

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

鈴木啓司（長崎大学原爆後障害医療研究所放射線災害医療学・准教授）

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

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

白石一乗（大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻放射線生物学・助教）

研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所の事故を受けて、低線量放射線、とりわけ 100mSv 以下の放射線被ばくによる健康影響が懸念されている。疫学調査結果等では、このような低線量放射線による健康影響については明確な答えを得る事は極めて困難であるため、放射線防護の立場から、直線しきい値なし (Linear Non-Threshold: LNT) モデルを採用しているが、このことが逆に、一般住民の健康不安を醸成する原因にもなっている。そこで、本研究課題では、低線量率・低線量被ばくモデル動物において、被ばくによって誘発される DNA 損傷および発がん変異の組織における蓄積と排除を、組織幹細胞に着目しながら解析することを計画した。具体的には、公益財団法人環境科学技術研究所（環境研）において低線量率・低線量放射線（0.05～20mGy/日）を慢性的に照射したマウスにおいて、累積線量が 1～100mGy の間で、肺や甲状腺を含む 10 種の代表組織を採取し、長崎大学において DNA 損傷分子プローブおよび幹細胞マーカーあるいは増殖マーカーとの蛍光免疫二重染色を実施し、組織幹細胞における DNA 損傷のレベルを検討した。

まず、低線量率・低線量放射線照射マウスにおける標本の採取については、0.05mGy/日、1 mGy/日、20 mGy/日の線量率で蓄積線量 1mGy、20mGy あるいは 100mGy を照射をしたマウスより、甲状腺、乳腺、脾臓、胸腺、消化管、肝臓、肺、腎臓、膀胱および生殖腺を採取し、ホルマリン中で固定後にパラフィン包埋を行った。組織切片は、厚さを 4 ミクロンに固定して薄切し、スライドガラス上に固定した切片を脱パラフィン後、抗体賦活化処理を施して、抗 53BP1 および抗 Ki-67 抗体で蛍光免疫染色を行った。その結果、まず、組織を構成する全ての細胞で必ずしも 53BP1 フォーカスが検出されるのではなく、組織毎に特異的な領域の細胞でのみフォーカス形成が観察されることがわかった。また、非照射マウスにおける 53BP1 フォーカス形成頻度（以降 BG と標記）が、組織毎に顕著に異なることも明らかにした。低線量率・低線量放射線照射マウスにおける検討から、0.05mGy/日の線量率では、400 日程度（蓄積線量 20mGy）の長期慢性被ばくでも、組織における DNA 損傷の蓄積は起こらないことを見いだした。また、1mGy/日～20mGy/日までの線量率では、蓄積線量で最大 100mGy の被ばくでも、BG のレベルを超える DNA 損傷の蓄積はないことを確認した。

分担研究では、組織別の幹細胞において、DNA 損傷を受けた細胞の運命の追跡と、その基盤機構の解析を行った。今岡は、内腔細胞と筋上皮細胞の両系譜への分化能を示す両能性前駆細胞の放射線感受性はさほど高くないことを考察した。また、100mGy～8Gy の放射線照射が、両能性前駆細胞の分化能には影響を与えないことを見いだした。大塚は、幹細胞系譜追跡法を用

いて、集積線量（1Gy）を照射したマウスにおいて、Lgr5 幹細胞の上位補充を指標に解析を行い、高線量率放射線照射（30Gy/時）で観察された上位補充が 0.3mGy/時では検出されず、幹細胞による組織修復反応において、線量率効果の存在を証明した。白石は、マウスより単離した神経幹細胞において、フローサイトメトリー法を用いて DNA 損傷応答を評価し、DNA 損傷の線量率依存的（1.75～500mGy/分）増加を観察した。また、胎児期被ばく仔マウスの神経幹細胞中の DNA 損傷が、胎児期の神経幹細胞と比べて低いレベルであることを確認した。

本研究の結果、ここで検討した低線量率・低線量放射線の長期間に渡る慢性被ばくでは、マウスの臓器・組織において DNA 損傷の蓄積がないことを証明した。これらの臓器・組織では、放射線被ばくによる過剰な細胞死は検出されなかったことから、誘発された DNA 損傷は、細胞の持つ DNA 損傷修復能により速やかに修復されていると考えられる。本研究で検討した中線量率放射線（400mGy/日）では、組織・臓器における明らかな DNA 損傷の蓄積が観察されたことを考慮すると、20mGy/日から 400mGy/日の間に、臓器・組織における DNA 損傷の蓄積が顕在化するしきい線量率が存在し、少なくともそれ以下の低線量率・低線量放射線被ばくでは、『線量の蓄積』という概念を適用するのは科学的見地から適切ではないことを明確に示した。

また、組織幹細胞に対する影響の解析から、組織幹細胞の分化段階に特異的な放射線感受性や、組織幹細胞に特徴的な DNA 損傷修復や細胞死による排除機構の存在が証明され、組織幹細胞では、低線量率・低線量放射線による誘発される DNA 障害をより効率的に排除して、線量の蓄積を回避するシステムが存在する可能性が示唆された。

以上の研究成果は、低線量率・低線量放射線被ばくによる健康影響に対する理解を深め、福島での原子力被災者などの健康管理・健康不安対策に資する、低線量率・低線量被ばくの健康影響に関する極めて重要な科学的知見である。

キーワード: 低線量、低線量率、100mGy、組織幹細胞、DNA 損傷

I. 研究目的

東京電力福島第一原子力発電所の事故を受けて、低線量放射線、とりわけ 100mSv 以下の放射線被ばくによる健康影響についての多くの議論が交わされている。しかしながら、広島・長崎の原爆被爆者の疫学調査結果等では、100 mGy よりも低い低線量放射線による健康影響について明確な答えを得る事は極めて困難で、このため、放射線防護の立場から直線しきい値なし（Linear Non-Threshold: LNT）モデルが採用されているが、このことが逆に、一般住民の健康不安を醸成する原因にもなっている。福島復興再生に向けた住民（ひいては国民）の安心のためにも、100mGy を下回るような低線量域での被ばくの健康影響の機構論に依拠した解明が望まれている。加えて、現存被ばくの状態で生活を続けている福島県民の安心・安全のための健康管理において、その科学的妥当性をより一層高めるためにも、年間 20mSv や生涯累積線量 100mSv 等の、長期低線量率・低線量慢性被ばくの健康影響の有無について、とりわけ発がんや継世代影響の標的となる組織幹細胞における放射線障害の蓄積の有無という観点から、科学的に実証された真実を得る事が求められている¹⁾。そこで本研究では、低線量率・低線量被ばくモデル動物において、被ばくによって誘発される DNA 損傷および発がん変異の蓄積と排除を、放射線発がんの標的となる臓器・組織の幹細胞において定量的に評価した。また、分担研究において、組織幹細胞における DNA 損傷の蓄積と排除に係わるメカニズムや、DNA 損傷を受けた細胞の運命を追跡するために、乳腺幹細胞、消化管幹細胞および神経幹細胞において、低線量率・低線量放射線の影響についての解析

を実施した。

II. 研究方法

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

標本は、賦活化液中で 95°C で 30 分処理して、抗原の賦活化を行った。その後、5%skim milk を含む TBS-T (0.5%Tween-20 を含む TBS 緩衝液) に一次抗体を希釈して、切片と 37°C で 2 時間反応させた。一次抗体としては、抗 53BP1 抗体 (Bethyl, A300-272) および抗 Ki-67 抗体 (DAKO、TEC-3 もしくは Biolegend, 16A8) を用いた。反応終了後、PBS でよく洗浄して、二次抗体を 37°C で 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa532 標識の抗ウサギ IgG 抗体及び Alexa647 標識の抗ラット IgG 抗体を用いた。標本は、1 μ g/ml の DAPI を含む 10%グリセリン PBS 溶液中で封入して保存した。

作成した標本は、蛍光顕微鏡下で観察し、デジタル画像を取得した後、画像解析システムにより最低でも 500 個 (非照射群では DNA 損傷の頻度に応じて 1000 個程度まで) の細胞について解析を行い、53BP1 の斑点状のシグナル (フォーカス) の出現頻度を算出することにより DNA 損傷の蓄積および排除を評価した³⁾。

分担研究では、成体雌ラットの下腹部乳腺脂肪体より採取した乳腺上皮組織塊を単一細胞にした後にマンモスフィアを形成させた。両能性の解析は、内腔細胞 (サイトケラチン 18) と筋上皮細胞 (サイトケラチン 14) のマーカーの発現を蛍光免疫染色法により調べた。消化管幹細胞の動態解析には、Lgr5 陽性幹細胞とその子孫細胞を標識させる幹細胞系譜追跡法を用いた。線量率効果の機構を探るために、組織幹細胞 (EGFP 強発現細胞) および前駆細胞 (EdU 陽性細胞) における放射線誘発 DNA 損傷の修復動態を、DNA 二本鎖切断部位への局在を示す 53BP1 タンパクの数 (フォーカス数) により評価した。神経幹細胞は、マウスより単離した大脳側脳室下帯より採取した。DNA 損傷の評価は、フローサイトメトリー法により行った。また、組織における DNA 損傷の評価は、 γ -H2AX 抗体による免疫染色法により行った。

(倫理面への配慮)

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

III. 研究結果

1. 組織における DNA 損傷応答の評価

B6C3F1 マウスを 5~6 週齢で入手し、環境研の低線量照射棟に搬入した。1 ケージあたり 3 匹

のマウスを入れて、検疫の後、8週齢になったところで照射を開始した。0.05mGy/日、1mGy/日、20mGy/日の各線量率で照射を継続し、累積線量1mGy、20mGyあるいは100mGyになったところで照射を終了し、非照射マウスと共にマウスを搬出して、環境研先端分子生物科学研究センターに搬入し、解剖を行った。各臓器・組織は10%中性緩衝ホルマリン中で1日振盪し、流水洗浄の後に70%エタノールに浸漬し臓器の切り出しを行った。切り出した臓器は、カセットに入れて自動包埋装置によりパラフィン包埋した。採取した臓器は甲状腺、乳腺、脾臓、胸腺、消化管、肝臓、肺、腎臓、膀胱および生殖腺で、薄切切片はスライドグラス上に固定した。

まず、抗53BP1抗体での染色を行うと、組織の中でも、部位によって53BP1蛋白質の発現レベルが顕著に異なることを見いだした。これに伴い、53BP1フォーカス形成にも、組織内の明らかな部位特異性が確認された。以下には、組織・臓器毎に、53BP1染色の結果を、Ki-67染色の結果と合わせてまとめた。

【甲状腺】：甲状腺は、1層の濾胞上皮細胞によって形成される濾胞が集まってできているが、濾胞上皮細胞および副甲状腺で53BP1蛋白質の発現が確認された。Ki-67陽性細胞も濾胞上皮細胞中に認められ、濾胞上皮細胞の数%が陽性細胞であった。放射線被ばく後の53BP1フォーカスは、全ての濾胞上皮細胞でのみ観察され、濾胞間の間質細胞ではフォーカス形成は顕著ではなかった。

【乳腺】：乳腺では、乳腺小葉や乳管を構成する細胞に53BP1の発現が認められ、放射線被ばく後も、これらの細胞でフォーカス形成が確認された。Ki-67陽性細胞は、乳管の細胞の極一部に確認された。一方、乳腺の大半を占める脂肪細胞は、高度に分化して凝集した核を持っており、53BP1の応答は認められなかった。

【脾臓・胸腺】：脾臓は、赤脾髄と白脾髄によって成り立っているが、赤脾髄の大半の細胞では53BP1の発現がなく、一方、白脾髄はほぼ全ての細胞において発現が認められた。放射線照射後は、赤脾髄は極一部の細胞ではフォーカスが見られたが、白脾髄では多くの細胞で53BP1フォーカスの誘導が見られた。脾臓のKi-67陽性細胞は、赤脾髄に局在しており、赤脾髄の細胞の6割程度の細胞が、Ki-67陽性であることがわかった。一方、胸腺では、もともと皮質の細胞において、恒常的にフォーカスの誘導が観察され、T細胞受容体のV(D)J組み換えに伴うDNA損傷が検出されているものと考えられる。髄質でも53BP1の発現が検出されており、照射後は、53BP1フォーカスの誘導が確認された。胸腺のKi-67陽性細胞は皮質に集中しており、皮質の細胞はほとんどが陽性細胞であった。

【消化管】：消化管は、全体がクリプト構造を示す大腸と、クリプト-絨毛構造を示す小腸とがあるが、いずれの場合も、クリプトを構成する上皮細胞では53BP1が恒常的に発現しており、放射線被ばく後も全ての細胞でフォーカスの誘導が見られる。一方、小腸の絨毛部位では、フォーカス形成能は消失していた。消化管におけるKi-67陽性細胞の分布も、53BP1の発現細胞の分布と酷似しており、クリプトを構成する細胞は、全て陽性細胞であった。

【肝臓】：肝臓は、大半が肝実質細胞で充満しているが、実質細胞は、観察した限り、辺縁部を除いて、ほとんど全ての細胞で53BP1の発現を認めなかった。一方、肝臓の中で53BP1の発現があったのが、グリソン鞘の一部を構成する胆管細胞である。末梢のグリソン鞘では、大半を占める静脈の脇に胆管と動脈が共存しており、この胆管細胞で53BP1蛋白質の発現及び放射線照射後の53BP1フォーカスの形成を確認した。Ki-67陽性細胞も、極わずかであるが、胆管上皮細胞に認められた。

【肺】：肺では、肺胞に貫入する細気管支の繊毛円柱上皮細胞に 53BP1 のシグナルが認められた。これに対し、肺胞の細胞は、ほとんどが 53BP1 陰性で、その中の極少数の細胞で 53BP1 フォーカス形成が認められるのみであった。同様の染色パターンは、Ki-67 でも観察され、円柱上皮細胞と肺胞の中の極少数の細胞で陽性シグナルが確認された。

【腎臓・膀胱】：腎臓・膀胱では、53BP1 の発現およびフォーカス形成は定かではなかった。

【卵巣】：卵巣は、卵胞では 53BP1 の発現が見られなかったが、卵胞周囲の結合組織においては被ばく後のフォーカスが確認された。

2. 低線量率・低線量放射線照射マウスにおける DNA 損傷応答の定量的評価

まず、非照射マウス由来の組織において、53BP1 フォーカスの BG の出現頻度を評価した。その結果、肺では、細胞あたりの 53BP1 フォーカス頻度が平均 0.04 であった。しかしながら、終末細気管支の領域によっては、局所的に多数の 53BP1 フォーカスを誘発している領域もあり、場所によっては数十個の細胞の領域で、細胞あたりの平均のフォーカス頻度がほぼ 1 に近いところも存在した。胸腺や脾臓では、細胞あたりの 53BP1 フォーカス頻度は極めて低く、胸腺で平均 0.004、脾臓で平均 0.002 であった。この他には、肝臓では平均 0.01 であることがわかった。

次に、低線量率・低線量放射線照射マウスから採取した臓器・組織について検討をおこなった。上述したように、組織・臓器によって 53BP1 フォーカスの形成動態が全く異なるため、定量的な解析は、肺、甲状腺、消化管などの組織において検討した。

まず肺での検討の結果、陽性コントロールとして用いた 400mGy/日の中線量率照射では、照射中に、組織内に DNA 損傷が蓄積することが明らかになった。たとえば、400mGy/日を 1 日連続して照射すると累積線量が 400mGy になるが、照射終了後に、細胞あたり平均ほぼ 0.5 個の 53BP1 フォーカスの蓄積が観察された。つまり、2 個に 1 個の細胞が、1 個のフォーカスを持つ頻度になり、このレベルは、BG の細胞あたり 0.04 個と比較すると、明らかに DNA 損傷が蓄積していることがわかる。また、53BP1 フォーカス陽性細胞率を算出すると、おおよそ 60%の細胞がフォーカスを持つことがわかった。BG のフォーカス陽性細胞率は、おおよそ 4%であることから、放射線照射による有意な増加と結論することができる。次に、400mGy/日の中線量率で累積線量 100mGy の影響を検討した結果、細胞あたりのフォーカス数はおおよそ 0.5 個で、累積線量が 400mGy になるまで照射をした場合と差は認められなかった。累積線量 100mGy の照射は、照射時間にして 5.5 時間であるが、この程度の照射時間において、DNA 損傷の誘発頻度と、DNA 損傷修復による減少の程度が拮抗していると考えられる。

次に、低線量率・低線量放射線照射の影響を評価した。まず、20mGy/日の照射では、おおよそ 22 時間で 20mGy を照射するが、細胞あたりの 53BP1 フォーカスの平均出現数は 0.06 ± 0.04 で、BG の値 (0.04 ± 0.02) との間に有意な差は認められなかった。また、20mGy/日の低線量率照射を 5 日間連続して累積線量が 100mGy になったところで 53BP1 フォーカス数を評価したところ、細胞あたりのフォーカス数は 0.05 ± 0.03 で、フォーカスの蓄積は認められなかった。1mGy/日の低線量率での照射は、累積線量が 100Gy、20mGy、あるいは 1mGy になるまで照射を連続して検討を行ったが、いずれの場合にも、細胞あたりのフォーカス数は 0.03~0.05 個で、BG の値と同程度のフォーカスレベルであった。0.05mGy/日の照射では、累積線量 1mGy の影響を検討したが、細胞あたりのフォーカス数は 0.04 個で、53BP1 フォーカスの蓄積は見られなかった。

以上の検討を甲状腺および消化管において行った。甲状腺では、甲状腺濾胞を構成する濾胞上

皮細胞を対象に検討を行った、また、消化管では、大腸のクリプト上皮細胞および小腸株のクリプトを構成する上皮細胞において検討を行った。その結果、肺での検討と同様の結果が得られ、0.05mGy/日、1mGy/日および20mGy/日の低線量率・低線量放射線照射による53BP1フォーカスの組織における蓄積は認められないことを確認した。

3. 組織幹細胞におけるDNA損傷の蓄積と排除

組織内に存在する幹細胞に着目して、DNA損傷の蓄積と排除の検討を試みた。組織幹細胞は、幹細胞特異的マーカーに対する抗体を用いた手法で、その存在を確認する必要があったが、研究期間の3年間で検討した様々な抗体は、いずれも、組織幹細胞を組織標本上で検出するに堪え得る感度を持たず、したがって、本研究では、組織標本で実績のある増殖マーカーのKi-67を指標に検討を行った。その結果、Ki-67陽性細胞と陰性細胞との比較において、53BP1フォーカスの出現頻度や修復動態に明らかな差は見いだされず、組織幹細胞に特徴的な現象は観察しなかった。

一方、Ki-67抗体を用いた方法には限界もあり、陽性細胞は必ずしも組織幹細胞ではない。また、Ki-67シグナルを用いた組織幹細胞の組織からの排除は解析不能であるため、評価委員の助言に基づき、EdU標識法の導入を平成25年度より始めた。幹細胞の持つ標識保持機能（Label retaining ability）を評価するため、EdUを腹腔内投与した後に飼育し、EdUの体内での代謝を検討した。その結果、EdU投与後のEdU陽性細胞の分布は、Ki-67陽性細胞の分布と同様であることが確認できた。また、投与1週間後の分布を解析した結果、消化管や皮膚など、組織代謝回転の早い組織では、EdU陽性細胞が急速に消失することが明らかになった。一方で、肺などEdU陽性細胞の頻度が低い組織もあり、組織・臓器毎に、EdU標識の至適条件を決定する必要がでてきた。EdU陽性細胞における、53BP1フォーカスの検出からは、EdU陽性・陰性によってフォーカス頻度に違いは認められず、EdU陽性細胞において、DNA損傷が効率的に排除されているかどうかは今後の課題である。

4. 分担研究者の研究成果概要

【今岡達彦】乳腺の未分化細胞モデルとされる細胞凝集塊（マンモスフィア）の特徴解析及び照射後の再生能の評価を精緻化したほか、細胞凝集塊の分化能に及ぼす放射線影響の評価実験を完了させ、数理解析を実施した。その結果、細胞凝集塊は内腔細胞と筋上皮細胞の両系譜のマーカーを共発現し、*in vitro*で両系譜への分化能を示す両能性前駆細胞である可能性が示された。細胞凝集塊の再生能は、100mGyの低線量域から8Gyの高線量まで検討したが、照射された細胞から形成された凝集塊において、再生能の顕著な違いは確認できず、前駆細胞の放射線感受性はさほど高くないことが考えられた。また、サイトケラチン14（筋上皮細胞の分化マーカー）およびサイトケラチン18（管腔細胞の分化マーカー）発現を指標にした分化能への影響も検討したが、100mGy～8Gyの放射線照射は、両能性前駆細胞の分化能に影響を与えないことが明らかになった。これらの実験データを反映した数理モデルを作成して挙動を解析したところ、自然発がんの幹細胞発がん起源が、放射線発がんの前駆細胞起源と異なることが示唆された。以上の解析から、放射線抗感受性である乳腺幹細胞に対し、乳腺前駆細胞は放射線にたいして耐性であることが明らかになった。

【大塚健介】消化管幹細胞マーカーとして知られるLgr5幹細胞と、その子孫細胞を標識させる幹

細胞系譜追跡法を用いて同じ集積線量 (1Gy) を照射したマウスにおいて、Lgr5 幹細胞の上位補充を指標に、低線量率 (0.0003Gy/時) による影響を調べた。その結果、これまでに高線量率放射線照射 (30Gy/時) で観察されてきた上位補充は、0.0003Gy/時では検出されず、幹細胞による組織修復反応における線量率効果が観察された。線量率効果の機構を探るために、組織幹細胞 (EGFP 強発現細胞) および前駆細胞 (EdU 陽性細胞) における放射線誘発 DNA 損傷の修復動態を DNA 二本鎖切断部位への局在を示す 53BP1 タンパクの数 (フォーカス数) により評価した。その結果、1Gy の高線量率放射線照射 8 時間後に、前駆細胞が幹細胞に戻る現象が確認されたが、前駆細胞でも幹細胞でも照射から 8 時間後には DNA 損傷が非照射レベルと同等まで修復されたことから、Lgr5 幹細胞プールに対して DNA 損傷が蓄積しない仕組みがあると推察された。

【白石一乗】マウスより単離した神経幹細胞において、フローサイトメトリー法による DNA 損傷応答を評価した結果、DNA 損傷は、線量率依存的 (500~1.75mGy/min) に増加することを明らかにした。このことから、組織内神経幹細胞は、損傷に対して一定の修復機能を持つことが示唆された。また、2Gy 照射された 14.5 日妊娠マウスから分離した胎児性神経幹細胞と成体神経幹細胞における DNA 損傷の程度は同程度だったにもかかわらず、生まれた仔マウスの神経幹細胞中の DNA 損傷は、胎児性神経幹細胞と比べても低いレベルであることがわかった。このことは、成体神経幹細胞では DNA 損傷が残存する一方、胎児幹細胞では発生過程で、DNA 損傷が消去される可能性を示している。このメカニズムとして、2Gy 暴露された母親から生まれた仔マウスには、高い頻度で水頭症が認められたことから、胎生神経幹細胞は、ゲノム損傷を持つ細胞を排除し、その結果、神経幹細胞数が減少して水頭症が誘発されたと考えることができた。興味深いことに、水頭症マウスから分離した神経幹細胞中には DNA 損傷応答や染色体異常は認められず、組織反応による DNA 損傷排除プロセスの存在が示唆された。

IV. 考察

1. 組織における DNA 損傷応答

個体を構成する様々な臓器・組織で 53BP1 フォーカスを検出したところ、組織の中でも、部位によって 53BP1 蛋白質の発現そのものや、53BP1 フォーカスの形成頻度が異なることが明らかになった。例えば、肺では、細気管支の繊毛円柱上皮細胞に 53BP1 のシグナルが認められたが、細気管支内壁を構成する一層の上皮細胞は、主気管支に至るまで 53BP1 の発現があり、53BP1 フォーカスの誘導も確認できた。これに対し、肺胞の細胞では、ほとんどが 53BP1 陰性で、その中の極少数の細胞で 53BP1 フォーカス形成が認められるのみであった。例えば、先行研究における皮膚での解析では、基底細胞から角化細胞に至る過程で、53BP1 の発現が消失する。したがって、細胞の分化程度による 53BP1 の発現の差が考えられる。つまり、肺では、より分化した細胞が組織を形作っており、そのため、多くの細胞では 53BP1 のシグナルが消失して、逆に、53BP1 の発現がある細胞はより未分化な細胞であると考えられる。事実、53BP1 シグナル陽性の細胞では、Ki-67 のシグナルも検出されることが多く、増殖性を持つより未分化な細胞が 53BP1 陽性であると考えられる。

肺以外の組織では、甲状腺や消化管において 53BP1 フォーカスの誘導が確認できるが、甲状腺では甲状腺濾胞を構成する全ての濾胞上皮細胞にフォーカスの誘導が観察された。一方消化管では、クリプト-絨毛構造がはっきりしている小腸では、クリプトの上皮細胞ではフォーカス形成が

