

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。初年度の研究では、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報告した。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（ $P=0.011$ ）。本年度は非がんリスクについて検討を行った。累積線量と非がん疾患死亡率には関連が見られなかった。死因別の解析は、現在、注目を集めている循環器疾患を中心に行った。循環器疾患（心疾患、脳卒中を含む）と累積線量の間に関連は認められなかった。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。これらの評価のために、分担研究者である床次眞司は、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評価を行った。

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、固形がん罹患、非がん死亡

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・長崎の原爆被爆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¹⁾、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。

インドの高自然放射線地域住民のコホート調査結果によると、固形がん罹患の線量当たりの過剰相対リスクは $-0.13/\text{Gy}$ (95% CI: 0.58, 0.46)であった²⁾。初年度の調査では、この値が原爆被爆者の固形がんリスクと比較して統計学的に有意に低いことを明らかにした ($P=0.011$)。また、インドでの調査の追跡期間を5年間延長したが、推定値は殆ど変わらなかったが、95%信頼区間は狭くなり、原爆被爆者から得られている線量当たりの過剰相対リスクとの違いはさらに明確となった。なお、中国の高自然放射線地域での研究でも、インドでの研究結果とほぼ同様の結果が得られている³⁾。

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⁴⁾。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、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^{5,6)}。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⁷⁾。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 $0.14/\text{Gy}$ (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。

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。また、白血病リスク、非がんリスクに関する検討も必要である。

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・高線量率と異なるか(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、非がん疾患死亡)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非がん死亡率調査を Nair らの報告²⁾より5年間延長し、2010年末までの非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、グループデータのポアソン解析を用いて検討した。線量当たりの過剰相対リスクの計算では、直線閾値なしモデルを用いた。線量は結腸線量を用い、10年のラグを仮定して累積線量を計算した。性、到達年齢、観察期間、宗教、教育、職業、喫煙・飲酒を調整して解析を行った。

中国広東省陽江地域の死亡率調査を Tao らの報告³⁾より4年間延長し、2002年までの非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グループデータのポアソン解析を用いて検討した。線量当たりの過剰相対リスクの計算では、直線閾値なしモデルを用いた。線量は結腸線量を用い、10年のラグを仮定して累積線量を計算した。性、到達年齢、観察期間で層別して解析を行った。

インド・ケララ州カルナガパリ地区内の12パンチャイの全てを網羅するように走行ルートを計画し、走行サーベイによる外部被ばく線量の評価を行った。また、内部被ばく線量調査として125軒の家屋に設置したラドン、トロンおよびトロン子孫核種濃度測定器を回収して分析を行った。さらに、隠膳方式により採取された食事試料中の放射性核種含有量を、ガンマ線スペクトロメトリー法により測定した。陽江地域においては、現地を訪問してラドン、トロンおよびトロン子孫核種濃度を測定し、外部および内部被ばく線量の評価を行った。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追跡調査を Nair らの報告²⁾より5年間延長し、2010年末までの非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。がん以外の疾患の死亡は11,917例で、線量当たりの過剰相対リスクは0.01(SE=0.09, P>0.5)であった。循環器疾患死亡は3,736例で、線量当たりの過剰相対リスクは-0.04(SE=0.16, P>0.5)、

心疾患死亡は 3,133 例で、線量当たりの過剰相対リスクは-0.13 (SE=0.16, P=0.411)、リウマチ性心疾患死亡は 626 例で、線量当たりの過剰相対リスクは 0.43 (SE=0.44, P=0.327)、虚血性心疾患死亡は 75 で、線量当たりの過剰相対リスクは 0.61 (SE=1.466, P>0.5)、心不全による死亡は 234 例で、線量当たりの過剰相対リスクは 0.86 (SE=0.89, P=0.337)であった。脳卒中死亡は 73 例で線量当たりの過剰相対リスクは-0.41 (SE=1.00、P>0.5)、であった。なお、過剰相対リスクの推定値は予備的な計算で得られたものである。解析では直線モデルを用いたが、線量に関する二次の項を追加することによるモデルの適合性を示唆する結果は得られなかった。また、線量の累積に関するラグを 5 年または 15 年に変更しても、結果に大きな違いは見られなかった。

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³⁾より 4 年間延長し、2002 年末までの非がん死亡率とデータを用いて、非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。循環器疾患死亡は 2,773 例で、線量当たりの過剰相対リスクは 0.40 (95%CI=-0.80, 1.59, P>0.5)、虚血性心疾患死亡は 297 例で、線量当たりの過剰相対リスクは -0.14 (95%CI=-3.83, 3.55, P>0.5)、脳卒中死亡は 1,514 例で、線量当たりの過剰相対リスクは 0.35 (95%CI=-1.23, 1.93, P>0.5) であった。なお、過剰相対リスクの推定値は予備的な計算で得られたものである。解析では直線モデルを用いたが、線量に関する二次の項を追加することによるモデルの適合性を示唆する結果は得られなかった。また、線量の累積に関するラグを 5 年または 15 年に変更しても、結果に大きな違いは見られなかった。

3) 線量測定の結果

3-1. インド・ケララ州・カルナガパリ地区

走行サーベイによる外部被ばく線量の評価：カルナガパリ地区内の 12 パンチャイにおいて走行サーベイを行い、外部被ばく線量を評価した。空気カーマ率の等値線図の作成を行い、その結果より、比較的高い空気カーマ率は海岸沿いに分布していることが確認された。空気カーマ率の最大値は Chavara パンチャイ内で観測され、その値は 2.0 $\mu\text{Gy/h}$ であった。また、Neendakara パンチャイ内においても 1.9 $\mu\text{Gy/h}$ の空気カーマ率が観測された。また、年間実効線量の最大値は Chavara パンチャイであり、その値は 14 mSv/y であった。また、平均値では Neendakara パンチャイが最も高く、2.5 mSv/y であった。Alappad パンチャイも平均的にみれば 2.1 mSv とカルナガパリ地区の中では高かった。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：吸入摂取による内部被ばくの評価に関しては、125 軒の家屋を対象にラドン、トロン、およびトロン子孫核種濃度を測定した。ラドン濃度については 125 軒中 35 軒、トロン濃度については 125 軒中 9 軒、トロン子孫核種濃度については 125 軒中 15 軒が検出下限値未満であった。それぞれの濃度は、平均値が 6.1 Bq/m³、50 Bq/m³ および 2.22 Bq/m³ を示し、ラドン濃度は概して低かった。これらの濃度に基づくと、ラドンおよびトロンによる内部被ばくの年間実効線量は、それぞれを 0.2 mSv および 0.8 mSv と評価

され、トロンによる寄与が高い。他方、経口摂取による内部被ばくの評価に関しては、隠善方式により採取された食事試料の内 4 サンプルについて放射性核種含有量の測定がなされた。ウラン系列元素およびトリウム系列元素の濃度は、それぞれ 5.6 から 8.0 Bq/kg および 6.0 から 29.6 Bq/kg の値をとり、1 食あたりの預託実効線量（平均値）は、それぞれ 0.8×10^{-4} mSv および 3.5×10^{-4} mSv と評価された。結果の詳細は、分担研究者の報告書に示した。

3-2. 中国・広東省・陽江地域

内部および外部被ばく線量の評価：陽江地域内の 8 家屋においてラドン、トロン、トロン子孫核種濃度および空間線量率の測定を行い、それらによる内部被ばくおよび外部被ばくの線量を評価した。内部被ばく線量は、ラドンによるものが 1.6 mSv、トロンによるものが 1.4 mSv と、両者がほぼ同等の寄与を示した。一方、外部被ばくの線量は 1.5 mSv と評価され、内部被ばく線量と比較して低い値であった。結果の詳細は分担研究者の報告書に示した。

IV 考察

1) コホート研究

インド・ケララ州カルナガバリ・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、自然放射線被ばくによる非がんの過剰死亡は観察されなかった。

原爆被爆生存者の追跡調査結果では、寿命調査集団で循環器疾患死亡率が被ばく線量と関連していると報告されている。しかし、死因を細かく見た場合、関連しているのはリウマチ性心疾患、高血圧性心疾患などであり、虚血性心疾患死亡との関連は明らかでない⁸⁾。2 年ごとに健康診断を行っている成人健康調査集団では被ばく時年齢 40 歳未満の場合に、1968-98 年の機関の心筋梗塞罹患率が被ばく線量と関連していた。被ばく時年齢が高い群で有意な関連が見られていない⁹⁾。また、脳卒中死亡率は被ばく線量とともに増加し、線量が高い群で線量当たりの過剰相対リスクが高く、線量にかんして線形のモデルよりも線形二次モデルの当てはまりが良いとの結果が寿命調査集団の死亡率の解析から得られている⁸⁾。なお、成人健康調査集団では、高血圧の罹患率が線量とともに増加していた⁹⁾。しかし、血圧が高く、脳卒中が多いということは、高血圧などの治療を受けていた可能性が高いが、治療の状況は解析で十分には考慮されていない（治療の状況が、高血圧の罹患率、脳血管疾患の死亡率に与える影響は、放射線影響に比べてはるかに大きい可能性が高い）。また、観察された過剰リスクが放射線被ばくによる直接的な生物学的影響によるものか、あるいは被爆による心理的ストレスなどによるものかなどは明確でない。以上のごとく、これまでの原爆被爆生存者の追跡調査で得られた循環器疾患と被ばく線量との関連は必ずしも説得力のあるものではない。したがって、原爆被爆者の調査で得られた循環器疾患死亡等の線量当たりのリスクをインドや中国の高自然放射線地域住民で得られた結果と比較

するのは時期尚早ではないかと思われる。

Little らは、循環器疾患リスクと放射線被ばくの関連を検討するためのメタ解析を行った¹⁰⁾。解析に含まれたのは、原爆被爆者の追跡調査結果（寿命集団の死亡追跡調査、成人健康調査集団の罹患調査）、カナダのエルドラド鉱山の鉱夫の追跡調査結果、フランス電力公社の従業員の追跡調査結果、IARC の 15 か国解析結果、英国の全国放射線作業登録者の追跡調査結果、マヤック工場作業員、チェルノブイリの緊急作業従事者などである。彼らは、低・中線量の放射線被ばくが循環器疾患と関連していると結論している。しかし、どの調査でも喫煙の影響が十分に考慮されていないなど、放射線以外の影響に関する調整が不十分であり、そのような調査結果を集めてメタ解析を行っても、循環器疾患が放射線被ばくと関連しているかどうかに関する結論を下せるか疑問である¹¹⁾。

2) 線量測定

今年度の調査から、カルナガパリ地区におけるラドン・トロンによる内部被ばくは、外部被ばくと比較して小さいものであった。今後は、各パンチャイにおける内部被ばく線量と外部被ばく線量の比較を行う。さらに、ラドンおよびトロン子孫核種の非付着成分比の結果より、線量換算係数が家屋ごとに異なると予想されることから、浮遊塵濃度や浮遊塵粒径分布のデータを収集して線量換算係数を評価する必要がある。これらに加えて、高空間線量率や高ラドン・トロン濃度の成因も検討しなければならないであろう。これらにより、線量を構築するための情報を収集し、総合的な線量評価を行っていく必要がある。また、中国広東省陽江地域におけるラドン・トロンによる内部被ばくは、外部被ばくと同等、もしくは高いものであった。しかし、今年度の調査は、対象家屋が 8 つと少なく、測定期間も短かった。適切に線量を評価するためには、調査家屋数を拡大し、積算型測定器を設置するなどカルナガパリ地区と同様な調査の実施を検討する必要がある。

V 結論

本研究の初年度（2012 年度）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低いことを示唆している。本年度は非がん死亡率との関連を検討したが、自然放射線被ばくによる過剰な死亡は認められなかった。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がん罹患・死亡、非がん疾患

死亡率の関連をインド・ケララ州カルナガパリでの 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者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(飲料水を含む)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。また、位置情報を基に外部被ばくおよび内部被ばく線量を整理し、自然放射性核種に由来する被ばくの総合的な評価を行う。

引用文献

- 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.
- 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.
- 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.
- Akiba S. Cancer risk associated with low dose and low dose-rate ionizing radiation exposure. *Genes and Environment.* 2013;35:80-87.
- 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.
- 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.
- 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
- Shimizu Y. et al. Radiation exposure and circulatory disease risk:Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003. *BMJ* 2010; 340;b5349.
- Yamada et al. Non-cancer disease incidence in atomic bomb survivors, 1958-98. *Radiat Res.* 2004;161:622-632.
- Little MO et al. systematic review and meta-analysis of circulatory disease from exposure to low-level ionizing radiation and estimates of potential population mortality risks. *Environ Health Perspect.* 120: 1503-1511.
- Akiba S. Commentary: circulatory disease risk after low level radiation exposure. *REM.* 2013;2:13-22.

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^{*1}, Shinji Tokonami^{*2}

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

**2 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, circulatory diseases

Abstract

The purpose of this study is to examine whether the 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 our study conducted in the fiscal year 2012, 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, China. In addition, this study has shown that the Indian estimate of excess relative risk per gray of cancer excluding leukemia is significantly lower ($P=0.011$) than that of solid cancer among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki. This year, similar analyses of non-cancer diseases were conducted. Cumulative radiation dose was not related to the mortality of non-cancer disease mortality. Cause-specific analysis was focused on circulatory diseases, which are the topic of interest. Cumulative radiation dose was not related to the mortality of circulatory diseases, including heart diseases and stroke. In order to evaluate the relationship between health risk and exposure to natural radiation, it is 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 conducted those surveys involved in dosimetry.

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、カルナガパリではラドン・トロンとその壊変生成核種濃度を125家屋において測定し、それらによる内部被ばく線量を評価した。さらに、食事試料を収集、放射性物質含有量を測定し、経口摂取による被ばくの線量を評価した。また、自動車走行サーベイにより空間線量率マップを作成し、外部被ばく線量を評価した。陽江地域では、ラドン・トロンとその壊変生成核種濃度および空間線量率を8家屋で測定し、内部被ばく線量および外部被ばく線量を調査した。

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）、大森康孝（放射線医学総合研究所放射線防護研究センター規制科学研究プログラム）、横田ひろみ（弘前大学大学院保健学研究科健康支援科学領域）

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・長崎の原爆被爆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¹⁾、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・高線量率と異なるか（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地区内の 12 パンチャイの全てを網羅するように走行ルートを計画し、走行サーベイによる外部被ばく線量の評価を行った。本調査の走行ルートを図 1 に示す。調査は、低レベルのパンチャイとして、Oachira、Thevalakkara、Thodiyoor、Thazhava、中レベルのパンチャイとして Thekkumbhagam、Karunagappally、K. S. Puram、Clappana、高レベルのパンチャイとして Chavara、Neendakara、Panmana、Alappad において実施した。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。

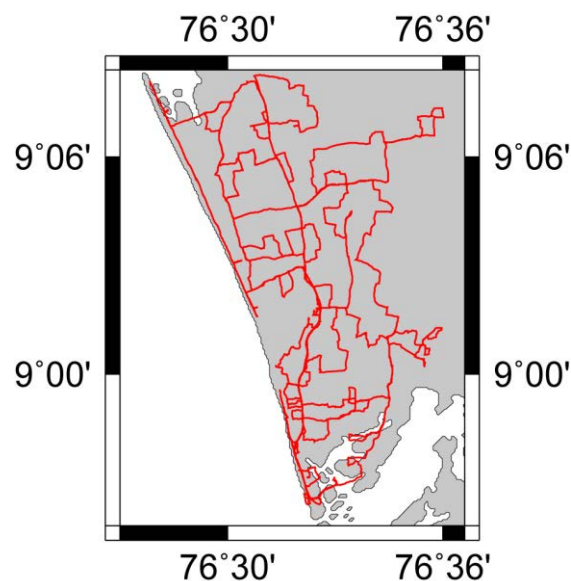


図 1 ケララ州カルナガパリ地区内における走行ルート

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 γ 線の遮蔽効果を評価する必要がある。今回の調査では、車内計数値から車外計数値に換算するためカルナガパリ地区内の34ヶ所において、車内外でのそれぞれ2分間の測定を行った。さらに、30秒間の測定で得られるガンマ線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ため、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。換算係数の算出にはカルナガパリ地区内の35ヶ所の車外において5～15分間の測定を行った。測定時間はポケットサーベイメータ(PDR-111、日立アロカメディカル株式会社)による実測値を参考にして決定した。なお、屋外におけるガンマ線波高分布の取得はいずれも地表面から1mの高さにおいて実施した。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9月23日から27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。

2)内部被ばく線量評価

内部被ばくは吸入摂取によるものと経口摂取によるものがある。吸入摂取は、ラドン・トロン²²²の吸入、経口摂取としては飲食物の摂取が主要な要因として考えられる。

吸入摂取による内部被ばくを評価するために、インド・ケララ州では、120軒を超える家屋にラドン・トロン²²²弁別測定器を設置し、ラドンおよびトロン²²²濃度を測定した。測定器は、分担研究者が開発し、商用化されたRaduet (Radosys Ltd., ハンガリー)を使用した。さらに、トロン²²²に起因する内部被ばくをより正確に評価するため、トロン²²²子孫核種濃度測定器を設置した。この測定器も、前述の測定器と同様に、分担研究者が開発したものである。これらの測定器は、家屋内で曝露後、放射線医学総合研究所に返送され、同所において濃度評価がなされた。

経口摂取による被ばくを評価するために、同州から食事試料を入手した。これは、影膳方式により採取され、現地協力者により凍結乾燥させ灰化处理されたものである。食事試料をU-8分析容器に密封して40日経過した後、高純度ゲルマニウム半導体検出器を用いたガンマ線スペクトロメトリー法により試料中のウランおよびトリウム含有量を測定した。

ラドンやトロン²²²に起因する線量は、屋内空気に浮遊するエアロゾル(浮遊塵)の濃度に依存する。また、高自然放射線地域では浮遊塵中にウランやトリウムが含まれていることがあり、それを摂取することによる被ばくも考えられる。そのため、分担研究者らは2013年9月から10月に同州を訪問し、前述の外部被ばく線量の調査と併せてそれらの調査を行った。本調査では、コンデンセーション・パーティクル・カウンタ(Model 3800、日本カノマックス、日本)を用いて浮遊塵濃度を測定し、ラドンおよびトロン²²²子孫核種の内、浮遊塵に付着していない核種の比(非付着成分比)を評価した。その計算は、Porstendörfer³⁾により示された以下の式に基づいた。

$$f_{p, Rn} = 414/Z \quad (1)$$

$$f_{p, Tn} = 150/Z \quad (2)$$

ここで、 $f_{p, Rn}$ 、 $f_{p, Tn}$ および Z は、それぞれラドン子孫核種の非付着成分比、トロン²²²子孫核種の非付着成分比および浮遊塵濃度(粒径:0.015-1 μ m)を表す。さらに、分級型捕集装置(カスケードインパクト)を用いて浮遊塵を捕集し、ウランおよびトリウム含有量を測定した。ウランおよびトリウム含有量の測定には、誘導結合プラズマ質量分析計(Agilent-7500、Agilent Technologies、米国)を使用した。

3) 外部および内部被ばく線量評価のための予備調査（中国・広東省・陽江）

また、分担研究者らは、2014年1月に中国・広東省・陽江を訪問した。同地は、インド・ケララ州と同様に高自然放射線地域に属する。本調査では、ラドン、トロンおよびトロン子孫核種濃度をアクティブ型の手法を用いて評価した。ラドンおよびトロン濃度の測定には、静電捕集型ラドン・トロン弁別測定器 Rad7 (DurrIDGE Co. Inc., 米国) を使用した。さらに、トロン子孫核種濃度の測定には、分担研究者が開発したフィルタ捕集と固体飛跡検出器 CR-39 を組み合わせた方法を採用した。また、空間線量率を CsI(Tl)シンチレーションサーベイメータ (PDR-111、日立アロカメディカル株式会社) により測定し、外部被ばく線量を評価した。

