%の参加者が朗読を *upsetting* と感じた。感情的な表出の場面に立ち会うことで生じる反応として、ある程度予測はしていた。

GMHP の経験から、コミュニティにおいて課題となるのは、資金・資源不足とスティグマである。GMHP では、トレーニングの機会を増やすこと、資源の不足している状況で地域のキャパシティを増強すること、リサーチの実施、コミュニティの意識を高めることを意図して活動を行っている。コミュニティと一緒にプロジェクトをデザインすることが大事である。福島の場合は、地震、津波、原発など複数の原因が絡んでいて、ストレスへの反応を予測する要因が複雑である。誰が高リスクなのかをアセスメントすることが必要である。現在 Pike 博士が構想している The Tohoku Theater Project では、①ストレスの軽減、②コーピングの推進、③サポートの提供、④スティグマや恥の意識の減少を目的とした実施を考えている。実施の折りには、コミュニティのスポンサーシップ (自分たちのプロジェクトと認識すること) が重要。役者は誰にするのか、朗読の感情的なトーンはどの程度にするか、コミュニティで活用できる資源としてはどのようなものがあるか、について、コミュニティと一緒に考え、作り上げていくことが大事。アメリカの Out of Wire グループと共同して進めることもできる。

福島におけるプログラム実施のターゲットとして保健師が考えられる。慢性的なストレス状況下であって、*dissatisfaction, burnout, turnover, inadequate staffing* の悪循環が起こっている可能性がある。また、小さい子どものいる母親は、有力なターゲット。継続的に話し合う場を提供することはとても大事である。母子講演会で、プログラムの最初にシアタープログラムを導入してはどうか。シアタープログラムは、年4回程度行うのが良いかもしれない。母親への支援は次世代への影響が大きい。

2) 行動活性化プログラム

行動活性化の理論およびこれまでのプログラムを参考に、行動活性化を応用した保健師が実施するプログラムの素案を作成した。

IV 考察

1. 住民調査（予備調査）

1) 放射線健康不安の評価尺度の開発

本年度研究では、放射線健康不安の評価尺度(候補)を開発し、その信頼性と妥当性を福島市住民に対する予備調査で検討した。作成された放射線健康不安尺度は、福島県避難住民の困難や不安の情報に、これまでの放射線不安に関する調査票を参考にして作成されており、福島県における状況に適した項目プールから作成されており、また7項目と項目数が少ないことから、現場で使用しやすいものになっている。福島市住民に対する予備調査では、内的整合性による信頼性が十分あることが確認された。項目合計相関も十分に高く、尺度の信頼性は満足できるものである。また第1因子（主成分）が分散の約50%を説明しており、因子的妥当性も基準を満たしている。従って本尺度は原則一因子尺度と考えられるが、回転後の因子構造からは放射線健康影響（項目1～4）と放射線による社会的問題（項目5～7）の2因子から構成されている可能性があるため、多次元尺度としての利用も考えられる。項目および尺度得点は、精神健康、震災後の活動性の変化、身体症状と、理論的に予測される関連性を示しており、一定の構成概念妥当性もあることが示された。今後さらに必要な項目の追加などを検討する必要はあるが、本尺度は福島県における放射線健康不安を測定する簡便な尺度として活用できると考えられた。

2) 住民調査（予備調査）からみた放射線健康不安等の分布

福島市一般住民における予備調査では、放射線健康不安の項目のうち、原発関連報道、放射線の次世代影響、将来の放射線による病気について不安に思うとの回答が多かった。避難住民ではない一般住民においても、原発関連報道への対処方法の提供、放射線の将来の疾病発症および次世代への影響についての情報提供、リスクコミュニケーションが、今後のプログラム開発の中で検討される必要があると考えられた。