検出されたのに対し、絨毛部ではフォーカスの誘導は一切なく、クリプト部と絨毛部で極めて明確な違いが認められる。Ki-67 陽性細胞の分布もクリプト部に限局されていることから、小腸の場合にも、細胞が増殖性を失い、分化が進むにつれて 53BP1 フォーカス形成能を失うと説明することができる。その一方で、甲状腺はやや異なるパターンを示した。甲状腺では、53BP1 フォーカスは全ての濾胞上皮細胞に認められるのに対し、Ki-67 陽性細胞は濾胞上皮細胞の約 5%程度に認められるのみであった。甲状腺濾胞細胞の代表的な分化マーカーであるサイログロブリンの発現を調べると、全ての濾胞細胞で発現が認められた。つまり、甲状腺濾胞細胞では、十分な細胞分化プロセスが進行しながら、53BP1 フォーカスを誘導していることになり、このような状態は、他のどの臓器・組織でも観察されなかった。

以上のような臓器・組織に対して、組織の中で極めて限局された部位で 53BP1 の発現があったのが、乳腺や肝臓であった。特に肝臓では、組織の大半を占める肝実質細胞では 53BP1 の発現が認められず、機能細胞に分化した実質細胞では、53BP1 フォーカス形成能が喪失していることがわかる。一方で、グリソン鞘内の胆管上皮細胞では、53BP1 の発現が確認され、これらの細胞では、放射線照射後のフォーカス形成も検出された。また、乳腺でも、乳腺小葉や乳管の一部でフォーカス形成が認められ、細胞の構造・機能と 53BP1 フォーカス誘導能との関連が興味深い。

53BP1 フォーカスは、DNA 二重鎖切断を基点とした ATM 依存的な DNA 損傷応答が惹起された結果形成される。ATM によって最初にリン酸化される蛋白質がヒストン H2AX で、 γ H2AX と呼ばれるリン酸化ヒストン H2AX も、DNA 二重鎖切断の分子マーカーとしてよく用いられる。53BP1 フォーカスは、さらに複雑な蛋白質複合体形成の過程を経て形成される後発的な蛋白質複合体であるが、このように、あくまでも、DNA 二重鎖切断が形成された後のクロマチン構造変化にともなう生化学的変化を検出しているに過ぎない。したがって、リン酸化やユビキチン化などの生化学的変化が起これる細胞でなければ、53BP1 フォーカスは形成されない。現時点では、あくまでも 53BP1 フォーカスは、DNA 損傷により誘発されるとして妥当であるが、フォーカスがないからといって DNA 損傷がないとは結論づけられない。この点が、 γ H2AX をはじめ、DNA 二重鎖切断の分子マーカーを用いて DNA 損傷を検出する系の限界であるが、本研究では、この点も踏まえながら、53BP1 フォーカスを形成できる組織内の領域をきちんと特定した後に、その部分に限局して定量的な解析を水平方向で行うように配慮した。たとえば、肺であれば、絨毛円柱上皮細胞が標的であるし、消化管であれば、小腸クリプトというようにである。

その一方で、組織・臓器内の 53BP1 フォーカス形成能を有する細胞の分布は、放射線発がんの標的細胞という観点から十分に議論すべき問題である。つまり、53BP1 フォーカスを形成することは、その細胞に DNA 損傷応答能があることを意味するからである。組織・臓器を構成している細胞の中で、DNA 損傷応答能を喪失した細胞が存在することを示した本研究結果は、そのような細胞は放射線発がんの標的にはならないことを意味し、逆に言えば、組織・臓器内に存在する発がん標的細胞を可視化することになる。放射線発がんの起源細胞 (cells-of-origin) として幹細胞が想定されているが、本研究の成果は、組織幹細胞のみならず、増殖性を有する progenitor 細胞 (TA 細胞) も、発がんの標的細胞となりうることを示唆している⁴⁾。今後は、組織・臓器の中で、放射線照射後に長期間にわたって DNA 損傷を持ち続ける細胞集団の特定が必要になると思われる。特に、組織によっては、例えば肺がんの場合のように、発がんの母地になる組織内の領域が明らかになりつつある組織がある。このような場合、特定の空間的配置にある細胞に着目して、DNA 損傷の次空間的解析を行うことにより、発がんの初期過程につながる DNA 損傷応答

を記述できるようになると期待される。

2. 自然発生の DNA 損傷

放射線照射していない非照射マウス由来の組織において、53BP1 フォーカスの BG の出現頻度を評価したところ、組織によってその頻度が顕著に異なることを見いだした。例えば、肺では、細胞あたりの 53BP1 フォーカス頻度が平均 0.04 であったが、甲状腺では、その値は平均 0.02 であった。また、乳腺や肝臓ではともに平均 0.01 であることがわかった。消化管では、平均の 53BP1 フォーカス頻度は 0.008 と、乳腺や肝臓に近い値であった。これらはいずれも、組織・臓器内のフォーカス形成能が確認された領域を対象にした評価であるため、組織全体の平均値ではないことに注意を要する。これらの臓器・組織に対し、胸腺や脾臓では、組織を構成しているほぼ全ての細胞でフォーカス形成能が確認されるが、胸腺や脾臓での細胞あたりの 53BP1 フォーカス頻度は極めて低く、胸腺では平均 0.004、脾臓で平均 0.002 であった。

このような BG での 53BP1 フォーカス頻度の違いは、各臓器・組織の生理的な状況を反映していると考えられ、たとえば、終末細気管支では、領域によって、局所的に多数の 53BP1 フォーカスを誘発している部分も観察された。場所によっては数十個の細胞の領域で、細胞あたりの平均のフォーカス頻度がほぼ 1 に近いところも存在し、これは、100mGy の放射線を急性被ばくとして受けた時とほぼ同程度のレベルの DNA 損傷数である。その原因を特定するには至っていないが、感染や炎症などによって ROS のレベルが局所的に上昇し DNA 損傷の誘発に至ったことが考えられる。これまで、個体内での日常的な DNA 損傷の誘発については、ほとんどデータがなかったが、本研究の結果、生体内の臓器・組織では、恒常的に DNA 損傷が誘発されている様子が明らかになった。これまでも、細胞内の ATP 産生にともなうミトコンドリア由来の活性酸素に起因するラジカルが、核内の DNA に損傷を誘発することが想定されたり^{5,6)}、また、DNA 複製に伴う酵素化学的な DNA 鎖切断による DNA 二重鎖切断の誘発が推定されたりしてきたが⁷⁾、実際に、生体内での DNA 損傷を、様々な臓器・組織で可視化する意義は大きい。さらに、このような日常的に生ずる DNA 損傷が一定のレベルで保たれているということは、組織や臓器を構成している細胞は、日常起きているレベルの DNA 損傷に対しては、それを排除する十分な能力を有していることを意味し、また、組織としての恒常性を保つような組織反応を起こしているということの意味することになる。このことは、とりわけ低線量率・低線量放射線被ばくに対する放射線影響の理解に多いに貢献できると確信する。たとえば、肺組織で観察される、細胞あたり平均 0.04 個の DNA 損傷のレベルは、少なく見積っても一日あたり 40mGy の放射線をうけるのに相当するレベルで、1 時間あたりに直すと、おおよそ 1.8mGy/時間程度の放射線被ばくに相当することになり、このようなレベルの放射線被ばくにより生ずる DNA 損傷に対しては、生体は対応する能力を持っていることになる。

3. 低線量・低線量率放射線被ばくによる DNA 損傷の蓄積

低線量率・低線量放射線照射マウスから採取した臓器・組織について検討をおこなったところ、線量率の違いによる DNA 損傷の蓄積程度の顕著な違いが明らかになった。まず、陽性コントロールに用いた 400mGy/日の中線量率照射では、終日の照射で累積線量が 400mGy の時の 53BP1 フォーカス数は、細胞あたり平均 0.5 個であった。これは、BG の細胞あたり 0.04 個と比較しても有意に高い数字で、400mGy/日という線量率の放射線被ばく環境では、肺組織内に DNA 損傷が蓄

積することが明らかになった。興味深いことに、累積線量を 100mGy（照射時間にして 5.5 時間）とした時の 53BP1 フォーカス数も、細胞あたり 0.5 個で、このことから、累積線量 100mGy 程度で、新たに生成される DNA 損傷の誘発頻度と、DNA 損傷修復による修復頻度が均衡していることが予想される。事実、400mGy/日の照射を終えてからの 53BP1 フォーカスの減少動態を追跡すると、ほぼ 2 日後に BG レベルに戻ることが確認された。

これに対し、低線量率・低線量放射線照射の場合は、例えば、20mGy/日の照射では、おおよそ 22 時間で 20mGy を照射するが、細胞あたりの 53BP1 フォーカスの平均出現数は 0.06 で、BG と有意な違いは認められなかった。1mGy/日の照射では、例えば、累積線量 100mGy の照射のために、最大 100 日に渡る連続照射を行ったが、53BP1 フォーカスレベルは BG と同等のレベルで、DNA 損傷の組織における蓄積は一切認められなかった。また、0.05mGy/日の線量率の照射でも DNA 損傷の蓄積は観察されず、低線量率での放射線照射の場合には、累積線量で 100mGy 程度の照射であっても、組織における DNA 損傷の蓄積は一切なく、照射によって生じた DNA 損傷は全て修復されていることが明らかになった。

低線量率・低線量放射線照射環境下で、DNA 損傷が組織・臓器に蓄積しないメカニズムについては、DNA 損傷修復による DNA 損傷の修復と、組織の代謝などによる DNA 損傷誘発細胞の排除の両方の可能性が考えられる。そこでまず、組織における細胞死による排除の可能性を、アポトーシスの誘導を指標に検討した。その結果、解析した組織・臓器においては、胸腺や脾臓など一部の組織を除いて、放射線照射によるアポトーシスの誘導はほとんど見られないことが明らかになった。次に、組織内に存在する増殖性を有する細胞を EdU によって標識し、DNA 損傷を誘導した EdU 陽性細胞が積極的に排除されるか否かを検討した。解析の結果、EdU 陽性細胞の中での 53BP1 フォーカス陽性細胞と陰性細胞の頻度は変わらず、本研究で対象にしたような低線量率・低線量放射線照射環境では、組織の代謝による DNA 損傷の排除よりも、細胞の持つ DNA 損傷修復能力がより優位に機能すると結論することができた。

4. 組織幹細胞における DNA 障害の蓄積と排除

本研究では、組織レベルでの DNA 損傷の評価と平行して、組織から単離した組織幹細胞を標的にした分担研究を推進した。その結果、消化管幹細胞や神経幹細胞での評価から（大塚担当）、幹細胞とそこから派生した子孫細胞との間で、DNA 損傷修復能に顕著な違いはないことが明らかになった。この結果は、低線量・低線量率放射線被ばくの際に最も重要になる DNA 損傷修復能には、組織幹細胞に特有の仕組みは特段ないことを意味する。一方で、乳腺幹細胞のように（今岡担当）、組織幹細胞と子孫細胞の間に明らかな放射線感受性の違いが認められた事実は、組織幹細胞に仕組まれた、ゲノム変異を有する細胞の積極的な排除システムの存在を示唆する。この可能性は、例えば、胎児性の神経幹細胞ではゲノム異常が見つかるのに対し、生まれた胎児において神経幹細胞にゲノム異常が見られないという観察により支持される（白石担当）。そのメカニズムの解明にまでは至らなかったが、組織・臓器レベルでの解析ではかいま見ることのできなかつた、組織幹細胞の細胞死による DNA 損傷排除機構の存在が想定され、線量率の違いによる生物影響を理解する上で、今後進めるべき最重要課題の 1 つになる。たとえば、消化管の細胞系譜追跡系を用いた検討では、DNA 損傷による細胞死が、組織幹細胞プールにどのような影響を及ぼすかを検討したが、高線量率照射で観察された幹細胞の動員が低線量率では観察されず、組織反応において明らかな線量率効果が確認された。放射線発がん、DNA 損傷に起因するゲノム変異を

持つ組織幹細胞の関与を考えるのであれば、少なくとも、DRFは1ではないということになる。

ICRP から近々刊行される『幹細胞の放射線影響に関する報告書』でも議論されているように、放射線発がんリスクにおける組織レベルのクリアランス（品質管理）の重要性がクローズアップされている。本研究でその一部が明らかになったように、組織幹細胞に特異的な DNA 損傷修復能は存在しないとすると、組織レベルの品質管理としては、①幹細胞ニッチをめぐる幹細胞競合、②組織幹細胞にプログラムされた高精度細胞死メカニズム、③組織幹細胞死に誘導される組織幹細胞補償プログラム、④ゲノム損傷を有する組織幹細胞の分化を促進する微小環境、などの可能性が考えられ、低線量・低線量率放射線影響の解明を目指す本研究の今後の課題として提案していきたい。

V. 結論

低線量率・低線量放射線被ばくマウスにおいて、採取した臓器・組織における DNA 損傷の蓄積と排除の解析を実施した。その結果、臓器・組織によって、53BP1 フォーカスを誘導する特異的部位が存在することを明らかにした。また、非照射マウスにおいても低頻度ながら DNA 損傷が生じていることを確認し、その頻度は、臓器・組織によって異なること、さらに、組織によっては、非照射時にも、局所的に多数の DNA 損傷が生じるような状況があることを明らかにした。低線量率・低線量放射線照射マウスにおける定量的 DNA 損傷の評価から、20mGy/日（累積線量 100mGy）程度の低線量率・低線量放射線被ばくでは、あらゆる組織・臓器において、DNA 障害の蓄積はないことを証明した。

VI. 次年度以降の計画

平成 24 年度より 3 年間の計画で着手した本研究では、世界で初めて、個体を形作る種々の臓器・組織における DNA 損傷の誘発と修復、DNA 損傷応答の時空間的動態を明らかにした。その結果、低線量率・低線量放射線被ばくでは、累積線量が 100mGy 程度であれば、DNA 損傷の蓄積はないことが明らかになった。一方で、環境研の研究では、20mGy/日の照射を、累積線量が 8Gy になるまで 400 日間連続で行った場合、その後、発がんによる寿命短縮が有意に認められることを報告している。したがって、20mGy/日程度の低線量率放射線被ばくでも、低線量率・高線量になれば、DNA 損傷の蓄積と、それに起因する発がん誘導があることを意味する。そこで、次年度以降の研究として、20mGy/日の低線量率放射線の長期照射を用い、累積線量で **100mGy から 8Gy の間に起こる発がんにつながる分子レベルの変化**を、組織における DNA 損傷保持細胞のクリアランスという視点により解明する研究計画を提案したい。このとき、放射線被ばくの影響は単に発がんの標的臓器だけではなく、全身性の臓器・組織機能の変化が関わっている可能性があることを踏まえ、1 個体から主要な臓器・組織を採取して解析するホリスティック解析を導入する予定である。

第二の研究計画として、本研究計画で得られた成果をさらに発展させ、胎児期あるいは小児期の DNA 損傷動態を解析する研究計画を策定し、すでに着手している。チェルノブリ原発事故後の疫学調査研究結果から、放射性ヨウ素の内部被ばくによる小児甲状腺がんの誘発が明らかであるが、一方で、胎内被ばくでは甲状腺がんのリスクは増加していない。なぜ小児の発がん感受性が高いのか、逆に、胎児期の放射線被ばくではなぜ発がんリスクが高くないのか、これらの疑問に組織幹細胞の視点から科学的な解答を与えることは、福島県民ならびに国民の大きな懸念に答

えることになり、発がんリスクに影響を与える分子レベルの変化の解明にもつながると確信している。そこで、胎児期あるいは小児期に低線量率・低線量放射線被ばくを受けたモデル動物において、DNA 損傷のクリアランスを解析する実験系を確立した。次年度からは、この手法を基盤とした、低線量率・低線量放射線被ばく影響の年齢依存性を解明する研究計画を提案したい。とりわけ、胎児期から小児期は、組織幹細胞およびそのニッチ環境がダイナミックに変化する時期である。そこで、組織レベルでの研究と共に、*ex vivo* で組織幹細胞への影響を解明する実験を並行しておこない、①幹細胞ニッチをめぐる幹細胞競合、②組織幹細胞にプログラムされた高精度細胞死メカニズム、③組織幹細胞死に誘導される組織幹細胞補償プログラム、④ゲノム損傷を有する組織幹細胞の分化を促進する微小環境、について検討する。

以上をもって、評価委員からの『低線量率・低線量の生物影響を解明するという意味で今後の更なる研究発展を期待する』との期待に応えたい。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

1. 鈴木啓司

Suzuki K Yamauchi K Tanaka S et al. Distinct 53BP1 foci kinetics and tissue response corroborated in mouse exposed to chronic γ -rays at different dose-rate. (投稿準備中)

引用文献

- 1) Niwa O. Roles of stem cells in tissue turnover and radiation carcinogenesis, *Radiat Res* 2010; 174: 833-839.
- 2) Tanaka S Tanaka IB III Sasagawa S et al. No lengthening of life span in mice continuously exposed to gamma rays at very low dose rates, *Radiat Res* 2003; 160: 376-379.
- 3) Suzuki K Nakashima M Yamashita S. Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue, *Radiat Res* 2010; 174: 415-423.
- 4) Chaffer CL Weinberg RA. How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discovery* 2015; 5: 22-24.
- 5) Ames BN. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging, *Mutat Res* 1989; 214: 41-46.
- 6) Bont RD van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of qualitative data, *Mutagenesis* 2004; 19: 169-185.
- 7) Vilenchik MM Knudson AG. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer, *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12871-12876.

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

Keiji Suzuki^{*1}, Tatsuhiko Imaoka^{*2}, Kensuke Otsuka^{*3}, Kazunori Shiraishi^{*4}

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

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

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

^{*4}*Laboratory of Radiation Biology, Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka
Prefecture University*

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

Abstract

After the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant in Japan, much attention has been paid for probable health risks associated with annual low-dose radiation exposure. While the epidemiological studies of A-bomb survivors from Hiroshima and Nagasaki have indicated a linear dose-dependent increase in cancer risk at doses above 100 mGy, it is quite difficult to estimate cancer risks stem from lower doses of radiation, e.g. less than 100 mGy. Thus, the LNT model has been adopted and used as the current standard for radiation protection. However, the LNT model does not always explain biological and epidemiological data. Although the LNT model assumes that accumulation of the initial radiation-induced damage in the target cells is associated with cancer development, this has not been proven in any of the experimental systems so far. Therefore, current study aimed to demonstrate whether DNA damage is accumulated in mouse tissues exposed to low-dose-rate radiation. B6C3F1 mouse were exposed to low-dose-rate gamma-rays (0.05 mGy/day, 1 mGy/day, and 20 mGy/day) until the total dose became 1 mGy, 20 mGy or 100 mGy, and several organs, including lung, liver, spleen, thymus, thyroid, mammary gland, intestine et al., were obtained. Then, tissue slices were incubated with anti-53BP1 and anti-Ki-67 antibodies to visualize DNA damage and proliferating cells, respectively.

53BP1 foci were detectable in every tissues derived from the exposed mouse, whereas not all cells consisting tissues and organs form 53BP1 foci. In particular, more differentiated cells seem to lose the ability to form 53BP1 foci. Importantly, the 53BP1 foci were also observed in the control mouse. The spontaneous foci frequency was completely different from tissues to tissues, in which the lung is the highest. While middle-dose-rate radiation, 400 mGy/day, was confirmed to induce 53BP1 foci, low-dose-rate exposure examined in this study never accumulate DNA damage in tissues/organs even an accumulated dose was 100 mGy. Thus, the present study clearly indicates that cells consisting tissues and organs are capable of eliminating DNA damage induced by chronic radiation exposure at low-dose and low-dose-rate. The results should provide scientific evidences that might contribute to the scientifically

acceptable estimation of cancer risks from low-dose/low-dose-rate radiation exposure.

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

低線量率・低線量被ばくによる乳腺幹細胞への影響蓄積の評価

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

研究要旨

原子力災害による健康リスクの評価の基盤となる新たな科学的知見を創出するため、組織幹細胞への放射線影響を評価することが、本研究の目的である。本年度は、乳腺の未分化細胞モデルとされる細胞凝集塊の特徴解析及び照射後の再生能の評価に実験を追加してデータを精緻化したほか、細胞凝集塊の分化能に及ぼす放射線影響の評価実験を完了させ、数理解析と個体における DNA 損傷細胞の追跡実験を行った。その結果、細胞凝集塊は内腔細胞と筋上皮細胞の両系譜のマーカーを共発現し、*in vitro* で両系譜への分化能を示す前駆細胞であると考えられた。細胞凝集塊の再生能は照射された細胞から形成された凝集塊においてもあまり変化がなかった。分化能にも照射の影響は見られなかった。実験データを反映した数理モデルを作成して挙動を解析した。以上の解析から、乳腺前駆細胞は放射線耐性であることが示唆された。

キーワード：組織幹細胞、乳腺、放射線影響、ターンオーバー

I 研究目的

東京電力福島第一原子力発電所事故後では、多くの被災者が低線量率もしくは低線量の放射線に被ばくした。我が国の放射線防護体系は、低線量でも線量に比例したリスクが生まれ蓄積するという直線しきい値なし（LNT）モデルを採用してリスクを評価する。LNT モデルは単に実用的であるばかりでなく、多くの不確実性がある現状において科学的に一番もっともらしい仮定とされる¹⁾。

放射線によるがんリスクを蓄積する実体として、組織幹細胞（長寿命の前駆細胞等を含む）が想定される。LNT モデルの基礎に「放射線は線量に比例した頻度で組織幹細胞に遺伝子変異を起こし、変異細胞の頻度に比例してがんリスクが生じる」という仮説があり、大きな不確実性もここにある²⁻⁴⁾。たとえば、線量に比例して変異幹細胞が生成されたとしても、その数を変えるようなターンオーバー（細胞致死、自己複製、分化等）が同時に線量依存的に起これば、この仮定は成り立たない⁵⁾。

本研究では、放射線防護上の重要臓器の一つである乳腺に注目し、組織幹細胞に放射線が及ぼすターンオーバーの影響を定量的に解明することを目的とする。これまで、乳腺幹細胞及び前駆細胞の実験モデルとされる細胞凝集塊（マンモスフィア）⁶⁾を利用して、放射線が細胞凝集塊の形成に関わる細胞の致死及び二次細胞凝集塊の形成に大きな影響を及ぼさないことを明らかにした。本年度は、これまでの実験で観察数の少ない部分（細胞凝集塊の特徴解析及び照射後の再生能の評価）に実験を追加してデータを精緻化したほか、細胞凝集塊の分化能に及ぼす放射線影響の評価実験を完了させ、さらに数理解析と個体における DNA 損傷細胞の追跡実験を行った。

II 研究方法

DNA 損傷細胞の追跡実験：昨年度行った照射実験のデータと比較するための試料を作製した。すなわち、5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU, 50 mg/kg/回、3 回/日) を腹腔内投与した 7 週齢雌ラットに、照射群の 1 時間、6 時間、1 日、2 日、3 日、7 日後に対応する時点で解剖を行って、乳腺等の 11 組織を採取した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した標本の電子画像を閲覧システムにより、親水化した凍結未染色標本 (各採取時、各組織 4 検体ずつ) を郵送により、それぞれ長崎大学へ提供した。

ラット乳腺上皮細胞の作製：成体雌ラットの下腹部乳腺脂肪体を細断及びコラゲナーゼ III 処理して乳腺上皮組織塊を得、さらにトリプシン及び DN アーゼ I により単一細胞に解離した。

細胞凝集塊の形成の評価：乳腺上皮細胞にガンマ線を非照射もしくは 100mGy~8Gy で急照射 (0.5Gy/分、室温) した。100mGy に関しては低線量率照射 (1mGy/分、100 分、室温) も行った。照射後、マンモスフィア形成条件にて 1 週間培養して一次細胞凝集塊を得、ウェル全体の画像上で数を測定した。一部の実験ではこの間、増殖評価のため 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU, 10 μ M) を培地に添加した。一次細胞凝集塊を再度トリプシン処理して単一細胞に解離し、マンモスフィア形成条件でさらに 1 週間培養し、二次細胞凝集塊の形成を評価した。

細胞凝集塊の分化能の評価：一次細胞凝集塊を分化誘導条件に移してさらに 1 週間培養し、固定した細胞でサイトケラチン 14 及び 18 の蛍光免疫染色を行った。

(倫理面への配慮) 実験動物の使用に関しては、放射線医学総合研究所動物実験委員会にて承認された計画に基づき、動物愛護法ならびに放射線医学総合研究所諸規程・基準を遵守して実施した。

III 研究結果

1. DNA 損傷細胞の追跡実験

経時的に採取した組織について、54 枚の HE 染色標本電子画像及び 216 枚の未染色標本を作製して、長崎大学に提供した。

2. 細胞凝集塊の特徴解析

ラットから採取した乳腺上皮の病理標本においては、筋上皮細胞 (サイトケラチン 14 陽性/サイトケラチン 18 陰性) と管腔細胞 (サイトケラチン 14 陰性/サイトケラチン 18 陽性) が観察される。これらは共通の幹細胞及び前駆細胞から分化して産生されると考えられている^{7, 8)}。細胞凝集塊モデルについてこれらのサイトケラチンの発現を蛍光免疫染色によって解析した昨年度の結果を再検討したところ、初めの解釈に反して、大部分の細胞がサイトケラチン 14 に弱陽性である可能性が見いだされた。そこで今年度は、乳腺上皮の病理標本と細胞凝集塊の標本を同一条件で蛍光免疫染色に供し、乳腺上皮において筋上皮細胞がサイトケラチン 14 陽性/サイトケラチン 18 陰性、管腔細胞がサイトケラチン 14 陰性/サイトケラチン 18 陽性と判定されるように陽性・陰性の境界となる蛍光強度を設定し、この条件で細胞凝集塊の標本を再解析した。その結果、細胞凝集塊の大部分 (約 90%) の細胞がサイトケラチン 14 陽性/サイトケラチン 18 陽性であり、約 10% がサイトケラチン 14 陽性/サイトケラチン 18 陰性 (すなわち筋上皮様の細胞) であることが明らかとなった。