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

カルナガパリ地区内の 34 か所において実施した車内外の計数率の比は 1.47 であった。この値は既報の範囲内であった。さらに、35 ヶ所における測定結果より、計数率から空気カーマ率への換算係数は 0.00234 (nGy/h/cpm) と評価された。したがって、車内で得られた 30 秒間の計数値を n_{in} とすると、車外の地表面から 1 m の高さにおける空気カーマ率 K_{out} (nGy/h) は (3) 式によって求められる。

$$K_{out} = 2N_{in} (\text{cpm}) \times 1.47 \times 0.00234 (\text{nGy/h/cpm}) \quad (3)$$

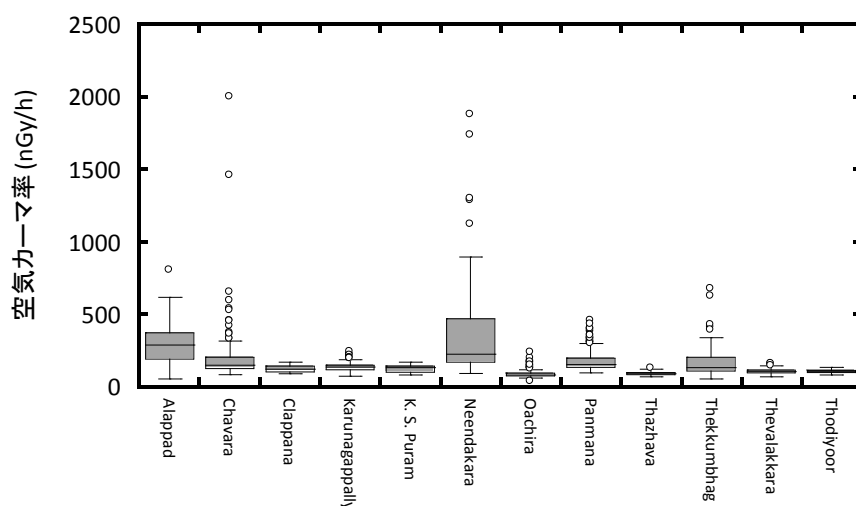


図 2 各パンチャイの空気カーマ率

図 2 に各パンチャイにおける空気カーマ率を箱髭図で示す。特に高レベルのパンチャイでは空気カーマ率のバラツキが大きかった。これは、高レベルのパンチャイでは局所的に高い地域が存在し、その結果、空気カーマ率の分布が均一ではないことを示唆している。図 3 にカルナガパリ地区の空気カーマ率の等値線図を示す。図 3 からわかるように、比較的高い空気カーマ率は海岸沿いに分布していた。空気カーマ率の最大値は Chavara パンチャイ内で観測され、その値は 2.0 $\mu\text{Gy/h}$ であった。また、Neendakara パンチャイ内においても 1.9 $\mu\text{Gy/h}$ の空気カーマ率が観測された。いずれも、モナザイトを含んでいると思われる砂上で観測された。

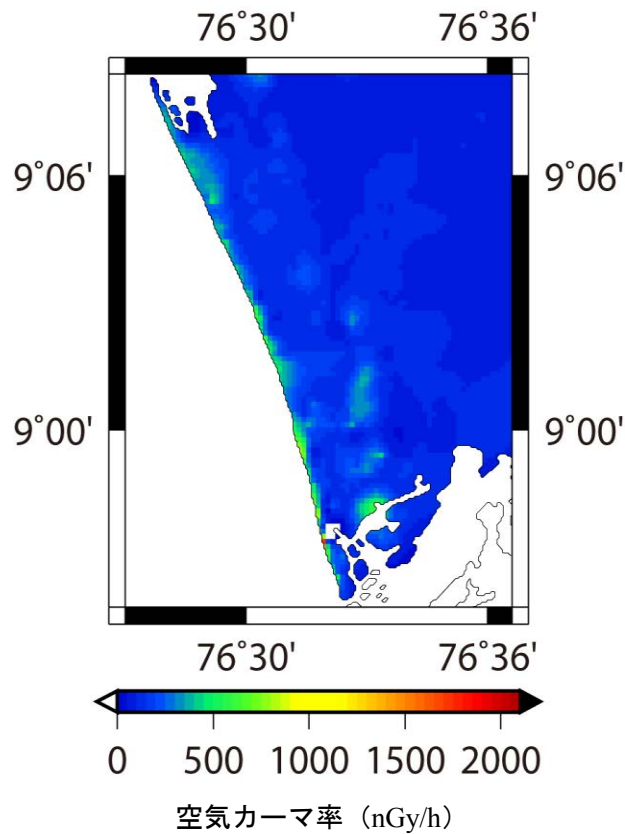


図3 カルナガパリ地区の空気カーマ率の等値線図

表1に各パンチャイの年間実効線量を示す。ここでは、評価手法を単純にするため、空気カーマから実効線量への換算係数を0.8 (Sv/Gy)、1年間を8760時間(24時間×365日)として屋外の空気カーマ率のみで算出した。年間実効線量の最大値はChavaraパンチャイであり、その値は14 mSv/yであった。また、平均値ではNeendakaraパンチャイが最も高く、2.5 mSv/yであった。Alappadパンチャイも平均的にみれば2.1 mSvとカルナガパリ地区の中では高かった。

表1 各パンチャイの年間実効線量のまとめ

パンチャイ	全データ数 (定点データ数)	平均値 (mSv/y)	最大値 (mSv/y)	最小値 (mSv/y)	中央値 (mSv/y)	放射線レベル
Chavara	156 (9)	1.4	14	0.61	1.1	高レベル
Thekkumbhagam	112 (0)	1.2	4.8	0.40	0.94	中レベル
Thevalakkara	210 (5)	0.77	1.1	0.52	0.76	低レベル
Neendakara	125 (7)	2.5	13	0.67	1.6	高レベル
Panmana	221 (6)	1.3	3.2	0.70	1.2	高レベル
Alappad	136 (3)	2.1	5.6	0.42	2.0	高レベル
Karunagappally	112 (0)	0.99	1.7	0.54	1.0	中レベル
Thodiyoor	109 (0)	0.76	1.0	0.59	0.76	低レベル
Thazhava	138 (0)	0.67	0.92	0.52	0.65	低レベル
K. S. Puram	74 (0)	0.90	1.2	0.59	0.94	中レベル

Clappana	50 (0)	0.89	1.2	0.64	0.88	中レベル
Oachira	115 (5)	0.67	1.7	0.27	0.60	低レベル

2) 内部被ばく線量評価

125軒の家屋において得られたラドン、トロンおよびトロン子孫核種濃度の頻度分布を図4、5および6に示す。ラドン濃度は、125軒中35軒が検出下限値未満であり、検出下限値を超えた値の大部分は10 Bq/m³以下であった。また、トロン濃度については125軒中116軒から検出下限値を超える値が得られた。その濃度は、20-30 Bq/m³の範囲で家屋数が最大を示しているものの、100 Bq/m³を超える家屋が10軒程度存在した。トロン子孫核種濃度は、平衡等価トロン濃度として評価した。適切に濃度評価がなされたのは125軒中115軒で、その濃度は0.5-3.0 Bq/m³が大部分を占める。ラドン、トロンおよびトロン子孫核種濃度の詳細な分析値を表2にまとめた。

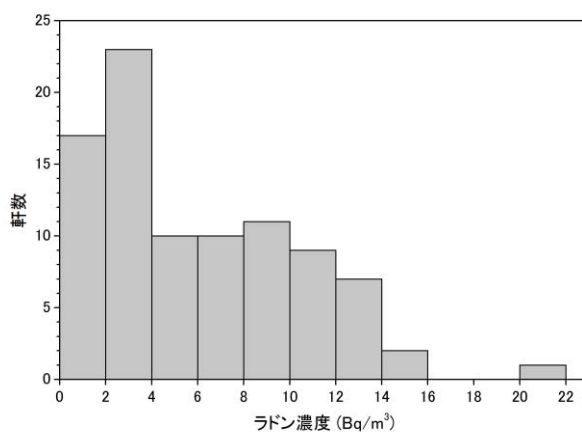


図4 屋内ラドン濃度に関する頻度分布

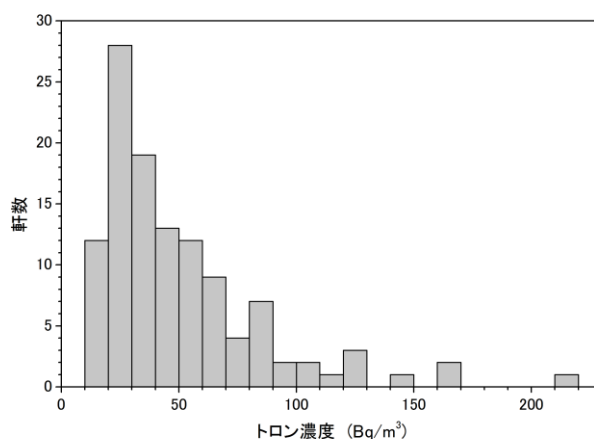


図5 屋内トロン濃度に関する頻度分布

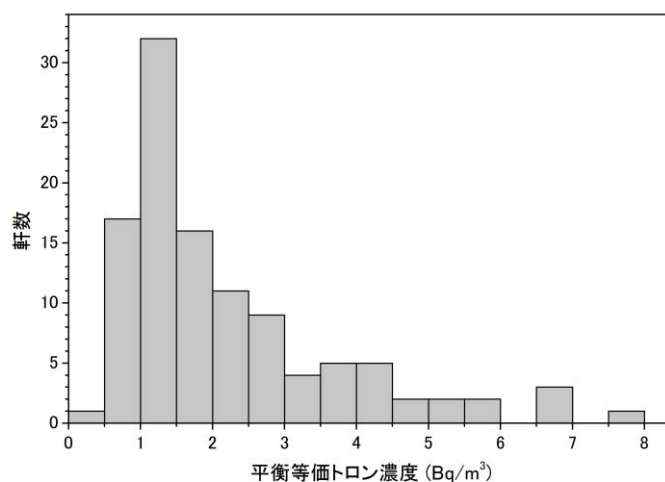


図6 屋内トロン子孫核種濃度に関する頻度分布

表2 ラドン、トロンおよびトロン子孫核種濃度の分析値（総家屋数：125軒）

核種	家屋 (NA ¹)	平均値 (Bq/m ³)	中央値 (Bq/m ³)	範囲 (Bq/m ³)
ラドン	90 (35)	6.1 ± 4.3	5	1-21
トロン	116 (9)	50 ± 35	39	11-212
トロン子孫核種	110 (15)	2.22 ± 1.54	1.59	0.36-8.00

¹ NA: 検出下限値未満あるいは濃度評価せず

分担研究者らの現地調査により得られた家屋内の浮遊塵のデータを図7および8に示す。

図7には、屋内に浮遊するラドンおよびトロン子孫核種の非付着成分比を家屋ごとにまとめた。非付着成分比は家屋ごとに異なり、ラドン子孫核種については0.004から0.22(平均値:0.06 ± 0.06)、トロン子孫核種については0.002から0.08(平均値:0.02 ± 0.02)の範囲の値をとった。非付着成分比は浮遊塵濃度に依存し、濃度が高いほど非付着成分比は低い。

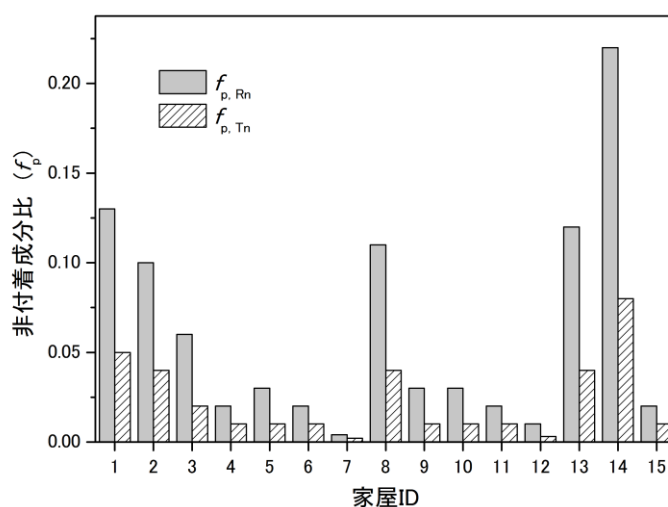


図7 屋内に浮遊するラドンおよびトロン子孫核種の非付着成分比

図8には、浮遊塵におけるウランおよびトリウム含有量の粒径分布を示す。3家屋からデータが得られたが、家屋ごとに濃度および粒径分布が異なる。トリウムについては、中粒の浮遊塵（粒径：1-2.5 μm）に比較的多く含まれているように見える。

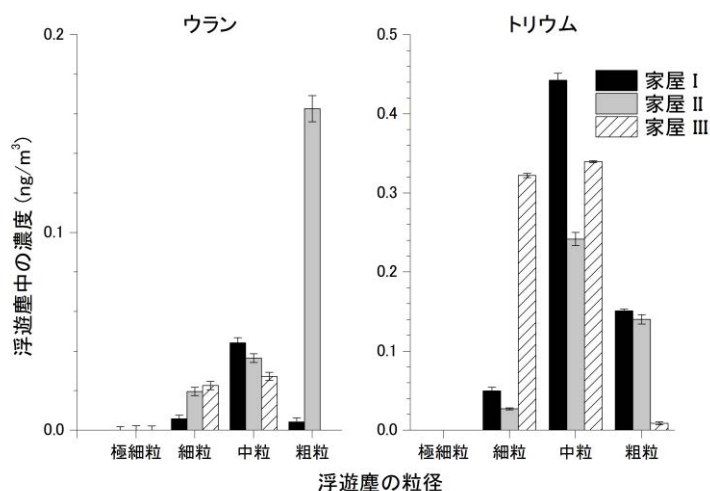


図8 浮遊塵中のウランおよびトリウム含有量の粒径分布

食事試料については、現地協力者により17サンプルを得た。その内、隠膳方式により採取された食事試料は7サンプルである。現時点で4サンプルについて、ガンマ線スペクトロメトリー法によるウランおよびトリウム含有量の測定を終えた。その結果を図9に示す。ウラン系元素の含有量は5.6から8.0 Bq/kgの範囲の値を示し、採取された試料の間で顕著な差異は認められなかった。一方、トリウム系元素は、6.0から29.6 Bq/kgと広範な値をとり、1サンプルにおいて比較的高い濃度を示した。

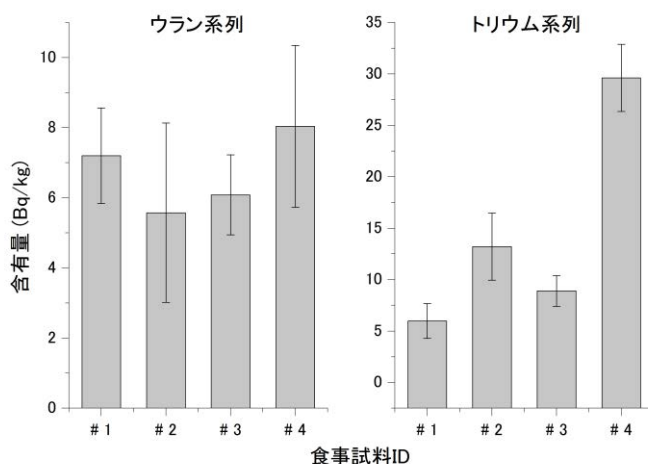


図9 食事試料中のウランおよびトリウム系列元素の含有量

3) 外部および内部被ばく線量評価（中国・広東省・陽江）

分担研究者らの現地調査で得られたラドン、トロンおよびトロン子孫核種濃度の結果を図 10 に示す。図から明らかなように、家屋によりそれぞれの濃度は大きく異なる。ラドン濃度の最小値および最大値は、それぞれ 19 および 98 Bq/m³ であった。一方、トロン濃度は、最小値が 6 Bq/m³、最大値が 380 Bq/m³ と、調査家屋内で 2 桁程度の差が認められた。この傾向はトロン子孫核種濃度でも認められ、最小値は 0.4 Bq/m³、最大値は 10.3 Bq/m³ であった。図 10 には、空間線量率の結果を併せて示す。屋内、屋外ともに、0.1 から 0.5 μSv/h の範囲の値を示した。家屋ごとに比較すると、屋内の空間線量率は屋外と同等、もしくは高かった。

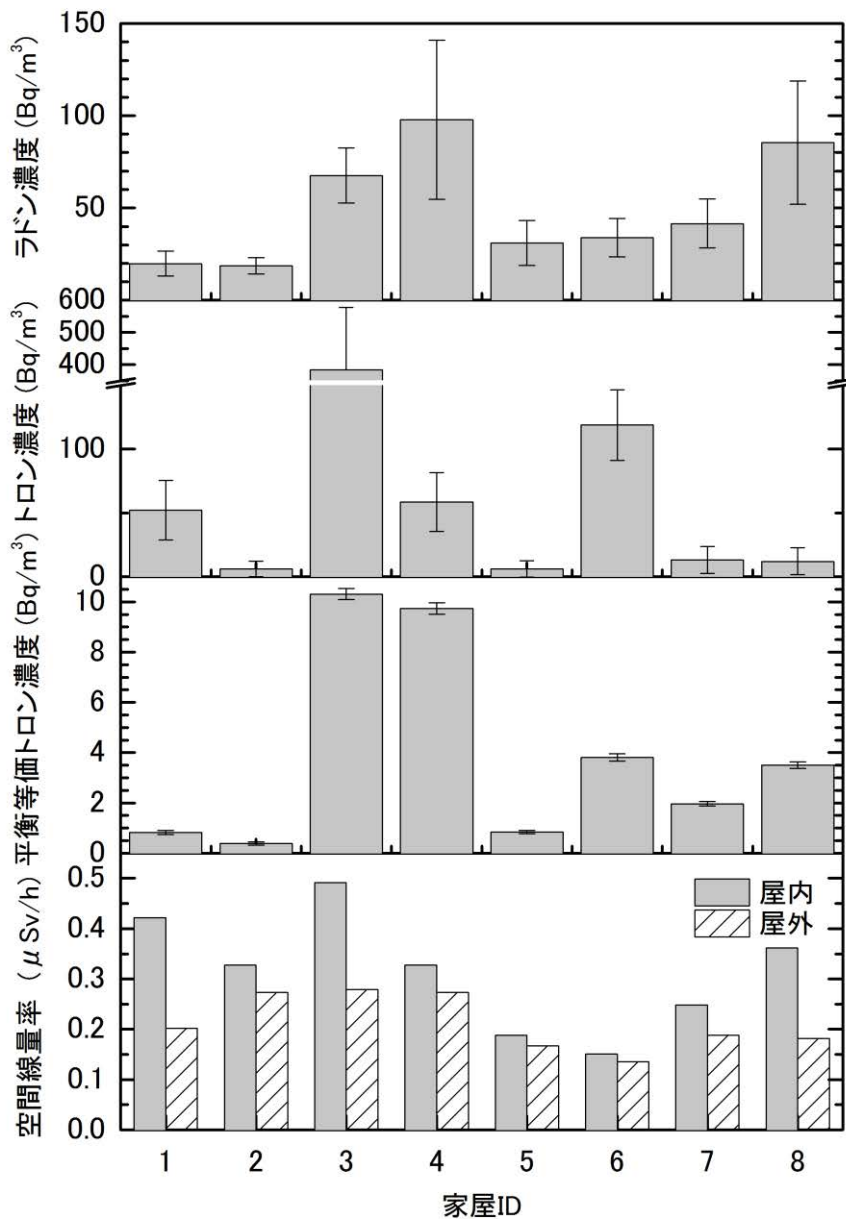


図 10 ラドン濃度、トロン濃度、トロン子孫核種濃度および空間線量率に関する頻度分布

IV 考察

1) インド・カルナガパリ地区での走行サーベイによる外部被ばく線量の評価

昨年と比べ、今年度の調査では遮蔽係数および線量換算係数を評価するために十分な定点観測を行うことができた。さらに、カルナガパリ地区全域を網羅するように走行ルートを計画したため、全域の空気カーマ率の等値線図の作成を行うことができ、対象地区全員の空気カーマ率の分布を把握することができた。ケララ州における高自然放射線地域の放射線分布図の報告がないことから、本研究における成果は貴重な資料になり得ると思われる。