また今回の予備調査では、20-39歳の若年層において精神健康（抑うつ、不安）の得点が高くなっており、また放射線健康不安、身体症状も同様の傾向にあった。放射線健康不安の改善対策を行う折には、まずこうした若年層をターゲットとしたプログラムの提供を検討することが必要と思われる。本調査では放射線健康不安や精神健康に性差はみられなかった。しかしながら、本調査では人数が少なく男女、年齢別の詳細な解析は行っていない。子供がいるかどうか、同居しているかどうかなど、放射線健康不安に影響すると思われる要因についても調査しておらず、その影響を検討できていない。これらについてはより大規模な、平成25年度の本調査によって明らかにすることが必要である。

また本年度研究で予定していた、仮設住宅住民における放射線健康不安との比較、総合解析については、県民健康管理センター側の調査が本報告書提出時点までに完了していないため、次年度の報告書で報告する。

2. 放射線健康不安の改善に関するプログラムの開発

1) 住民参加型情報提供プログラム

福島県自治体保健師からのヒアリングからは、以下のことが明らかとなった。

①情報提供だけでは不十分であること

情報提供も大切だが、リスクコミュニケーションが重要。住民がどう情報を受け止めて、自分の中に落とし込んでいるかを理解することが必要である。

②変動する不安な気持ちの理解

住民の不安は、行きつ戻りつすることを理解する必要がある。「1回聞いて分かった気がするけれども、やっぱり分からないという気持ちもあるよね」、「それでよいんだよね」という確認、受容をプログラムの中に取り入れてゆくことが大切である。プログラムの名称に「放射線」という用語を使うかどうかについては慎重な検討を要する。

③保健師の苦しい立場

明確な手法や方針のない中、手探りで関わりを続けている保健師が困難を感じている。放射線対応と日常業務をどう区別し位置づけるかも不明確である。住民からの非難に困惑することもある。この点から、住民を支援する保健師の支援も重要な課題であることが浮かび上がった。

④現時点での好事例

福島医大が「出前講座」＋グループワークを提供しており、グループワークの中での癒しがあることが報告された。これは現時点で収集された情報からはベストプラクティスに近いと考えられた。住民には「情報提供＋グループワーク」が有用である可能性があり、情報提供の内容は放射線およびリスクコミュニケーションの専門家から助言を得ながら、情報提供およびグループワークの標準的な方法を開発し、保健師による住民支援に活用してもらうことが考えられる。同一住民グループに繰り返し提供することで、住民間の連帯感の醸成にも好影響を得られる可能性がある。

一方、Pike 博士らが考案しているシアタープログラム（朗読による活性）技法は、非常に魅力的かつ発展性のある手法である。しかし場合によっては参加者に過度に情緒的な刺激を与える可能性もある。このため住民ではなく、保健師の心のケアに活用するのがより適切である可能性がある。一方、対象集団を限定し、小さな子どもを持つ母親対象にしてこれに特化したシアタープログラムを開発することで、大きなメリットが得られる可能性もある。

以上から、参加型プログラムにおいては、以下のような対象集団と手法の組み合わせが適切であると考えられた。

①避難区域等住民対象

情報提供（講義）とグループワーク。シアタープログラムは含めない。

②保健師対象

情報提供（講義）とシアタープログラム

③小さな子どもを持つ母親対象

情報提供（講義）とシアタープログラム

2) 行動活性化プログラム

福島市一般住民における予備調査データの解析から、放射線健康不安は住民の精神健康（抑うつ、不安）と強い関連があるが、この関係は、震災後の活動性の低下および身体症状によって大部分が説明されることが示された。これは行動活性化プログラムの基礎となる理論モデル(図1)の仮説を指示する結果であり、本研究において行動活性化プログラムを開発することの根拠の1つとなると考えられる。しかしながら本予備調査は横断的な調査であり、これらの要因の因果関