両サイトケラチンに陽性の細胞は筋上皮細胞と管腔細胞の両者を産生できる前駆細胞であると考えられている⁸⁾。従って、この細胞凝集塊は両能性前駆細胞のモデルとして用いることができ

ると考えられた。

3. 照射後の細胞凝集塊形成

昨年度まで、100mGy～8Gy 照射した乳腺上皮細胞から一次細胞凝集塊が形成される効率が照射によりあまり低下しない（すなわち照射による細胞致死効果は低い）ことを示してきた。非照射の場合を1とした相対的な細胞凝集塊形成率 S の実験データを線量 D の関数として $S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$ で表したところ、 $\alpha = 0.065$ 、 $\beta = 0.0031$ であった。また、こうして形成された細胞凝集塊を分散し、再度培養することで形成された二次細胞凝集塊の形成効率について実験を繰り返し、100mGy～8Gy の照射による顕著な変化が認められない（すなわち照射を生き延びた細胞から形成された細胞凝集塊の再生能は非照射の場合と同レベルであり、遅延的な影響も見られない）という昨年度の結果を再現した。100mGy の効果は線量率に依存しなかった。プールした実験データを $S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$ で表すと、 $\alpha = 0.091$ 、 $\beta = 0.0083$ であった。これらの線量効果関係を移植再生能（すなわち幹細胞活性）のデータから求めた数式（ $\alpha = 0.124$ 、 $\beta = 0.129$ ）と比較すると、細胞凝集塊の形成効率が幹細胞活性と比較して放射線に耐性であることが明らかである。さらに、増殖した細胞の核にとりこまれる物質である BrdU を培地に添加して同様の細胞凝集塊形成実験を行ったところ、照射の有無に関わらず、BrdU は細胞凝集塊を構成する細胞の核に同じ割合（約40%）で取り込まれることがわかった。

以上のように、100mGy～8Gy の照射は両能性前駆細胞の生存及び増殖効率を大きく低下させないこと、照射された両能性前駆細胞において遅延的影響の証拠は見られないことが明らかになった。

4. 照射後の細胞凝集塊の分化能

昨年度、非照射もしくは100mGy から8Gy 照射した乳腺上皮細胞から作製した細胞凝集塊を分化誘導条件に1週間置き、回収した。今年度は、この標本におけるサイトケラチン14及び18の発現を蛍光免疫染色によって解析した。その結果、分化誘導条件では約40%の細胞がサイトケラチン14陽性/サイトケラチン18陰性（すなわち筋上皮様細胞に分化）、約15%の細胞がサイトケラチン14陰性/サイトケラチン18陽性（すなわち管腔様細胞に分化）、残りは両陽性を保つことがわかった。この割合は、照射された細胞から形成された細胞凝集塊でも有意な変化を示さなかった。すなわち、100mGy～8Gy で照射された両能性前駆細胞は正常な分化能を保つことが示唆された。

5. 数理解析

細胞の動態（増殖と死）を考慮し、細胞分裂の際に変異が発生して正常幹細胞が中間細胞を経てがん細胞へ推移することを仮定した発がんの数理解析モデルに、2段階発がんモデルがある。本研究では2段階発がんモデルに幹細胞及び前駆細胞の2細胞を網領したモデルを構築し解析を行った。また、本研究において幹細胞活性は線量依存的な減少を示し、前駆細胞活性は放射線耐性を示したことから、放射線が幹細胞のみを減少させることを仮定した。本モデルでは、がんのサブタイプに幹細胞由来のサブタイプと前駆細胞が脱分化することで得られる前駆細胞由来のサブタイプのがんを仮定した。先行研究では放射線由来と自然発がんではがんのサブタイプが異なることが知られている^{9,10}。本モデルの解析の結果、前駆細胞の増殖率が幹細胞に比べて速い（従って、前駆細胞における単位時間当たりの突然変異率が幹細胞に比べて高い）場合、自然発がんでは幹細胞由来のサブタイプとなり、放射線発がんでは前駆細胞由来のサブタイプとなる条件が存在することが示唆された。

IV 考察

ラットは放射線誘発乳がんの優れたモデルであるが、これまでに開発された幹細胞・前駆細胞研究法は少ない。歴史の長い移植再生能アッセイの他には、研究分担者による長期標識保持細胞の報告¹¹⁾、米国の研究者によるフローサイトメトリーの報告¹²⁾が1報ずつしかなかった。本研究は、低接着培養における細胞凝集塊のモデルを追加した。本法は過去に報告された手法⁶⁾に基づいており、筋上皮及び内腔細胞系譜への分化能、完全な乳腺構造の形成能が低いこと等の特徴は既報のもの⁶⁾と共通している。

細胞凝集塊の特徴については、本年度の再解析の結果、約90%の細胞が内腔細胞及び筋上皮細胞の両系譜の分化マーカーを発現することが明らかになった。文献的には、両系譜の分化マーカーを共発現する細胞が両能性を有すると報告されている⁸⁾。また、本研究における昨年度及び本年度の解析においては、細胞凝集塊を分化誘導条件に置くと内腔細胞あるいは筋上皮細胞の分化マーカーを単独で発現する細胞が増加する。さらには、昨年度までの結果において移植再生能で定義される両能性幹細胞が濃縮されていない。これらの事実から、本研究における細胞凝集塊は乳腺の両能性前駆細胞のモデルとするのが適切であると考えられる。

昨年度及び本年度に得られたデータにより、100mGy～8Gy照射した細胞からの細胞凝集塊形成能と、照射後に形成された細胞凝集塊がさらに細胞凝集塊を再形成する能力は、移植再生能によって定義される乳腺幹細胞活性と比較して、放射線耐性であることが示された。分化誘導条件における分化能も放射線耐性であった。これらの結果は、乳腺の両能性前駆細胞の動態は放射線の影響を受けにくいことを示唆している。

幹細胞・前駆細胞の放射線応答は、組織によって多様である。腸管では放射線感受性の position +4 幹細胞を、放射線耐性の Lgr5 陽性増殖性幹細胞¹³⁾、Bmi1 陽性休眠幹細胞¹⁴⁾、Dll1 陽性前駆細胞¹⁵⁾が補うことが報告されている。メラノサイト幹細胞は照射されると早期に分化が誘導される¹⁶⁾。これに対し、造血幹細胞¹⁷⁾及び毛包幹細胞¹⁸⁾は放射線誘発アポトーシスに耐性であり、これは抗アポトーシス因子である Bcl-2 の発現に関連している。Bcl-2 は前立腺、ケラチノサイト、腸管の幹細胞でも高発現しているが、腸管でも放射線感受性の position +4 細胞では発現していない¹⁹⁻²²⁾。本研究で用いた細胞凝集塊は、低接着培養下において上皮細胞が自発的に起こすアポトーシス(アノイキスと呼ばれる)への耐性を一つの条件として選抜された細胞である。そのため、Bcl-2 のような抗アポトーシス因子が機能していることは考え得る。このように、種々の組織の幹細胞・前駆細胞の放射線耐性には共通の生物学的メカニズムが関わっているのかもしれない。

V 結論

低接着培養下で生存し凝集することによって選択される乳腺上皮細胞は、筋上皮細胞と内腔細胞の両系譜のマーカーを発現し、両系譜への分化能を示す前駆細胞である。この細胞モデルに対する放射線影響の特徴を調べたところ、細胞凝集塊の形成能及び分化能において影響はほとんど見られず、少なくとも本実験系における乳腺前駆細胞は放射線耐性であることが明らかとなった。

VI 次年度以降の計画

ラット乳腺をモデルとして、生体内で数週間以上の長期にわたってチミジンアナログを保持する細胞の標識・検出法、フローサイトメトリーによって幹細胞及び前駆細胞を計測する方法を確立する。これら、より *in vivo* に近い実験系を用いて、放射線照射後の幹細胞・前駆細胞の挙動を

解析する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) 細木彩夏、今岡達彦、小川真里、西村由希子、谷修祐、西村まゆみ、山田裕、島田義也。マンモスフィア（乳腺未分化細胞凝集塊）を用いたラット乳腺幹/前駆細胞への放射線照射後の動態解析～低線量率放射線発がん影響解明に向けて～第37回日本分子生物学会年会、横浜市、2014年11月25日～27日
- 2) 細木彩夏、今岡達彦、小川真里、西村由希子、谷修祐、西村まゆみ、山田裕、島田義也。ラット乳腺幹/前駆細胞動態への放射線影響の解析 第29回発がん病理研究会、いわき市、2014年9月1日～3日

引用文献

- 1) International Commission on Radiological Protection. The 2007 Recommendation of the International Commission on Radiological Protection, *Annals of ICRP* 2007; 35
- 2) International Commission on Radiological Protection. Low-dose Extrapolation of Radiation-related Cancer Risk, *Annals of ICRP* 2005; 35
- 3) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Biological mechanisms of radiation actions at low doses. A white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work, United Nations, 2012
- 4) National Council on Radiation Protection and Measurements. Uncertainties in the estimation of radiation risks and probability of disease causation, NCRP Report No. 171, 2012
- 5) Niwa O. Roles of stem cells in tissue turnover and radiation carcinogenesis, *Radiat Res* 2010; 174: 833-839.
- 6) Dontu G Abdallah WM Foley JM et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells, *Genes and Dev* 2003; 17: 1253-1270.
- 7) Visvader JE Stingl J. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives, *Genes and Dev* 2014; 28: 1143-1158.
- 8) Villadsen R Fridriksdottir AJ Ronnov-Jessen L et al. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast, *J Cell Biol* 2007; 177: 87-101.
- 9) Castiglioni F Terenziani M Carcangiu ML et al. Radiation effects on development of HER2-positive breast carcinomas, *Clin Cancer Res* 2007; 13: 46-51.
- 10) Broeks A Braaf LM Wessels LF et al. Radiation-associated breast tumors display a distinct gene expression profile, *Int J of Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76: 540-547.
- 11) Imaoka T Hisatsune H Sakanishi Y et al. Progesterone stimulates proliferation of a long-lived epithelial cell population in rat mammary gland, *J Endocrinol Invest* 2102; 35: 828-834.
- 12) Sharma D Smits BM Eichelberg MR et al. Quantification of epithelial cell differentiation in mammary glands and carcinomas from DMBA- and MNU-exposed rats, *PLoS One* 2011; 6: e26145.
- 13) Metcalfe C Kljavin NM Ybarra R et al. Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration, *Cell Stem Cell* 2014; 14: 149-159.
- 14) Yan KS Chia LA Li X et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally

- distinct populations, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 466-471.
- 15) van Es JH Sato T van de Wetering M et al. Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage, *Nat Cell Biol* 2012; 14: 1099-1104.
 - 16) Inomata K Aoto T Binh NT et al. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation, *Cell* 2009; 137: 1088-1099.
 - 17) Insinga A Cicalese A Faretta M et al. DNA damage in stem cells activates p21, inhibits p53, and induces symmetric self-renewing divisions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 3931-3936.
 - 18) Sotiropoulou PA Candi A Mascre G et al. Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death, *Nat Cell Biol* 2010; 12: 572-582.
 - 19) Merritt AJ Potten CS Watson AJ et al. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia, *J Cell Sci* 1995; 108: 2261-2271.
 - 20) Mandal PK Blanpain C Rossi DJ. DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 198-202.
 - 21) Burger PE Gupta R Xiong X et al. High aldehyde dehydrogenase activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells, *Stem Cells* 2009; 27: 2220-2228.
 - 22) Tiberio R Marconi A Fila C et al. Keratinocytes enriched for stem cells are protected from anoikis via an integrin signaling pathway in a Bcl-2 dependent manner, *FEBS Lett* 2002; 524: 139-144.

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

Tatsuhiko Imaoka

National Institute of Radiological Sciences

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

Abstract

The goal of the present project is to offer a novel scientific basis for improvement of radiation risk estimation, and specifically, the study aims at evaluating radiation effects on tissue stem cells. This year, the mammosphere model, which is generally regarded as stem/progenitor cells of the mammary gland, was characterized further and used for evaluation of radiation effects on its in vitro regeneration and differentiation. Our results reveal that the mammosphere expresses both luminal and myoepithelial markers and shows ability to generate single positive cells for either of the luminal or myoepithelial marker, suggesting that it is a model of bipotent mammary progenitor cells. In vitro regeneration of mammospheres was not affected by prior radiation exposure. We further develop a mathematical model that incorporates the present findings. Taken together, it is suggested that mammary progenitor cells survive radiation exposure.

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

消化管幹細胞に対する放射線応答の線量率効果の評価

大塚 健介

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

研究要旨

低線量率放射線被ばくによるがんリスクの推定は、高線量率放射線のがんリスクをもとに推定せざるをえないが、生物学的には同じ集積線量でも線量率が異なれば生物効果が異なる「線量率効果」が知られており、そのため低線量率・低線量放射線による発がんリスクを考えるにあたっては、発がんの標的細胞における線量率効果の機構を生物学的に理解することが必要である。近年、発がんの標的が組織幹細胞であることが報告されたことから、本研究では、組織幹細胞に対する線量率効果を、幹細胞への障害の蓄積性の観点から明らかにすることを目的とした。消化管幹細胞マーカーとして知られる *Lgr5* 幹細胞と、その子孫細胞を標識させる幹細胞系譜追跡法を用いて同じ集積線量 (1 Gy) を照射したマウスにおいて、*Lgr5* 幹細胞の上位補充を指標に、低線量率 (0.0003 Gy/時) による影響を調べた。その結果、これまでに高線量率放射線照射 (30 Gy/時) で観察されてきた上位補充は、0.0003 Gy/時でも検出されず、線量率効果が観察された。線量率効果の機構を探るために、組織幹細胞 (EGFP 強発現細胞) および前駆細胞 (EdU 陽性細胞) における放射線誘発 DNA 損傷の修復動態を DNA 二本鎖切断部位への局在を示す 53BP1 タンパクの数 (フォーカス数) により評価した。その結果、1 Gy の高線量率放射線照射 8 時間後に、前駆細胞が幹細胞に戻る現象が確認されたが、前駆細胞でも幹細胞でも照射から 8 時間後には DNA 損傷が非照射レベルと同等まで修復されたことから、*Lgr5* 幹細胞プールに対して DNA 損傷が蓄積しない仕組みがあると推察された。

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

I 研究目的

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

線量率効果を、幹細胞への障害の蓄積性の観点から明らかにすることを目的とした。
以下に、本年度の研究計画に記載した事項を示す。

① 異なる線量率の放射線照射による消化管幹細胞ターンオーバーの解析

平成 26 年度は、Lgr5-cre/ROSA26-LacZ マウスに低線量率放射線 (0.3~3 mGy/時程度) を照射し、様々な線量 (100mGy~1Gy) 照射後に解剖し、消化管組織における LacZ を発現クリプトの頻度を測定する。また、線量率効果を確認するために、高線量率放射線 (0.5~1.5 Gy/分) を同線量照射する。陽性対照を 1 Gy とする。本年度は、平成 25 年度で得られた結果と②の結果をまとめ、損傷蓄積性に関するデータを集約する。

② 放射線障害の消化管幹細胞における蓄積と排除の組織動態の解析

組織幹細胞における放射線による損傷の「蓄積」と「排除」の機構を評価する。損傷の蓄積は、DNA 損傷修復タンパク (53BP1) の集積を指標とする。幹細胞マーカー (EGFP) との共染色によって、幹細胞における DNA 損傷の消長を明らかにする。また、Lgr5-EGFP マウスに細胞標識試薬 (EdU) を *in vivo* 投与し、標識された細胞における DNA 損傷修復タンパク (53BP1) の集積度を評価する。損傷の排除は、放射線照射後に残存する EdU 標識細胞の頻度が減少することにより評価する。本年度は、平成 25 年度に構築した幹細胞への DNA 損傷蓄積を EdU の取り込み動態と比較することで、幹細胞プールが低線量下で健全に保たれているかを指標として、低線量放射線照射による損傷の組織内蓄積度の評価を行う。

II 研究方法

供試動物

組織幹細胞に対する放射線影響を評価するために、消化管幹細胞マーカーとして知られる Lgr5 陽性幹細胞において、タモキシフェン (4OHT) の投与に依存して時期特異的に組換えを誘導し、その子孫細胞をレポーター遺伝子 (LacZ) で標識させる幹細胞系譜追跡法 (Lineage tracing) が適用可能なマウス (Lgr5-EGFP-cre^{ERT2} × ROSA26-LSL-LacZ マウス, 以下 LRZ マウス)³⁾を用いた。それぞれの系統を維持するために、マウスはイノケージ (オリエンタル技研) を用いた個別換気飼育環境で繁殖を行った。交配によって得た 10~14 日齢の LRZ マウスに対し、滅菌ヒマワリ種オイルに溶かした 10 mg/ml の 4-hydroxytamoxifen (4OHT) (Sigma, #H6278) を、3 mg/40g 体重になるように単一腹腔内投与した。離乳時に耳片を採取し、ゲノム DNA を抽出してジェノタイプピングを行い、ノックインアリルを有する個体のみを評価実験に用いた。

高線量率 X 線照射および低線量率ガンマ線照射

動物への 30 Gy/時の照射は、X 線照射装置 (Hitachi, MBR-320R) を用いて行った。照射は、260 kV, 4.5 mA, 0.5 mm Al + 0.3 mm Cu フィルタ、管球距離 550 mm の条件で行った。マウスは専用のアクリルホルダーに収容して照射を行った。同じホルダーに収容して偽照射を行ったマウスを対照群とした。動物への低線量率放射線照射は、電力中央研究所放射線安全研究センターが保有する低線量率ガンマ線長期照射施設 (¹³⁷Cs 線源) にて実施した。線量率は平均 0.0003 Gy/時になる場所を照射位置とした。いずれの照射群も、照射期間が異なるため、それぞれに対照群を置いた。低線量率長期照射群の対照群は、同じ長期照射施設線源の背後で、さらに 60cm の鉛コン

クリートで遮蔽した場所に置いた飼育ラックにて同期間飼育したものとした。

LacZ 発色像の定量的評価

LRZ マウスから大腸を摘出して切開し、固定した大腸組織を、X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, 和光純薬 #027-07854) を含む発色液に一晩浸漬して発色させ、LacZ 発現クリプトを可視化した。発色終了後の組織は、4%パラホルムアルデヒド中性緩衝溶液中で再固定し、その後、パラフィン包埋して、クリプトの伸長方向と垂直になるように組織切片を作製した。切片はエオシン染色により対比染色を行った。スライド中の測定した全クリプトのうち、クリプト断面が全て LacZ 標識されたものの割合を求めた。

ホールマウントクリプト蛍光抗体染色

マウスの十二指腸および大腸を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンブロックに包埋した後、組織切片を作製した。また、組織単位の細胞動態を詳細に解析するために、50mM EDTA/PBS 溶液に 30 分浸漬させ、クリプトのみを単離してホールマウント試料とした。蛍光抗体染色のために、抗 GFP 抗体 (Abcam, Chicken anti-GFP antibody)、抗 53BP1 抗体 (Bethyl, anti-53BP1 antibody) を用いた。

EdU を用いた細胞標識法

組織細胞への DNA 損傷の蓄積と、細胞のターンオーバー動態を評価するために細胞標識実験を行った。細胞標識には、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, Life Technologies, #E10187)を用いた。EdU は PBS にて 30 mM の濃度に調製し、放射線照射の 4 時間前に、マウス当たり 50 mg/kg/回を単一腹腔内投与した。EdU により標識したホールマウントクリプト組織は、Click-iT EdU Imaging Kit (Life Technologies)により蛍光標識し、レーザー共焦点顕微鏡 (Nikon, C1) を用いて蛍光画像を取得した。

画像解析

ホールマウントのクリプト懸濁液は、蛍光染色後にスライドガラスに封入した。レーザー共焦点顕微鏡 (Nikon, C1) を用いて、核 (Hoechst34580)、EGFP (Alexa488)、EdU (Alexa555)、そして 53BP1 (Alexa647) の核チャンネルから画像取得した。レーザーの出力は、408nm レーザーが出力 27%でゲイン 103、488nm レーザーが出力 10%でゲイン 85、543nm レーザーが出力 10%でゲイン 70、そして 637nm レーザーが出力 40%でゲイン 110 とした。それぞれのチャンネルに対して、取得画像サイズを 512x512 画素とし、4 回スキャンによる平均蛍光強度を取り、0.5 μ m 厚さごとにクリプトの一層の細胞厚になるように Z 軸スキャンを行った。それらの平均蛍光強度を volume renderer 機能において maximum projection することにより、クリプトの 1 層の蛍光画像合成像を得て、ids(ics)拡張子形式で保存を行った。これらの画像は、NIS-Elements AR-SP (Nikon 製)上で開き、各チャンネルに対して、自家蛍光以上の蛍光レンジを選択した二値化画像 (ROI) を得た。ただし、EGFP については、蛍光強度が高いほうが幹細胞であるため、EGFP の蛍光陽性レンジを 2 分割して、蛍光強度の高い方 (EGFP⁺) を幹細胞領域と設定した。各チャンネルの二値化した ROI を組み合わせ、幹細胞あたりの 53BP1 フォーカス数などを評価した。すなわち、核および EGFP⁺ の ROI の共通面積を幹細胞の核とみなし、同様に、EdU 陽性細胞と核の ROI の共通面積を EdU を

取り込んだ細胞の核面積とした。53BP1 フォーカス数は、53BP1 蛍光のうち、円形度を 0.8-1.0, サイズを 0.5-2 μm と設定した際のオブジェクト数がどれくらい含まれるかにより求め、細胞核面積あたりの 53BP1 フォーカス数として計算した。同様に、EGFP と EdU の共染色面積を EdU を取り込んだ EGFP⁺⁺の面積として計算した。各実験群について、1 匹から 3~5 クリプトを選択して、核クリプトの画像解析結果の平均値と標準偏差をまとめた。

統計学的解析

LacZ 陽性クリプトは各個体 1000 個以上数えて、断面全体が染色されたクリプトの割合を求めた。多群間の検定には、Dunnett および Williams の多重比較検定を適用した。2 群間の検定には、Student の t 検定 (Welch 法) を用いた。

(倫理面への配慮)

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

III 研究結果

LRZ マウス (10-14 日齢) に 4OHT を投与し、その約 1 か月後から、低線量率 (0.0003 Gy/時) を集積線量が 1 Gy に到達するまで約 140 日間、もしくは、集積線量が 0.1 Gy に到達するまで約 14 日間、連続照射を行った。また、高線量率照射として 30 Gy/時の照射を行った (高線量率照射群は、昨年度までの成果で有意差が認められていたため、本年度は低線量率放射線の解析を優先した)。低線量率放射線照射終了から約 2 週間後の大腸組織の LacZ 陽性クリプトの頻度を測定した。結果を表 1 に示す。低線量率放射線 (0.0003 Gy/時) を集積線量 0.1 Gy まで照射した場合、LacZ を発現したクリプトの割合は非照射群が $1.80 \pm 0.64\%$ ($n = 4$)であったのに対し、照射群は $1.77 \pm 0.49\%$ ($n = 2$)と同等の頻度で統計学的な有意差は認められなかった ($p = 0.96$)。集積線量を 1 Gy まで増加させた場合、非照射群が $2.05 \pm 0.57\%$ ($n = 6$)であったのに対し、照射群は $2.03 \pm 1.21\%$ ($n = 6$)となり、統計学的な有意差は認められなかった ($p = 0.97$)。

次に、幹細胞における残存 DNA 損傷の数を評価した。DNA 損傷の蓄積は、DNA 二本鎖切断部位に局在するタンパクである 53BP1 フォーカス数によって評価した⁴⁾。組織における幹細胞の場所を決定するために、クリプト組織のホールマウント蛍光免疫染色を行った (図 1)。EGFP は発現が高い細胞ほど幹細胞の性質を持ち、弱発現する細胞は幹細胞の性質も弱いため⁵⁾、EGFP に対する抗体を用いて EGFP を強発現する細胞 (以下、EGFP⁺⁺と記載) を幹細胞と見なした。十二指腸に比べて、大腸では EGFP を発現するクリプトが極端に少ない (6%程度) ことから、本研究では、組織内の幹細胞の DNA 損傷修復動態の評価には十二指腸のクリプトのみを用いた。DNA 合成細胞を標識するために、EdU を用いた。EdU 投与から 4 時間後に解剖した場合、EdU を取り込んだ細胞のうち、EGFP⁺⁺ではない核の面積割合は $85 \pm 15\%$ であった ($n = 5$, 図 2)。また、クリプト底部の幹細胞以外の部位 (パネート細胞の場所) に取り込まれている画像は観察されなかった (図 2A)。従って、EdU が取り込まれたのは、ほぼ前駆細胞であると考えられる。この画像解析スキームに基づいて、EdU を取り込んだ前駆細胞の放射線照射後の組織内推移を調べた。