2) インド・ケララ州での内部被ばく線量の評価

ラドン濃度は概して低く、平均値で 6.1 Bq/m^3 という結果であった。一方、トロン濃度は平均値 50 Bq/m^3 と、ラドン濃度と比較して桁高い値を示した。トロン子孫核種濃度は平均値 2.22 Bq/m^3 であった。本報告書では詳細な記載はしないが、トロン濃度に対するトロン子孫核種濃度の比を示すトロン平衡ファクタは平均で $0.06 (\pm 0.04)$ の値をとり、この値は UNSCEAR 報告書³⁾に記載されている値と調和的である。この平均濃度の環境下において1日中滞在すると仮定すると、ラドンおよび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。

$$D(\text{Rn}) = 6.1 \times 0.4 \times 9 \times 24 \times 365 \div 10^6 = 0.2 \text{ mSv} \quad (4)$$

$$D(\text{Tn}) = 2.22 \times 40 \times 24 \times 365 \div 10^6 = 0.8 \text{ mSv} \quad (5)$$

本評価では、ラドン平衡ファクタは 0.4 を採用し、線量換算係数は UNSCEAR 報告書³⁾ の値（ラドン： $9 \text{ nSv}/(\text{Bq m}^{-3} \text{ h})$ 、トロン： $40 \text{ nSv}/(\text{Bq m}^{-3} \text{ h})$ ）を使用した。なお、分担研究者らの現地調査により、ラドンおよびトロン子孫核種の非付着成分比に依存する線量換算係数が家屋ごとに異なる可能性が示された。今後は、浮遊塵の粒径分布を考慮に入れて線量換算係数の妥当性について検討し、線量評価の高精度化を図っていく必要がある。

経口摂取による内部被ばく線量に関しては、図 9 のデータを基に、ICRP68⁴⁾に記載されている実効線量係数を用いて1食分（ 500 g を仮定）の預託実効線量を評価した。ウラン系列元素およびトリウム系列元素による預託実効線量は、以下のように評価される。

ウラン系列： $0.8 \times 10^{-4} \text{ mSv}$ ($0.5 \times 10^{-4} - 1.1 \times 10^{-4} \text{ mSv}$)

トリウム系列： $3.5 \times 10^{-4} \text{ mSv}$ ($2.1 \times 10^{-4} - 6.3 \times 10^{-4} \text{ mSv}$)

隠膳方式として採取された食事試料が7サンプルと少ないため、今後も現地の研究者と協力して食事試料の採取に努め、線量評価に耐えうるサンプル数を確保することが課題である。

3) 外部および内部被ばく線量評価（中国・広東省・陽江）

前項と同様に家屋内に1日中滞在すると仮定して、家屋ごとに外部および内部被ばく線量を評価すると、その平均値、最大値および最小値は表3のようにまとめられる。

表3 短期間測定による外部および内部被ばく線量の評価¹⁾（家屋数：8）

被ばくの種類	平均値 (mSv)	最大値 (mSv)	最小値 (mSv)
外部被ばく	1.5	2.3	0.7
内部被ばく（吸入）	ラドン	3.1	0.6
	トロン	3.6	0.1
	計	6.5	0.7

¹⁾ 24時間屋内にいたと仮定

本地域では、外部被ばくよりも内部被ばくによる線量が卓越し、トロン線量への寄与はラドンのそれと同等と評価される。本結果は半日程度の短期間の測定により得られたものであるが、ラドン濃度などの日変動を考慮すると、線量は大きく異なる可能性がある。さらに、図 10 で示されたように、家屋ごとに濃度が大きく異なる。これらの点を考慮すると、本地域での内部被ばくの実態を明らかにするためにはインド・ケララ州で実施している調査と同様な調査が必要であろう。また、概して屋外より屋内の空間線量率のほうが高かったが、これはおそらく建材の影響と考えられる。このことは屋内空間線量率測定的重要性を示すものであり、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。

V 結論

今年度の調査から、ケララ州の本調査地域におけるラドン・トロンによる内部被ばくは、外部被ばくと比較して小さいものであった。今後は、各パンチャイにおける内部被ばく線量と外部被ばく線量の比較を行う。さらに、ラドンおよびトロン子孫核種の非付着成分比の結果より、線量換算係数が家屋ごとに異なると予想されることから、浮遊塵濃度や浮遊塵粒径分布のデータを収集して線量換算係数を評価する必要がある。これらに加えて、高空間線量率や高ラドン・トロン濃度の成因も検討しなければならないであろう。これらにより、線量を構築するための情報を収集し、総合的な線量評価を行っていく必要がある。また、中国広東省陽江におけるラドン・トロンによる内部被ばくは、外部被ばくと同等、もしくは高いものであった。しかし、今年度の調査は、対象家屋が 8 つと少なく、測定期間も短かった。適切に線量を評価するためには、調査家屋数を拡大し、積算型測定器を設置するなどケララ州と同様な調査の実施を検討する必要がある。

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) 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（特に飲料水）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。
- (2) 高空間線量率や低空間線量率の場所においてガンマ線のスペクトル測定を行い、空間線量率を支配する核種を同定する。
- (3) 家屋周辺の地表からラドン・トロン散逸率を測定し、それらの核種によるリスクのポテンシャルを散逸率として評価する。

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) Porstendörfer J, Physical parameters and dose factors of the radon and thoron decay products. *Radiat. Prot. Dosim.* 2001;94(4):365-73.
- 3) 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.

- 4) International Commission on Radiological Protection: Dose Coefficient for Intakes of Radionuclides by Workers. ICRP Publication 68, Pergamon Press, Oxford, 1994.

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

Shinji Tokonami^{*1}, Tetsuo Ishikawa^{*2}, Masahiro Hosoda^{*3}, Atsuyuki Sorimachi^{*1},
Yasutaka Omori^{*2}, Hiromi Yokota^{*3}, Sarata K. Sahoo^{*2}, Suminori Akiba^{*4}

^{*1} *Department of Radiation Physics, Institute of Radiation Emergency Medicine, Hirosaki University*

^{*2} *National Institute of Radiological Sciences*

^{*3} *Department of Radiological Life Sciences, Hirosaki University Graduate School of Health Sciences*

^{*4} *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 the principal investigator of this project, 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, China. In this fiscal year, in Karunagapally, radon thoron and its progeny concentrations in 125 dwellings and radionuclides in diet samples were measured to estimate internal exposure. In addition, car-borne survey was conducted to create a gamma-dose-rate distribution map and to evaluate external exposure. In Yangjiang area, short-term measurements of radon thoron and its progeny concentrations and gamma dose rate were made in 8 dwellings to evaluate internal and external exposure.

階層的ゲノミクス解析を基盤とした放射性物質による健康影響の解明

研究者：秋光信佳（東京大学アイソトープ総合センター、教授）

研究要旨

低線量放射線による人体影響は、わが国が今後数十年以上にわたり向き合っていかなければならない深刻な研究課題である。研究を進めるに当たり低線量被ばくの影響は、バックグラウンドの影響を受けやすく、疫学研究や動物実験で検出するのは極めて困難である。しかし、高感度な培養細胞実験系を用いれば、低線量被ばくの影響を検出し、予測することが不可能ではないと思われる。その第一歩として、本研究では、第一に培養正常ヒト細胞を使用した密封セシウム-137 線源によるガンマ線照射（外部照射実験系）と培養液へのセシウム-137 溶液の直接添加による照射（内部照射実験系）を用い影響を検討した。第二に、胎児、小児などへの影響を想定し、低線量外部被ばくの影響への影響を検討した。両実験で使用したセシウム-137 の線量は、コンピューターによるモンテカルロ法を用いて計算した。

最初の実験では、培養正常ヒト細胞を使用し、両曝露方法に対する細胞影響の違いをDNA二本鎖切断で生じる核内フォーカス形成（ γ H2AX と 53BP1 を使用）と遺伝子発現パターン（トランスクリプトーム）を指標に調べた。その結果、120 ミリグレイ以下の被ばくによっても、DNA二本鎖損傷数が線量依存性に増加することを確認し、外部照射と内部照射間での有意な差は認められなかった（ANCOVA法による検定）。次に、発現変動する遺伝子を解析した。1時間～6時間の短時間照射では、内部照射と外部照射で発現量に差が確認された遺伝子は4個であり、いずれも内部照射の方で発現量が低かった。3段階の線量率を用いて72時間照射したところ、発現変動は線量率よりもむしろ照射方法（内部、外部）に依存して変動することが明らかとなった。パスウェイ解析の結果外部照射したものでは、31 ミリグレイ、124 ミリグレイ、496 ミリグレイのいずれの場合にも細胞周期関連遺伝子の発現上昇が観察された。また、31 ミリグレイではインターフェロン関連遺伝子が抑制された。これに対して、内部照射では、39 ミリグレイ、157 ミリグレイ、628 ミリグレイ照射したもので細胞周期に関連する遺伝子の変動はいずれも観察されなかった。

第二に、胎児、小児などへの影響を想定し、低線量外部被ばくの影響を理解するため、神経細胞分化への形態変化及び遺伝子発現変動を調べた。その結果、496 ミリグレイの外部照射によって神経細胞への分化が有意に抑制された。このときに神経分化関連遺伝子の発現変動の生じていることが確認されたが、30 ミリグレイ以下の低線量領域に於いても、これらの神経分化関連遺伝子の軽度の発現変動が生じていた。線量依存的に変動する遺伝子群について、バイオインフォマティクス解析した結果、DNA傷害・発がん・神経発生・分化及びアポトーシスに共通したTP53を制御するMDM2応答経路が活性化され

ていることが検出された。これらの結果から、放射線照射によって引き起こされる神経分化抑制に TP53 経路が関与していることが示唆された。

分担研究者氏名：曾根秀子（独立行政法人 国立環境研究所、環境リスク研究センター、曝露計測研究室、室長）

研究協力者氏名：桂 真理（東京大学アイソトープ総合センター、特任助教）

石崎 梓（東北大学大学院工学系研究科、助教）

キーワード：

放射性セシウム、低線量被ばく、内部被ばく、次世代シーケンサー、細胞周期、エピゲノム、トランスクリプトーム、TP53

I. 研究目的

2011年3月11日に発生した地震と津波による壊滅的破壊によって引き起こされた福島第一原子力発電所事故では、大量の放射性物質が東日本の広範囲の地域に飛散した。なかでも、特に健康影響の観点から問題視されるのはセシウム-134 やセシウム-137 のような放射性セシウムである。このうち、セシウム-137 は半減期が約 30 年と長く、今後の長期的な健康影響の原因となる可能性が危惧されている。実際、被災地では現在でも農作物に放射性セシウムが検出されることが多々あり、これらを市場に出さないための甚大な苦勞を強いられている。さらに、ホールボディカウンターを用いたヒトの内部被ばく検査においても未だ放射性セシウムが人体中で検出される例が散見される。

これまでの放射線影響研究では、主に数グレイ以上の放射線照射を受けた細胞における細胞応答が調べられてきており、長時間照射で数日間以上かけて数ミリから数百ミリグレイ照射された細胞でどのような生理的反応が起きているかについての情報は少ない。一方、放射性セシウムによる内部被ばく影響については、外部被ばく影響に比べて、不明な点が多い。内部被ばく影響研究は、個体レベルでの放射性物質摂取を対象とするため、厳密な線量計算が困難で、実験的研究の対象となりにくい。したがって、ヒトに対する内部被ばくがどのような影響を及ぼすかを実験的に調べた研究はほとんど報告されていない。

上記のような状況を踏まえ、本研究では、放射性セシウム（セシウム-137）による低線量被ばく影響を細胞レベルの遺伝子発現変動として検出する。そして、エピジェネティックな変化との関連からも遺伝子発現変動を調べる。東京大学アイソトープ総合センターで作成した、培養細胞に直接放射性セシウムを添加してその影響を外部照射と比較するシステム（内部照射影響評価系）を活用する点が従来の研究に比べて独創的な点となっている。

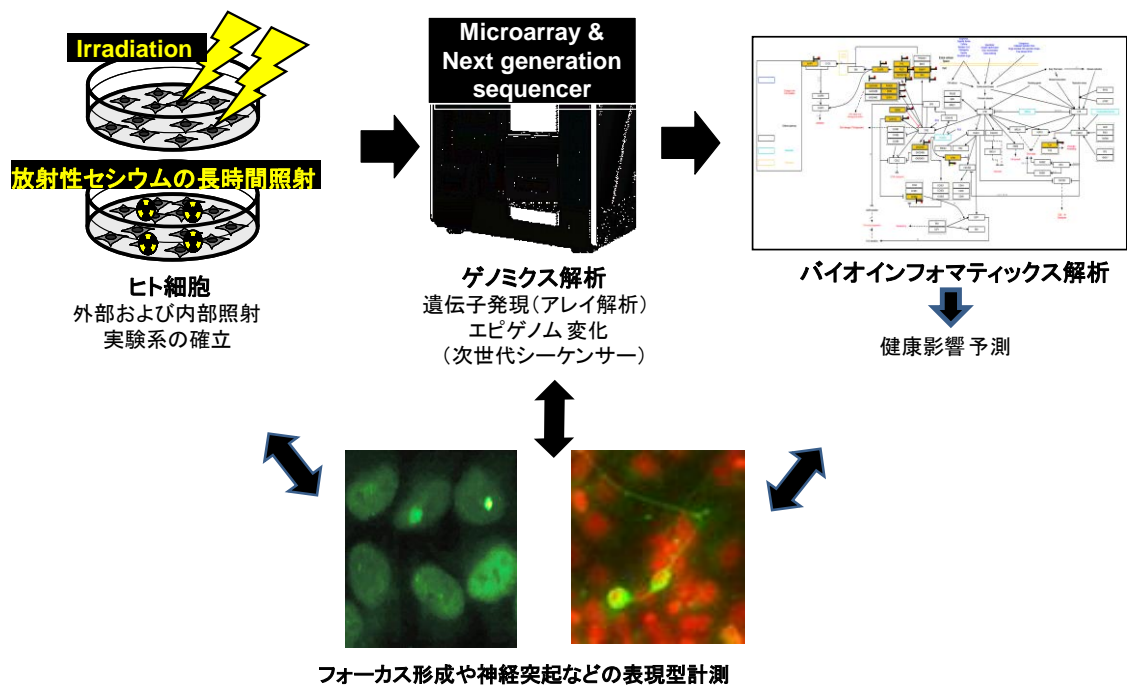


図1 研究の概略図

さらに、研究分担者により確立されたヒト ES 細胞を用いた神経系への分化系を活用し、神経分化に対する放射線影響を神経突起伸長の長さ及び遺伝子発現変動応答の観点から解析した。得られた遺伝子発現変動パターンをバイオインフォマティクス解析することで、放射線照射によって影響を受ける（あるいは応答する）生化学的経路を明らかにすることを旨とした（図1）。

II. 研究方法

【1】セシウム-137による外部照射と内部照射の線量計算手法に関する検討

東京大学アイソトープ総合センターでは、放射性セシウムによる内部被ばく影響を分子レベルで解析するために、培養細胞に直接放射性セシウムを添加して（内部照射実験系）その影響を低線量外部照射（外部照射実験系）と比較するシステムを構築してきた（図2、図3）。

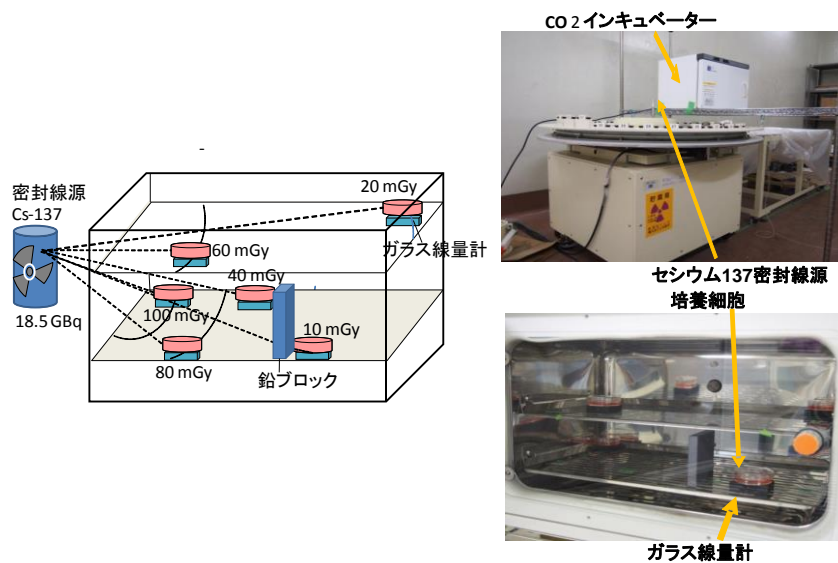


図2 外部照射実験系

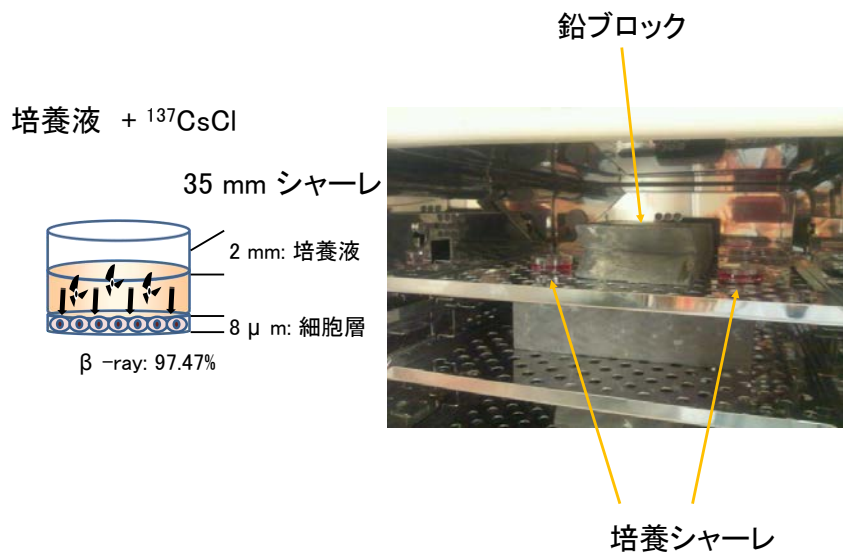


図3 内部照射実験系

外部照射実験時の照射線量は、蛍光ガラス線量計で実測測定していた。この線量値の妥当性の確認のため、平成 25 年度には、フリッケ線量計、OSL 線量計を用いて空間線量の確認を行った。しかしながら、フリッケ線量計は数グレイの放射線照射線量の推定には有効であるが今回の低線量域の照射線量の評価には適さないため、実際の線量評価には利用で

きなかった。さらに、モンテカルロシミュレーションでも線量計算を実施した。今後は、細胞への線量寄与の計算を行う予定である。内部照射実験系の線量計算は GEANT4 を用いたモンテカルロシミュレーションで行ったが、さらに異なる計算方法 (PHITS) との比較も行った。なお、PHITS の計算は評価委員会からの援助により実施した (評価委員会からデータの提供を受けた)。