係は明確にできていない。また認知パターンや性格特性などが交絡している可能性も否定できない。基礎となる理論モデルの厳密な意味での検証はきわめて難しく、多くの時間と労力を必要とする。このため、理論モデルの検証を継続するよりも、平成 25 年度研究においては実際のモデル事業における前後比較によってプログラムの効果を評価することで、この理論モデルの適切さを評価することが現実的で効率的であると判断している。紙面の関係で掲載していないが、本年度研究で行動活性化プログラムの素案が作成されており、今後はこれを、ターゲットとなる集団、提供される方式（集団か個別か、複数回か単一セッションかなど）に合わせて修正し、モデル事業版とする予定である。本プログラムは放射線の健康影響などについてのコミュニケーション部分を搭載していないものであるため、現在のところ福島県一般住民を主な対象として想定している。

V 結論

本年度研究では、以下の研究成果をあげた。

1. 放射線健康不安尺度の開発と福島市住民への予備調査：福島第一原発周辺地域からの避難住民の不安や困難を質的に収集して項目プールを作成し、7項目からなる放射線健康不安尺度を作成した。福島市住民への予備調査（回答者 145 名）から、この尺度の信頼性、妥当性を確認した。この尺度を用いて 20-39 歳の若年住民に抑うつ・不安、放射線健康不安などが多いことを明らかにした。また放射線健康不安と抑うつ・不安との関連性を、震災後の活動性の低下および身体症状が大部分説明することを予備的に明らかにした。これらは放射線健康不安の改善プログラムの主要ターゲットの選定および有効なプログラムの開発に役立つ研究成果である。
2. 放射線健康不安の改善プログラムの開発：福島県自治体保健師等へのヒアリング、海外専門家との討議により、3種類の放射線健康不安の改善プログラムの基本方針が固まった。これらは、①避難区域等住民を対象とした、情報提供（講義）とグループワークプログラム、②福島県自治体保健師または小さな子どもを持つ母親対象の情報提供（講義）とシアタープログラム、③福島県一般住民を広く対象とした行動活性化プログラムである。福島県の実情を踏まえて開発されるこれらのプログラムは、平成 25 年度におけるモデル事業において円滑に導入しその効果を評価できると期待される。

VI 次年度以降の計画

本年度の研究成果および評価委員会のコメントを踏まえて、平成 25 年度には、住民調査と、放射線健康不安の改善プログラムのモデル事業を行う。

1. 住民調査

関連領域の専門家および関係機関から十分な情報収集を行い調査計画、特に平成 24 年度に開発した放射線健康不安の尺度の見直しに反映させる。3つの集団に対して住民調査を実施する。1) 福島県避難住民調査、2) 福島県一般住民調査、3) 福島県外一般住民調査。以上のデータを解析し、避難住民・居住地域、性別、年齢、社会的孤立などの要因別の放射線健康不安の実態、放射線健康不安が心身の不調に与える影響を詳細に解析する。

2. 放射線健康不安の改善に関するプログラムの開発とモデル事業

- 1) 住民参加型リスクコミュニケーションプログラム、2) 保健師向け心理的支援プログラム、3) 行動活性化に基づく健康教育プログラムについて各プログラムをモデル事業として試行し、

前後比較により効果評価を行う。結果に基づきプログラムを改善する。

3. 自治体等との連携体制の構築：福島県の自治体・保健医療福祉担当者との会合をもち、開発中のプログラムを現行あるいは新規の保健医療福祉事業にどう落とし込むかについて検討を進める。

平成26年度には、開発された放射能健康不安の改善に関するプログラムの効果評価を、比較対照試験のデザインにより評価する。また3年度に渡る研究の成果を要約し、自治体、保健医療専門職、住民代表と意見交換する場を持ち、福島県における最適化された放射線健康不安改善プログラムを作成し、提案する。マニュアルを作成し、福島県内の避難住民、一般住民および福島県外移転の避難住民、保健師などグループごとにこれらのプログラムをどう活用するかについて、行政に提案する。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 雑誌