30 Gy/時の高線量率 X 線を 1 Gy 照射して 1, 2, 8, 12 時間後に EGFP⁺⁺核面積あたりの EdU 陽性細胞核面積の割合を調べたところ、照射前は、 $39.7 \pm 27.3\%$ であったのが、照射後 1, 2 時間後には

それぞれ $19.2 \pm 11.9\%$, $15.9 \pm 19.1\%$ となり、減少傾向が見られ、8 時間後、12 時間後には、それぞれ $39.3 \pm 21.9\%$, $31.9 \pm 10\%$ と再び増加に転じた (図 3)。ただし、対照群との Dunnet の多重比較検定ではいずれの増減についても統計学的有意差は認められなかった。同様に、30 Gy/時の高線量率 X 線 0.1 Gy を照射して、3, 8 時間後に EGFP⁺⁺ 核面積あたりの EdU 陽性細胞核面積の割合を調べたところ、照射後 3, 8 時間後にはそれぞれ $23.0 \pm 14.1\%$, $11.8 \pm 10.4\%$ となり、単調減少傾向が見られた (図 3)。対照群との Dunnet の多重比較検定では統計学的有意差は認められなかったが、単調減少を想定した Williams の多重比較検定では、照射から 8 時間後の減少に統計学的な有意差が認められた ($\alpha = 0.05$)。

次に、EdU を取り込んだ細胞と取り込んでいない EGFP⁺⁺ 細胞との間で、DNA 損傷修復の効率を調べるため、1 Gy もしくは 0.1 Gy を照射したときの EGFP⁺⁺ と EGFP⁺⁺ を含まない EdU 陽性細胞核に生じる 53BP1 フォーカスの数を様々な時間経過後に評価した。画像解析によって求めた非照射対照群の EGFP⁺⁺ 細胞核における 53BP1 フォーカス数は、 0.016 ± 0.007 個/ μm^2 であった (図 4A)。30 Gy/時の高線量率 X 線 1 Gy を照射後、1, 2, 8, 12 時間後の核面積あたりの 53BP1 フォーカス数を、EGFP⁺⁺ 細胞核面積あたり、もしくは EdU 陽性細胞核面積あたりの数として求めた。EGFP⁺⁺ 細胞核あたりの 53BP1 フォーカス数は、照射から 1, 2, 8, 12 時間後にはそれぞれ、 0.025 ± 0.016 , 0.096 ± 0.015 , 0.011 ± 0.006 , 0.012 ± 0.010 個/ μm^2 となった (図 4A)。Dunnet の多重比較検定の結果、照射後 2 時間の 53BP1 フォーカス数にのみ統計学的有意な増加が認められた ($\alpha = 0.01$)。同様に、非照射対照群の EdU 陽性細胞核における 53BP1 フォーカス数を求めると、 0.012 ± 0.010 個/ μm^2 (図 4A) であった。EdU 陽性細胞核面積あたりの 53BP1 フォーカス数を求めると、照射から 1, 2, 8, 12 時間後にはそれぞれ、 0.021 ± 0.016 , 0.069 ± 0.018 , 0.016 ± 0.017 , 0.015 ± 0.016 個/ μm^2 となった (図 4A)。Dunnet の多重比較検定の結果、照射後 2 時間の 53BP1 フォーカス数にのみ統計学的有意な増加が認められた ($\alpha = 0.05$)。また、同じ経過時間の EGFP⁺⁺ 細胞核と EdU 陽性細胞核との間で面積あたりの 53BP1 フォーカス数に統計学的な差が認められるかを t 検定により比較したところ、0, 1, 2, 8, 12 時間後の p 値は、それぞれ 0.49, 0.77, 0.04, 0.64, 0.70 となり、照射 2 時間後の EGFP⁺⁺ 細胞核の 53BP1 フォーカス数のみ EdU 陽性細胞核の 53BP1 フォーカス数よりも有意に高い結果が得られた (図 4A)。

次に 30 Gy/時の高線量率 X 線 0.1 Gy を照射後、3, 8, 12, 48 時間後の 53BP1 フォーカス数を、EGFP⁺⁺ 細胞核面積あたり、および EdU 陽性細胞核面積あたりの数として求めた。EGFP⁺⁺ 細胞核面積あたりの 53BP1 フォーカス数は、照射から 3, 8, 12, 48 時間後にはそれぞれ、 0.047 ± 0.021 , 0.029 ± 0.016 , 0.01 ± 0.008 , 0.012 ± 0.010 個/ μm^2 となった (図 4B)。Dunnet の多重比較検定の結果、照射後 3 時間の 53BP1 フォーカス数にのみ統計学的有意な増加が認められた ($\alpha = 0.01$)。一方、EdU 陽性細胞核面積あたりの 53BP1 フォーカス数を求めると、照射から 3, 8, 12 時間後にはそれぞれ、 0.031 ± 0.019 , 0.032 ± 0.010 , 0.012 ± 0.003 個/ μm^2 となった。0.1 Gy 照射から 48 時間後には、クリプト内に EdU 陽性細胞が観察されなかったため、EdU 陽性細胞核面積あたりの 53BP1 フォーカス数は求められなかった。そこで、0, 3, 8, 12 時間の間で Dunnet の多重比較検定を行った結果、照射後 3 時間の 53BP1 フォーカス数にのみ統計学的有意な増加が認められた ($\alpha = 0.05$)。また、同じ経過時間で EGFP⁺⁺ 細胞核と EdU 陽性細胞核との間で面積当たりの 53BP1 フォーカス数に統計学的な差が認められるかを t 検定により比較したところ、3, 8, 12 時間後の p 値は、それぞれ 0.24, 0.76, 0.84 となり、いずれの比較でも EGFP⁺⁺ 細胞核と EdU 陽性細胞核との間で観察される 53BP1 フォーカス数に有意な差は認められなかった。

IV 考察

幹細胞に対する放射線影響研究の重要性は、国際放射線防護委員会（ICRP）が編纂中の幹細胞の放射線影響に関する報告書案（タスクグループ 75 の Stem Cell Report）でも主張されている⁶⁾。その中では、従来がんリスクの基本原則とされてきた細胞レベルの突然変異蓄積のみならず、組織レベルの品質管理を考慮すべきという考え方が重要視されている。本研究成果は、線量率の違いによって、幹細胞に及ぼす影響が組織レベルで異なることを示す直接的な証拠を示したものである。

我々は、LRZ マウスを用いたこれまでの研究で、1 Gy の高線量率 X 線（30 Gy/時）照射によって大腸幹細胞が消失し、その後、新しい Lgr5 幹細胞が作られる幹細胞ターンオーバーの攪乱が誘発されることを見出している^{7,8)}。標識されたクリプト数の減少は、照射前に存在した Lgr5 幹細胞が失われて、Bmi-1⁹⁾や mTert¹⁰⁾などを発現する、「休止期にある放射線抵抗性の上位の幹細胞」によって置き換わったことを間接的に示している。このような上位の幹細胞による Lgr5 幹細胞の補充および、それに伴う再構築を、我々は「上位補充」と呼ぶことにする。休止期の幹細胞では DNA 損傷修復効率が低いことが知られており^{11,12)}、放射線によって DNA 損傷が蓄積しやすい細胞の可能性がある。このような細胞によって DNA 損傷修復能が十分な Lgr5 幹細胞が置き換わる場合、Lgr5 幹細胞プールは DNA 損傷を蓄積した細胞で再構築されやすくなる。すなわち、この上位補充は、突然変異の蓄積やがん化をもたらす要因であると予想される。そのため、組織を健全に維持するためには、上位補充を避けて、DNA 損傷修復能の十分な細胞が絶えず損なわれることなくプールを維持することが重要であろう。本研究では、様々な線量率下で上位補充が観察されるかを調べてきた。しかし、ここまで調べた限りの線量率では、低線量率、すなわち、0.0003 Gy/時、0.003 Gy/時（昨年度成果）では、非照射対照群と比較して、放射線による幹細胞の上位補充が生じたことを示す統計学的有意な証拠は得られなかった。そのため、この組織幹細胞レベルの線量率効果によって、同じ集積線量でも突然変異の蓄積が起こらず、組織のがん化が防がれているものと考えられる。

がん化リスクを考慮するためには、幹細胞を含む組織内で DNA の障害が蓄積するのかを直接評価する必要がある。本研究では、放射線照射後に残存する 53BP1 フォーカス数が幹細胞や前駆細胞でどのような消長を示すのかという観点で評価した。一般に、放射線によって生じる 53BP1 フォーカス数は、細胞核あたりいくつ存在するかで定量的に損傷修復度が評価される^{4,13)}。しかしながら、本画像解析のために得られたクリプトのホールマウント染色像では、細胞同士がきわめてタイトに結合しており、さらに細胞質も少なく、核の蛍光チャンネルを観察しても、核同士が密集した像しか得られなかったため、クリプトに含まれる各々の核の面積を算出することはできなかった。そこで、分化した細胞の核も同等とみなし、核がよく分離して観察された絨毛組織の核平均面積を画像解析により求めたところ、 $56.3 \pm 8.4 \mu\text{m}^2$ (n = 46) あった。1 Gy で 2 時間後に観察された 53BP1 フォーカス数は $1 \mu\text{m}^2$ あたり 0.096 個であったため、細胞核当たりをノーマライズすると、平均 5.4 個となった。これはマウスの組織レベルで観察された収量と比較しても同等であり¹³⁾、本研究で用いた評価法が他の組織にも適用可能であることを示唆している。

画像解析の結果、EdU を取り込む細胞のうち 85% が幹細胞以外で、パネート細胞への取り込みも観察されなかったため、EdU の大部分は前駆細胞に取り込まれていると考えられた。EdU のマウスの体内半減期は、24 分¹⁴⁾から 35 分¹⁵⁾との報告がある。仮に、EdU の体内半減期を 30 分と

すると、投与から4時間後には投与時の0.4%の濃度に低下する計算になる。さらに8時間後には投与時の0.000006%まで低下するため、投与から12時間後にDNA合成が行われたとしても、その時点で細胞にEdUが取り込まれる可能性は極めて低いと考えられる。そのため、1Gy照射後にEdUを持ったEGFP⁺⁺が増えた結果は、EdU投与初期に幹細胞もしくは前駆細胞であったものが、再び幹細胞に戻ることを示唆している。Huaらは12Gyの高線量を照射したマウスにおいて、解剖の4時間前にEdUを取り込んだクリプトがどれくらい存在するかを調べ、照射から12時間後にはEdUを取り込む細胞が無かったが、24時間後には、非照射と同等まで増加することを報告している¹⁶⁾。この報告は、解剖の4時間前にEdUを投与するデザインであるため、前駆細胞が幹細胞に戻るかを評価していないが、我々は照射の4時間前にEdUを投与するデザインにしたことで、照射前の細胞が起こす、照射後の組織内動態を評価することができた。

本研究における課題は、大腸においてEGFPを発現するクリプトが極めて少なかったため、前駆細胞が幹細胞に戻る現象を十二指腸のみで評価した点である。そのため、LacZ陽性クリプトの上位補充を評価した大腸の系とは異なる解釈が必要かもしれない。今後は、大腸のクリプトでも比較評価することが重要であろう。しかしながら、少なくとも観察した照射後の経過時間では、0.1Gyと1GyとでEdU陽性の幹細胞の現れ方に違いが見られたこと、すなわち、1Gyの方が前駆細胞からの供給がされやすいことから、1Gyの照射では、いわば「下位補充」(前駆細胞がLgr5幹細胞プールを再構成すること)も起こっていると考えられた。大腸のLacZ陽性クリプトの消失は、上位補充のみしか検出できないため、1Gyで下位補充が生じる可能性は本研究によって初めて明らかになった。前駆細胞によるLgr5陽性幹細胞の供給については、Dlil⁺陽性細胞が関与することが知られている。Dlil⁺は前駆細胞のマーカーであり、Dlil⁺陽性細胞はLgr5幹細胞によって作られるが、放射線照射(6Gy)後に失われたLgr5幹細胞を埋め合わせることが報告されている¹⁷⁾。そのため、1Gyで生じるEdU陽性細胞の幹細胞プール構築は、このDlil⁺前駆細胞の可能性がある。

上位補充が起こらない線量・線量率であっても、下位補充が生じてしまうと幹細胞プールに変異が蓄積する可能性がある。なぜなら、もし幹細胞でDNA損傷が十分に修復されても、前駆細胞が傷を有した状態で幹細胞に戻るのであれば、幹細胞プールに傷が蓄積し、がんリスクが高まる恐れがあるためである。そのため、前駆細胞と幹細胞とで放射線の傷が残存するかを比較する必要があった。実際に幹細胞プール(EGFP⁺⁺細胞)と前駆細胞(EdU陽性細胞)とで残存するDNA損傷がどれくらいの時間をかけて修復され、また、損傷が存在するかを調べると、0.1Gy, 1Gy照射とも、53BP1フォーカス数の形成ピーク(照射後2~3時間)はEGFP⁺⁺細胞の方が高い結果が得られたものの、その後の修復により数はどちらも変わらない結果を示したため、幹細胞の傷が残りやすいというわけではなさそうであった。さらに、下位補充が観察された照射8時間後には、残存DNA損傷は認められず、非照射レベルと同等であったため、1Gyの放射線によって生じた傷は、幹細胞、前駆細胞いずれに生じても、その後幹細胞プールに持ち込まれる可能性は低いことを示唆している。前述の通り、これは十二指腸のクリプトにおいて観察されたことであったため、今後は大腸でも同様に、前駆細胞で観察される下位補充が観察されるのか、またその場合に、幹細胞と比べてDNA損傷修復の効率に違いがあるのかを評価することができれば、損傷の蓄積性が低線量・低線量率放射線によってどの程度生じるかを定量的に示すことができるかもしれない。

V 結論

本研究により、3Gy/時以下の線量率では、腸管幹細胞の幹細胞プールへの影響が小さいことが明らかになった。その機構として、幹細胞プールに残存 DNA 損傷が過剰に蓄積しない仕組みがあると考えられた。

VI 次年度以降の展開

線量率が下がるほど、単位時間あたりに放射線ヒットする確率が減るため、組織幹細胞プールを考慮するとヒットした細胞としていない細胞が混在する状況が生じる。そこで、照射細胞と非照射細胞との間の「細胞競合」に着目した研究が必要である。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Otsuka K Iwasaki T. Effects of dose rates on radiation-induced replenishment of intestinal stem cells determined by Lgr5 lineage tracing. *J Radiat Res in press.*
- 2) Yamauchi M Otsuka K Kondo H et al. A novel in vitro survival assay of small intestinal stem cells after exposure to ionizing radiation. *J Radiat Res* 2014; 55:381-390.
- 3) 大塚健介、富田雅典、山内基弘、鈴木啓司、岩崎利泰 異なる線量率下での腸管幹細胞への DNA 損傷と幹細胞ターンオーバー動態の評価、第 57 回日本放射線影響学会、鹿児島市、2014 年 10 月 1 日～3 日
- 4) 大塚健介、富田雅典、鈴木啓司、岩崎利泰 腸管幹細胞の細胞死と組織維持機構、第 8 回 Quantum Medicine 研究会、水戸市、2015 年 3 月 1 日

引用文献

- 1) Barker N Ridgway RA et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer, *Nature* 2009; 457: 608-611.
- 2) Niwa O. Roles of stem cells in tissue turnover and radiation carcinogenesis, *Radiat Res* 2010; 174: 833-839.
- 3) Barker N van Es JH Kuipers J et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5, *Nature* 2007; 449: 1003-1007.
- 4) Suzuki K Nakashima M Yamashita S. Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue, *Radiat Res* 2010; 174: 415-423.
- 5) Sato T Vries RG Snippert HJ et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche, *Nature* 2009; 459: 262-266.
- 6) ICRP. Draft Report for Consultation: Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection.
< <http://www.icrp.org/docs/TG75DraftForConsultation.pdf> >
- 7) Otsuka K Hamada N Magae J et al. Ionizing radiation leads to the replacement and de novo production of colonic Lgr5⁺ stem cells, *Radiat Res* 2013; 179: 637-646.
- 8) Otsuka K Iwasaki T. Effects of dose rates on radiation-induced replenishment of intestinal stem cells determined by Lgr5 lineage tracing. *in press.*

- 9) Tian H Biehs B Warming S et al. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 2011;478:255-9.
- 10) Montgomery RK Carlone DL Richmond CA et al. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:179-84
- 11) Beerman I Seita J Inlay MA et al. Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell* 2014; 15: 37-50.
- 12) Mohrin M Bourke E Alexander D et al. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 174-185.
- 13) Rube CE Lorat Y Schuler N et al. DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA Repair* 2011; 10: 427-437.
- 14) Cheraghali AM Knaus EE Wiebe LI. Bioavailability and pharmacokinetic parameters for 5-ethyl-2'-deoxyuridine. *Antiviral Res* 1994; 25: 259-267.
- 15) Cheraghali AM Kumar R Knaus EE et al. Pharmacokinetics and bioavailability of 5-ethyl-2'-deoxyuridine and its novel (5R,6R)-5-bromo-6-ethoxy-5,6-dihydro prodrugs in mice. *Drug Metab Dispos* 1995; 23: 223-226.
- 16) Hua G Thin TH Feldman R et al. Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant. *Gastroenterology* 2012; 143: 1266-1276.
- 17) van Es JH Sato T van de Wetering M et al. Dll1⁺ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol* 2012;14:1099-1104.

表 1 極低線量率放射線がマウス大腸 LacZ 陽性クリプトの割合に及ぼす影響

線量率 (Gy/ 時)	集積 線量 (Gy)	照射/ 非照射	ID	LacZ ⁻ クリプト	LacZ ⁺ クリプト	LacZ ⁺ クリプト 割合(%)	平均値	標準 偏差
0.0003	0.1	非照射	405	4,630	93	1.97	1.80	0.64
			397	2,611	28	1.06		
			377	1,628	43	2.57		
			376	5,146	83	1.59		
	1	照射	373	2,540	55	2.12	1.77	0.49
			403	3,185	46	1.42		
			802	1,207	37	2.97		
			809	2,220	36	1.60		
			816	1806	44	2.38		
			817	1956	33	1.66		
0.0003	1	照射	819	2448	55	2.20	2.03	1.21
			820	1186	18	1.50		
			833	1,797	40	2.18		
			834	3,142	45	1.41		
			838	1,006	44	4.19		
			839	3,822	24	0.62		
			841	2,537	41	1.59		
			842	4,114	92	2.19		

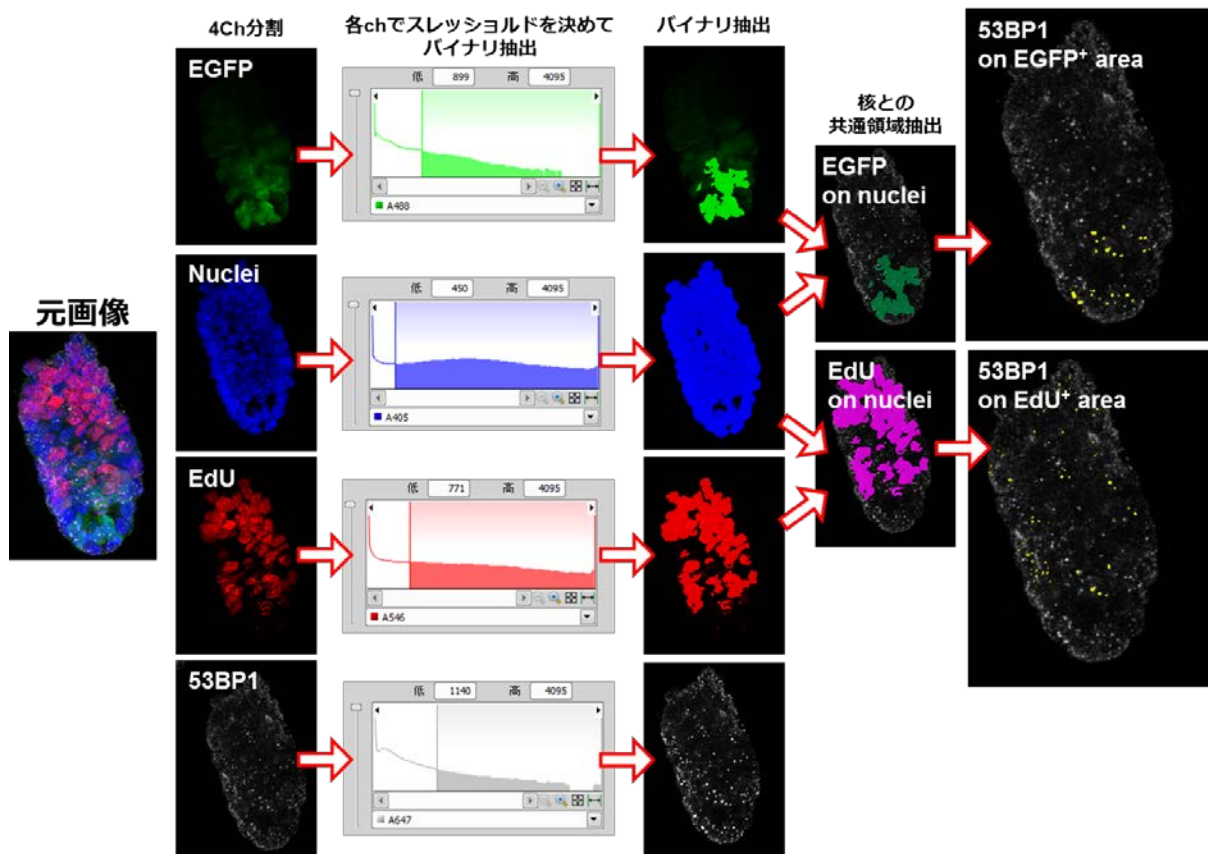


図1 ホールマウントクリプトの蛍光画像解析法

本研究では、幹細胞および前駆細胞のそれぞれにおいて、放射線照射によって細胞核に局在することが知られている 53BP1 フォーカス数を評価するために、クリプト組織の4重蛍光免疫染色を行い、クリプトごとに同一の画像処理を施して定量化を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C1) で組織の細胞一層の画像を撮像し、画像解析ソフト NIS-Elements AR-SP (Nikon) を用いて、元画像を各蛍光チャンネルに分割した。無染色の自家蛍光のシグナルを参考にしきい値を定め、それより高いシグナルを持つ蛍光のみをバイナリ抽出した。ただし、EGFP は強発現する細胞のみが幹細胞であることが知られているため、発現分布が高い部分のみを選択した。さらにバイナリ抽出後の画像を重ね合わせて共通の領域を抽出した。例えば、核のチャンネルと EdU のチャンネルの共通領域を選択することで、EdU を持つ核を抽出することができる。同様に EGFP を強発現する細胞における核を抽出した。さらにこの抽出バイナリ領域に含まれる 53BP1 フォーカスを選択することで、EGFP を強発現する核、もしくは、EdU を取り込んだ核に含まれる 53BP1 フォーカス数がオブジェクト数として得られた。それぞれの核面積 (μm^2) あたりに、53BP1 フォーカス (オブジェクト数) がいくつ存在するかをカウントした。細胞核同士が密集しているために、核あたりの 53BP1 フォーカス数ではなく、核面積あたりの 53BP1 フォーカス数で表した。

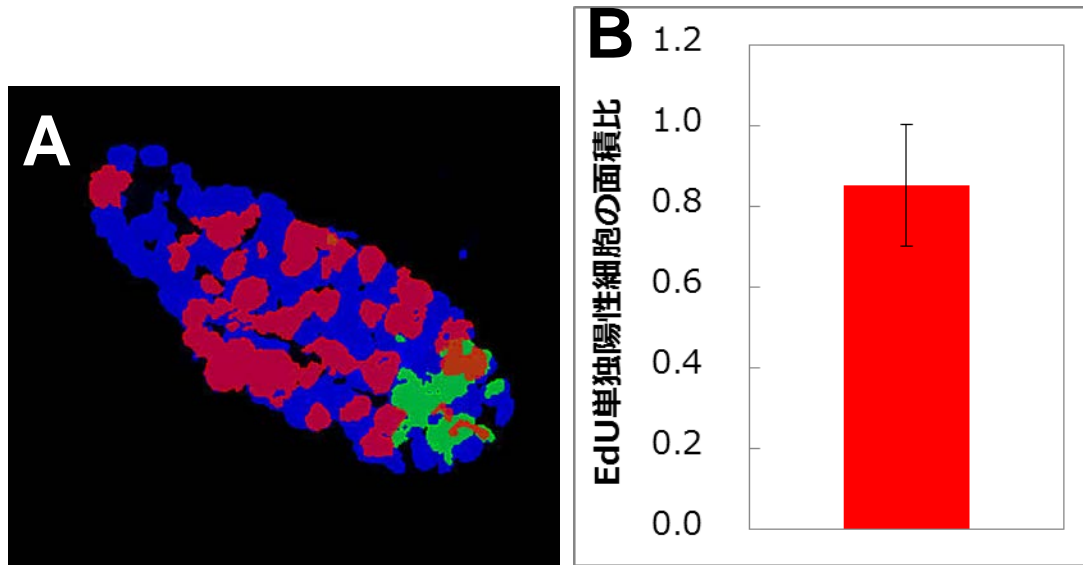


図2 EdU の投与 4 時間後におけるクリプト内の幹細胞および EdU 陽性細胞の分布
 A: 青は細胞核、緑が EGFP⁺(Lgr5 幹細胞)、赤が EdU 陽性細胞を表す。画像は解析のために二値化処理済み
 B: EdU 陽性細胞のうち、EGFP⁺細胞を除く EdU 単独陽性細胞の面積比