【2】外部照射と内部照射による DNA 二本鎖切断

外部照射と内部照射によりヒト正常細胞 (HUVEC、筋芽細胞、肺線維芽細胞) に生じる γ H2AX、53BP1 の核内フォーカス形成を免疫蛍光染色法により観察した。照射線量は、当初 10, 20, 40, 60, 80, 100 ミリグレイを 72 時間で照射することを想定して行ったが、後の照射線量の再評価により、当初の線量とは異なるものとなったため、グラフ上のプロット位置を変更した。外部照射する場合、対象実験群では内部照射と同じ濃度 (16.89 マイクログラム/ミリリットル) となるように非放射性塩化セシウムを添加した。平成 24 年度に実施した研究では、カウントするフォーカスのサイズによって結果の変動を生じた。そこで、平成 25 年度、リン酸化 ATM との共染色を実施し、リン酸化 ATM と共存するある程度大きなフォーカスのみをカウントすることにした (図 4 において黄色矢印で示したフォーカス)。

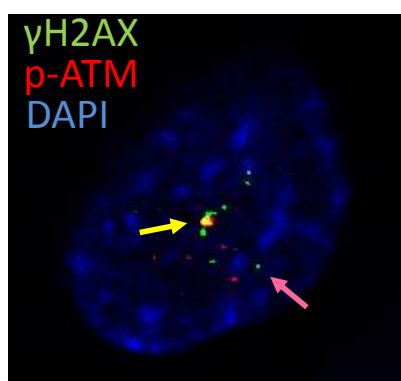


図 4 γ H2AX とリン酸化 ATM との免疫共染色実験の例

黄色矢印で示した大きい共染色部位を核内フォーカスと判定した。ピンクで示したサイズの小さなものはカウントしないことにした。

【3】分化細胞における外部照射と内部照射による遺伝子発現影響解析

HUVEC を用いて、外部照射と内部照射の 2 つの系を用いて、線量率と照射期間を系統的に変化させた照射実験を実施した。まず、5%FBS 存在下でコンフルエントになった HUVEC を 0.5%FBS 存在下で 16 時間培養し、細胞周期を同調させた。次に、外部照射実験系と内部照射実験系で外部照射は 1.73 ミリグレイ/時間、内部照射は 2.47 ミリグレイ/時間の線量率で 1 時間、3 時間、6 時間の照射を行った。外部照射する場合、内部照射と同じ濃度 (16.89

マイクログラム/ミリリットル) となるように非放射性塩化セシウムを添加した。照射直後にトータル RNA を回収し、アフィメトリックス社製 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 マイクロアレイと GeneSpring12.5 解析ソフトを用いて解析した。また、非照射コントロールと比較して、2 倍以上の差があるものに関しては、異なる時期に同様の方法で回収した RNA サンプルを利用して、リアルタイム PCR による再現性の確認を行った。

次に、次世代シーケンサーを用いて、上記 2 種類の条件で 72 時間被ばくした細胞における RNA 発現パターンの変動 (メッセンジャー RNA とノンコーディング RNA の両方を解析) を調べた。

さらに、放射線照射によって発現変動した遺伝子について、エピジェネティックな変化を調べるため、該当遺伝子のヒストン修飾に特異的な抗体を使用したクロマチン免疫沈降法、次世代シーケンサー解析 (ChIP-seq) を用いて調べた。エピジェネティックな遺伝子発現変化は遺伝子発現の量的変化に先立って起きると考えられることから、線量率を変えずに短時間で照射したときに生じるエピゲノム変化を調べた。

【4】未分化細胞における影響評価：ES 細胞の分化系を用いた、放射性セシウム照射による胎児期・小児期の発生モデルに対する影響評価

分担研究者は、これまでに、hNPC を LN111/ L-オルニチンコートディッシュ上で増殖培養後、丸底 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 3000 個細胞を播種して作出した神経前駆細胞塊ニューロスフィアを一定培養後、さらにニューロンに特異的に誘導する分化培地で微小管結合タンパク質 (Microtubule-associated protein 2, MAP2) 陽性神経細胞が誘導し神経突起が伸長するシステムを確立し、環境ストレスによる影響評価を実施している (図 5)。本研究では、この分化システムを活用して、細胞分化に対する放射線照射影響を調べた。すなわち、丸底 96 ウェルプレートに細胞を播種後、胚様体状のニューロスフィア (nSp) を形成するまで 2 日間浮遊培養し、浮遊培養段階の nSp にセシウム-137 密封線源を用いたガンマ線照射を 3 日間照射した。そして、この nSp を更に予めラミニン 511 タンパク質 (LN511) でコートした 24 ウェルプレートに移し、さらに分化培地で 6 日間培養した。外部照射する場合、内部照射と同じ濃度 (16.89 マイクログラム/ミリリットル) となるように非放射性塩化セシウムを添加したものと添加しないものを使用し、添加より影響を受けるものは排除した。

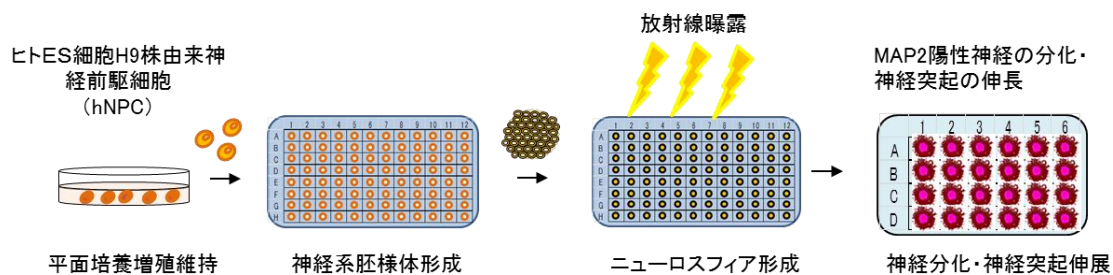


図5 ヒト ES 細胞 H9 細胞由来の神経前駆細胞 (hNPC) から神経細胞へ分化させる実験系の模式図

その後、4%PFA で固定後、イメージング画像解析装置 (In Cell Analyzer 1000、GE Health Care Inc. Little Chalfont, UK) を使用し、各ウェル内の nSp を撮影した。撮影後、各細胞 1 個あたりの神経細胞のサイズ及び神経突起長を解析ソフト Developer (GE Health Care Inc.) で計測し、定量的解析を実施した (図 6)。

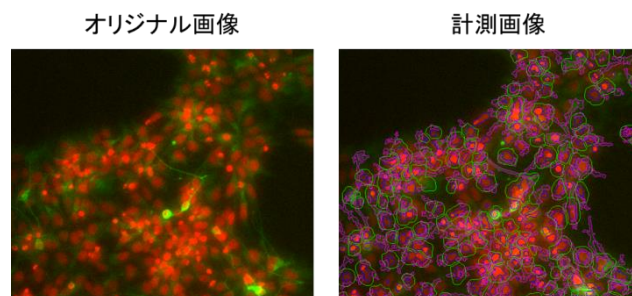


図6 神経細胞への分化の程度を評価する実験例：MAP2 陽性細胞 (緑) の数 (赤色で認識された核数)、面積 (緑色で認識された面積) 神経突起長 (マジエンダ色で認識された径長)

また、外部照射量と神経細胞の影響関係及びその閾値限界を把握するために、無毒性量 (NOAEL：毒性学的な全ての有害作用が認められなかった最大曝露量のこと) は、カーブフィッティングによる近似法によって BMDL (Benchmark dose lower confidence level) から求めた。この BMDL は BMD (Benchmark dose：バックグラウンドと比較して有害影響を有意に検出できる用量) の 95 %信頼下限値と定義した。本研究ではアメリカ合衆国環境保護庁 the United States Environmental Protection Agency (US EPA) 提供の Benchmark Dose Software (BMDS) version 2.4.0.70 (<http://www.epa.gov/ncea/bmbs/>) を使用した。ソフトウェア内臓の 4 つの計算モデル (Hill, Linear, Polynomial 及び Power) から各モデル図を導き、BMDL を計算しその値をもって、細胞影響をもたらす最低被ばく線量とした。

マイクロアレイ解析及びバイオインフォマティクス解析は、マイクロアレイ解析のために、別途、hNPC 細胞を平面上で培養し、セシウム外部照射を 3 日間実施し細胞からトータル RNA (n=3) を抽出後、常法に従いアフィメトリックス社製のマイクロアレイ (GeneChip. HG-U133_Plus_2) を使用して解析を実施した (表 8)。アレイ上の発現シグナル

は Gene Spring(ver12.1 及び ver12.5)ソフトで正規化処理した後、クラスタリング解析及び Wikipathway のデータベースを利用したパスウェイ解析（生化学的応答経路の探索）を実施した。

III. 研究結果

【1】セシウム 137 による外部照射と内部照射の線量計算手法に関する検討

外部照射実験では当初ガラス線量計による線量測定を実施していたが、他の線量計による測定との差の確認を試みた。この結果、フリッケ線量計では誤差が判定困難であったが、OSL 線量計とモンテカルロシミュレーションで本実験条件では想定する空間線量が達成されていることを確認した。

内部照射（セシウム-137 溶液添加）時の被ばく線量は、モンテカルロシミュレーション法にて評価した。GEANT4 計算コードでモンテカルロシミュレーションを実施してきたが、この従来計算値の妥当性を検証するため、異なる計算法による線量計算データを評価委員会から提供いただいた。その結果、GEANT4 と PHITS によって、誤差が 15%程度生ずることが判明した（表 1）。表は、3.5 センチ培養シャーレに 2 ミリリットルの細胞培養液を入れ、その培養液にセシウム-137 を 18.5 キロベクレル添加した際、シャーレの底に 8 マイクロメートルの厚みで存在する培養細胞に照射される線量である。

表 1 異なるモンテカルロシミュレーション計算コードで計算した細胞が受ける線量

計算コード	β 線のみ		β 線+内部転換電子+オージェ電子	
	72 時間線量(ミリグレイ)	線量率(ミリグレイ/分)	72 時間線量(ミリグレイ)	線量率(ミリグレイ/分)
GEANT4	127.39	0.0295	157.91	0.0365
PHITS	142.74	0.0330	193.10	0.0447

以下の実験におけるデータ解釈では、照射条件における細胞の被ばく線量はこの程度の誤差のあることを前提に解釈する必要のあることが判明した。

【2】外部照射と内部照射による DNA 二本鎖切断

本実験では、低線量外部照射と内部照射が引き起こす γ H2AX と 53BP1 のフォーカス形成とに違いがあるかを検証した。照射線量は、当初 10, 20, 40, 60, 80, 100 ミリグレイを 72 時間で照射することを想定して行ったが、後の照射線量の再評価により、当初の線量とは異なるものとなったため、グラフ上のプロット位置を変更した。この結果、血管内皮、筋芽細胞、肺線維芽細胞において、線量依存性に γ H2AX、53BP1 の核内フォーカスは増加することが確認され、内部照射と外部照射との間での核内フォーカス形成数に統計的有意差は無かった（図 7、表 2-表 5）。

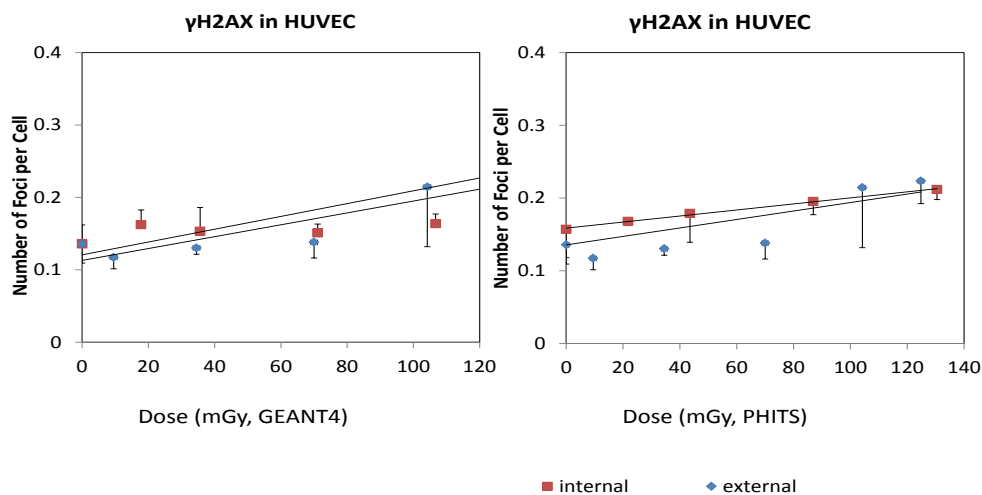


図7 72時間照射後の γ H2AX フォーカス
(2種類のモンテカルロコードで内部照射線量を算出)

表2 γ -H2AX フォーカスの線量依存性 (ANCOVA 法による解析)

細胞	残差平方和	自由度	F	p
HUVEC	0.03694	1	27.3622	7.407e-06 ***
TIG-3	0.2093	1	101.4339	2.091e-12 ***
HSM	0.28100	1	43.1225	8.475e-08 ***

表3 γ -H2AX フォーカスの照射方法非依存性 (ANCOVA 法による解析)

細胞	残差平方和	自由度	F	p
HUVEC	0.001507	1	1.1162	0.2978
TIG-31	0.000188	1	0.0914	0.7641
HSM	0.01115	1	1.7107	0.1985

表4 53BP1 フォーカスの線量依存性 (ANCOVA 法による解析)

細胞	残差平方和	自由度	F	p
HUVEC	41.837	1	35.5854	5.786e-07 ***
TIG-3	0.40553	1	44.4895	6.101e-08 ***
HSM	7.656	1	15.4594	0.0003677 ***

表 5 53BP1 フォーカスの照射方法非依存性 (ANCOVA 法による解析)

細胞	残差平方和	自由度	F	p
HUVEC	1.996	1	1.6979	0.2002
TIG-3	0.00595	1	0.6524	0.4242
HSM	0.650	1	1.3123	0.2595

【3】外部照射と内部照射による遺伝子発現影響解析

HUVEC 細胞について、放射線照射によって発現変動する遺伝子の探索を行った。まず、HUVEC 細胞に対して、セシウム 137 の外部照射と内部照射実験を 1 時間、3 時間、6 時間という短時間で実施した (図 8)。なお、対象実験群ではセシウム 137 と同モル数のコールド塩化セシウムを添加した。

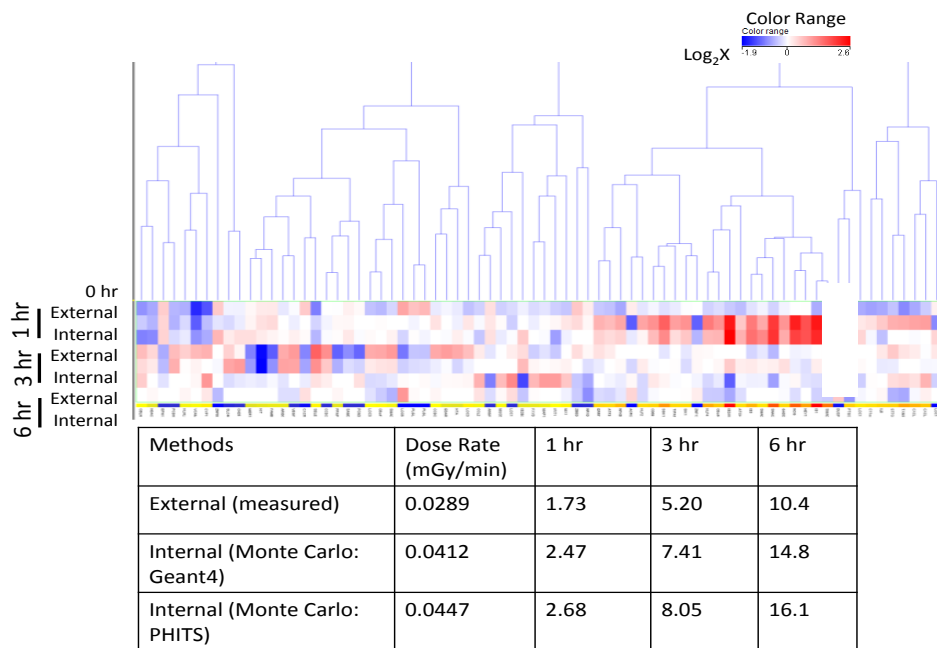


図 8 同じ線量率、異なる線量と照射時間 (1 時間、3 時間、6 時間) で外部照射または内部照射を受けた HUVEC のクラスタリング解析 線量: 外部照射: OSL 線量計で測定、内部照射: GEANT4 で計算

この結果、非照射コントロールに対して 2 倍以上の発現変化があった遺伝子は 79 個あり、その中で外部照射と内部照射で 2 倍以上の差があり、なおかつリアルタイム PCR でも確認できたものは 4 個であった。

この 4 つの遺伝子は、チオレドキシシン結合蛋白 (TXNIP)、CD69 (T 細胞活性化マーカー)、Inhibitor of DNA binding (ID1) (がん細胞に過剰発現の報告がある) とノンコーディング RNA (ST70T1) (がん抑制作用が報告されている) であり、いずれも内部照射における発

現量が低かった。これらの遺伝子はいずれもストレスに反応して活性が上がることが予測される遺伝子である。外部照射と内部照射に対し HUVEC において何らかの反応の違いがあることが示唆された。

さらに、この実験より線量率を 4 倍上げたものと 4 分の 1 に下げたものも含め、72 時間照射を実施した (図 10)。図 10 では非照射コントロールと比較して 1.5 倍以上の差がある遺伝子のクラスタリング解析をしめす。最終線量は、線量計算方法により誤差が生じることが分かっているので、おおよそ推定される線量を示した。すると、外部照射では約 25 ミリグレイ、100 ミリグレイ、400 ミリグレイ内部照射では 50 ミリグレイ 200 ミリグレイ、800 ミリグレイを被ばくしたことになる。線量よりも、照射方法に依存した発現パターンになることが明らかとなった。

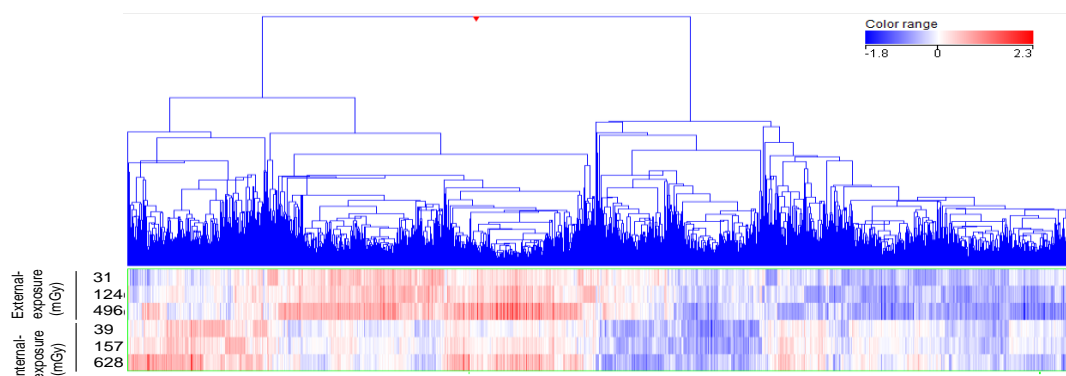


図 9 異なる線量率で72時間の外部照射または内部照射を受けた HUVEC のクラスタリング解析 線量：外部照射：OSL 線量計で測定、内部照射：GEANT4 で計算

次に、マイクロアレイデータ解析から得られたゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルを元に、発現変動遺伝子がどのような生化学反応に関与するかについて、Gene Spring12.5 ソフトウェアを利用したパスウェイ解析を実施した。その結果、外部照射によって発現上昇する遺伝子の関わる生化学的反応として、細胞周期制御が見いだされた。表 6 に示すように、25 ミリグレイの低線量照射でも、HUVEC では細胞周期関連遺伝子の発現が統計的に有意に上昇していることが判明した。一方、炎症関連経路である INF 経路が外部照射によって低下していることも判明した。同様な傾向は、100 ミリグレイと 400 ミリグレイの外部照射条件でも認められた (表 6、13)。