該当せず。

イ) 単行本

該当せず。

引用文献

1. Kim Y, Tsutsumi A, Izutsu T, et al. Persistent distress after psychological exposure to the Nagasaki atomic bomb explosion. *Br J Psychiatry*. 2011; 199(5):411-6.
2. Bromet EJ, Havenaar JM, Guey LT. A 25 year retrospective review of the psychological consequences of the Chernobyl accident. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2011; 23(4):297-305.
3. Dew MA, Bromet EJ. Predictors of temporal patterns of psychiatric distress during 10 years following the nuclear accident at Three Mile Island. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 1993; 28(2):49-55.
4. 広島市. 広島市原子爆弾被爆実態調査研究原爆体験者等健康意識調査報告書, 2010.
5. Maida CA, Gordon NS, Steinberg A, Gordon G. Psychosocial impact of disasters: Victims of the Baldwin Hills fire. *Journal of Traumatic Stress*, 1989; 2(1), 37-48.
6. Kessler RC, Andrews G, Colpe LJ, et al. Short screening scales to monitor population prevalences and trends in non-specific psychological distress. *Psychol Med*. 2002;32(6):959-76.
7. Furukawa TA, Kawakami N, Saitoh M, et al. The performance of the Japanese version of the K6 and K10 in the World Mental Health Survey Japan. *Int J Methods Psychiatr Res*. 2008;17(3):152-8.
8. Sakurai K, Nishi A, Kondo K, et al. Screening performance of K6/K10 and other screening instruments for mood and anxiety disorders in Japan. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2011; 65(5):434-41.
9. 下光輝一, 原谷隆史, 中村賢, 他. 主に個人評価を目的とした職業性ストレス簡易調査票の完成, 加藤正明班長, 労働省平成11年度「作業関連疾患の予防に関する研究」労働の場におけるストレス及びその健康影響に関する研究報告書, 労働省, 東京, 2000; 126-164.
10. Lewinsohn PM. Engagement in pleasant activities and depression level. *J Abnorm Psychol*. 1975; 84(6):729-31.
11. Dimidjian S, Davis KJ. Newer variations of cognitive-behavioral therapy: behavioral activation and mindfulness-based cognitive therapy. *Curr Psychiatry Rep*. 2009; 11(6):453-8.