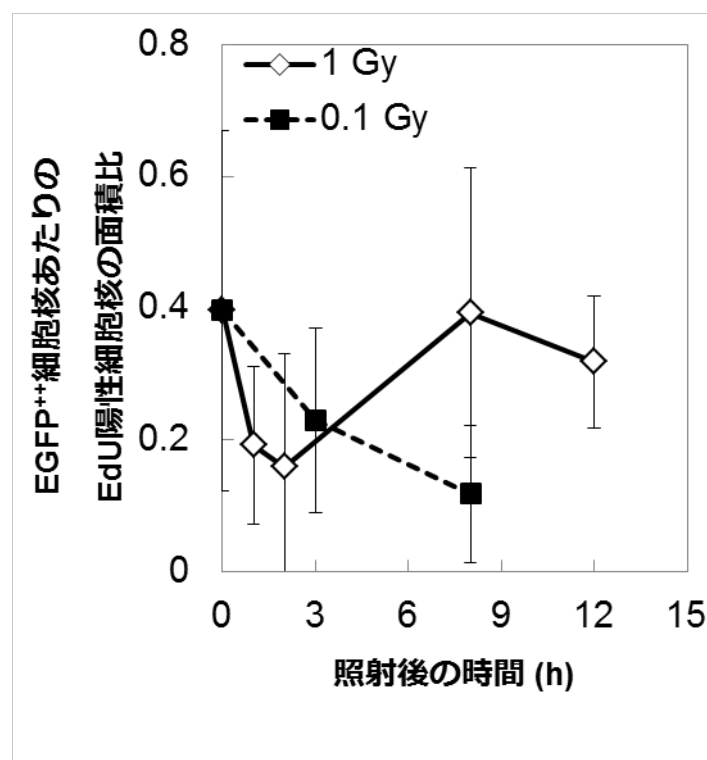


図3 EdU を取り込んだ幹細胞のクリプト内の存在割合
 EGFP⁺細胞のうち、EdU を取り込んだ細胞核の面積を比で表した。0.1 Gy 照射から 3, 8 時間後、1 Gy 照射から 1, 2, 8, 12 時間後に調べた。平均値±標準偏差 (n = 3 - 5)。

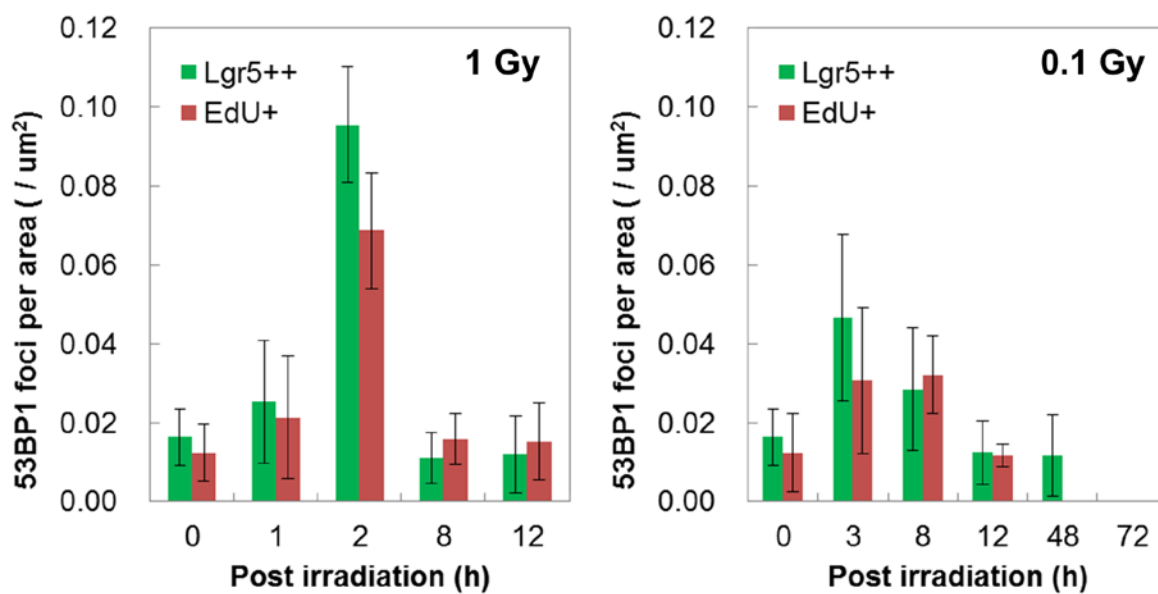


図4 幹細胞および前駆細胞における 0.1, 1 Gy 照射後の 53BP1 フォーカス数の推移
 画像解析により幹細胞 (Lgr5⁺⁺) 細胞および前駆細胞 (EdU⁺) における核面積あたりの 53BP1 フォーカス数を示す。平均値±標準偏差 (n = 3 - 5)。

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

Kensuke Otsuka

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

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

Abstract

The risk of cancer induced by low-dose-rate radiation is estimated on the basis of the frequencies induced by high-dose-rate radiation. However, it is well known that the biological consequences after irradiation depend on the dose-rate (Dose-rate effects). To estimate the risk of cancer induced by low-dose-rate or low-dose radiation, it is important to understand the biological mechanisms of the dose-rate effects on the cell-of-origin of cancer. Recent studies demonstrated that the tissue stem cells (Lgr5-positive cells) can develop into cancer using Lgr5-dependent lineage tracing system. Using the lineage tracing system, we evaluated the replenishment of the intestinal stem cells after extremely low-dose-rate, middle-dose-rate irradiation. We found that 1 Gy of extremely low-dose-rate (0.0003 Gy/h) gamma-rays and middle-dose-rate (3 Gy/h) X-rays did not induce replenishment of Lgr5⁺ stem cells. We also found that cycling transit amplifying (TA) cells which were identified as 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) incorporated cells in duodenal crypts, returned to Lgr5⁺ stem cells pool 8 hours after 1 Gy X-irradiation. However, residual DNA damage (foci of 53BP1 proteins) was already disappeared 8 hours after 1 Gy X-irradiation both in Lgr5⁺ stem cells and EdU-incorporated TA cells. These findings indicated that alimentary tract has some mechanisms to avoid the accumulation of DNA damage from their stem cells pool under wide range of dose-rates.

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

低線量被ばくによる神経幹細胞に蓄積する放射線損傷の影響

白石一乗（大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻放射線生物学・助教）

研究要旨

幹細胞は個体内で生涯維持されるという特性を持つ。このことから、低線量放射線の長期被ばくに対して、幹細胞では、その損傷が蓄積される可能性がある。しかしながら、低線量放射線曝露後の幹細胞への影響は明らかにされていない。本研究では、放射線の生体内神経幹細胞への影響を 1) DNA 損傷応答の蓄積、2) 染色体構造異常を指標に検証した。フローサイトメトリー法による DNA 損傷応答評価の結果、DNA 損傷は線量率依存的 (500~1.75mGy/min) に増加することが認められた。このことから、組織内神経幹細胞は損傷に対して一定の修復機能を持つことが示唆される。また、2Gy 照射された 14.5 日妊娠マウスから分離した胎児性神経幹細胞と生体神経幹細胞における DNA 損傷の程度は同程度だったにもかかわらず、生まれた仔マウスの神経幹細胞中の DNA 損傷は減少していた。このことは、成体神経幹細胞では DNA 損傷が残存する一方、胎児幹細胞では発生過程でこれが消去される可能性を示している。今回の実験で、2Gy 暴露された母親から生まれた仔マウスに高い頻度で水頭症が認められた。胎性神経幹細胞はゲノム損傷に対して細胞排除で対応した結果、神経幹細胞数が減少し水頭症を誘発したのかもしれない。実際、水頭症マウスから分離した神経幹細胞中に DNA 損傷応答と染色体異常は認められなかった。

キーワード：神経幹細胞、 γ -H2AX フォーカス、染色体異常

I 研究目的

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

II 研究方法

全ての放射線照射実験は大阪府立大学・地域連携研究機構の所有する放射線発生場で行われた。低線量率被ばくマウスの神経幹細胞における、*ex vivo* での DNA 損傷の評価は次の様に行われた。6 週齢 B6C3F1 マウスに集積線量 2Gy で照射を行った。0.5Gy の高線量率照射には X 線発生装置を用いた。18m、1.75mGy/min の低線量率照射には 60Co ガンマ線照射装置を用いた。照射後直ちにマウスに安楽死を施し、全脳組織を回収した。その脳組織より、大脳側脳室下帯を回収した。酵素処理により単個細胞化した後、6% percol を含む緩衝液に重層、遠心処理によってミエリンを分離し、これを測定試料

とした。DNA 損傷評価はフローサイトメトリー法で行った。CD133 陽性細胞を神経幹細胞とし、この集団での γ -H2AX 陽性細胞の蛍光強度の分布から神経幹細胞中の DNA 損傷の評価を行った。

成体神経幹細胞と胎児神経幹細胞の比較は、2Gy 照射された妊娠 14.5 日齢の C57B6 マウス (C3H と交配) とその仔マウス B6C3F1 の脳組織から回収された細胞を用いることで行われた。回収された各細胞を数日間培養し、細胞塊 (neurosphere) を得た。これを神経幹細胞として評価を行った。試料細胞をスライドガラス上に固定し、 γ -H2AX 抗体で免疫染色することで、DNA 損傷の評価を行った。また、1 番、3 番染色体をプローブとした Whole chromosome (WCP) FISH を指標とした染色体異常の評価も行った。

(倫理面への配慮)

実験動物の取扱において「大阪府立大学実験動物指針」に則って行った。

III 研究結果

1) Ex vivo 神経幹細胞の DNA 損傷評価

これまで、神経幹細胞の障害評価に neurosphere 形成細胞が用いられてきた。これは、回収した脳組織は雑多な細胞を含むので (図 1. A)、培養系による純化作業が必要なためである。しかし、neurosphere 形成は胎児由来組織で数日、成体組織では 10 日程度の培養期間を必要とした。そのため、DNA 修復過程のような早期の生体反応を評価することができなかった。特に、組織分散溶液中に含まれるミエリンは抗体と非特異的に結合するため (図 1. C)、幹細胞マーカー CD133 によるポジティブセレクションもできなかった。これまでに、0.9M ショ糖遠心分離によるミエリン除去が報告されているが、大きな効果は認められなかった。本研究では、単核球細胞を回収する手法である、6% percol による密度勾配遠心法を用いることで、ミエリンの混入が改善された (図 1. B)。この細胞に幹細胞表面抗原 CD133 と DNA 損傷マーカー γ -H2AX で 2 重染色を行った。CD133 ポジティブセレクションを行うことで、幹細胞分画を得た (図 1. D)。この集団の γ -H2AX 陽性細胞における、蛍光強度を指標とした DNA 損傷評価を行った。この方法で、neurosphere 形成細胞に見られる γ -H2AX フォーカス形成と同様の線量依存的増加がフローサイトメトリー法によっても確認できたので、この評価法は有効であると判断した (図 2.)。

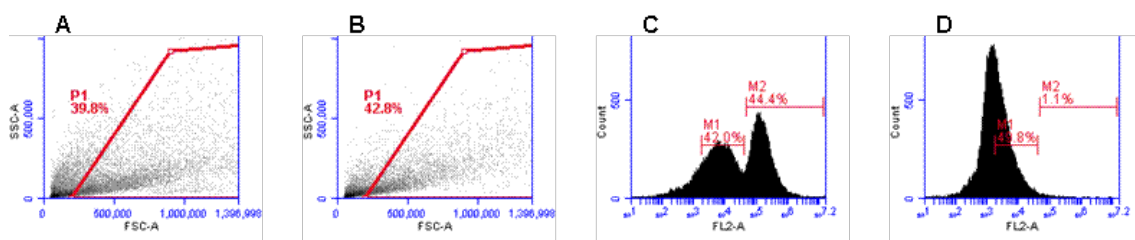


図 1. 脳組織からの神経幹細胞濃縮

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

2) 低線量率被ばくマウスでの線量率効果

6 週齢 B6C3F1 マウスに総線量 2Gy の低線量率放射線照射を行った。このマウスの脳神経組織から回収した細胞の DNA 損傷の評価をフローサイトメトリー法により行った。500mGy/min の急性被ばく

に対して、18mGy、1.75mGy/min の中、低線量率被ばくは有意に DNA 損傷を減少させた (図 2.)。これは Ex vivo における神経幹細胞に線量率効果が見られることを示している。一方、18mGy と 1.75mGy/min の線量率被ばくマウス間では統計有意差が見られなかった。

DNA損傷における線量率効果

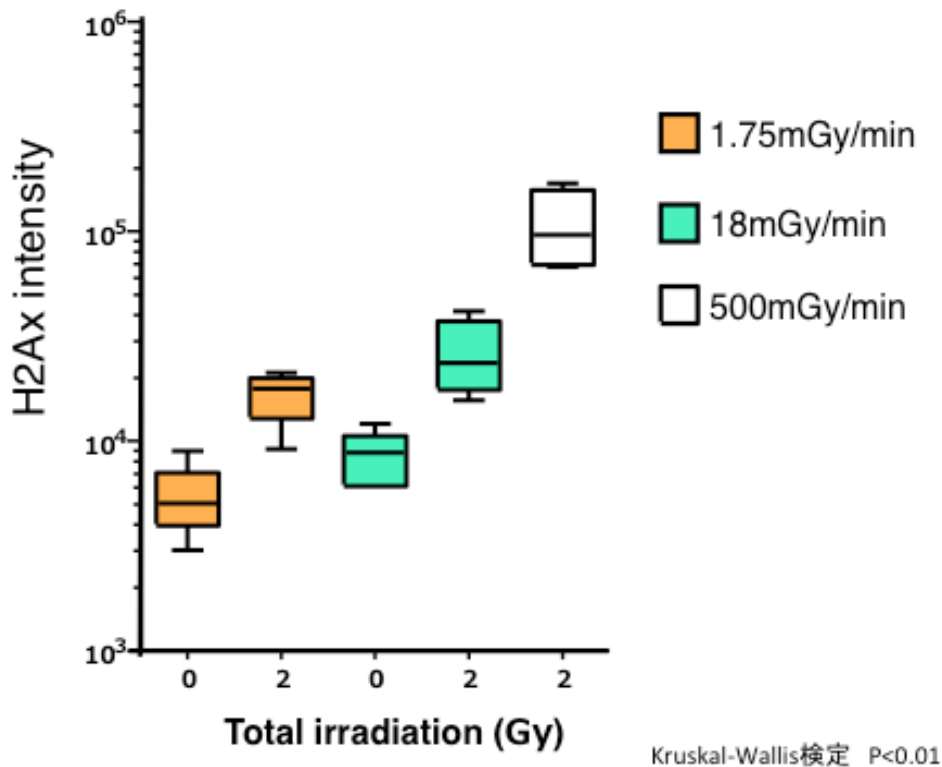


図 2. 各線量率での神経幹細胞の DNA 損傷

総線量 2Gy で放射線照射後、脳組織から回収した細胞の CD133 陽性細胞を神経幹細胞集団とした。

3) 胎児および成体マウスでの γ -H2AX による DNA 損傷評価

妊娠 14.5 日 C57BL6 マウス (C3H マウスと交配) に 2Gy (0.5Gy/min) の X 線を照射した。被ばく直後の胎児由来神経幹細胞、生後 6 週齢の F1 神経幹細胞、およびその母親由来の成体神経幹細胞を回収した。三種類の神経幹細胞について、 γ -H2AX フォーカスを免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察することで DNA2 重鎖切断(DSB)数を測定した。本実験では体内被ばくしたマウスの 30%に水頭症が発生した (図 3.)。被ばく直後には胎児、成体由来細胞どちらもフォーカス数の上昇が有為認められた (図 4.)。これは繊維芽細胞、リンパ球でも同様の結果であった。また、妊娠時に被ばくした雌マウスでは 6 週間後でもフォーカス数の上昇が認められた。一方、体内被ばくした 6 週齢仔マウスではフォーカス数の上昇が認められなかった (図 5.)。また、水頭症マウスから分離された、神経幹細胞中のフォーカス数はいずれの群と比べても最も低くなった。未照射群と比較して有為になかった (図 5.)。

放射線被曝による水頭症マウスの発生

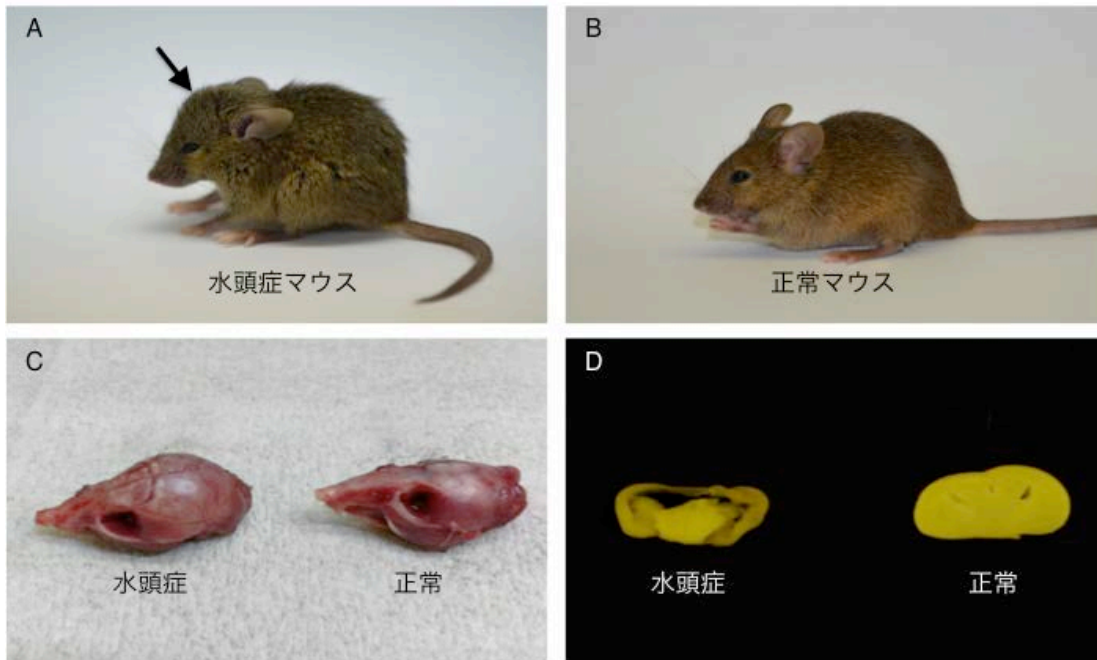
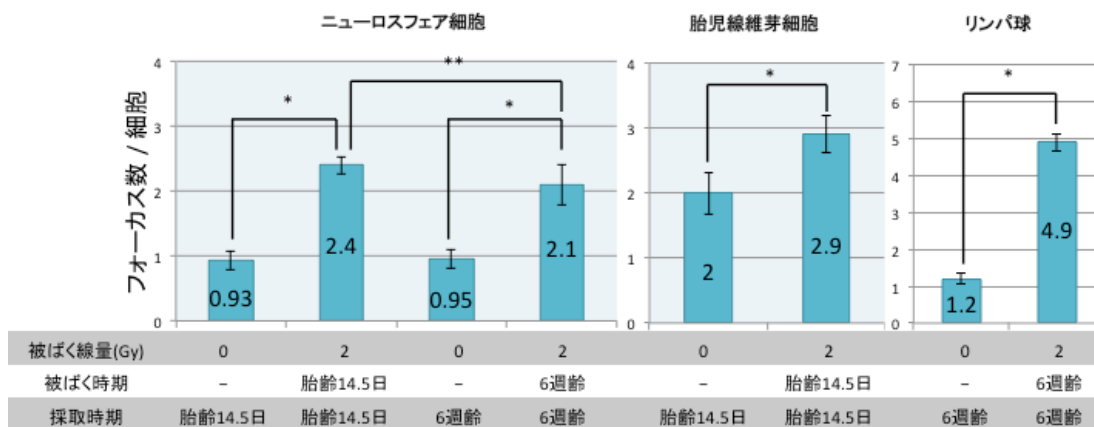


図3. 体内被曝による水頭症の発生。水頭症マウスは頭頂部が隆起していることが外観上の特徴であり (A 矢印、C)、体重減少と毛並みの悪いものも多くみられた。一方、明らかな行動異常を示すものは見られなかった。ブアン固定標本では脳室の拡張が認められた (D)。

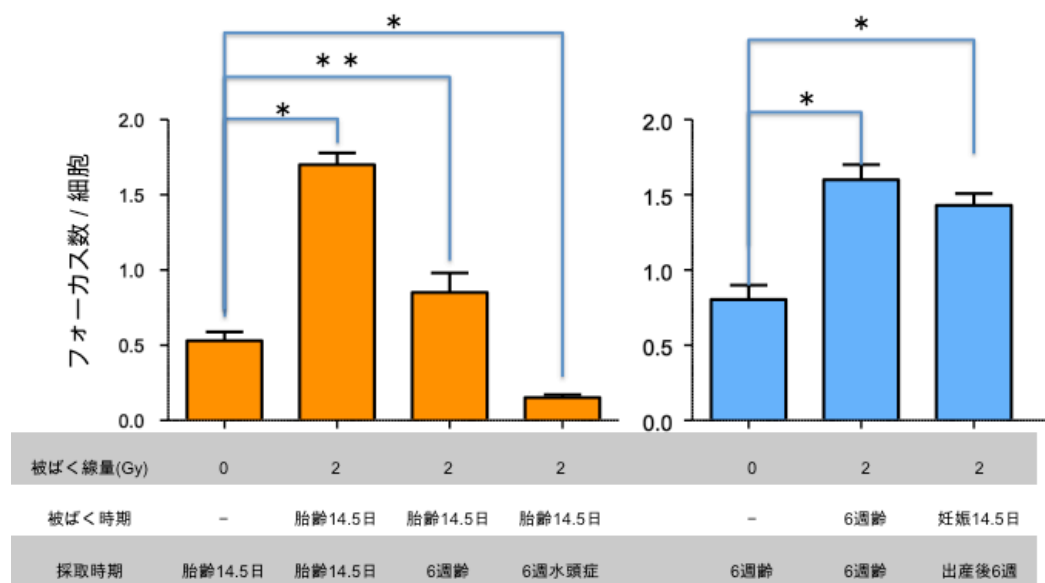
被ばく直後のDNA損傷



* $p < 0.0001$; ** $p = 0.0014$ (Mann-Whitney test)

図4. 被ばく直後のDNA損傷応答。被ばく直後では組織に関わらず被ばくの影響が認められる。

胎生神経幹細胞でのDNA損傷排除



Mann-Whitney test *: 有為差あり, **: 有為差なし

図5. 胎生神経幹細胞中に見られるDNA損傷細胞の低下。胎生期に被ばくしたマウスの神経幹細胞において、被ばく直後に見られた γ -H2AXフォーカスは新生児6週目で低下していた。一方、同時に被ばくした親マウスの神経幹細胞では、6週間後でも γ -H2AXフォーカスは保持されていた。

4) WCP FISH による染色体安定性評価

妊娠14.5日C57BL6マウス(C3Hマウスと交配)にGy(0.5Gy/min)のX線を照射した。生後6週齢のF1神経幹細胞、およびその母親由来の成体神経幹細胞を回収した。1番、3番染色体をプローブとしたWCP FISHを行うことで、染色体異常を検出した(図6.)。未照射群(A)では転座が検出されなかった一方、照射群(図6. B)では $2.2 \pm 0.8\%$ の頻度で転座が観察された。観察された染色体異常は全て転座を伴う安定型であった。3)で見られた結果と同様に、照射後6週後の母親マウス神経幹細胞と比較して、胎児期被ばくマウスの神経幹細胞中の染色体異常は有意に低かった(表1.)。また、水頭症を呈したマウスにおいて、染色体異常は観察されなかった(表1.)。

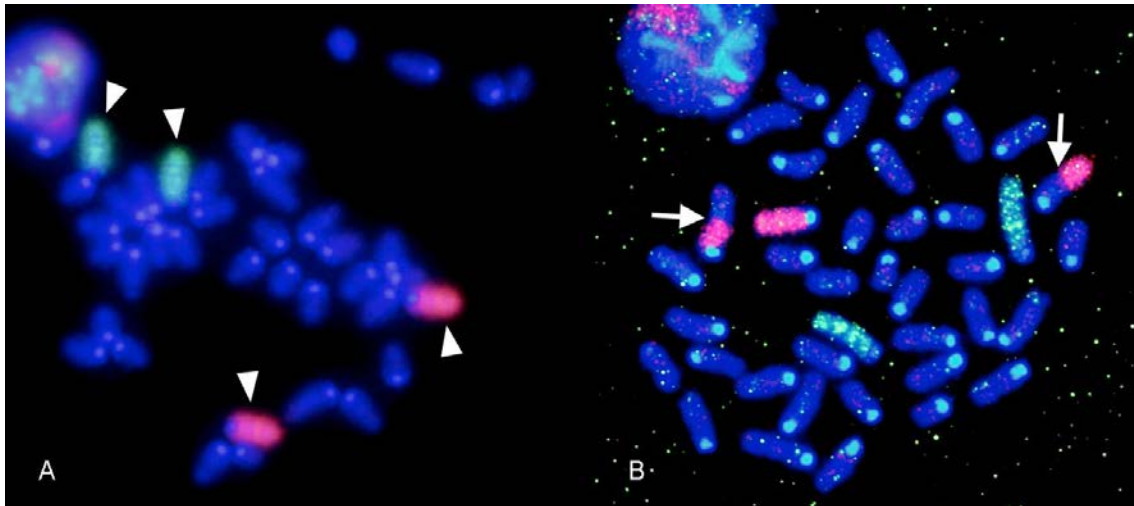


図 6. WCP-FISH による染色体転座検出

転座は 1 番染色体（緑）と 3 番染色体（赤）を染め分けることで測定された。

表 1. 放射線による染色体転座の誘発

マウス	匹数	細胞	転座数 / 数えた細胞数	転座数 / 100細胞 (mean ± SE)
母	8	NSC	7 / 314	2.2 ± 0.84
	9	リンパ球	20 / 374	5.3 ± 1.2
仔	25(4)	NSC	2 / 549	0.36 ± 0.26
		リンパ球	3 / 574	0.52 ± 0.30