表 6 : HUVEC に対する外部照射の影響によって発現変動する遺伝子の関わる生化学的経路の同定

応答経路の生物学的機能	Wikipathway データベースID	p-value	今回の実験で 応答のあった 遺伝子数	経路内の総 遺伝子数
外部照射31mGy上昇				
細胞周期チェックポイント	Hs APC-C-mediated degradation of cell cycle proteins WP1782_44955□	1.2.E-12	7	10
細胞周期有糸分裂	Hs Mitotic M-M-G1 phases WP1860_44914□	9.2.E-11	7	15
輸送	Hs Kinesins WP1842_44882□	8.3.E-05	3	9
IGF関連シグナル	Hs Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) Activity by IGF Binding Proteins (IGFBPs) WP1899_4503□	1.2.E-04	3	10
S期 DNA複製	Hs Synthesis of DNA WP1925_45107□	2.1.E-04	3	13
DNA修復	Hs Double-Strand Break Repair WP1807_45201□	7.6.E-04	3	18
外部照射31mGy低下				
免疫応答	Hs Interferon_alpha-beta_signaling WP1835_44864□	4.0.E-04	3	26
外部照射124mGy上昇				
細胞周期チェックポイント	Hs APC-C-mediated degradation of cell cycle proteins WP1782_44955□	1.6.E-10	6	10
細胞周期有糸分裂	Hs Mitotic M-M-G1 phases WP1860_44914	3.7.E-09	6	15
S期 DNA複製	Hs Synthesis of DNA WP1925_45107	6.2.E-08	5	13
輸送	Hs Kinesins WP1842_44882	7.2.E-05	3	9
免疫反応	Hs Interferon_alpha-beta_signaling_WP1835_44864	7.9.E-05	4	26
IGF関連シグナル	Hs Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) Activity by IGF Binding Proteins (IGFBPs) WP1899_4503□	1.0.E-04	3	10
成長、細胞分化、細胞死	TGFBR	3.3.E-04	7	134
形態形成	Hedgehog	9.1.E-04	3	20
外部照射124mGy低下				
成長、細胞分化、細胞死	TGFBR	6.5.E-05	8	134
運動ニューロン□	EGFR1 □	4.2.E-04	8	176
外部照射496mGy上昇				
細胞周期チェックポイント	Hs APC-C-mediated degradation of cell cycle proteins WP1782_44955□	3.1.E-11	6	1.00E+01
輸送	Hs Kinesins_WP1842_44882	3.2.E-05	3	9.00E+00
IGF関連シグナル	Hs Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) Activity by IGF Binding Proteins (IGFBPs) WP1899_4503□	4.6.E-05	3	1.00E+01
細胞周期有糸分裂	Hs Mitotic M-M-G1 phases WP1860_44914	1.7.E-04	3	1.50E+01
	Hs Phase 1 - Functionalization of compounds WP1879_42095□	4.0.E-04	4	4.90E+01
形態形成	Hedgehog	4.1.E-04	3	20
外部照射496mGy低下				
IGF関連シグナル	Hs Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA WP1889_42105□	2.2.E-05	5	52

表 7 : HUVEC に対する内部照射の影響によって発現変動する遺伝子の関わる生化学的経路の同定

応答経路の生物学的機能	Wikipathway データベースID	p-value	今回の実験で 応答のあった 遺伝子数	経路内の総 遺伝子数
内部照射39mGy上昇				
	なし			
内部照射39mGy低下				
	なし			
内部照射157mGy上昇				
	なし			
内部照射157mGy低下				
	なし			
内部照射628mGy上昇				
免疫反応	Hs Interferon_alpha-beta_signaling WP1835_44864□	6.8.E-04	3	26
内部照射628mGy低下				
免疫反応	Hs Interferon_alpha-beta_signaling_WP1835_44864□	4.9.E-05	3	26

内部照射（セシウム 137 溶液添加）実験では、外部照射とは異なり、628 ミリグレイ照射では INF 経路と関わる遺伝子群の発現変動が認められたが、39 ミリグレイと 157 ミリグレイの低線量域では INF 経路の発現変動は認められなかった（表 7）。

今回、同一線量での比較はできなかったが、複数の線量（外部照射では、31, 124, 496 ミリグレイ/3 日、内部照射（セシウム 137 溶液添加）では、39, 157, 628 ミリグレイ/3 日）での遺伝子発現変動を調べており、それらのデータを総合して考えると、ほぼ同じ程度の

低線量被ばくであっても、内部照射（セシウム 137 溶液添加）と外部照射との間では遺伝子発現の変動パターンが異なることが示唆された。細胞周期チェックポイントの活性化やストレス反応のような遺伝子発現変動の違いが、外部照射と内部照射（セシウム 137 溶液添加）との間で異なる生化学的経路に影響を与える可能性が考えられた。

【参考データ】

次に、クロマチン免疫沈降（ChIP）解析により、HUVEC にて発現変動した遺伝子のエピジェネティック制御の変化を調べた。得られたデータをバイオインフォマティクス解析することでゲノム上にマッピングし、マッピングされたシーケンスタグ数から、ゲノムワイドなヒストン修飾の変化（エピジェネティック変化）を検出した。そして、放射線照射によって発現変動する遺伝子においてエピジェネティックな変化が生じているかについて検証した。DUSP6 遺伝子では、外部照射したときのみ H3K4me3 の増加が認められた。一方、PTGS2 (COX2) では、逆に、内部照射したときのみ H3K4me3 の増加が認められた。この結果は、内部照射と外部照射との間で、遺伝子発現変動が異なった結果を、エピジェネティックな変化から裏付ける結果であるが、再現性等も含め、さらに慎重な確認作業を要するため、今回の報告書では参考データとして記載するにとどめる。

【4】未分化細胞における影響評価：ES 細胞の分化系を用いた、放射性セシウム照射による胎児期・小児期の発生モデルに対する影響評価

本実験では、外部照射被ばくによる胎児期・小児期の神経発達影響を評価する目的で、ヒト ES 細胞由来神経前駆細胞から神経細胞への分化に対する放射線影響を形態ならびに遺伝子発現変動を調べた。最初に神経細胞分化への影響を神経特異的に発現しているたん白質微小管結合タンパク質（Microtubule-associated protein 2, MAP2）の発現を指標に、MAP2 陽性神経細胞の増殖と神経突起伸長の程度を調べた。図 10 は、典型的な nSp の画像である。非照射群では、MAP2 陽性神経細胞は、十分に伸展しており、Hoechst で染色された核は、スフィア中心よりも端末方向に散在して認められるが、外部照射量の増加と共に、MAP2 陽性神経細胞の伸展は縮小し、反対にスフィア中心における Hoechst 染色細胞の数が増加していた。

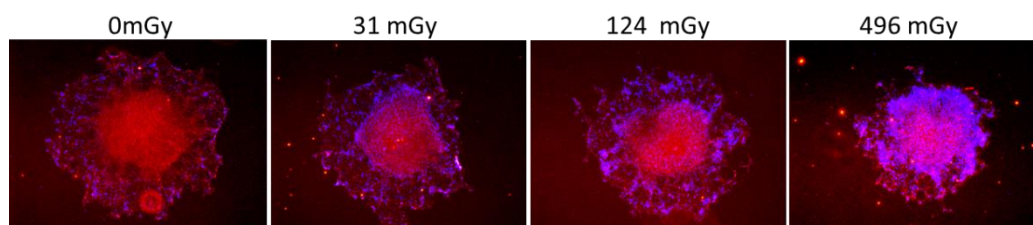


図 10：ヒト ES 由来細胞から神経細胞への分化に対する、放射線外部照射の影響
赤：MAP2 陽性神経細胞、青：Hoechst による核染色

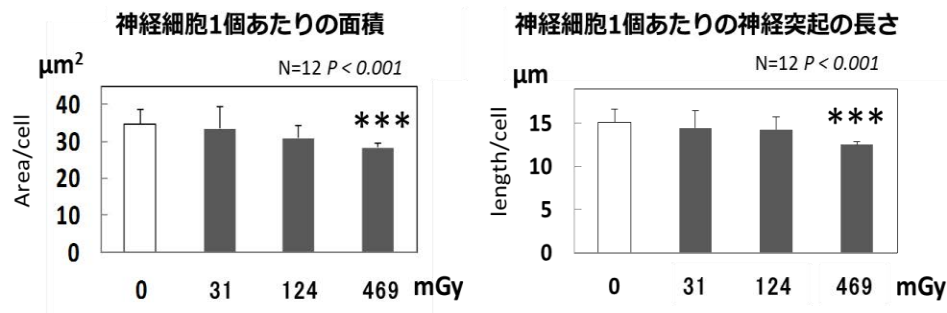


図 11 : 神経細胞の分化に対する外部照射の影響の定量的解析

図 11 には、神経細胞の分化に対する外部照射の影響の定量結果を示した。最高照射量である 496 ミリグレイ群が、対照にくらべ有意に神経細胞の面積及び神経突起の長さの値が低下した。次に、このような神経分化の背景を遺伝子レベルで調べるため、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析にて調べた。最初に、アレイ上に搭載されている 54675 遺伝子のうち、対照と比べて ± 1.5 倍以上変動のあった 1020 遺伝子(上昇 520、低下 500)の階層的クラスタリング解析を実施した(図 12)。照射量依存的に発現量が変動している遺伝子、最高照射量においてのみ発現している遺伝子など、多様な応答性が認められた。

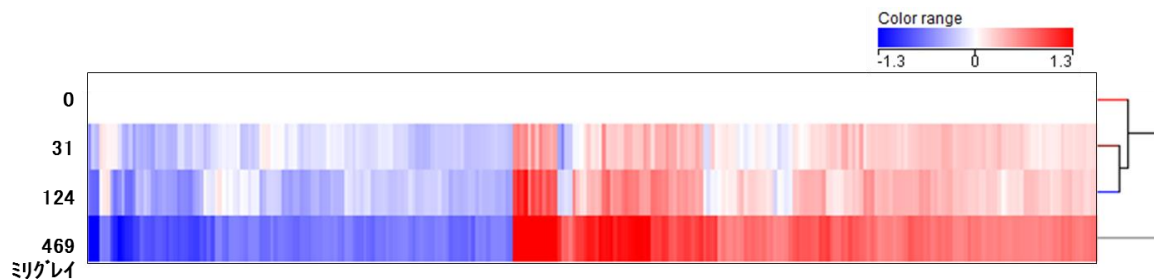


図 12 : 外部照射による hNPC の遺伝子発現プロファイリング

対照 (0 mGy) と比較して ± 1.5 倍変動のあった 542 遺伝子の階層的クラスタリング

さらに、この遺伝子発現プロファイルをもとに、放射線照射によって遺伝子発現が上昇変動する遺伝子及び低下する遺伝子の抽出を生化学的応答経路の解析により行った。その結果のうち P 値が 10^{-4} レベル以下の経路を表 8 に示した。放射線外部照射によって、hNPC 細胞において発現上昇する遺伝子群が関与する生化学的応答として、今回の実験に用いた最小照射線量 31 ミリグレイでは、がん細胞応答経路の「Integrated_Pancreatic_Cancer_Pathway_WP2256_49836」の中の 204 個の遺伝子のうち 6 個の遺伝子に変動があった。124 及び 496 照射線量と線量が上がるにつれて、上昇した遺伝子では、DNA 傷害応答、炎症性応答、細胞増殖・分化及びアポトーシスの応答経路が抽出された。一方、発現が低下した遺伝子

群においては、神経発生・分化に関与する遺伝子群が見いだされた。この結果は、前述した形態学的観察による神経細胞の分化・神経突起伸長の抑制の結果とよく一致するものと考えられた。

そこでさらに、照射依存の変動のあった遺伝子を抽出するために、ピアソン相関分析により抽出した遺伝子 542 個について再度 pathway 解析を行うと表 9 のような結果となった。すなわち、DNA 傷害性、神経分化・発生、がん細胞応答、アポトーシス及び脂肪生成に関わる遺伝子の応答が上位に抽出された。

そこで、DNA 傷害応答、がん細胞応答及びアポトーシスに共通な 4 遺伝子 BAX、ANXA1、FAS 及び MDM2 の mRNA 発現を定量 PCR 解析で調べたところ、照射量依存的な発現上昇が確認できた (図 13)。

表 8 : hNPC の MAP2 陽性神経細胞の分化に対する外部照射の影響によって発現変動する遺伝子の関わる生化学的経路の同定

応答経路の生物学的機能	Wikipathway データベースID	p-value	今回の実験で応答のあった遺伝子数	経路内の総遺伝子数
31mGy 上昇				
がん細胞応答	Hs_Integrated_Pancreatic_Cancer_Pathway_WP2256_49836	1.14E-05	6	204
31mGy 低下				
がん細胞応答	Hs_MAPK_signaling_pathway_WP382_44890	2.83E-04	5	161
124 mGy 上昇				
DNA傷害応答	Hs_DNA_damage_response_WP707_38403	1.55E-08	7	68
がん細胞応答	Hs_Integrated_Pancreatic_Cancer_Pathway_WP2256_49836	2.49E-06	8	204
炎症性応答	Hs_Interferon_alpha-beta_signaling_WP1835_44864	2.93E-06	4	26
細胞増殖・分化	Hs_TGF_Beta_Signaling_Pathway_WP560_42992	7.90E-05	4	55
細胞老化	Hs_Senescence_and_Autophagy_WP615_47912	8.67E-05	5	106
124 mGy 低下				
神経発生・分化	Hs_L1CAM_interactions_WP1843_44884	6.70E-06	4	27
神経発生・分化	Hs_NCAM_signaling_for_neurite_out-growth_WP1866_42084	2.46E-05	3	13
神経発生・分化	Hs_Nephrin_interactions_WP1867_42085	4.27E-04	2	7
496 mGy 上昇				
DNA傷害応答	Hs_DNA_damage_response_WP707_38403	<1.0E-12	13	68
がん細胞応答	Hs_Integrated_Pancreatic_Cancer_Pathway_WP2256_49836	1.06E-06	12	204
アポトーシス	Hs_Apoptosis_Modulation_and_Signaling_WP1772_42308	1.37E-06	8	93
アポトーシス	Hs_Apoptosis_WP254_41184	1.96E-05	7	83
脂肪生成	Hs_Adipogenesis_WP236_44941	5.00E-05	8	131
神経発生・分化	Hs_Neural_Crest_Differentiation_WP2064_45566	7.08E-05	6	71
炎症性応答	Hs_Interferon_alpha-beta_signaling_WP1835_44864	8.68E-05	4	26
細胞老化	Hs_Senescence_and_Autophagy_WP615_47912	9.48E-05	7	106
496 mGy 低下				
神経発生・分化	Hs_L1CAM_interactions_WP1843_44884	5.00E-05	4	27

表 9：外部照射量依存的に発現変動する遺伝子の関わる生化学的応答経路の同定

外部照射量依存的変動				
応答経路の生物学的機能	Wikipathway データベースID	p-value	今回の実験で応答のあった遺伝子数	経路内の総遺伝子数
DNA傷害応答	Hs_DNA_damage_response_WP707_38403	8.99E-11	11	68
神経堤分化・発生	Hs_Neural_Crest_Differentiation_WP2064_45566	7.00E-06	7	71
がん細胞応答	Hs_Integrated_Pancreatic_Cancer_Pathway_WP2256_49836	7.88E-06	11	204
DNA傷害応答	Hs_DNA_damage_response_(only_ATM_dependent)_WP710_33421	2.73E-05	7	89
アポトーシス	Hs_Apoptosis_WP254_41184	2.17E-05	7	83
脂肪生成	Hs_Adipogenesis_WP236_44941	5.57E-05	8	131

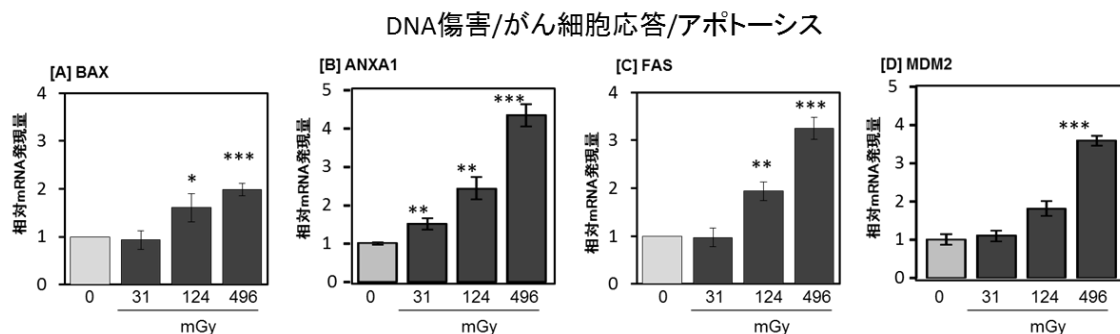


図 13：外部照射により hNPC 細胞において発現変動した DNA 傷害応答遺伝子群
各グラフは、定量的 PCR 法によって測定した遺伝子の変動を示す。

次に、内部照射の場合に、どのような遺伝子発現変動があるかを調べた。すなわち放射性セシウム-137 溶液の添加による遺伝子発現プロファイリング解析を実施した。放射性セシウム-137 溶液の添加は、前項における記載のとおり 39、157、628 ミリグレイで 3 日間行った。セシウム-137 の内部照射による hNPC 細胞の遺伝子発現プロファイリングは、±1.5 倍変動のあった 559 遺伝子(上昇 326、低下 233)について階層的クラスタリングを行った(図 14)。

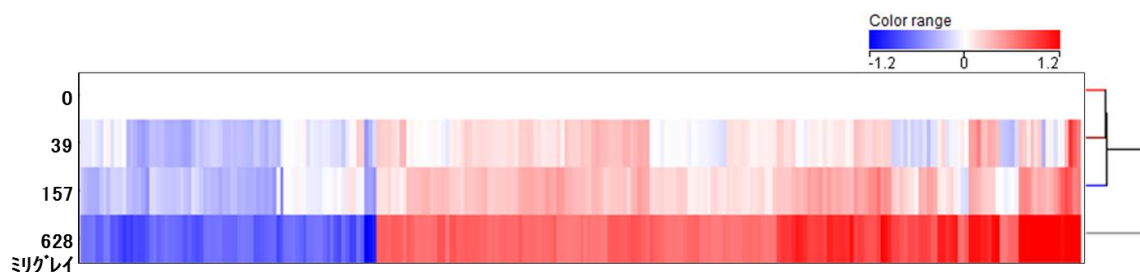


図 14：内部照射による hNPC 細胞の遺伝子発現プロファイリング
対照（非照射）と比較して±1.5 倍以上変動のあった 559 遺伝子の階層的クラスタリング

内部照射の場合も、外部照射の時と同様に、今回曝露した最低照射線量から多様な遺伝子発現変動が認められたが、±1.5倍以上変動のあった遺伝子は外部照射と比べ少なかった。そこでさらに、内部照射量依存的変動のある遺伝子について同様にパスウェイ解析を行うと、39 及び 157 ミリグレイの線量レベルでは、39 ミリグレイの炎症性応答である「Hs_Interferon_alpha-beta_signaling_WP1835_44864」しか検出されなかった。一方、最高線量の 628 ミリレベルでは、外部照射で認められたアポトーシ