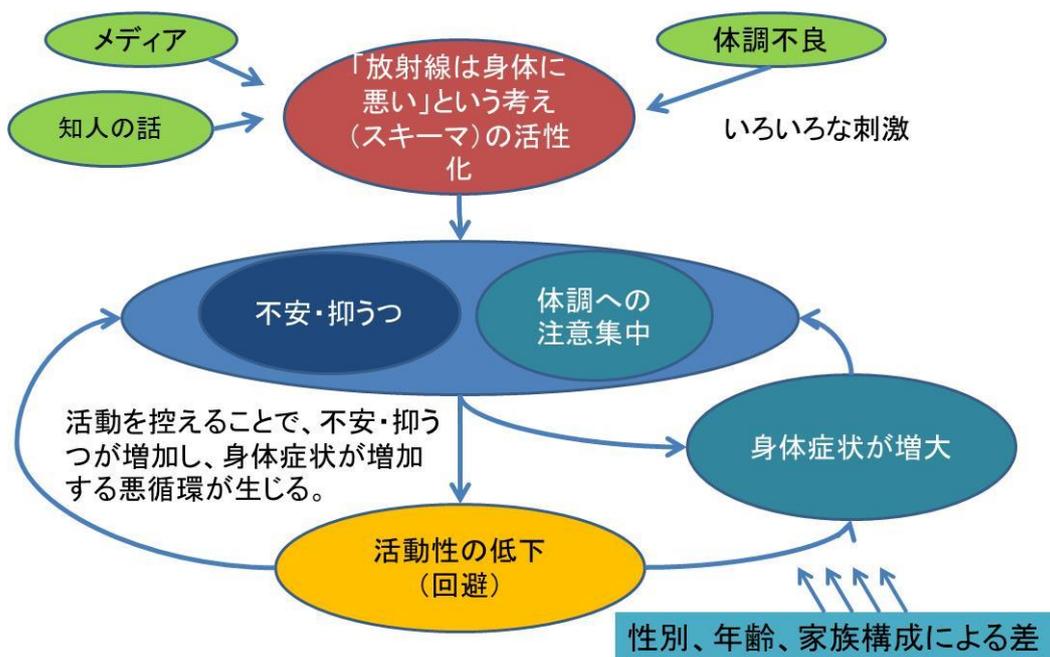


図1 放射線健康不安による心身不調モデル（仮説）の検証

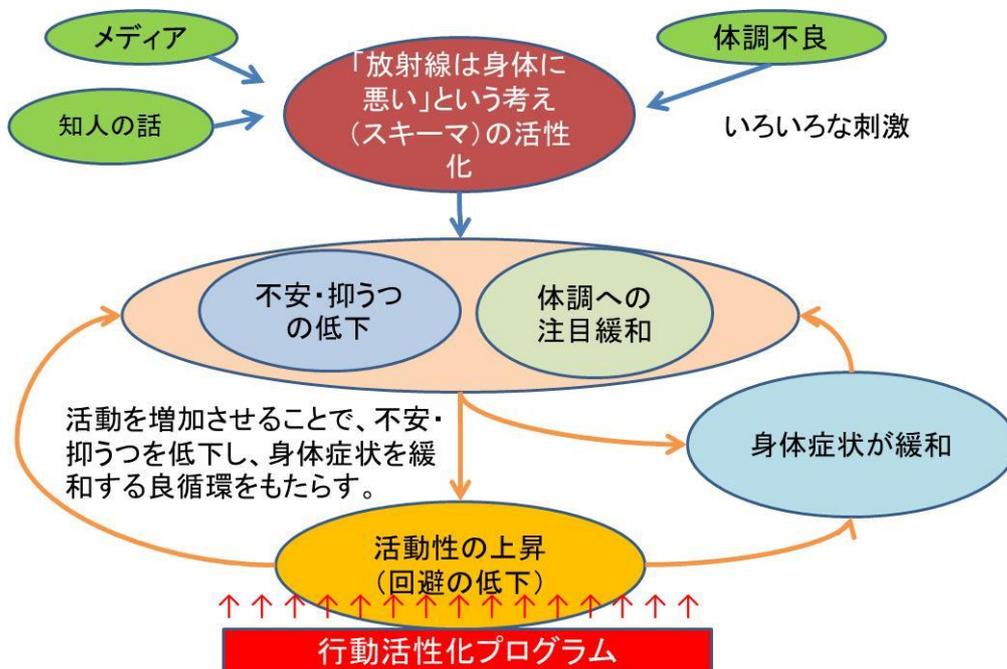


図2 行動活性化が放射線健康不安による心身不調を改善するメカニズム（仮説）

表 1 福島市一般住民における放射線不安、精神健康、震災後の活動低下、身体症状の性別、年齢別得点分布：有効回答者 141 名

	放射線健康不安			精神健康(K6)			震災後の活動変化			身体症状*		
	人数	平均値	(標準偏差)	人数	平均値	(標準偏差)	人数	平均値	(標準偏差)	人数	平均値	(標準偏差)
合計	141	17.4	(4.2)	137	4.7	(5.8)	142	-4.6	(5.2)	95	16.5	(4.9)
性別												
男性	49	17.8	(4.4)	49	3.5	(5.1)	47	-4.7	(5.2)	32	16.2	(4.8)
女性	92	17.2	(4.2)	88	5.4	(6.1)	95	-4.6	(5.2)	63	16.6	(5.0)
		p=0.196			p=0.411			p=0.940			p=0.666	
年齢層												
20-39 歳	32	18.4	(4.6)	32	6.9	(4.6)	32	-3.5	(4.6)	17	18.9	(4.6)
40-54 歳	34	17.6	(3.7)	32	3.3	(4.1)	35	-3.8	(4.6)	21	17.8	(4.5)
55-64 歳	37	17.8	(3.8)	36	3.8	(4.4)	39	-5.7	(5.1)	27	15.7	(4.8)
65 歳以上	38	16.1	(4.6)	37	4.8	(6.7)	36	-5.3	(5.6)	30	14.9	(5.2)
		p=0.123			p=0.055			p=0.197			p=0.019	