()内は水頭症マウスの匹数

NSC, ニューロスフェア細胞; *p = 0.00522; **p = 0.00000237

IV 考察

これまで、組織神経幹細胞の DNA 損傷評価を行う方法として組織切片あるいは培養した神経幹細胞塊 (neurosphere) を用いた実験が行われてきた。組織切片での評価は非常に少量の組織幹細胞を染め分ける困難さがあり。また、neurosphere 形成細胞での評価は、in vitro 培養中の変化を無視できない問題があった。今回、培養操作を行わずに、神経幹細胞を評価する方法を確立した。大脳側脳室下帯から細胞分散液を調整し、ミエリン除去と CD133 ポジティブ選択を行うことで、フローサイトメトリー法による神経幹細胞の DNA 損傷を測定することが可能となった。特にミエリンは CD133 抗体とも親和性が高いため、除去なしで神経幹細胞の障害評価を行うことは、誤った結果を得る可能性がある。今回、この分離細胞を用いて、放射線障害の評価を行うと、照射後、数時間以内で消失する γ -H2AX リン酸化シグナルもとらえることが可能であると考えている。

総線量 2Gy の放射線照射において、500mGy/min の急性照射に対して、18mGy/min、1.75mGy/min

の照射条件で線量率効果が見られた。一方、18mGy/min と 1.75mGy/min 照射の間には統計有意差が認められなかった。これは、未照射群でのバラツキがあることと、標本数の数が原因であると予想される。今後、細胞染色条件を検討することで、DNA 損傷評価の精度が増すことは十分期待できる。

胎生幹細胞と成体幹細胞での放射線応答性の違いを明らかにするために、2Gy (0.5Gy/min) の X 線を照射した妊娠 14.5 日 C57BL6 マウス (C3H マウスと交配) を用いた。この照射条件で被ばく直後の胎児由来神経幹細胞、生後 6 週齢の F1 神経幹細胞、およびその母親由来の成体神経幹細胞を回収した。被ばく直後の γ -H2AX フォーカス数は、胎児由来神経幹細胞と母親由来神経幹細胞どちらも増加していた。このことは初期の放射線応答性に大きな差が無いことを示している。一方、被ばく 6 週間後の母親由来神経幹細胞では γ -H2AX フォーカス数が増加したままだったが、仔由来の神経幹細胞では減少していた。同様の結果は染色体異常を指標にしたときにも観察された。この結果から、成体幹細胞は被ばく後の損傷を保持する可能性を示している。これは、成体脳組織内ではほとんど細胞が分裂していないことと関係があるのかもしれない。また、今回の実験で安定型染色体異常しか観察されなかったのは、FISH 法では分裂している細胞しか評価できない性かもしれない。胎生被ばくした仔マウスにおいて、 γ -H2AX フォーカス数が抑えられていたことは、発生や幼弱な幹細胞の高い増殖性と関係があるのかもしれない。強い分裂刺激を受けている幹細胞中では損傷を持ったまま組織内に留まれない可能性がある。DNA 損傷を持った幹細胞の積極的な排除の結果、神経幹細胞の枯渇を引き起こし、胎内被ばくマウスで水頭症が生じるのかもしれない。

V 結論

本研究の成果として以下の 3 つを上げる。

1) Ex vivo 神経幹細胞の DNA 損傷評価法の確立

Percol 密度勾配遠心法とフローサイトメトリー法を組み合わせることで、組織内神経幹細胞の DNA 損傷を評価できるようになった。この方法を用いることで、培養過程を経ずに放射線損傷を評価することが可能となった。

2) 組織内神経幹細胞にみられる線量率効果

新規の ex vivo 損傷評価法を用いて、マウス組織神経幹細胞における線量率効果を検証した。500mGy/min 照射に対して、18m、1.75mGy/min の線量率で線量率効果が認められた。このことは生体幹細胞中で DNA 修復機構が機能しており、低い線量率の積算線量では個体影響を見積もれない可能性があることを示唆している。

3) 胎生神経幹細胞と成体神経幹細胞の放射線応答性の違い

2Gy 被ばくした妊娠 14.5 日マウスの母体マウスでは出産後、6 週目でも神経幹細胞でゲノム損傷が観察された。一方で、同時に胎内被ばくした 6 週齢仔マウスにおいて、ゲノム損傷の減少が認められた。特に水頭症マウスではゲノム損傷が観察されなかった。このことは胎生あるいは若年神経幹細胞には、成体新家幹細胞とは異なり、何らかのゲノム損傷排除機構が存在することを示唆している。

VI 次年度以降の計画

低線量率被ばくでの DNA 損傷評価において、18mGy と 1.75mGy/min の線量率では統計有意差が見られなかった。より低い線量率照射での線量率効果を明らかにするために、DNA 損傷評価の方法をより改善する必要がある。また、胎児期に被ばくした神経幹細胞は発生を通じて排除される可能性が示されたが、詳細は不明である。水頭症マウスにみられるゲノム安定性も説明がなされていない。一方、

被ばく母親マウス神経幹細胞に存在する、ゲノム損傷を持つ幹細胞は個体の脳組織で機能しているのか、また発癌過程に寄与するものであるのか不明である。これらを検証するためには神経幹細胞とその系譜細胞を組織内で視覚化できるシステムを構築する必要があるので、これを検討する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績
特になし。

引用文献
特になし。

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

Kazunori Shiraishi

Laboratory of Radiation Biology, Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University.

Keywords: neural stem cell; CD133; gamma-H2AX; chromosome aberration

Abstract

A somatic stem cell has the specific roles to maintain and repair tissue in a living organ. Because of the characteristics, damage in stem cell may be accumulated by long-term exposure of low dose radiation. However, the influence of the stem cell after low dose irradiation has not been elucidated. In this study, to assess the influence of the radiation on a neural stem cell (NSC) which is one of tissue stem cells, we verified the accumulation of DNA damage response and chromosome aberration.

Neural stem cells were harvested from mice which was exposed to various dose rate radiation (500m, 18m, 1.75mGy/min). The estimation of DNA damage response by flow cytometric analysis showed that the increase of DNA damage depended on radiation dose rate. This result suggests that neural stem cell in nerve organ has a certain activity of DNA repair. 14.5 days pregnant mice irradiated by 2Gy were sacrificed to obtain embryonic and adult neural stem cell. The number of gamma H2Ax focus used for DNA damage estimation is equal degree in both cells. On the other hand, although the number of gamma H2Ax focus after irradiation is maintained in maternal mice 6 weeks, the number of gamma H2Ax focus reduced in 6 weeks aged mice irradiated in uterus. These findings suggest that DNA damages in embryonic or (and) natal stem cells were eliminated during developmental phase. As a result of the severe exclusion in genome damaged stem cells, hydrocephalus might occur from the reduction in neural stem cells. Indeed, DNA damage response and chromosome aberration were not observed in the neural stem cells harvested from hydrocephalus mouse.

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す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を検証するとともに、低線量放射線被曝でも同様な結果が見られるかを検証する。指標としては、SHRSPを用いた実験では脳卒中様症状の発症時期または寿命を、一方、SHRでは血圧値の上昇時期およびプラトーに達した際の血圧値を用いる。また、両系統のラットを病理検索することにより、線量と病理形態学的、生理学的変化との相関を調べる。更に、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)が存在するか否かを検証する。

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）、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。さらにモデル動物における線量効果のパターン、および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、その除染作業員、核施設復旧作業員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

本年度の放射線影響の調査にあたっては、SHR ラットをヒト高血圧疾患のモデル動物として用いる。5週齢のオスのSHR ラットに1.0 Gy、2.0 Gy、4.0 Gy および0 Gyのガンマ線を照射し、非照射ラット(0 Gy)を対照群として用いる。この研究は以下の手順により実施される。1) 血圧、体重を測定する実験；照射後1週間毎にtail-cuff法により血圧値を測定するとともに体重を測定する。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の測定を実施する。これに使用する新鮮標本を得るため、SHR ラットは一定期間(照射後30週間)飼育後、麻酔下で全血を採取する。広島大学でSHR 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、血液バイオマーカーの測定は放影研で実施する。

得られたデータはSteel test、線形回帰モデル、Linear mixed effects モデルなどを用いて統計解

析を行い、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、放射線の血圧へ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。尚、本実験は広島大学動物実験委員会の承認を得て遂行している。

III 研究結果

我々は本実験において、対照ラット(0 Gy)に比べ、1Gy 以上を照射したラットで放射線量に従って収縮期血圧値が上昇することを観察した。更に、照射ラットに観察された肝臓に生じた脂肪滴、類洞拡張や炎症などの病変は対照ラットには認められなかった(結果 1、2)。現在、匹数を増やして、この結果の確認を実施中である。また、放射線量の増加に従って体重の増加の抑制が観察された(結果 3)。この体重増加の抑制の原因を明らかにするために単位時間当たりの餌の摂餌量、糞便数を測定したが、照射ラット、対照ラットの間には有意な差異は認められなかった。解剖時に各臓器・組織の重量を測定した結果、全身臓器・組織の重量は放射線量の増加に従って減少していた。よって、この体重増加の抑制は組織・臓器の成長遅滞が原因ではないかとも考えられる。このように、SHR を用いた実験系は放射線被曝と血圧、体重との相関を観察するに、最も適したものの一つと考えられる。更に血液バイオマーカーの測定を行った。今回は、当研究所の生化学検査に用いられる 11 種類の項目について結果が得られた。表 1 に示したように、血液マーカーの値が放射線量の増加に従って上昇、もしくは減少することが認められた。他の血液バイオマーカー(例えば、レプチン、MCP-1 などのホルモン、サイトカイン等)の測定条件が設定できたので順次解析を行う予定である。また、病理検索は進行中である。

SHRSP を用いた研究においては、脳卒中発症時期、病理学的表現型の変化、血液バイオマーカーの変化などを指標にして、低線量放射線(0.1 Gy~0.2 Gy)影響を調べる実験を実施している。

IV 考察

本研究を通じて、過去の疫学調査により示唆された心血管疾患と放射線との相関について興味深いデータが得られつつある。この研究で、極めて低い線量(0.1 Gy 未満)の放射線影響の検討が可能であることが判明すれば、現在福島被災地域で問題になっている極低線量の放射と循環器疾患との相関に関しても重要な知見が得られることが期待される。

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 次年度の計画

●平成 27 年度は引き続き 0.1 Gy および 0.2 Gy の放射線を一括照射した SHRSP を用いた実験を継続する。更に、今までの調査で集積された高線量率放射線を一括照射した場合の影響と、低い線量率の放射線を緩照射して得られた影響の比較をし、その違いを検証する。そのために、低線量

率で緩照射した SHR および SHRSP を用いた実験を下記の表に示した規模で行う。①、②では SHRSP を使用する。線量率(0.1mGy/分)で総線量が各々0.25 および 0.5 Gy になるまで照射する。①においては全例を終生飼育し、脳卒中様症状の発症時期の亢進、寿命の変化および死因の同定と各臓器の病理変化の重篤度を調べる。②では、8 週目で全例の病理検索を行う。同時に血液を採取し、それを用いてバイオマーカーの測定を行う。③においては、SHR に総線量が 2 および 4 Gy に達するまで照射し、その後 30 週目まで飼育し血圧および体重の変遷を観察する。解剖して得られた組織の病理形態学的検査を行う。同時に、血液を採取しバイオマーカーの測定を行う。測定するバイオマーカーの種類は、一括照射の実験で線量と有意な相関を示したものを優先的に行う。①から③の過程で得られた種々の指標、例えば、脳卒中発症時期の変化、血圧値および体重の変遷、バイオマーカーの値、組織の病理学的形態変化などと放射線量との関連を統計的に解析する。平成 27 年度の後半には、一括照射して得られた結果と緩照射した場合の結果を比較してその違いを検証する。更に、これまでの結果を総合して、どのような生物学的機序が放射線の影響を受け、どのような心血管疾患をもたらすのかを生命情報学的解析法による予測を試みる。得られた結果は、福島の被災地のような低線量・低線量率の放射線と心血管疾患との相関を知るための重要なデータとなると期待される。更に、より低線量・低線量率の放射線の影響を検出するための実験系および適切な測定項目などの確立に努力する。

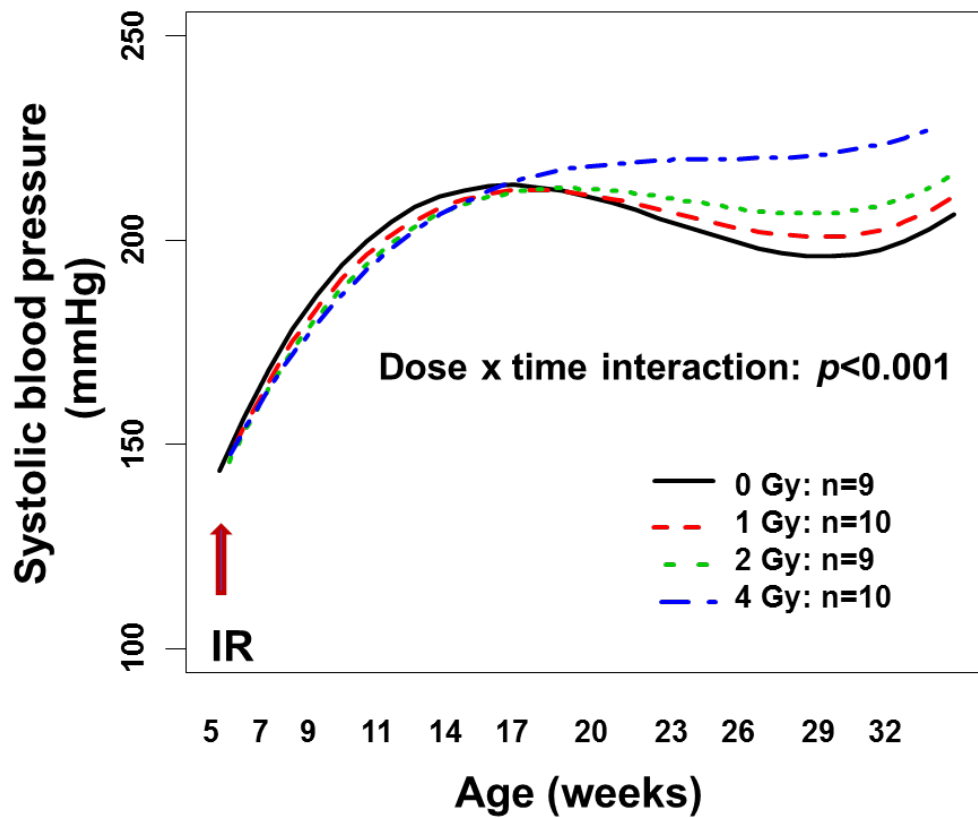
実験番号	ストレイン	総線量				
		0.25 Gy	0.5 Gy	2 Gy	4 Gy	0 Gy
①	SHRSP	10 匹	10 匹			20 匹
②	SHRSP	10 匹	10 匹			20 匹
③	SHR			10 匹	10 匹	20 匹

本研究は、低線量(0.1 Gy 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。

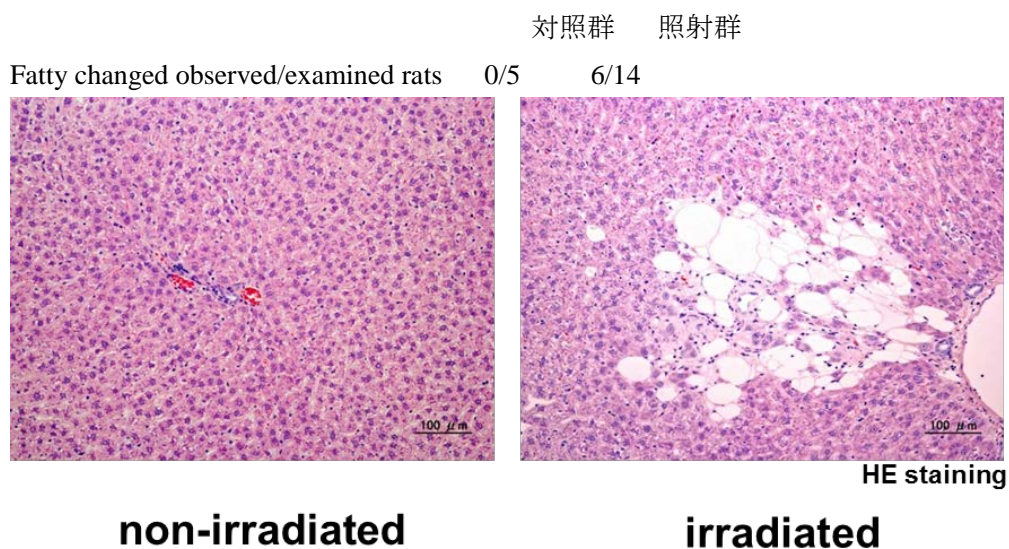
引用文献

- 1) Takahashi I Ohishi W Mettler Jr FA et al. A Report from the 2013 International Workshop: Radiation and Cardiovascular Disease, Hiroshima, Japan. *J Radiol Prot.* 2013: 33(4); 869-80.
- 2) 高橋 規郎, 丹羽 保晴. 放射線が循環器疾患の発症リスクを上げているか-モデル動物としての SHRSP の適切性-. SHR 等疾患モデル共同研究会, News Letters, 2014: No.45; 1-2.

結果 1. 収縮期血圧の放射線による影響



結果 2. 病理検索の概要



結果 3. 体重変化の放射線による影響

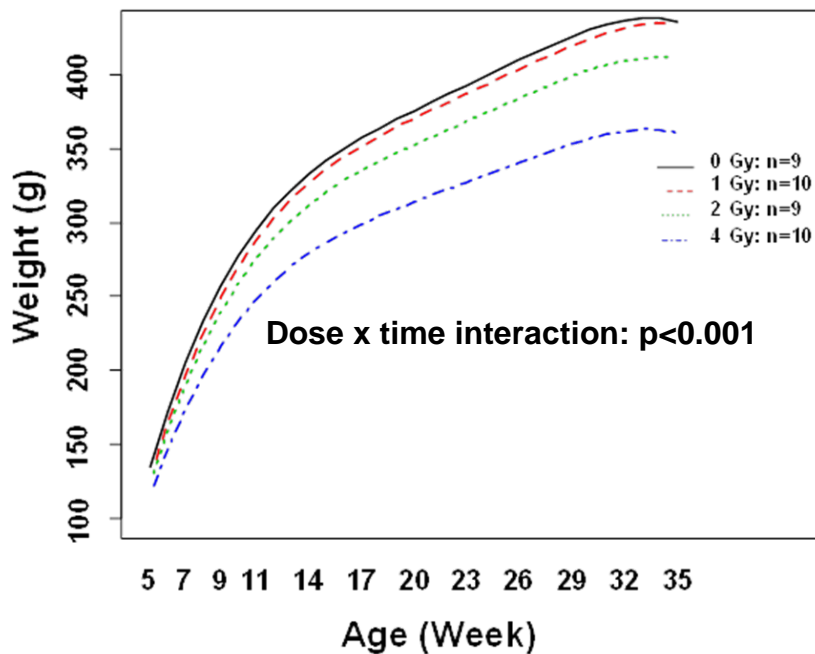


表 1. 血液バイオマーカーの放射線による影響

	0 Gy (n=8)	1 Gy (n=10)	2 Gy (n=7)	4 Gy (n=10)	<i>p for trend</i>
AST (U/L)	84.5	87.8	111	120	0.002
ALT (U/L)	74.5	76.9	95.1	108	0.002
Glu (mg/dl)	162	160	165	194	0.008
T-CHO (mg/dl)	93.5	96.5	93.8	97.5	0.582
TG (mg/dl)	119	134	132	118	0.547
HDL-C (mg/dl)	30.4	30.6	31.3	35.5	0.001
LDL-C (mg/dl)	12.7	13.6	12.3	10.3	0.002
BUN (mg/dl)	17.2	16.9	16.2	18.1	0.876
Cre (mg/dl)	0.24	0.22	0.22	0.24	0.331
IP (mg/dl)	7.0	7.2	7.2	7.5	0.890
Cl (mEq/L)	97.4	95.8	95.5	93.9	0.019

Whether lower-dose radiation can induce circulatory disease?

-Assessment using animal models-

Yasuharu Niwa

*Department of Radiobiology/Molecular Epidemiology,
Radiation Effects Research Foundation (RERF), Hiroshima*

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

Abstract

[Introduction]

Previous epidemiological findings including the LSS and the AHS indicated that radiation may be associated with increased risk of circulatory diseases (CDs). These issues received keen attention from the research scientists in the field of radiation protection, radiation biology and cardiology. On the other hand, inconsistencies have been observed among various studies, especially low-dose occupational and environmental exposures. Given the uncertainties, a study using irradiated model animals is being conducted to assess whether or not risk of CD is elevated with increasing radiation dose.

We have been assessing the issues as above, and to obtain information about biological mechanisms through the animal model studies. We presented the results at Japan Radiation Research Society. Irradiated stroke-prone spontaneous hypertensive rats (SHRSP) showed significantly shortened lifespans and had more progressed perivascular damage in their organs than non-irradiated rats. However, we learned that the system of using SHRSP rats is not appropriate for assessing evidence of radiation-associated risks for hypertension because measuring blood pressure after observing initial symptoms of stroke can lead to further stroke symptoms. Thus, we proposed to use SHR rats, since SHR rats do not show any stroke symptoms. We conducted the study using SHR rats as an animal model for assessing the radiation effects on their blood pressure.

[Methods]

In this study, we examined four endpoints: 1) blood pressure, 2) pathological phenotypes, 3) body weight, and 4) blood biomarkers. The rats were evenly placed into four exposure groups (1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, and 0 Gy as a control). In the study, each dose group consisted of 10 rats. Blood pressure and body weight was measured once a week for 30 weeks after irradiation.

[Results]

1) The systolic blood pressure level of irradiated rats was statistically significantly higher than that of non-irradiated rats. 2) Significant pathologic changes in brain, heart, and small intestine were not observed. However, hepatocytes containing lipid-like droplets were frequently observed in the irradiated rats, but not in control group. Pathological analyses are being continued for increasing number of rats to confirm the

results. 3) The body weight of irradiated rats was significantly lower than that of non-irradiated rats. 4) Several blood biomarkers altered with increasing radiation dose.

[Discussions]

Our animal model studies using SHR rats demonstrated that we expect to obtain somewhat clear evidence indicating whether or not radiation truly causes CDs as well as hypertension. The approach may also provide a novel way to seek possible mechanisms of CDs at lower-dose radiation exposure.