表 10 : hNPC の MAP2 陽性神経細胞の分化に対する外部照射の影響によって発現変動する遺伝子の関わる生化学的経路の同定

応答経路の生物学的機能	Wikipathway データベースID	p-value	今回の実験で応答のあった遺伝子数	経路内の総遺伝子数
内部照射39mGy 上昇				
炎症性応答	Hs_Interferon_alpha-beta_signaling_WP1835_44864	9.82E-04	2	26
内部照射39mGy 低下				
	なし			
内部照射157 mGy 上昇				
	なし			
内部照射157 mGy 低下				
	なし			
内部照射628 mGy 上昇				
DNA傷害応答	Hs_DNA_damage_response_WP707_38403	1.80E-10	10	68
DNA傷害応答	Hs_DNA_damage_response_(only_ATM_dependent)_WP710_334	2.26E-10	11	89
アポトーシス	Hs_Apoptosis_Modulation_and_Signaling_WP1772_42308	1.69E-09	9	93
がん細胞応答	Hs_Integrated_Pancreatic_Cancer_Pathway_WP2256_49836	4.53E-09	12	204
脂肪生成	Hs_Myometrial_Relaxation_and_Contraction_Pathways_WP289_4	3.97E-08	10	156
神経発生・分化	Hs_Apoptosis_WP254_41184	4.11E-08	8	83
炎症性応答	Hs_Senescence_and_Autophagy_WP615_47912	2.77E-07	8	106
細胞老化	Hs_Striated_Muscle_Contraction_WP383_41139	3.20E-06	5	38
細胞増殖・分化	Hs_TGF_beta_Signaling_Pathway_WP366_45152	7.36E-06	7	118
脂肪生成	Hs_Adipogenesis_WP236_44941	1.47E-05	7	131
細胞増殖・分化	Hs_TGF_Beta_Signaling_Pathway_WP560_42992	1.87E-05	5	55
がん細胞応答	Hs_Prostate_Cancer_WP2263_69730	4.57E-05	6	116
MAPKシグナル	Hs_MAPK_signaling_pathway_WP382_44890	5.55E-05	7	161
MAPKシグナル	Hs_MAPK_signaling_pathway_WP382_41048	5.55E-05	7	161
インシュリン応答	Hs_Insulin_Signaling_WP481_42706	5.55E-05	7	160
がん細胞応答	Hs_Prostate_Cancer_WP2263_53136	5.62E-05	6	115
がん細胞応答	Hs_Integrated_Breast_Cancer_Pathway_WP1984_44857	6.49E-05	7	164
内部照射628 mGy 低下				
	なし			

表 11 : 内部照射 (セシウム 137 溶液添加) によって hNPC 細胞において、照射量依存的に発現変動する遺伝子の関わる生化学的経路の同定

内部照射量依存的変動				
応答経路の生物学的機能	Wikipathway データベースID	p-value	今回の実験で応答のあった遺伝子数	経路内の総遺伝子数
アポトーシス	Hs_Apoptosis_Modulation_and_Signaling_WP1772_42308	<1.00E-12	10	93
DNA傷害応答	Hs_DNA_damage_response_WP707_38403	<1.00E-12	10	68
アポトーシス	Hs_Apoptosis_WP254_41184	2.69E-10	9	83
がん細胞応答	Hs_Integrated_Pancreatic_Cancer_Pathway_WP2256_49836	5.24E-09	11	204
筋刺激応答	Hs_Myometrial_Relaxation_and_Contraction_Pathways_WP289_45373	9.80E-07	8	156
DNA傷害応答	Hs_DNA_damage_response_(only_ATM_dependent)_WP710_33421	4.04E-06	6	89
がん細胞応答	Hs_Senescence_and_Autophagy_WP615_47912	1.35E-05	6	106
がん細胞応答	Hs_Prostate_Cancer_WP2263_69730	1.35E-05	6	116
がん細胞応答	Hs_Prostate_Cancer_WP2263_53136	1.67E-05	6	115
アポトーシス	Hs_Extrinsic_Pathway_for_Apoptosis_WP1814_42037	3.06E-05	3	13
筋刺激応答	Hs_Striated_Muscle_Contraction_WP383_41139	3.43E-05	4	38
がん細胞応答	Hs_Integrin_cell_surface_interactions_WP1833_44861	3.88E-05	3	16

ス、DNA 傷害応答、がん細胞応答に加え、細胞周期、血管新生などさまざまな生物機能維持に関連する MAPK シグナル応答及びインシュリン応答反応が認められた(表 10)。外部照射の場合と同様、線量依存的な解析を再度行うと、外部照射で認められたアポトーシス、DNA 傷害応答、がん細胞応答に加え、筋刺激応答経路が抽出された(表 11)。また、内部照射では、アポトーシス応答経路に関連した遺伝子が上位に抽出され、外部照射よりも内部照射の方がより細胞毒性が強いことが示唆された。これらマイクロアレイ解析によって認められたセシウム-137 曝露の応答遺伝子を定量 PCR 法によって発現量を再確認し、応答性が大きかった 4 遺伝子の結果を図 25 に示した。IFITM1、CDKN1A、DCX 及び MT1F の遺伝子は、炎症性応答、DNA 傷害、神経発生・分化に関与していることが知られている。炎症性応答に関連の深い IFITM1 及び CDKN1A は、外部照射において、照射量依存的に上昇し、DCX 及び MT1F は、外部照射量依存的に減少した。一方、内部照射においては、IFITM1 は、最高照射量のみ有意な発現上昇であったが、上昇の度合いは、小さかった。CDKN1A は、最低照射量から照射量依存的に有意な上昇が認められた。しかし、神経発生・分化に関与する DCX は、最低照射量で有意な低下が認められたがより高い照射量では、有意な変化は認められなかった。さらに、MT1F は内部照射では影響は認められなかった。図には示さないが、MT1F はタンパク質の発現レベルも減少していた。

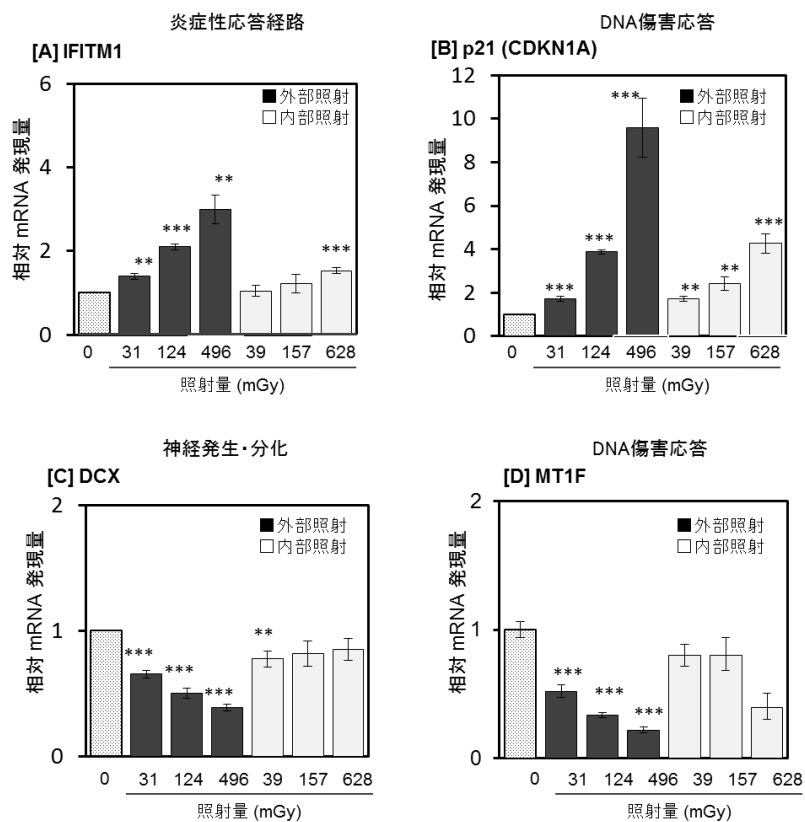


図 15：外部照射及び内部照射により hNPC 細胞において発現変動した遺伝子定量的 PCR 法によって測定した遺伝子の変動を示す。

IV. 考察

本研究では、外部照射と内部照射の照射量を二通りの方法で計算し、曝露線量レベルを正確に求めた。内部照射実験系の線量計算は GEANT4 を用いたモンテカルロシミュレーションで当初行った。しかしながら、評価委員会からのアドバイスに従って、さらに異なる計算方法 (PHITS) との比較も行った。両計算手法とも放射線医学や放射線物理学分野で広く利用されている計算コードである。その結果、GEANT4 と PHITS によって、誤差が 15%程度生ずることが判明した。しかし、計算打ち切り条件が GEANT4 では飛程、PHITS ではエネルギーで決められている点や核データ、モデルの適応範囲など細かい部分で異なるため、両計算方法を類似条件で比較検討することを今後検討する。また、計算対象がマイクロメートル単位であることから、計算精度の評価も必要であると考えられる。

線量評価に上述の通り 15%程度の誤差のあり得る条件下ではあるが、外部照射と内部照射との二つの異なる放射線照射経路の違いによる細胞影響の違いを遺伝子発現プロファイリングを決定することで影響評価した。第一に正常ヒト培養細胞に対し、研究者らが構築した外部照射実験系と内部照射実験系を用い、それぞれの条件での遺伝子発現変動プロファイルを中心に解析した。また、核内フォーカス形成やエピジェネティック修飾について

も調べることにより、放射線照射が引き起こす遺伝子発現変動のメカニズムについても検討した。その結果、外部照射した場合と内部照射した場合では、異なる遺伝子発現プロファイルとなることが示唆された。

今回、外部照射実験系および内部照射実験系の再測定、再計算により、当初の線量計算値が修正されたため、同一線量率による 1, 3, 6 時間の曝露では、それぞれ、外部照射で、1.73, 5.20, 10.4 ミリグレイ、内部照射では、2.47, 7.41, 14.8 ミリグレイとなった。また、複数の線量率による、72 時間曝露では、外部照射で、31, 124, 496 ミリグレイ、内部照射で、39, 157, 628 ミリグレイにおける遺伝子発現変動を調べた。120 ミリグレイ外部照射と内部照射が引き起こす核内 DNA 修復複合体の形成の違いについては、 γ H2AX のフォーカス形成を指標とした核内 DNA 修復複合体の形成の観点からは、両者間に明らかな違いは認められなかった。一方、ほぼ同じ程度の低線量照射であっても、遺伝子発現の変動パターンは外部照射と内部照射で異なっていた。この違いは、分化した血管内皮である HUVEC と未分化の神経細胞 hNPC と異なる細胞種においても同じ傾向の結果であった。すなわち、今回の実験では、DNA 損傷応答と呼ばれている細胞周期チェックポイント、DNA 複製、DNA 修復などの一連の反応は外部照射では比較的良く観察されるが、内部照射に対する反応はほとんど観察されないかまたはきわめて弱かった。さらに、このような一次的な遺伝子発現変動の違いが、細胞影響として、外部照射と内部照射との間で異なる生化学的経路に影響を与える可能性が考えられる。

外部照射ではガンマ線の影響のみが生じているが、内部照射実験では、ベータ線の影響が大きくなる。本実験で線質の違いが生物影響の違いを引き起こすメカニズムは不明だが、線エネルギー付与の観点から解釈が可能かも知れない。外部照射と内部照射では、ミクロレベルでのエネルギー付与の距離、間隔が異なるため、より低線量の曝露の場合、細胞核に与える電子線のエネルギー量が異なる可能性も考えられる。

なお、本実験系では放射性セシウムを直接培地中に添加する実験を行っているが、放射性セシウム溶液中に発生したラジカルの影響について厳密に評価できていない。すなわち、放射性セシウム溶液中のラジカルが遺伝子発現プロファイルを変化させた影響を排除するため、ラジカルスキランジャー等を添加した条件で放射線照射した実験結果も考慮して最終的に考察する必要がある点は留意したい。

上述のとおり、本研究ではセシウム-137 を培地に添加したときの細胞における遺伝子発現変動を調べることで、内部照射による細胞レベル放射線影響を調べた。ここで検出された遺伝子発現変動が金属セシウムに応答するものであるか否かを検証するため、対照実験として、非放射性セシウムを添加したときに遺伝子発現変動が起きるかも調べている。その結果、今回の報告で考察している遺伝子発現変動の多くは非放射性セシウム添加によって発現変動しないことを確認している。

第二の実験において、ヒト ES 細胞由来神経前駆細胞から神経への分化モデルを用いて、胎児・小児の発達 *in vitro* モデル実験における神経分化への影響を調べた。神経細胞の形

態変動値を用いて、ベンチマークドーズ法によるベンチマーク用量の信頼限界下限値を求めてみた（表 11）。その結果、4 種のモデルのうち、Hill モデルの最小値で 34.7 ミリグレイであった。この照射レベルは、遺伝子発現レベルで考えてみると、今回用いた外部照射量の最小値 31 ミリグレイで有意に応答している遺伝子は、多数あり、いずれも DNA 傷害応答が報告されている遺伝子である。形態変化のベンチマーク解析と遺伝子発現の定量結果を合わせて考えると、30 ミリグレイ付近の照射は、影響が懸念されるレベルであると考えられた。さらに、DNA 傷害応答、がん細胞、アポトーシス応答に関連する遺伝子群の 496 ミリグレイ照射した hNPC において生じた遺伝子発現変動値を用いてバイオインフォマティクス解析すると、TP53 転写因子を制御する MDM2 の活性化を示唆する結果を得た。近年、DNA 傷害と神経疾患や神経発生・分化との関係に関する研究が進んでおり、DNA 傷害は発がんだけでなく、パーキンソン、アルツハイマー及び自閉症の発症に関与することが数多く報告されている。今回のヒト ES 由来神経前駆細胞を用いた分化モデルの影響評価実験の結果からも、セシウム-137 の曝露による神経疾患への影響が懸念される。

表 12 : BMDS による最低被ばく線量予測

		BMDS モデル (mGy)			
		Hill	LINEAR	POLYNOMIAL	POWER
神経細胞面積					
	BMD	145.6	365.2	140.0	365.2
	BMDL	34.7	235.6	66.2	236.7
神経突起長					
	BMD	258.7	308.8	260.6	308.8
	BMDL	63.9	209.9	92.3	209.9

V. 結論

今回の研究において、ヒト細胞を使用したセシウム-137 線源による放射線影響を調べた。その結果、細胞核の二本鎖 DNA 切断指標では、30 ミリグレイ以下においても影響があることを見出した。この指標による影響には、ガンマ線照射（外部照射実験系）と培養液へのセシウム-137 溶液の直接添加による照射（内部照射実験系）による差は認められなかった。さらに未分化神経前駆細胞の神経分化への抑制が 500 ミリグレイレベルで認められた。遺伝子発現レベルでは、ヒト正常細胞及び神経分化細胞においても、30 ミリグレイレベルにおいて、炎症、DNA 傷害・発がん・神経発生・分化及びアポトーシスに応答する遺伝子の変動が観察された。ただし、今回の研究では、結論的解釈はできないと考えられるため、今後のさらなる検証が必要である。

VI. 次年度以降の計画

本計画は本年度で終了する。しかしながら、使用した放射性セシウム溶液中に含まれる

夾雑物の同定は ICP-MASS の導入・運用が可能となる平成 26 年度に実施する予定である。また、考察部分で述べた各種課題を解決した上で、本計画で得られた細胞形態変動データ及び遺伝子発現変動データを活用して、最小影響量の計算や影響予測の解析をさらに進めていく予定である。このように、本研究成果を補完する実験ならびに発展させる実験を次年度以降も継続し、本研究で得た成果を持続的に発展させ、放射線による健康影響の解明に貢献する。

文献

1. Mizutani R., Wakamatsu A., Tanaka N., Yoshida H., Tochigi N., Suzuki Y., Oonishi T., Tani H., Tano K., Ijiri K., Isogai T. and Akimitsu N., (2012) Identification and characterization of novel genotoxic stress-inducible nuclear long noncoding RNAs in mammalian cells., PLoS ONE, 7, e34949.
2. Julia Heß, Gerry Thomas, Herbert Braselmann, Verena Bauer, Tatjana Bogdanova, Johannes Wienberg, Horst Zitzelsberger, and Kristian Unger, (2011) Gain of chromosome band 7q11 in papillary thyroid carcinomas of young patients is associated with exposure to low-dose irradiation. Proc Natl Acad Sci U S A., 108, 9595-600
3. Francia S, Micheli F, Saxena A, Tang D, de Hoon M, Anelli V, Mione M, Carninci P, d'Adda di Fagagna F. (2012) Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. Nature., 488, 231-235.
4. Qin XY, Akanuma H, Wei F, Nagano R, Zeng Q, Imanishi S, Ohsako S, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, Sone H. (2012) Effect of low-dose thalidomide on dopaminergic neuronal differentiation of human neural progenitor cells: a combined study of metabolomics and morphological analysis. Neurotoxicology, 33(5):1375-80.
5. Akanuma H, Qin XY, Nagano R, Win-Shwe TT, Imanishi S, Zaha H, Yoshinaga J, Fukuda T, Ohsako S, Sone H. (2012) Identification of Stage-Specific Gene Expression Signatures in Response to Retinoic Acid during the Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. Front Genet., 7;3:141.

Study of Health Effects by radiation based on hierarchical genomic analysis

Mari Katsura¹, Azusa Ishizaki², Hideko Sone³ and Nobuyoshi Akimitsu¹

¹ Radioisotope Center, The University of Tokyo, Japan.

² Department of Quantum Science and Energy Engineering, School of Engineering, Tohoku University, Japan.

³ Health Risk Research Section, Center for Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies, Japan.

Keywords: radioactive cesium, low dose exposure, next generation sequencer, epigenome, transcriptome, Monte Carlo simulation

Abstract

In this research, we analyzed biological effects in response to radiation by focusing on transcriptome, epigenome and the formation of nuclear focus. To this end, we employed a novel cultured cell-based approach that enables to estimate the effects of external and internal exposures. In the system, the dose of internal radiation by addition of ¹³⁷CsCl solution to the culture medium, was calculated using Monte Carlo simulation. We found many altered gene expressions upon low dose irradiation, such as 100 mGy, in HUVEC (Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells) and hNPC (human Neural Precursor Cells). We have revealed the altered epigenetic regulation, such as the pattern of H3K4me3, in corresponding genes in response to irradiation. In addition, we have found several candidate genes that are able to explain the differential inhibition of hNPC to neuron-like cells after irradiation. Bioinformatics analysis predicted that TP53 and MDM2 pathway is involved in the gene regulation in hNPC upon irradiation.