* 身体症状は、現在治療中の疾患がある者に対してのみ質問されている。

表2 福島市一般住民における放射線健康不安の項目別回答分布：回答者 145 名

	とても思う		やや思う		あまりそう思わ ない		全くそう思わな い		無回答	
	人数	(%)	人数	(%)	人数	(%)	人数	(%)	人数	(%)
1 将来、放射線の影響で深刻な病気にかかる のではないかと心配している。	34	23.4	63	43.4	42	29.0	4	2.8	2	1.4
2 体の具合が悪くなるたびに、放射線を浴び たせいではないかと不安になる。	14	9.7	32	22.1	70	48.3	26	17.9	3	2.1
3 放射線の影響が子どもや孫など次の世代に 遺伝するのではないかと心配している。	58	40.0	54	37.2	24	16.6	7	4.8	2	1.4
4 原子力発電所の事故に関する報道を見る と、とても不安、または不快になる。	72	49.7	55	37.9	10	6.9	6	4.1	2	1.4
5 自分が福島県に住んでいたために、他の人 から差別された(不公平な扱いを受けた)経 験がある。	15	10.3	30	20.7	43	29.7	54	37.2	3	2.1
6 福島県の住民であることを、なるべく人に 話さないようにしている。	6	4.1	25	17.2	52	35.9	60	41.4	2	1.4
7 放射線が健康に与える影響について、家族 と意見が対立して、もめた経験がある。	9	6.2	32	22.1	43	29.7	59	40.7	2	1.4

表3 福島市一般住民における放射線健康不安尺度の項目および合計得点と各指標とのピアソン相関係数

	放射線健康不安*	精神健康(K6)	震災後の活動変化	身体症状**
	n=141	n=135 - 136	n=139 - 141	n=93- 94
1 将来、放射線の影響で深刻な病気にかかるのではないかと心配している。	0.606	0.241 (p=0.005)	-0.108 (p=0.203)	0.271 (p=0.008)
2 体の具合が悪くなるたびに、放射線を浴びたせいではないかと不安になる。	0.591	0.243 (p=0.004)	-0.269 (p=0.001)	0.239 (p=0.020)
3 放射線の影響が子どもや孫など次の世代に遺伝するのではないかと心配している。	0.586	0.304 (p<0.001)	-0.133 (p=0.117)	0.340 (p=0.001)
4 原子力発電所の事故に関する報道を見ると、とても不安、または不快になる。	0.515	0.238 (p=0.005)	-0.163 (p=0.053)	0.261 (p=0.011)
5 自分が福島県に住んでいたために、他の人から差別された(不公平な扱いを受けた)経験がある。	0.573	0.203 (p=0.018)	-0.171 (p=0.043)	0.093 (p=0.374)
6 福島県の住民であることを、なるべく人に話さないようにしている。	0.512	0.300 (p<0.001)	-0.173 (p=0.040)	0.216 (p=0.036)
7 放射線が健康に与える影響について、家族と意見が対立して、もめた経験がある。	0.478	0.160 (p=0.062)	-0.092 (p=0.277)	0.015 (p=0.890)
放射線健康不安合計得点		0.346 (p<0.001)	-0.233 (p=0.006)	0.282 (p=0.006)

* 項目合計相関係数(各項目を削除した合計点数とその項目との相関)を示した。放射線健康不安尺度(合計得点)のクロンバック α 係数: 0.812。

** 身体症状は、現在治療中の疾患がある者に対してのみ質問されている。