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

屋外活動を制限された子供の放射線感受性変化に関する動物モデル研究

根井充（放射線医学総合研究所放射線防護研究センター・プログラムリーダー）

研究要旨

福島原発事故に伴い、福島の子供たちには放射線の影響そのものよりも原子力発電所事故に起因した不安を抱き続ける心理的ストレスの影響の方が大きいことが指摘されている。本事業は、低週齢マウスを用いてインビボとインビトロの多面的な解析を行い、より低い線量の放射線感受性に対する心理的ストレスの影響を評価するとともに、心理的ストレスと DNA 修復系との関連性を明らかにすることを目的とする。そのため、Feng ら (PNAS, 109, 7013-7018, 2012) が心理ストレス後の放射線発がん感受性の上昇を示した際に用いた方法を踏襲し、5 週齢マウスを用いて 6 時間/日の拘束を 28 日間行うとともに、8 日目に 4Gy の X 線照射を行った。28 日間の拘束処理後、マウスは解剖して血液、脾臓、大腿骨髄、肝臓等を採取した。昨年度実施した臓器重量、血液像、血中抗酸化活性、大腿骨髄細胞における小核生成の解析に引き続き、今年度は血中のストレス関連ホルモン、炎症関連サイトカインおよび脾臓の染色体異常の解析を行った。その結果、(1)拘束ストレスはストレス関連ホルモンであるコルチコステロンの上昇をもたらすこと、(2)拘束によるコルチコステロンの上昇は照射によって抑制されること、(3)炎症性サイトカイン TNF- α は身体拘束のみによって若干上昇するが、照射後コルチコステロンの低下に符合して顕著に上昇すること、(4)抗炎症性サイトカイン IL-10 は照射のみによって上昇するが、身体拘束下での照射では上昇が抑制されること、(5)照射によって生成された 1~3 番染色体が関わる転座は拘束によって減少すること、を示した。これにより、身体拘束の実験系を用いることで、大災害を経験した住民にしばしば観察されるストレスホルモンの上昇を再現し、これに伴う炎症関連サイトカインの変動を誘導できることがわかり、身体拘束の実験系が心理ストレスを模擬する有効な系であることを確認した。そして、少なくとも安定型染色体異常である転座を見る限り、拘束ストレスは脾臓における放射線誘発染色体異常に有意な増感効果をもたらさず、昨年示した小核試験の結果と一致して放射線発がんを促進するような知見は得られないと結論された。

キーワード：放射線感受性、心理的ストレス、小核頻度、染色体異常、抗酸化系

研究協力者：森田明典（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部（医学系）准教授）

I 研究目的

福島原発事故に伴い、住民には放射線の影響そのものよりも「放射線を受けた」という不安を抱き続ける心理的ストレスの影響の方が大きいと言われていた。事故の翌年に発表された「子供の心のケアに関する」文部科学省の調査結果から、被災地においては不安障害を始め、心的外傷後ストレス障害を疑う症状が多く認められると報告されている。特に福島県で最も多いことから原発事故が最大の原因であると考えられる。チェルノブイリ事故においても、事故後 5 年~10 年の時期に住民の無力感、日常生活管理能力の喪失感、疎外感、自暴自棄といった心理的な要因から住民、特に小児の被ばく増大を引き起こしたと報告されている。今後避難指示解除準備区域における住民の帰還に際し、高リスク群である子供は屋外での活動が制限される等、強い心理的ストレスを受けることが予想されているが、心理的ストレスが子供の放射線感受性に与える影響はあまり調べられていない。そこで、本事業は、心理的ストレスが子供の放射線感受性に与える影

響を動物モデルを用いて細胞遺伝学のおよび分子生物学的に明らかにすることを旨とする。長期汚染地域の子供のリスク低減に資するとともに、科学的知見の不足が原因となって住民に広がる放射線長期被ばくに対する不安を解消することに本事業の意義はある。

II 研究方法

心理ストレスに関わる生理反応には、大脳皮質を起点として、視床下部から自律神経系、副腎髄質に至る急性の反応系と、下垂体、副腎皮質に至る慢性反応系がある。急性反応系ではノルアドレナリンやアドレナリンが機能して一過性の血圧上昇や血糖上昇、発汗、覚せい等を引き起こす一方、慢性反応系ではコルチゾール（げっ歯類では少し化学形が異なるコルチコステロンに代る）が抗炎症作用や免疫抑制作用をもたらすと同時に、長期的に多量に分泌されれば脳の海馬を委縮させる。この慢性の反応系は、視床下部 (hypothalamic area)、下垂体 (pituitary gland)、副腎皮質 (adrenal cortex) の頭文字を取って HPA 軸と呼ばれている。心理ストレスのような慢性のストレスのバイオマーカーとして、コルチゾールもしくはコルチコステロンの利用価値が期待されている。

実際に、これまで多くの大災害に際してコルチゾールが長期に渡って上昇することが報告されている。東日本大震災においては、仙台に住む大学生において震災前と比べて震災3ヶ月後に有意に高い唾液中コルチゾールが観察され、同時に行ったアンケート調査項目の Negative な気分のスコアと相関していることが報告されている¹⁾。また、Chernobyl 事故では、フィンランドにおいて事故時に妊娠第2期であった母から生まれた子供が14歳で有意に高い唾液中コルチゾールが維持していたこと²⁾、Three Mile Island 事故から17ヶ月後、サイトから5mile以内の居住者に有意に高い尿中コルチゾールが観察されたこと³⁾、阪神淡路大震災から20ヶ月後、淡路島の住人に高い血清中コルチゾールが観察されたこと⁴⁾等が報告されている。これらすべてにおいて住民の被ばくは無視できるものであり、コルチゾールの上昇は心理ストレスの裏付けとして解釈されている。このようにコルチゾールは大災害時の心理的ストレスのよいバイオマーカーとしての可能性が期待される。

これまでコルチゾールを指標として心理的ストレスの放射線感受性修飾作用を調べた先行研究として2例上げることができる。一つは SJL/J マウスを用いた急性骨髄性白血病の実験系⁵⁾である(図1)。通常なら3Gy照射後200日目頃から図中□のように発がんするところ、心理ストレス

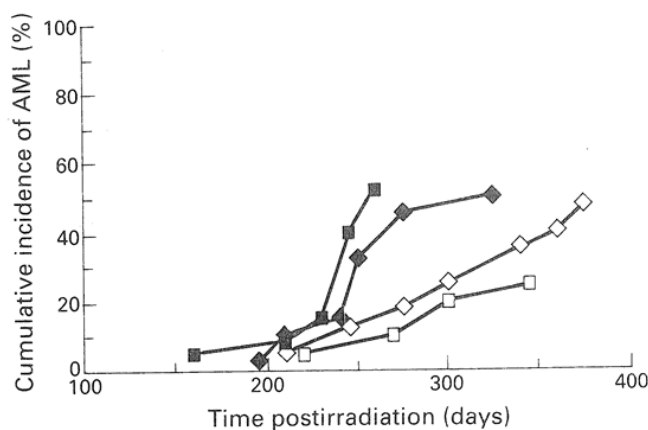


図1. デキサメタゾン接種により放射線誘発の急性骨髄性白血病の発症が上昇している。文献5から引用。

を模擬するために照射直後にコルチゾールの類似体であるデキサメタソンを皮下投与すると図中◆のように発がんが増強することが示されている。もう一つは、本事業がベースとしている Feng らの実験⁶⁾であり(図2)、p53ヘテロのC57BLマウスを身体拘束することで心理ストレスを模擬し、4Gy照射後の胸腺および脾臓のリンパ腫を調べたものである。身体拘束によりコルチコステロンの顕著な上昇を観察している(図2A)。サバイバル解析において半数のマウスが死ぬまでの

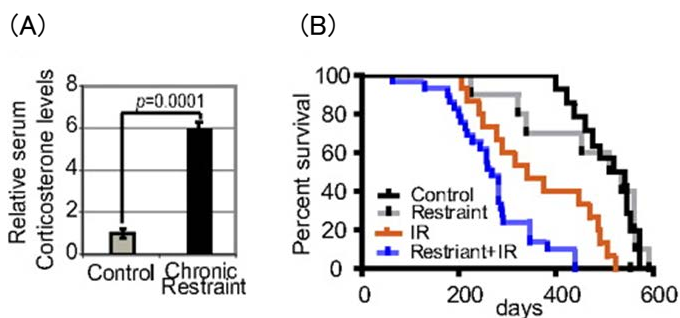


図2. 身体拘束により血中コルチコステロンの上昇が観察されている(A)。身体拘束下では、放射線誘発リンパ腫により寿命が有意に短くなっている(B)。文献6より引用。

日数を見る限り、コントロール群と身体拘束のみの群では大きな差は無いものの、照射のみの群に比べて照射と拘束の両方を処置した群では顕著にリンパ腫の発症が早まっていることから(図B)、心理ストレスが放射線発がん感受性を高めていることが示唆された。本事業では遺伝的にノーマルな動物を使ってこの結果を細胞遺伝学的・分子生物学的に検証する。

これまでに心理的ストレスを模擬する実験系は数多く考案されている。拘束ストレスは物理的ストレスをともなう実験系の一つであり、コルチゾールの誘導をともなう、HPA 軸支配の反応を調べる確立された実験系とされている。一方、物理的ストレスをともなわないストレスとして、未知の場所や物にさらす新奇ストレス、強い個体と同居させる社会的ストレス、猫やラットの匂いや鳴き声にさらす捕食者ストレス、多くの個体を同居させる過密ストレス、他の個体が苦しむ状況を見せる社会・心理的ストレス等があるが、HPA 軸の関与を含めて原発事故の被災者への展開の可能性が明らかでない。本事業において、HPA 軸支配が明らかな身体拘束の実験系を用いることとする。

しかしながら、身体拘束ストレスは、屋外活動の制限に起因する子供のストレスとの関係が不明であることは否めない。例えば、昨年度報告した通り身体拘束は体重低下を引き起こしており、必ずしも運動不足で肥満が増えている福島の実情を反映していない。それでもなお、HPA 軸支配の生体応答は原発事故の心理ストレスを反映しており、これを調べる上で身体拘束は有効であると考えられる。また Feng らの知見を検証することに重要な意義がある。その上で、今後、狭い居住空間等の実験系の有効性を検討し、福島の実実をより反映した実験系を見つけて行くことが重要と考えられる。

本事業では、遺伝型がノーマルな 5 週齢の C57BL/6J 雄マウスを 1 週間馴化飼育の後、図 3 に示す専用拘束器で 1 日 6 時間ずつ 7 日間拘束し、4 Gy の X 線を照射する。そして更に 21 日間拘束する。マウス数は、非拘束・非照射群、拘束・非照射群、非拘束・照射群および拘束・照射群について、それぞれ 6 匹を用いる。その後解剖し、種々の臓器を採取してアッセイする。脾臓においては染色体異常、大腿骨骨髓細胞においては小核形成、血清においては種々のサイトカイン



図3. マウス拘束容器

やホルモン、肝臓においてはタンパク質発現や DNA メチル化、マイクロ RNA 発現、末梢血においては抗酸化活性を調べる。

今年度は、酵素結合免疫吸着法 (ELISA 法) により血清中の炎症関連サイトカイン (TNF- α 、IL-10) およびストレス関連ホルモン (コルチコステロン) を測定した。また染色体は蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization, FISH) 法により解析した。放射線等に起因する染色体異常には、細胞分裂により消失

する不安定型異常（二動原体染色体、環状染色体、染色体断片など）と、消失しないで新生細胞に受け継がれてゆく安定型異常（転座、逆位、部分欠失、重複など）がある。二動原体染色体は、その特異な構造から検出が比較的容易であり、放射線の生物影響評価に利用される代表的な染色体異常である。しかしながら、不安定型の異常であり、一つの染色体に二つの動原体があることで細胞分裂が阻害されるため、二動原体を持った細胞の頻度は時間とともに低下する。このため、被ばくから時間を経た場合や、低線量率で長期にわたって被ばくした場合には、検出できない。一方、転座（および逆位）は、安定型の異常であり、細胞分裂の支障にならないことから、被ばくから時間を経た場合でも検出可能である。また、安定型異常は、生じる頻度が低くても蓄積されるため、低線量率長期被ばくについても、検出できる可能性がある。しかしながら、転座（および逆位）等の安定型異常は、通常の染色法では検出が難しいという問題点がある。加えて、顕微鏡下で分裂中期の細胞を検索し、染色体像を観察して染色体異常を検討する作業は、熟練した専門の研究者でも、膨大な時間と労力を要する作業である。本事業では、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法により、1番、2番、3番染色体を、それぞれ、緑色、赤色、黄色に染色し、最新の染色体自動解析システムを利用して分裂期中期の細胞のみを選び出すとともに染色体のイメージデータを取得した。得られたイメージデータを解析して、1番、2番、3番染色体に生じた転座と全染色体に生じた二動原体染色体の出現頻度を評価した。

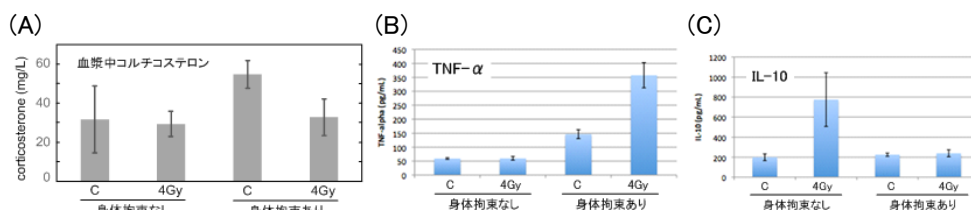
（倫理面への配慮）

拘束に用いる拘束容器は Feng ら⁵⁾が用いたのと同規格の物を用い、拘束中は容器ごと飼育ケージに横たえ、床敷、照明などの環境は通常飼育と同じにする等、過度の苦痛を与えないよう配慮した。本事業を実施するに当たり、放射線医学総合研究所「動物実験等実施に関する規程」に基づき、動物実験委員会での審査を受け、承認を得た。

III 研究結果

図 4A に示す通り、血中コルチコステロンは身体拘束によって上昇傾向を示した。そして興味深いことに拘束に加えてさらに 4Gy 照射することにより上昇傾向は消失した。炎症性サイトカインである TNF- α は身体拘束のみによって若干上昇することが観察されたが、さらに照射することによってコルチコステロンの低下に符合して顕著に上昇することが観察された（図 4B）。また、抗炎症性サイトカインである IL-10 は照射によって上昇しているが、身体拘束下での照射では、上昇が抑制されていることが観察された（図 4C）。

図 5 は脾臓細胞における染色体異常誘発への効果を見た結果である。照射マウスについては非拘束群、拘束群ともにトータルで約 1500 細胞、非照射マウスについては各群約 3000 細胞を調べた（図 5A）。その結果、照射によって生成された 1~3 番染色体が関わる転座（図 5B）は、拘束によって有意に減少していることが観察された（図 5C）。一方、照射によって生成された二動原



体は、拘束により若干増加の傾向を示した（図 5C）。

図4. 血中コルチコステロン(A)および炎症関連サイトカインTNF- α (B)、IL-10(C)の解析。

以上まとめると、(1)拘束ストレスはコルチコステロンの上昇をもたらした、(2)拘束によるコルチコステロンの上昇は照射によって抑制された、(3) TNF- α は身体拘束のみによって若干上昇するが、照射後コルチコステロンの低下に符合して顕著に上昇した、(4)IL-10 は照射のみによって上昇するが、身体拘束下での照射では上昇が抑制された、(5) 照射によって生成された1~3番染色体が関わる転座は拘束によって有意に減少した。

IV 考察

血中コルチコステロンが身体拘束によって上昇傾向を示したこと、そして拘束に加えてさらに4Gy照射することにより上昇傾向が消失したこと

(図4A)は、照射が拘束ストレスの効果を抑制していることを示唆している。今後再現性を確認する予定である。

コルチコステロンには抗炎症作用があり、他の炎症関連サイトカインと互いに制御し合っていることが知られている。炎症性サイトカイン TNF- α の変動(図4B)は、身体拘束が炎症を引き起こす一方で、コルチコステロンの上昇がTNF- α の上昇を低く抑えていることを示していると思われる。照射によりコルチコステロンの抑制作用が失われ

てTNF- α は顕著に上がり、強い炎症を引き起こしているのかもしれない。また、抗炎症性サイトカイン IL-10 の変動(図4C)からわかる通り、拘束ストレスと照射により、コルチコステロンの変動をともなって炎症関連サイトカインが複雑に制御されている。

照射によって生成された1~3番染色体が関わる転座(図5B)が拘束によって有意に減少している(図5C)ことは、拘束が放射線の転座効果を抑制しているように見えるが、今後再現性を調べる予定である。一方、照射によって生成された二動原体は、拘束により若干増加の傾向を示した(図5C)。昨年度実施した血液像の解析から、造血系の増殖が拘束によって抑制されていることを観察したが、そのために拘束条件下では不安定型異常である二動原体の消失が遅れ、照射後3週間において多くが残存したためではないかと考えられる。少なくとも、安定型染色体異常頻度を指標とした放射線感受性に対して、拘束による心理的ストレスは有意な増感効果をもたらしていないと考えられた。

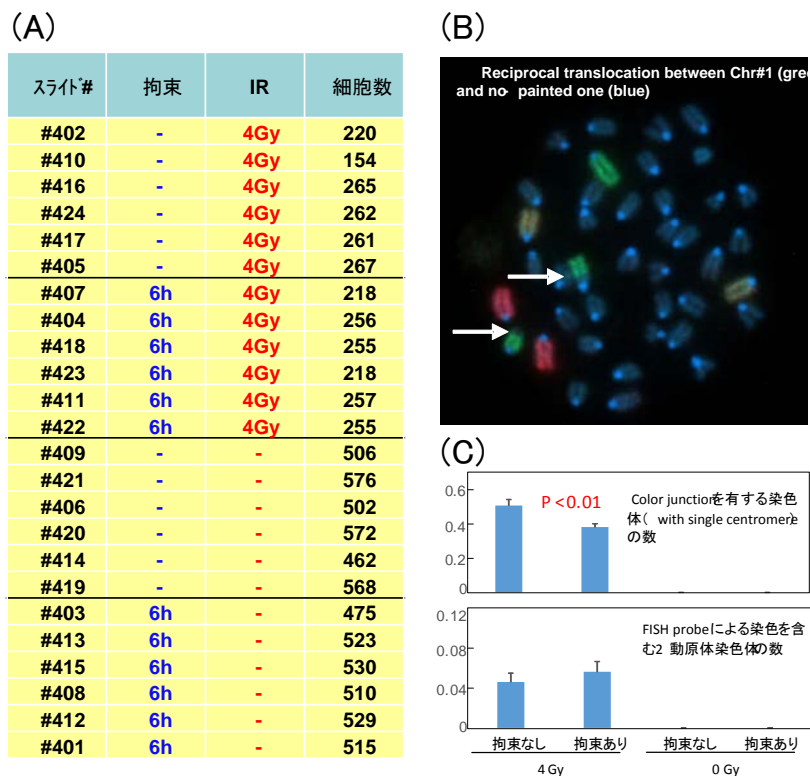


図5. 染色体異常の解析。実験群ごとのスライド試料当たりの解析細胞数を示している(A)。蛍光in situハイブリダイゼーション法によって検出された転座を示している(B)。上は転座の頻度、下は2動原体の頻度を示している(C)。

身体拘束の実験系は、大災害で住民がしばしば示すコルチゾールの上昇を再現し、これに伴う炎症関連サイトカインの変動を示したことから、心理ストレスを模擬する有効な実験系であることが確認された。そして、少なくとも安定型染色体異常である転座を見る限り、拘束ストレスは脾臓における放射線誘発染色体異常に有意な増感効果をもたらさず、放射線発がんを促進するような知見は得られなかった。今後は肝臓におけるタンパク質発現や DNA メチル化を調べるとともに、身体拘束の低線量もしくは低線量率放射線影響への修飾作用を解析する計画である。

V 結論

正常な遺伝子型を有する個体において、過度の心理ストレスにより、放射線発がんのリスクが高まることを示す知見は得られなかった。

VI 次年度以降の計画

平成 27 年度以降は、肝臓におけるタンパク質発現および DNA メチル化を指標として身体拘束の効果を評価する。また、末梢血における抗酸化活性についても評価する。この結果に基づき身体拘束の低線量もしくは低線量率放射線影響への修飾作用を解析する。

引用文献

- 1) Kotozaki Y Kawashima R. Effects of the Higashi-Nihon earthquake: posttraumatic stress, psychological changes, and cortisol levels of survivors, PLoS One 2012; 7(4): e34612.
- 2) Huizink AC Bartels M Rose RJ, et al. Chernobyl exposure as stressor during pregnancy and hormone levels in adolescent offspring, J Epidemiol Community Health 2008; 62(4): e5.
- 3) Schaeffer MA Baum A. Adrenal cortical response to stress at Three Mile Island, Psychosom Med 1984; 46(3): 227-237.
- 4) Fukuda S Morimoto K Mure K, et al. Effect of the Hanshin-Awaji earthquake on posttraumatic stress, lifestyle changes, and cortisol levels of victims, Arch Environ Health 2000; 55(2): 121-125.
- 5) Haran-Ghera N Peled A Krautghamer R, et al. Initiation and promotion in radiation-induced myeloid leukemia, Leukemia 1992; 6(7): 689-695.
- 6) Feng Z Liu L Zhang C, et al. Chronic restraint stress attenuates p53 function and promotes tumorigenesis, Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109(18): 7013-7018.

Animal model study on radiation sensitivity of children prohibited from doing outdoor activities

Mitsuru Neno

National Institute of Radiological Sciences

Keywords: Radiation sensitivity; Psychological stress; Chromosome aberration; Micronucleus; stress-related hormone; inflammatory-related cytokine

Abstract

It has been suggested that psychological stresses of children who suffered Fukushima Nuclear Power Plant accident affect their health more severely than radiation emitted from contaminated environments. In this study, we aim to estimate the effects of psychological stresses on children's sensitivity to radiation by an *in vitro* and *in vivo* experiments using young mice. And we also aim to assess an involvement of DNA repair capability in influencing radiation sensitivity by psychological stresses. For these purposes, we treated young mice of 5 weeks old with chronic restraint for 6 hrs a day on consecutive 28 days and irradiation with 4 Gy of X rays on the 8th day according to the method of Feng *et al.* (PNAS, 109, 7013-7018, 2012) who have shown an elevated sensitivity of mice to radiation carcinogenesis after psychological stresses. The blood, spleen, femoral bone marrow and liver were sampled after euthanasia, and we analyzed the combined effects of chronic restraint and radiation on organ weights, hemogram, antioxidant capability of blood cells and micronuclei induction in femoral bone marrow cells last year. This year, we further analyzed the effects on stress-related hormones, inflammation-related cytokines in bloods, as well as chromosome aberrations in spleen cells. In the results, we revealed (1) the level of stress-related hormone, corticosterone, in bloods was increased by chronic restraint alone, (2) the increased corticosterone by chronic restraint was blocked by irradiation, (3) the level of pro-inflammatory cytokine, TNF- α , was increased by chronic restraint which was further increased by irradiation in concert with the block of corticosterone increase, (4) the level of anti-inflammatory cytokine, IL-10, was increased by chronic restraint alone, but was reduced to its basal level by irradiation, (5) radiation-induced translocation involving chromosome 1, 2 and 3 was significantly increased in chronically restrained mice compared to un-restrained mice. From these results, it was confirmed that the experimental system of chronic restraint reproduced increased stress-related hormone and the following fluctuation of inflammatory-related cytokines which were frequently observed in severe disaster-suffered people, thus was an effective experimental system for investigation of influences of psychological stresses on radiation sensitivity. And as far as translocations were concerned, we concluded that chronic restraint did not sensitize spleen cells to radiation-induced chromosomal aberration, which accorded with the results we had shown last year by micronuclei assay.