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（産業医科大学産業生態科学研究所放射線健康医学研究室）

研究要旨

福島第一原子力発電所（原発）事故に対処した東京電力（東電）の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。マウスに 0Gy, 10mGy, 100mGy 及び 1 Gy 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旨し、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

1. 東京電力社員の放射線業務従事者の原発事故前（平成 18 年から 23 年）及び事故後（平成 23 年から 25 年）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解析する。血液に影響する可能性のある交絡因子（喫煙、飲酒あるいは肝機能等）を除外し、純粋に放射線が電離放射線健康診断で行われる血液検査（白血球数及び白血球百分率、赤血球数及び血色素料又はヘマトクリット値の検査）に影響を及ぼしていないかを考察する。また、外部及び内部被曝線量も考慮にいれ解析する。特に 100mSv 超えの放射線業務従事者は事故後から平成 24 年 7 月まで毎月採血しており、上記に示した血液検査の経時的な動態を解析する。健康診断データを解析することの許可を東電本

店から得たが、実行に向けてインフォームドコンセント等の最終段階の調整をしている。

2. 平成 24 年に 0Gy、10mGy、100mGy、1Gy 照射しておいたマウスが、100 日経過した時点で、採血し血球計算、また脾臓を摘出し、幹細胞の割合及びメタボローム解析を行った。血球計算はモノリス株式会社に、メタボローム解析はヒューマンメタボロームテクノロジーズ株式会社に外注検査を依頼した。造血幹細胞は解糖系優位となるので、照射群間で差が生じないか、Lin、Scat+及び C-kit 抗体を用いて、幹細胞の割合を調べた。

(倫理面への配慮)

東電の健診データは連結不可能匿名化とし、対象者は特定できない。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。研究の可否は、東電内での審査は終わり許可が出ているが、東電本店では対象となる労働者の同意を取っている。またデータ解析の発表に関しては、東電の許可を得てから行う。

さらに健康診断データ解析及びマウス実験に関しては、産業医科大学倫理委員会及び動物倫理委員会にも審査を受け、既に許可を得ている。

III 研究結果

東電の健康診断のデータは、会社側が労働者に同意を取っている段階で入手できていないため、解析はできていない。平成 26 年度には入手できる予定である。

100 日目の血球計算では、100mGy 及び 1Gy 照射群で白血球と 1Gy 照射群で赤血球の有意な減少がみられた (Figure 1)。

造血幹細胞の比率は、非照射群と照射群で有意な差は無かった (Figure 2)。

100 日目におけるメタボローム解析にて、TCA cycle は照射群で高値、Cys は照射群で低値、GSH/GSSH 及び NADP+ (弱い酸化ストレスの指標) は高線量群で低値、PRPP は照射群で高値 (核酸合成の促進) (Figure 3)、プリン合成は低線量 (Figure 4) で活発となっていた。

IV 考察

放射線による酸化ストレスの発生はよくみられる現象であり¹⁾、長期的な炎症が残存すると考えられる²⁾。今回、マウスに対する放射線は 100 日では、造血幹細胞に影響がなくなっていたが、白血球数及び赤血球数の減少をみた。これらの結果から、細胞による代謝の影響はさほど無いと考えられる。しかしながら、照射後 100 日目でも、GSH/GSSH の低下は弱い酸化ストレスが残存している指標であり、TCA サイクル、核酸合成及びプリン合成の増加が生じていると考えられた。

V 結論

照射後長期に渡っても酸化ストレスが残るが、TCA サイクル、核酸合成及びプリン合成の増加があると考えられた。

VI次年度以降の計画

東電の健診データは、労働者の同意を取るという最終段階の状況であるので、次年度以降には提供される。そのデータは、多変量解析を行い、生活習慣を除いた放射線のみの血液動態に対する影響を検討する。

マウス実験は、平成 24 年に照射したマウスが 1 年半から 2 年となる時期になるので、これまで同様に血球計算及び脾臓を採取しメタボローム解析を行う予定である。またこれまでの結果から、酸化ストレスの増加がみられた。抗酸化能を測定する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Mori K Tateishi S Okazaki R, 他. How Occupational Health Can Contribute at a Disaster and What Should Prepare for the Future? -Lessons Learned through Support Activities of a Medical School at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant in Summer 2011, J Occup Health 2013; 55: 6-10.
- 2) 岡崎 龍史. 日本における放射線に関する法令（総説），産業医科大学雑誌特集号「産業医と労働安全衛生法四十年」2013; 35: 85-89
- 3) 岡崎 龍史. 特集：福島第一原子力発電所事故後の放射線対策と動向，日本臨床 2014; 72: 236-239.
- 4) Okazaki R Ootsuyama A. The p53 dependent delayed effects of radiation varied at the timing of irradiation in $p53^{+/-}$ mice. J Radiat Res 2014; 55: 25-31.
- 5) 岡崎 龍史. 総説：職業における放射線障害の歴史，産業医科大学雑誌 2014; 36: 27-31.

引用文献

- 1) Ran Y Wang R Gao Q, 他. Dragon's blood and its extracts attenuate radiation-induced oxidative stress in mice. J Radiat Res 2014; doi: 10.1093/jrr/rru013
- 2) Neriishi K Nakashima E Delongchamp RR. Persistent subclinical inflammation among A-bomb survivors. J radiat biol 2001; 77: 475-482.

Figure 1 照射後100日目の各血球数

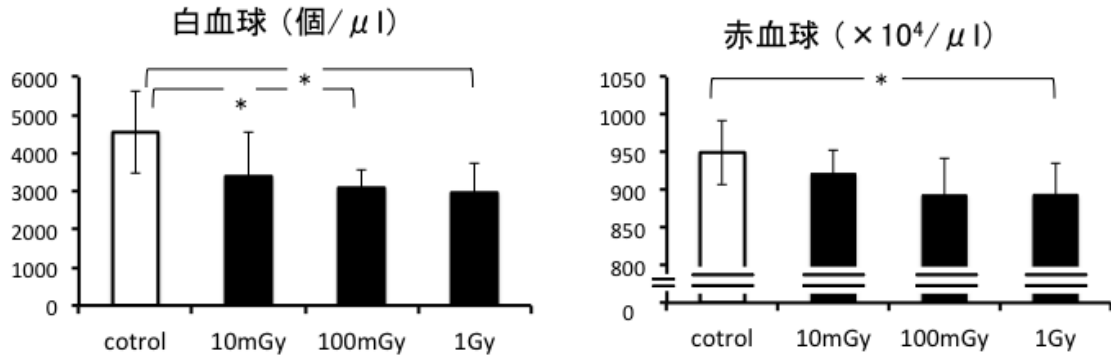


Figure 2 照射後100日目における造血幹細胞の比率

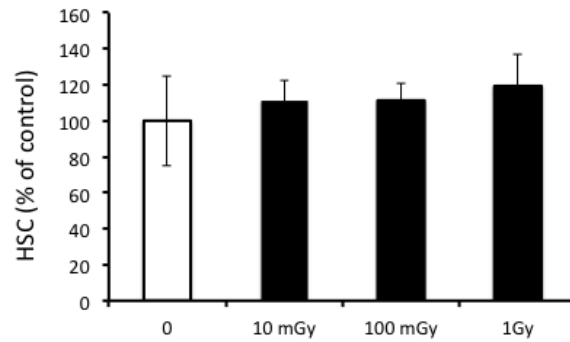


Figure 3 照射後100日目の脾臓におけるメタボローム解析

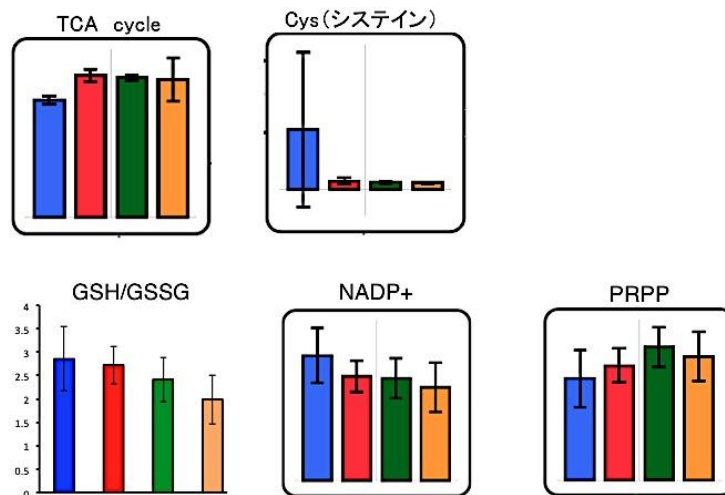
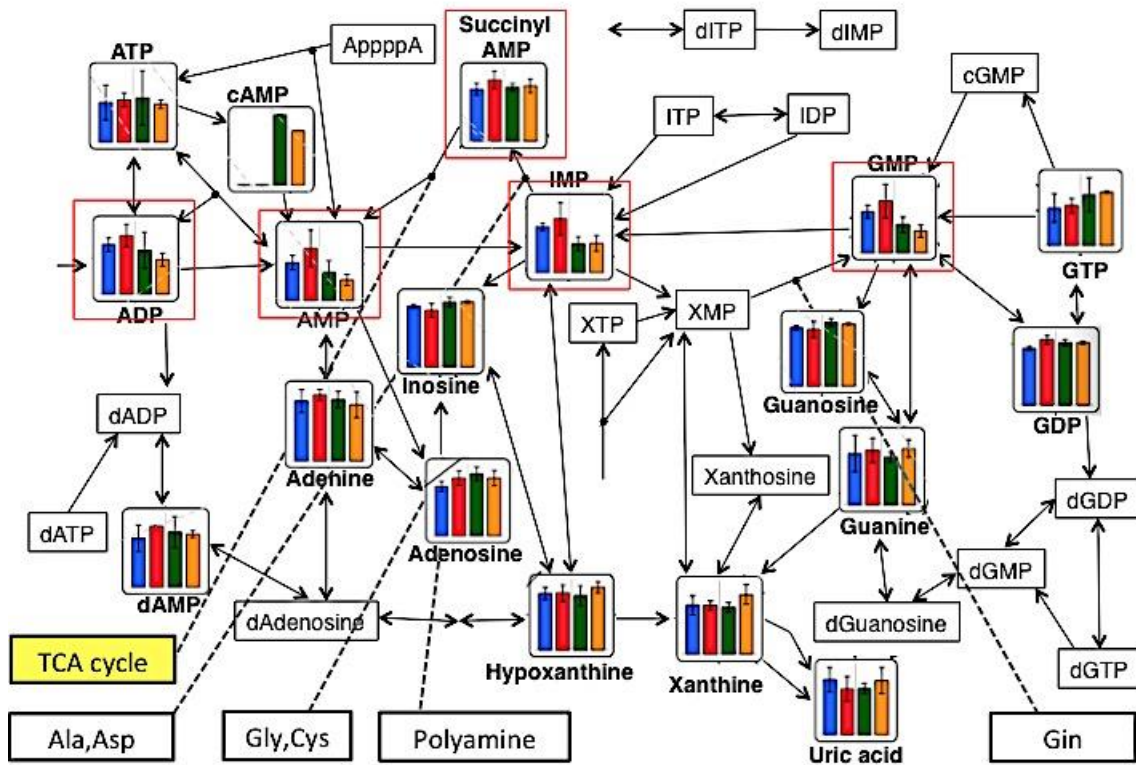


Figure 4 照射後100日目の脾臓におけるプリン合成



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

Ryuji Okazaki

Department of Radiological Health Sciences, Institute of Industrial Ecological Sciences, 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

To evaluate the effects of low-dose irradiation, C57BL/N mice were irradiated with a whole-body dose of 0Gy, 10mGy, 100mGy and 1Gy gamma rays at 8 weeks of age. These mice were sacrificed at 100 days after irradiation, and their cytometry and metabolome were analyzed. Leucocytes and erythrocytes were significantly decreased in the 1Gy irradiated mice group compared to the other groups. In the metabolome analysis, TCA cycle, nucleic acid synthesis and purine synthesis were increased in the 10mGy irradiated mice group. We suggest that oxidative stress remains for a long time after low-dose irradiation at a young age and causes cell activity to increase.

Data of medical examinations in Tokyo Electric Power company (TEPCO) have not been made public, but TEPCO is going to try to get the workers to agree of the to make their data of the exposed dose and medical examinations available to us.

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

公立大学法人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、放射線が関与す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。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、学術報告のシステマティックレビューにより、造血幹細胞、活性酸素種、老化、放射線による細胞動態の変化について文献レビューを行い、急性骨髄性白血病の発症機構に関わる仮説を検証した。また、造血系細胞の動態を記述できる数理モデルをレビューし、それに基づいたシミュレーションから今後のデータ解析利用の可能性を検討した。実験研究では、造血系幹細胞および前駆細胞の線量・線量率効果を明らかにするために、マウスの白血病誘発過程における放射線の役割を、20mGy/day、200mGy/day、1000mGy/minの線量率で照射した C3H/HeNJcl マウスの造血系幹細胞(HSC)、前駆細胞(MPP, CMP, CLP)および末梢血細胞(WBC, RBC, PLT)の動態から調べた。細胞動態は時間・線量率・累積線量の関数と捉えることができ、統合的な解析を行うために、文献レビューからの考察と生物モデル研究者からのアドバイスを得て、モデル解析の方向性について検討した。

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¹⁻⁵⁾、(2) 2 番染色体の中間部分の欠失型異常⁶⁻¹⁰⁾ と対立する 2 番染色体上の Sfp1 遺伝子の点突然変異¹¹⁻¹³⁾ が必須であることが分かってきている。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^{7,14,15)}。

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¹⁶⁻¹⁸⁾。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¹⁹⁾。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²⁰⁾。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^{21,22)}。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²³⁾。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^{24,25)}。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に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^{26,27)}。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マティックレビューと実験を組み合わせ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) 低線量率 γ 線長期連続照射したマウスの血球数および造血幹/前駆細胞の存在割合の経時変化、(3) 低線量率 γ 線長期連続照射したマウスの造血幹/前駆細胞における Ki67 発現 (G_0 期以外の細胞のマーカー) 細胞割合の経時変化をそれぞれ検討した。

II. 細胞動態に関する文献レビュー

PubMed より細胞動態、老化、活性酸素、DNA 損傷、染色体異常、急性骨髄性白血病をキーワードとして文献を収集し、造血幹細胞、活性酸素種、老化、放射線による細胞動態の変化について文献レビューを行い、急性骨髄性白血病の発症機構に関わる仮説を検証した。

II-1. 造血幹細胞の概略

造血幹細胞 (HSC)は、自己複製能と多分化能を有し、個体の生涯を通して末梢血球を供給し続けることで特徴付けられる²⁹⁾。この細胞は、ニッチとして知られる特異的な微小環境において維持され、骨髄の低酸素領域である骨膜内のニッチ中で静止状態に保たれている^{30,31)}、また正常なHSCは細胞内低酸素状態であり、未熟な状態の維持にはHIF-1 α ³⁰⁾、Foxo³²⁾、ATM^{33,34)}等のような幾つかの分子が関与することが知られている。未熟なHSCは細胞内の活性酸素種 (ROS)が低レベルに抑えられており^{32,35,36)}、適切な細胞内ROSレベルは細胞の分化、増殖に重要な役割を果たすことが知られている^{29,35-37)}。しかし一方で、過剰な細胞内ROSレベルだけではなく、外因性もしくは内因性の過剰なROSは、HSCの生存、分化、増殖に悪影響を及ぼす^{29,36,38)}。

このようにHSCは、周辺環境もしくは細胞内の酸素状態、ROSレベルなどによって影響される複雑な情報伝達経路により精密に制御されていることが明らかとなった。

II-2. 活性酸素種の概略

放射線や化学療法薬剤などを含む酸化ストレスの代表例は、活性酸素種 (ROS)による作用である。ROSの発生源は主にミトコンドリアによる代謝過程であると考えられている^{37,39)}。Naka Kらによるとスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシ・ラジカルを含むROSは、不対電子を有し、フリーラジカルと作用することができる。またスーパーオキシド・ディスムターゼであるMnSODやCu/ZnSODは、スーパーオキシドを過酸化水素へ変換することができる³⁷⁾。それに加えて、Fe²⁺やCu⁺は、FentonもしくはHarber-Weiss反応を経由して、過酸化水素から反応性の高いヒドロキシ・ラジカルへ変換され⁴⁰⁾、これはDNA損傷の原因となり得る。全ての細胞は、過酸化水素を水に変換することで無毒化するカタラーゼもしくはグルタチオン・ペルオキシターゼ等により、ROS仲介性の酸化ストレスから自身を防衛している。

II-3. 老化

細胞老化とは、細胞が不可逆的に分裂を停止することを指し、これは細胞分裂により染色体末端に存在するテロメアの短縮が起きることが原因であることが示された⁴¹⁾。この現象を裏付けるように、ヒト間葉系幹細胞では、細胞が分裂停止するまでの最終的な分裂回数とドナー年齢との間に負の相関があること、テロメア長と最終分裂回数との間に正の相関があること、分裂回数の増加とともにp16、SA- β -Gal発現が陽性となることが示された⁴²⁾。Sedelnikova OAらは、継代数依存的に細胞老化マーカーであるSA- β -Galの発現増大が脳、肺、腎、肝など多くの組織で起きることを示した⁴³⁾。また、造血幹細胞においても老化は例外ではなく、自己複製能の低下、クローン増殖能の低下、骨髄移植後の生着能の低下、Myeloid-biasの様な特徴が現れることも報告された⁴⁴⁾。さらにHSCでは、加齢とともに非G0集団の割合が増加しており、細胞周期進行を示唆している⁴⁵⁾。もっと言うと、HSCでは加齢に伴いDNAの2本鎖切断頻度(γ -H2AX)⁴⁶⁾、染色体異常の発生頻度⁴⁷⁾の増大が、多くの組織では加齢に伴い塩基損傷頻度(8-OHdG)の増大⁴⁸⁾、抗酸化能の低下⁴⁹⁾、遺伝子突然変異発生頻度の増大^{50,51)}が示されている。このように、加齢の際に細胞内では細胞の老化が起きていることは明白であり、これに伴いテロメアの短縮、ROS産生量の増大、抗酸化能の低下、DNA損傷の蓄積、遺伝子突然変異発生頻度の増大、など様々な細胞動態変化が生じることが明らかとなった。もしかしたら、この様な細胞動態の変化が、加齢したHSCにおいて幹細胞の機能低下、造血の調節異常を結果としてもたらしているのかもしれない、発がん傾向を

強めるのかもしれない⁵²⁾。

II-4. 放射線による細胞の動態変化

放射線は酸化ストレスの一種であり、照射により *in vitro* ではヒト HSC の生存率及びクローン増殖能の低下が⁵³⁻⁵⁶⁾、*in vivo* ではマウス HSC の存在割合の低下が確認されている^{57,58)}。さらにマウス HSC では放射線照射により老化マーカー (p16, SA-β-Gal) の発現が増大することが示され⁵⁹⁾、同様に、放射線照射による老化マーカーの発現 (p21, SA-β-Gal) が、持続的に起こることも報告されている⁶⁰⁾。これらは放射線による細胞老化の誘導を示唆するデータである。もっと言うと、放射線照射後のマウス HSC では、ROS 産生量、DNA2 本鎖切断頻度、塩基損傷頻度の増大が起こり、結果としてクローン増殖能が劇的に減少することが示された^{57,58)}。このクローン増殖能の低下は、いずれも抗酸化剤の投与 (*N*-acetylcysteine: NAC、NOX inhibitor である diphenylene iodium: DPI、スーパーオキシド・ディスムターゼの擬態性抗酸化剤である Mn(III) *meso*-tetrakis-(*N*-ethylpyridium-2-yl): MnTE) によりほぼコントロールレベルにまで回復することから、ROS がマウス HSC の老化に関与していると考えられる。さらに外因性の ROS はマウス HSC の p38-MAPK を活性化させ、老化マーカーの発現 (p16, p19) を特異的に誘導し、HSC の再構成能喪失と細胞周期進行の誘導に関与することが示された³⁸⁾。また、放射線照射は、マウス HSC において p21 の活性化と p53 の抑制をもたらし、BrdU、Ki67 陽性細胞数を増加させ、これにより細胞周期の進行が誘導されることが示唆された⁶¹⁾。

一方、放射線照射はゲノム不安定性を導き、マウス HSC において不安定型染色体異常を起こさせることも報告され、この場合にも ROS 産生量、DNA2 本鎖切断頻度、塩基損傷頻度の増大が認められた⁶²⁾。

これら過去の報告をまとめると、放射線照射は HSC の細胞動態を変化させることで、特に細胞周期、ROS 産生量、DNA 損傷頻度、塩基損傷頻度などの増大により、不安定型染色体異常による細胞死、細胞老化に伴うクローン増殖能の低下を結果としてもたらすのかもしれない、加齢した HSC の細胞動態変化を鑑みると、このような変化が発がんの傾向を強めるのかもしれない。

II-5. 急性骨髄性白血病の発症機構に関わる仮説

放射線誘導性発がんの代表例である急性骨髄性白血病 (AML) は、AML モデルマウスである C3H/HeN Jcl マウスを用い、これまでに①放射線照射から平均して 1-2 年の潜伏期間があること¹⁻⁵⁾、②2 番染色体の欠失型異常⁶⁻¹⁰⁾ および対立する 2 番染色体上の *Sfpil* 遺伝子の点突然変異¹¹⁻¹³⁾ が必須であることが明らかになっている。これらの異常のうち 2 番染色体の欠失型異常には過去の報告から 2 つの可能性が示唆されている。第 1 は DNA2 本鎖切断が原因となり、放射線照射後の比較的早い段階で生じる可能性である^{7, 14, 15)}。第 2 は放射線による遺伝的不安定性により生じる可能性である¹⁶⁻¹⁹⁾。しかし、この 2 つの可能性について確証は未だ得られていない。一方、*Sfpil* 遺伝子の点突然変異については、放射線照射後の末梢血球減少に対応する為の HSC の持続的な分裂活性の上昇²²⁾、これにより老化が促進され²³⁾、老化による抗酸化能の低下が^{24, 25)}、細胞内 ROS の蓄積を可能にし、結果として点突然変異を生じるのかもしれない。そこで研究者らは、放射線が HSC の細胞動態変化をもたらす、細胞の老化を誘導することにより、結果として AML の発症に繋がる 2 番染色体の欠失型異常や *Sfpil* 遺伝子の点突然変異を惹起するのではないかと仮定するに至った。

II-6. 造血幹細胞および前駆細胞の動態に関する数理モデル

従来、放射線誘発急性骨髄性白血病のがん化プロセスを定量的に記述する数理モデルは2段階突然変異モデルが主流である。しかし、そこで推定されるがん化に必要な突然変異率は、放射線が単純に直接的なDNA損傷から生じたものであるかどうかは明らかではない。むしろ、放射線によって確実に引き起こされる細胞動態の変化の結果として、がん化を促進している可能性が高いことを我々の研究では示してきた。造血幹細胞および前駆細胞の動態に関する数理モデルはがん化のプロセスの理解に必要なものであると考える。急性骨髄性白血病は造血幹細胞から末梢血（白血球、赤血球、血小板）へと成熟する途中でがん化するため発症すると考えられ、白血病の起源細胞は、寿命や突然変異頻度を考えると造血幹細胞や前駆細胞である可能性が高い。

血液幹細胞からの血液分化過程におけるモデルとして、Colijn と Mackey (A mathematical model of hematopoiesis – Periodic chronic myelogenous leukemia. *J Theor Biol* 237,117-132, 2005) が開発した負フィードバックの特性を組み込んだ数理モデル (図 II-6-2) は、幹細胞のアポトーシス割合が増加することで末梢血の血球数が振動する時間的变化を示すことができ、臨床的な疾患の症例を表現できるとされている。

このモデルは実験データを解析する上で参考になる。放射線は各造血系の細胞死を線量率に応じて誘発し、その後、組織回復のために細胞増殖が作用して、細胞数の回復が誘発される。このプロセスを血液分化過程における負フィードバック機構として表現し、実験データを解析することが考えられる。その予備段階として、Colijn と Mackey のモデルを拡張したモデル (図 II-6-2) を含めて考察した。

放射線被ばくのように造血系細胞に定常ではない変化が与えられたときに、細胞動態の時間的变化は実験的に調べることは難しい。そこで、本研究で行った数理モデルによる予備的なシミュレーションから明らかになったことは、負フィードバックによって、幹細胞の細胞動態の変化は非線形的な影響が認められることである。また、幹細胞の動態に影響が生じた場合、一定の時間遅れを持って末梢血球にも影響が生じることを数理モデルに組み込むことが可能である。造血幹細胞は血球系の細胞にのみに分化できる多能性をもった幹細胞であり、幹細胞に関する実験データはまだ十分でない。シミュレーションは、幹細胞や前駆細胞のアポトーシスの増加率が、細胞増殖率の増加率の変化がより末梢血球数の変化に非線形的に影響を与えることを示したが、今後は、幹細胞と前駆細胞を分割した数理モデルを開発するために、必要なパラメータを実験的に得る必要があると考える。

生物モデルは、必要なパラメータが多いためにデータに適合することは不向きである。このモデルの特性を考慮した簡易モデルに改良するか、推定するパラメータを最小限にしてシミュレーションを繰り返す計算から最適解のパラメータを得ることが考えられる。今後は、両者の方法の検討を進め、AML の発症モデルを描くために、データ解析とシミュレーションによって、不明な点をより明らかにしていく予定である。

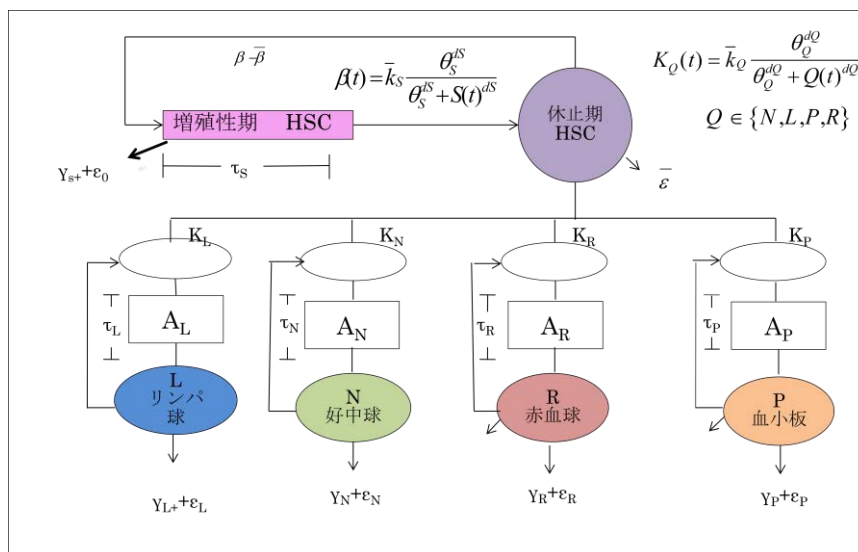


図 II-6-1: 血液幹細胞からの血液分化過程における負フィードバックの特性を組み込んだモデル (γ は自然によるアポトーシス、 ε は放射線誘導性のアポトーシスを示す)

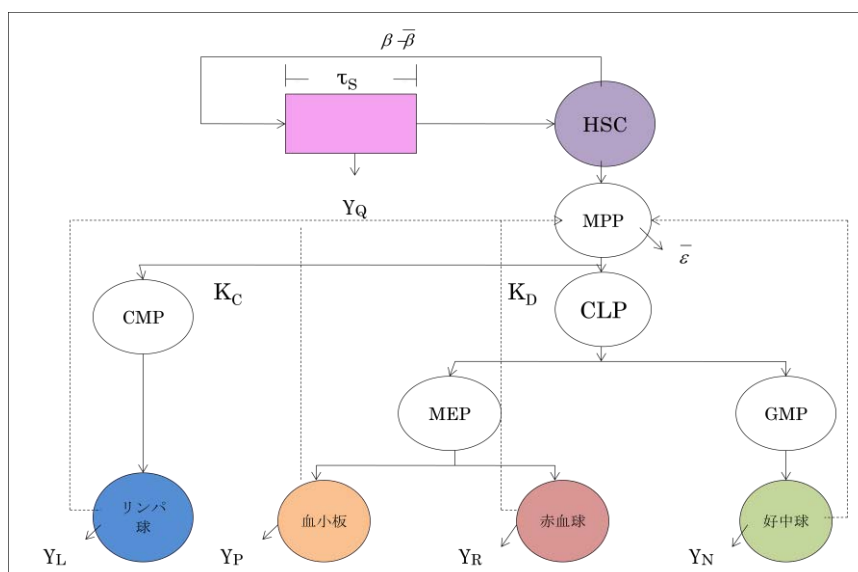


図 II-6-2: 造血幹細胞から末梢血への分化過程のプロセスから、幹細胞を前駆細胞と2つにわけた負のフィードバックの特性を組み込んだ末梢血への分化過程のモデル

HSC : 幹細胞

MPP : 多能性造血幹細胞

CMP : リンパ球系前駆細胞

CLP : 骨髄球系前駆細胞

III. 低線量率 γ 線長期連続照射したマウスの造血幹/前駆細胞における細胞動態の経時的変化

III-1. 方法

<マウス>

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

< γ 線の照射>

γ 線照射は環境科学技術研究所に設置してあるCs-137低線量率 γ 線照射装置を用いた。マウスを非照射群(0Gy)、20mGy/day群、200mGy/day群、1Gy/min群の4群に分け、集積線量が3Gyに到達するまで γ 線を全身に連続照射した。本研究では1群35匹のマウスを使用した。

<血球数の測定>

マウスをエーテルで麻酔後頸椎脱臼し、心臓採血を行なった。その後コールターカウンターを用いて、白血球(WBC)、赤血球(RBC)、血小板(PLT)の数を計測した。

<フローサイトセルソーターによる造血幹/前駆細胞の単離>

フローサイトメーターによる各分化段階の造血幹/前駆細胞の単離はHirouchiらによって確立されているプロトコールに従って行なった²⁸⁾(Hirouchi et al 2011)。下記に簡単に説明する。エーテル麻酔後頸椎脱臼したマウスの両側の大腿骨から骨髓細胞を摘出した。各分化段階の造血系細胞では細胞膜表面タンパク質の発現パターンが異なっていることが分かっている。その特性を利用してそれぞれのタンパク質の抗体処理を行ない、フローサイトセルソーターにて造血幹細胞(HSC)^{*1}、多能性前駆細胞(MPP)^{*2}、骨髓球系造血前駆細胞(CMP)^{*3}、リンパ球系前駆細胞(CLP)^{*4}をそれぞれ単離した。この操作は全て環境科学技術研究所にて実施した。

^{*1}HSC : CD34 陰性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

^{*2}MPP : CD34 陽性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

^{*3}CMP : CD34 陽性、Lin 陰性、sca1 陰性、c-kit 陽性

^{*4}CLP : CD34 陽性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陰性

<Ki67の免疫蛍光抗体染色>

HSC、MPP、CMP、CLPを4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定処理を行なった。その後、1200rpmで5分間遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、PBS溶液200 μ lを加え、よく攪拌した後に1200rpmで5分間遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、ブロッキング溶液^{*1}を200 μ l入れ、よく攪拌し、37 $^{\circ}$ Cで10分間静置した。静置後、1200rpmで5分間遠心した後、上澄み液を捨て、その後、1次抗体液^{*2}200 μ lを加え、よく攪拌した後、37 $^{\circ}$ Cで2時間静置した。静置後、1200rpmで5分間遠心し、上澄み液を捨て、PBS溶液100 μ lで攪拌した。攪拌後、再度1200rpmで5分間遠心し、上澄み液を捨てた後、2次抗体液^{*3}100 μ lを加え、よく攪拌し、37 $^{\circ}$ C、暗室の環境下で1時間静置した。静置後、1200rpmで5分間遠心し、上澄み液を捨て、PBS溶液100 μ lを加え、よく攪拌した。この操作を3回繰り返した後、再度1200rpmで5分間遠心し、上澄み液を捨て、DAPIIII

counterstain (Vysis) 10 μ l を加え、よく攪拌し、全量をカバーガラスに乗せて、スライドガラスに貼付けた。

*1 ブロッキング溶液：0.5% TritonX で0.03g/mlの濃度に調整したBSA溶液。

*2 1次抗体：Anti-Ki67 Rabbit-Poly (Novus USA) とブロッキング液を1:299 で混合した溶液。

*3 2次抗体：Alexa 488 (life technologies) とブロッキング液を1:199 で混合した溶液。

< Ki67 発現細胞の観察および解析 >

Ki67 を発現している細胞は蛍光顕微鏡 OPTIPHOT-2 (Nikon) を用いて観察した。DAPI で染色されている細胞は蛍光フィルター DM400 UV-2A (Nikon) で、Ki67 を発現している細胞は蛍光フィルター DM510 B-2A (Nikon) でそれぞれ観察した。露出:40ms、ゲイン:27.0x、コントラスト:リニアで観察を行った。DAPI で染色された細胞から全細胞数を求め、Ki67 を発現している細胞（細胞増殖期にある細胞）の割合を計測した。

III-2. 結果

< 血球数の経時的变化 >

血球数の経時的变化を非照射群は図 1~3、20mGy/day 群は図 4~6、200mGy/day 群は図 7~9、1Gy/min 群は図 10~12 にそれぞれ示す。

非照射群では空照射を開始してから 50 日目以降のデータしか現在得られていないが、150 日までの間 WBC 数、RBC 数、PLT 数いずれも変化は見られなかった。よって、50 日目以降の値を平均したものを非照射群の値として下記の各線量率群の結果と比較することとした。

20mGy/day 群は現在までに照射を開始してから 10 日目、50 日目、100 日目、150 日目のデータが得られている。WBC 数は照射を開始してから 50 日目に非照射群の約 0.5 倍となった。しかし、その後は緩やかに増加していき、集積線量が 3Gy に達する 150 日目では非照射群の約 0.7 倍となった。RBC 数、PLT 数に関しては 150 日間非照射群と差が見られなかった。

200mGy/day 群は現在までに照射を開始してから 1 日目、5 日目、10 日目、15 日目、65 日目、110 日目のデータが得られている。WBC 数は集積線量が 3Gy に達する 15 日目に非照射群の約 0.7 倍となった。その後は変化が見られなかった。RBC 数は 15 日目に非照射群の 0.9 倍となった。その後は徐々に増加していき、65 日目以降は非照射群と差が見られなくなった。PLT 数は WBC や RBC の経時的变化とは様相が異なり、照射を開始してから 1 日目に約 1.2 倍の増加を示した。しかしその後は減少し、15 日目では非照射群の約 0.6 倍となった。15 日目以降は増加傾向を示し、65 日目以降は非照射群と差が見られなくなった。

1Gy/min 群は現在までに 50 日目と 100 日目のデータが得られている。1Gy/min では 3 分で集積線量が 3Gy に達する。その後 WBC 数は 50 日目が経過しても非照射群の約 0.6 倍であった。50 日目以降は増加していき、100 日目では非照射群と差が見られなくなった。RBC、PLT はいずれも非照射群と差は見られなかった。

< 造血幹/前駆細胞の存在割合の経時的变化 >

造血幹/前駆細胞の存在割合の経時的变化を非照射群は図 13~16、20mGy/day 群は図 17~20、200mGy/day 群は図 21~24、1Gy/min 群は図 25~28 にそれぞれ示す。

非照射群のデータは現在 65 日目以降のものしか得られていないが、HSC および MPP の存在割

合は空照射を開始してからの日数に依存して減少していく傾向が見られた。CMP、CLPは変化が見られなかった。

20mGy/day 群は現在までに照射を開始してから 10 日目、50 日目、100 日目、150 日目のデータが得られている。HSC の存在割合は非照射群と同様に照射を開始してから日数に依存して減少していく傾向が見られた。100 日目以降では非照射群の 65 日目以降の値と差が見られなくなった。MPP の存在割合は 150 日間非照射群の 65 日目以降の値と差は見られなかった。CMP の存在割合は照射開始から徐々に増加していく傾向が見られ、100 日目以降は非照射群の 65 日目以降の値と差が見られなくなった。CLP の存在割合は照射開始から 10 日以降に増加が生じ、50 日目以降は変化が見られなくなった。100 日目以降では非照射群の 65 日目以降の値と差は見られなかった。

200mGy/day 群は現在までに照射を開始してから 1 日目、5 日目、10 日目、15 日目、65 日目、110 日目のデータが得られている。HSC 存在割合は照射開始 1 日目に約 1.7%であった。その後、急激な減少を示し、集積線量が 3Gy になる 15 日目では約 0.1%となり、非照射群の 65 日目以降の値と差が見られなくなった。MPP の存在割合は照射開始 1 日目に約 1.2%であった。その後、急激な減少を示し、15 日目では約 0.06%となった。15 日目以降は増加傾向を示し、65 日目では非照射群の値と差が見られなくなった。CMP の存在割合は照射開始 1 日目に約 0.9%であった。その後、急激な減少を示し、15 日目では約 0.39%となった。15 日目以降は急激な増加を示し、65 日目では非照射群の値の約 2 倍となった。その後は減少し、110 日目では非照射群の値と差が見られなくなった。

1Gy/min 群は現在までに 50 日目と 100 日目のデータが得られている。1Gy/min では 3 分で集積線量が 3Gy に達する。その後 HSC の存在割合は 50 日が経過しても非照射群の 65 日目以降の値の約 0.5 倍であった。その後は増加していき、100 日目では非照射群の値と差が見られなくなった。MPP の存在割合も HSC とほぼ同様の変化であった。CMP、CLP の存在割合は 50 日目と 100 日目ともに非照射群の 65 日以降の値と差は見られなかった。

<造血幹／前駆細胞の Ki67 発現細胞の割合の経時的変化>

造血幹／前駆細胞における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化を 20mGy/day 群は図 29~32、200mGy/day 群は図 33~36 にそれぞれ示す。非照射群のデータは現在解析中である。

20mGy/day 群は現在までに照射を開始してから 10 日目、50 日目、100 日目のデータが得られている。HSC、MPP、CMP、CLP いずれも Ki67 を発現している細胞の割合は照射開始後の日数に依存して増加していく傾向が見られた。

200mGy/day 群は現在までに照射を開始してから 1 日目、5 日目、10 日目、65 日目のデータが得られている。HSC、MPP、CMP、CLP いずれも照射開始後 2 日目に Ki67 を発現している細胞が増加し、その後減少していく傾向が見られた。

III-3. 考察

本研究では 20mGy/day、200mGy/day、1Gy/min の線量率で γ 線を C3H マウスに長期連続照射し、血球数および造血幹／前駆細胞の存在割合がどのように変化するかを実験的に調べた。まず血球数の変化を調べた。その結果、線量率が高くなると血球数の減少が短時間に起こり、非照射群のレベルにまで回復していくにも時間がかかることが分かった。

次に、造血幹／前駆細胞の存在割合の変化を調べた。その結果、HSC、MPP、CMP、CLP の存

在割合は 20mGy/day では 150 日間ほとんど変化が見られなかったが、200mGy/day では照射開始一日目に急激な増加を示し、その後非照射群と同じレベルになる傾向が見られた。1Gy/min では 50 日目以降に増加し、その後非照射群と同じレベルになる傾向が見られた。本研究では各細胞の存在割合とともに、細胞動態を Ki67 (G₀ 期以外の細胞のマーカー) の発現の有無で調べた。その結果、20mGy/day では HSC、MPP、CMP、CLP いずれも照射開始から日数に依存して Ki67 を発現している細胞の割合が増加していることが分かった。200mGy/day では照射開始後 5 日目に Ki67 を発現している細胞の割合が増加し、その後徐々に減少していく傾向が見られた。これらの結果から、血球数の減少に応じて、造血幹/前駆細胞の細胞動態が変化し、造血幹/前駆細胞の存在割合が増加している可能性が考えられた。

今年度は実験の途中であるが、以上の本研究結果より、線量率によってマウス体内の血球数、造血幹/前駆細胞の存在割合、造血幹/前駆細胞の細胞動態の経時的変化のパターンが異なる可能性が考えられた。特に線量率が高い方が血球数の減少が早い段階に生じ、これを補うために造血幹/前駆細胞の存在割合が急激に増加するが、回復までに時間がかかることが分かった。

この造血幹/前駆細胞の細胞動態の変化がどのように AML に関わっていくのか次年度には結論をつけたいと考えている。

IV. 次年度以降の計画

昨年度に引き続き環境科学技術研究所に設置してある低線量率 γ 線照射装置を用いて、C3H 系マウスに 20mGy/day、200mGy/day、1Gy/min の線量率で γ 線を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、Sca1、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- β -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 $\cdot\text{O}_2$ 検出用蛍光試薬) および APF (細胞内 $\cdot\text{OH}$ 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 γ -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。

6) 造血系細胞の動態を考慮した数理モデルで解析し、細胞動態に及ぼす線量率効果をモデル解析がより明らかにする。

7) 以上の実験データとモデル解析を通して、線量率効果をどう描くことが実験データから示唆されるかを考察する。

V. 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; 放射線生物研究 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; 放射線生物研究 47: 347-360.

VI. 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. *Br J 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. *Br J 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.