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寿命や発がんなどの生体影響が、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 線長期連続照射による寿命の短縮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、照射 200 日目、照射 400 日目にマウスを解剖し、臓器重量、末梢血の血球解析、骨髄の血球分化割合などの解析を行うことで、低線量率 γ 線長期連続照射による生体影響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。

低線量率 γ 線連続照射終了である生後約 450 日よりマウスの死亡が見られる初期段階である 800 日間までの寿命解析を行ったところ、非照射群でカロリー制限を行うと寿命の変化は見られなかったが、照射群では寿命の延長が示唆される結果が得られた。このことから、カロリー制限は低線量率 γ 線連続照射による寿命の短縮の初期段階に影響を及ぼしていることが示唆された。また、カロリー制限を行ったマウスでは照射の有無にかかわらず体重増加が抑制されており、低線量率 γ 線長期連続照射による体重の顕著な増減は見られなかった。さらにカロリー制限を行うことで、脾臓重量や B 細胞の顕著な変化が見られた。

以上の結果より、低線量率 γ 線長期連続照射による寿命の短縮は、摂餌カロリーを制限することで延長することが示唆された。この延長の機構としては、カロリー制限による摂取カロリーが直接臓器重量などに影響を及ぼすほか、造血系や免疫系に対する影響が関与していることが考えられた。

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、末梢血

研究協力者 田中公夫（環境科学技術研究所相談役）、田中 聡（環境科学技術研究所主任研究員）、香田 淳（環境科学技術研究所研究員）

I 研究目的

低線量率 γ 線の連続照射により、マウスでは寿命の短縮が見られることが報告されている¹。

放射線の生物影響を低減する方法として、高線量率高線量放射線照射の動物実験で照射前後にビタミン C やラクトフェリンなどにより放射線の影響を緩和する方法が報告されている。しかしながらその多くは高線量の放射線を短期にし、照射後 30 日などの短期間の寿命を解析する方法であり、発がんや寿命など長期間に生物影響の低減化を解析した報告はあまり見られない。このうち高線量率高線量の放射線照射の発がんや寿命を指標とした低減化の方法として、照射後のマウスに対して、飼料中の総摂取カロリーを減少したカロリー制限を行うことにより、寿命の延長やある種の腫瘍発生時期の遅延、腫瘍発生率の減少が見られることが報告されている¹⁻³。しかしな

から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、 ^{137}Cs 線源を用いて20 mGy/22時間/日（以下、20 mGy/day）の γ 線を400日間照射する照射群の2つを設定した。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（通常餌群）と、約30%カロリーを減らした一週間当たり65kcal（カロリー制限餌群）の餌を与える二つの群を設定した。

8週齢より20 mGy/dayで400日間の γ 線の照射を行った後は、非照射飼育室で終生飼育を行った。終生飼育を行ったマウスが死亡もしくは瀕死のものが見られた際は、解剖を行い腫瘍の発生の有無と臓器重量の解析を行った。また各群のマウスの摂餌量と体重の測定は、 γ 線照射期間中は毎週、照射終了後は月に一回の頻度で行った。マウス寿命解析のための生存曲線は、カプラン・マイヤー法を用いて作成し、統計学的有意差はログランク検定を行い、P値が0.05より小さい時に有意差ありと判断した。

(2) 照射開始200日間と400日間のマウス個体における体重と臓器重量、末梢血の血球成分と骨髄の造血系細胞の比率の解析

低線量率放射線連続照射中のカロリー制限マウス個体に生じている生体影響を、マウスの体重や臓器重量、末梢血の血球成分や骨髄の造血系細胞の比率の変化を指標として解析を行った。生後8週齢より20 mGy/日の γ 線を200日間照射したマウスと400日間照射したマウスについて各群5匹解剖し、体重を測定した。その後麻酔下でマウスより末梢血を採取し、セルタック α （日本光電社）を末梢血の測定を行った。それぞれのマウスを解剖し、脾臓や肝臓などの臓器重量を測定した。採取した臓器は、一部は超低温冷凍庫で保存し、そのほかの臓器はホルマリン固定を行った後、70%エタノール固定を行い4°Cで保存を行った。造血系細胞の解析は右大腿骨より骨髄を採取し、蛍光抗体を用いて造血系細胞の分類を行い、次にフローサイトメーター（FACS Aira II 日本BD社）を使用して3万個の造血系細胞を解析し、その割合を解析した。

また、データの整理と解析には、Excel 2010(Microsoft社)、Graphpad Prism 6 (GraphPad社)、DeltaGraph 7 (Rockware社)、KaleidaGraph 4.5 (Synergy社)を用いて行い、統計解析には同一照射期間の実験群をOne-Way ANOVAを用いて比較した。

(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26年度動物実験計画書整理番号26-17号）。

III 研究成果

(1) マウス実験群の設定について

平成 25 年 1 月 30 日より各実験群で 65 匹の B6C3F1 マウスの雄を、1 ケージ 1 匹で飼育し、生後 8 週齢より 1 日当たり 20 mGy(20 mGy/日)の γ 線の 400 日間の連続照射と 1 週間あたり 95 kcal と 65kcal の餌を与える実験を開始した(図 1)。 γ 線の照射スペースの都合上、予定していたすべてのマウスの照射を一度に開始できなかつたため、平成 25 年 8 月 30 日より各実験群 25 匹のマウスを追加した。このため 20 mGy/日の γ 線の 400 日間照射は、平成 26 年 3 月 6 日と平成 26 年 10 月 4 日に照射が終了する。本年度までに、生後 800 日(照射終了より約 1 年)までの寿命の解析を終えた。この期間中に、非照射群のうち通常餌の群で 65 匹中 7 匹、カロリー制限群で 64 匹中 3 匹、照射群のうち通常餌の群は 64 匹中 12 匹、カロリー制限群では 65 匹中 5 匹のマウスが死亡した。

Kaplan-Meier 法を用いた生存曲線を図 1 に示した。ログランク検定をおこなったところ、非照射群では通常餌群とカロリー制限餌群の P 値が 0.163 であったことから、カロリー制限による顕著な寿命の延長は見られなかつた。次に照射群で同様に比較したところ、P 値が 0.0503 であったことから、照射群でカロリー制限を行うと、通常餌群と比較して寿命の延長を示唆する結果が得られた。

また、通常餌群の照射群と非照射群の比較では、P 値が 0.307 であり、カロリー制限群の照射群と非照射群の比較では、P 値が 0.677 であったことから、生後 800 日までの結果では、低線量率 γ 線連続照射による寿命短縮が顕著ではない初期段階であると考えられた。

以上のことから、生後 800 日までの解析では、照射群では通常餌群とカロリー制限餌群でログランク検定の結果、P 値が 0.0503 と統計学的な有意が見られなかつたが、カロリー制限により寿命が延長している傾向が見られる結果が得られた。

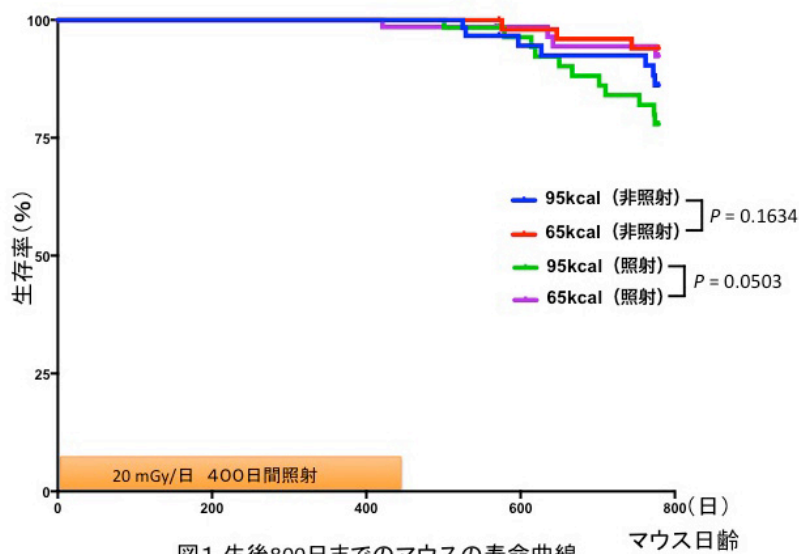


図1 生後800日までのマウスの寿命曲線

生後8週齢より20 mGy/日の400日間の照射を行い、生後800日までの観察期間内の生存曲線を示した。非照射群では、95 kcal群と65kcal群で、寿命に顕著な差が見られなかつた(ログランク検定:P = 0.1634)。それに対し、照射したマウスの95kcal群と65kcal群では、統計的な有意差は見られなかつたが、寿命の延長が示唆される結果が得られた。(同P = 0.0503)。

(2) 体重の推移

生後8週齢より400日間の γ 線照射期間において毎週1回、照射終了後は月1回の体重測定を行い、 γ 線照射とカロリー制限の体重への影響を解析した。図2は、生後800日までの低線量率 γ 線連続照射期間の各群マウスの平均体重の推移を示した。

このうち開始1週から3週で、65 kcal 群で体重の減少が見られるが、4週以降では体重の増加が見られ、この期間の65 kcal 群と95 kcal 群の体重差が大きい。これは、実験作業の都合上、1週から3週までは金曜日の摂餌前の空腹時に体重測定を行い、4週以降は月曜に摂餌を行った翌日の火曜日の満腹時に体重測定を行ったため、このような体重の変化が見られたためであると考えられる。この800日間の測定期間では、照射の有無にかかわらず65kcal 群と95kcal 群と比較して有意な体重の減少が見られた。また、通常餌群もしくはカロリー制限餌群で、照射の有無により体重の増加に変化が見られなかった。

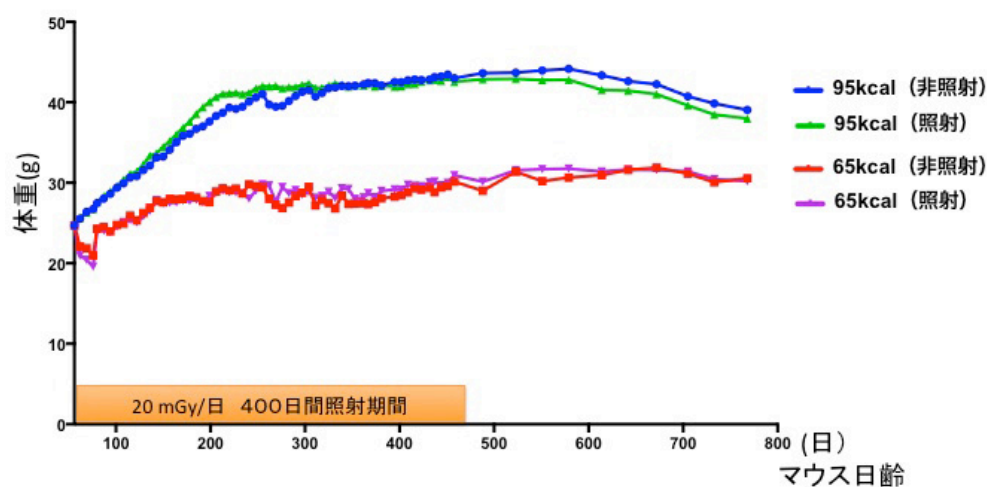


図2. 低線量率 γ 線連続照射とカロリー制限による体重の変化について

生後8週齢より20 mGy/日の γ 線を400日間照射し、その後生後800日までの観察期間の体重の変化を示した。95kcal群と65kcal群ともに、低線量率 γ 線の有無にかかわらず体重の大きな変化は見られなかった。

(3) 摂餌量と摂取カロリー

カロリー制限餌は、毎週月・水・金にそれぞれ分け与え、翌週月曜日に食べ残しの餌を測定することで、週あたりの摂餌量と摂取カロリーを計算した(表1)。65 kcal 飼育群では食べ残しがみられなかったため、週あたりの摂取カロリーは65 kcalであり、95 kcal 群では、一匹あたり平均2.5 gの食べ残しが見られたため、平均摂取カロリーは、86~87 kcal/週であった。

表1. 週あたりの摂餌量と摂取カロリー

	平均摂餌量 (g)	平均摂取カロリー (kcal)
65 kcal	19.8	65
95 kcal	25.4	86
65 kcal + 20 mGy/day	19.9	65
95 kcal + 20 mGy/day	25.7	87

(4) 低線量率 γ 線照射開始より200日、400日のマウス解剖結果

1. 体重と臓器重量の解析

次に低線量率 γ 線照射開始より200日、400日のマウスの解剖を行い、脾臓重量を測定した結果を示した。照射開始200日で非照射時にカロリー制限を行うと、非照射の通常餌群と比較して重量の顕著な減少が、400日では減少傾向が見られた(図3)。つぎに通常餌群の照射群と非照射群の脾臓重量を解析したところ、有意差は見られなかった。また、カロリー制限を行った照射群と非照射群を比較した際も有意差は見られなかった。このことは、脾臓の重量変化は低線量率 γ 線連続照射ではなく、カロリー制限による影響が大きいことが示唆された。

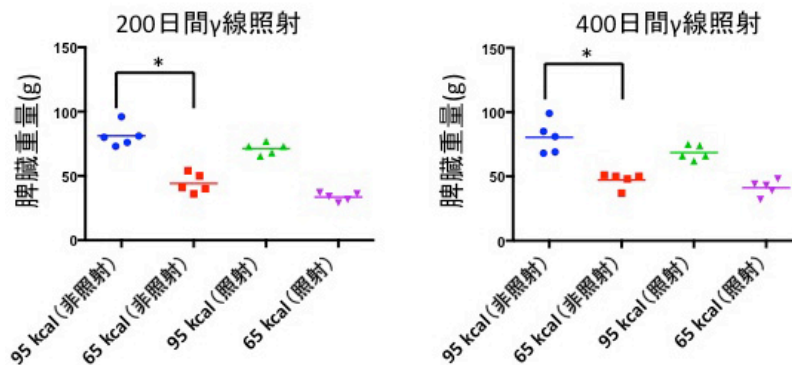


図3.低線量率 γ 線照射開始200日と400日のマウス脾臓重量について

低線量率 γ 線連続照射開始より200日と400日のマウスの脾臓重量を示した。非照射下でカロリー制限を行うと、脾臓重量の顕著な減少が見られた。また低線量率 γ 線連続照射を行った場合、通常餌とカロリー制限群ともに非照射群とくらべ、脾臓重量の顕著な減少は見られなかった。*: $P < 0.05$

2. 末梢血の解析

低線量率 γ 線連続照射開始より200日と400日の個体で、脾臓重量がカロリー制限により顕著な変化が見られたことから、カロリー制限は脾臓に対して影響を起こしていることが分かった。脾臓はB細胞とT細胞からなる組織であるため、これらの細胞数がカロリー制限や低線量率 γ 線連続照射でどのような影響を受けていることを明らかとするため、末梢血の赤血球ならびに白血球数の測定を行った。

赤血球は、照射開始200日で非照射群のカロリー制限餌群では通常餌群と比較して赤血球数の増加が、400日ではカロリー制限餌群では通常餌群と比較して顕著な増加が見られた。また放射線照射群では、非照射群と比較して顕著な増減が見られなかった(図4)。

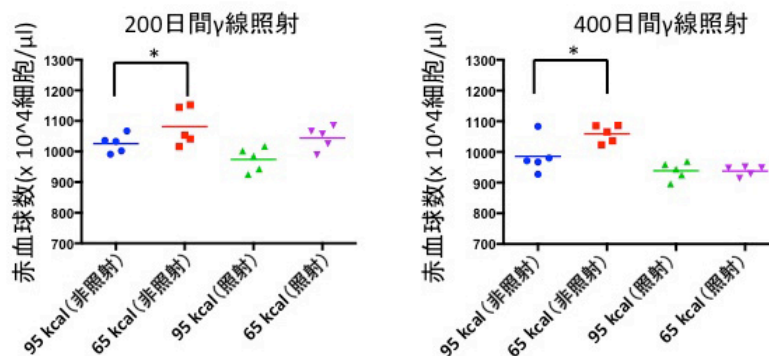


図4.低線量率 γ 線照射開始200日と400日のマウス末梢血の赤血球数について

低線量率 γ 線連続照射開始より200日と400日のマウスの末梢血の赤血球数を示した。非照射でカロリー制限を行うと、95kcal群と比べ赤血数の増加が見られた。また、放射線照射群では、通常餌群、カロリー制限餌群ともに非照射群と比べ、赤血球数の顕著な変化は見られなかった。*: $P < 0.05$

白血球数は、照射開始 200 日、400 日ともに非照射でカロリー制限を行うと、通常餌と比較したときに白血球数の顕著な減少が見られた。また放射線照射群と非照射群を比較すると、照射開始 200 日、400 日ともに通常餌群では白血球数の減少が見られたのに対して、カロリー制限群ではこのような減少が見られなかった (図 5)。

以上のことから、末梢血ではカロリー制限を行うことにより、赤血球数の増加と白血球の減少が見られた。低線量率 γ 線の連続照射を行うと、赤血球では顕著な増減は見られないのに対して、白血球では、細胞数の減少が見られた。

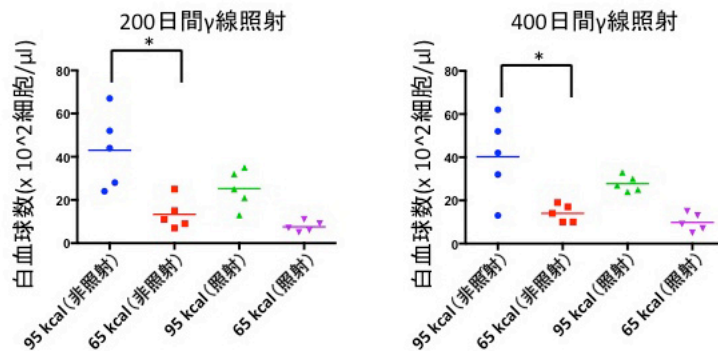


図 5 . 低線量率 γ 線照射開始より 200 日と 400 日のマウス末梢血の白血球数について

低線量率 γ 線連続照射開始より 200 日と 400 日のマウスの末梢血の白血球数を示した。非照射でカロリー制限を行うと、通常餌群と比べ白血球数の顕著な減少が見られた。また、通常餌群の照射群と非照射群を比較した場合、白血球数の減少が見られるが、カロリー制限群ではこのような減少はみられていない。* : $P < 0.05$

3. 骨髄中の造血系細胞の解析

カロリー制限による末梢血の白血球数の変化は、骨髄での造血系細胞の分化の変化が影響していることが考えられたため、次に骨髄の造血系細胞の変化を解析した。大腿骨より骨髄を採取し、フローサイトメーターで 3 万個の細胞を測定した。このうち、B 細胞数と、ヘルパー T 細胞数とキラー T 細胞数を合算した T 細胞数を図 6 と図 7 に示した。

照射開始 200 日に解剖した非照射のカロリー制限群で B 細胞数の顕著な減少が、400 日では割合の減少が見られた。次に照射を行った通常餌ならびにカロリー制限群のマウスでは、400 日でのみカロリー制限群の顕著な細胞の減少が見られた (図 6)。以上のことからカロリー制限は B 細胞の分化に影響を及ぼしていることが示唆された。

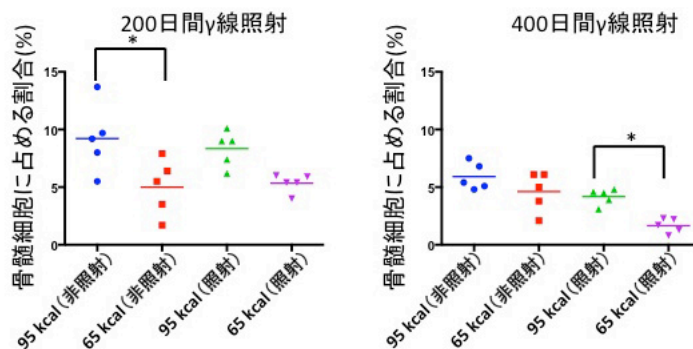


図 6 . 低線量率 γ 線照射開始より 200 日と 400 日のマウス骨髄の B 細胞の割合について

低線量率 γ 線連続照射開始より 200 日と 400 日のマウス骨髄の B 細胞の割合を示した。

非照射でカロリー制限を行うと、通常餌群と比べ 200 日で B 細胞の割合の顕著な減少が、400 日で減少が見られた。また、照射群では 400 日のカロリー制限群で、通常餌群と比較して割合の顕著な減少が見られた。* : $P < 0.05$

次にヘルパーT細胞とキラーT細胞を合計したT細胞は、B細胞で見られた細胞数の増減が見られなかった(図7)。

以上から、カロリー制限は、B細胞の減少に影響を及ぼし、T細胞については増減を起さなことが明らかとなった。また照射400日目のB細胞では、カロリー制限餌群で細胞割合の顕著な減少が生じていることから、B細胞は長期間の低線量率 γ 線連続照射により影響を受けることが示唆された。

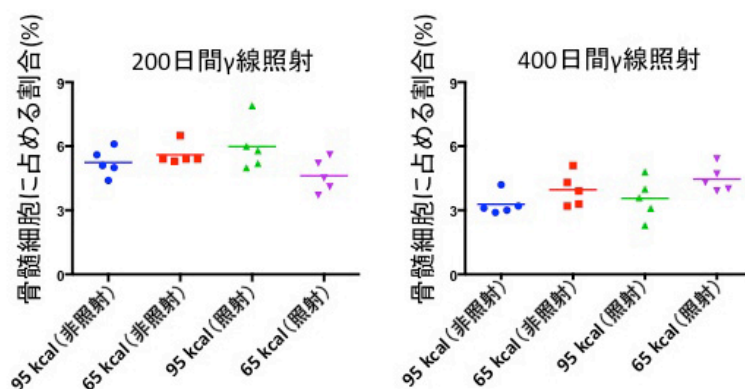


図7.低線量率 γ 線照射開始より200日と400日のマウス骨髄のT細胞の割合について

低線量率 γ 線連続照射開始より200日と400日のマウス骨髄のT細胞の割合を示した。T細胞は、ヘルパーT細胞とキラーT細胞の数を合算し、割合を算出した。

T細胞は、B細胞と異なりカロリー制限や放射線の照射により顕著な影響を受けない。

IV 考察

本研究では、低線量放射線の連続照射で見られたマウス寿命の短縮は、摂餌中のカロリー制限を行うことで低減化ができるか、また低減化が見られたマウスでは、どのようなメカニズムにより影響が変化するかを明らかとすることを目的として解析を行った。これまで各群で約60匹のマウスを生後8週齢より400日間に渡り、一日あたり20mGyの γ 線を照射して、その後非照射飼育下で飼育し、生後800日(照射終了から約1年)まで観察してきた。

マウスの死亡が見られる初期段階である低線量率 γ 線連続照射終了から1年後の生後800日までの寿命解析の結果では、期間内に死亡したマウスは一群あたり3から12匹であった。このうち非照射群では、カロリー制限群と通常餌群で、ログランク検定で顕著な寿命の変化は見られなかった。しかしながら照射群では、カロリー制限群と通常餌群で、ログランク検定のP値が0.00503となっていた。このことから、低線量率 γ 線連続照射群では、カロリー制限によりマウスの死亡時期が遅延することが示唆された。

次に低線量率 γ 線の照射期間中に生じた影響について、体重や臓器重量、末梢血や骨髄の造血系細胞の分布の変化を解析した。カロリー制限により脾臓重量が減少し、さらに末梢血の赤血球や骨髄中のB細胞の割合が減少しているのに対して、末梢血の赤血球数では増加が、骨髄のT細胞では割合が変化していないことが明らかとなった。このことから、カロリー制限はある特定の造血系に影響を与えることが示唆された。しかしながら低線量率 γ 線連続による臓器に対する影響が、カロリー制限によりどのようなメカニズム変化が生じることで寿命の低減化に関わることを明らかにすることはできなかった。

今回用いた系統では、腫瘍として脾臓などリンパ組織の肥大が生じる悪性リンパ腫が約半数のマウスに見られることが報告されている^{4,5}。この悪性リンパ腫は、おもに B 細胞の異常増殖による物である。カロリー制限餌を与えることにより、B 細胞の増殖が抑制されることから、今後の解析から悪性リンパ腫の発生の遅延や発生数の減少がみられることが考えられる。

V 結論

本研究では、低線量率 γ 線連続照射による寿命の短縮が、摂餌中のカロリー制限により低減化できるかを明らかとするために行った。本研究では、マウスの死亡が見られる初期段階である低線量率 γ 線連続照射終了より約 1 年間の生後 800 日まで観察期間の寿命解析を行い、低線量率 γ 線連続照射によるマウス寿命の短縮は、カロリー制限を行うことで通常餌とくらべ寿命の延長が見られることから、低線量率 γ 線連続照射による生物影響が低減化されることが示唆される結果を得ることができた。低線量率 γ 線連続照射による寿命の短縮が、カロリー制限によりどの程度低減化されるかを正確に知るためには、すべてのマウスの寿命を見る必要があることから今後の解析が必要である。

また、本研究で用いた B6C3F1 マウス系統の主な死因として、肝臓腫瘍や悪性リンパ腫が報告されており、高線量放射線による寿命の短縮は、肝臓腫瘍や造血組織の腫瘍によるが、カロリー制限を行うことでこれらの腫瘍の発生頻度の減少や発生遅延が生じることで寿命の延長が見られることが報告されている。カロリー制限中の血中成分の解析や栄養代謝で最も重要な臓器である肝臓の代謝や遺伝子発現に対する影響や、骨髄の幹細胞数やその性状に対する影響などを明らかにすることで、放射線照射による臓器細胞の減少や分化の変化に、カロリー制限がどのように作用するかを明らかにすることが必要と考えられた。

また、放射線照射の生物影響に対して抵抗性を獲得するメカニズムは、多岐にわたる影響によることと考えられるため、同一臓器に対して複数の解析手法を組み合わせることで、様々な期間で解析を行う経時的解析などを行うことが、寿命短縮の低減化のメカニズム解析を行うための必要であると考えられた。さらに最近では肥満と腸内細菌の関係や、カロリー制限と通常餌で細菌叢が変化して寿命に対する影響が報告されていることから、非がん臓器に対する影響に関して解析を行う必要があると考えている。

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 USA 1997; 94(6): 2615-2619.
- 2) Yoshida K Inoue T Hirabayashi Y, 他. Radiation-induced myeloid leukemia in mice under calorie restriction, Leukemia 1997; Suppl 3:410-412
- 3) Shang Y Kakinuma S Yamauchi K, 他. Cancer Prevention by adult-onset calorie restriction after ionizing radiation in B6C3F1 male mice, Int J Cancer. 2014; DOI: 10.1002/ijc.28751
- 4) 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): 376-379.

- 5) 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): 417-437.
- 6) 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.
- 7) 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 mice exposed to long-term, low-dose gamma irradiation

Kazumi Yamauchi

Department of radiobiology, Institute for environmental Sciences

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

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 whether the tumors and shortened life span induced by long-term exposure to a low dose rate of gamma radiation are reduced by CR. In this study, mice were exposed to a low dose rate (20 mGy/day) of gamma rays from 8 weeks of age for 400 consecutive days. They were fed normal-calorie or CR diets, and their life span and the incidence of tumors were analyzed. One male B6C3F1 mouse was housed per cage. The normal-calorie group was fed 95 kcal/week, and the CR group was fed 65 kcal/week. After receiving the predetermined total dose of radiation (8,000 mGy), the mice were transferred to animal rooms and housed there until they died. Two nonirradiated control groups were fed the same diets as the irradiated normal-calorie and CR groups. The number of mice per group was 60. In a separate analysis, five mice per group were sacrificed 200 and 400 days into the study and their organ, total body weights, blood cells and percent of B and T cells in bone marrow measured. During the study period, the body weight of mice fed normal-calorie diets increased for both the irradiated and the nonirradiated control groups, but the CR diet suppressed body weight in both groups. No significant difference was observed between life spans of the CR and normal-diet groups in 800 days after birth ($P = 0.0503$). Findings in irradiated mice sacrificed at 200 and 400 days showed significant differences in body and spleen weight, red and white cells in peripheral blood between the CR and normal-diet conditions. These results suggested that hematopoietic system may be highly influence by CR condition.

極低線量率放射線連続被ばくマウスを用いた健康影響解析

杉原崇（環境科学技術研究所生物影響研究部・主任研究員）

研究要旨

従来行われてきた低線量放射線影響研究は、高線量の放射線を短時間照射することにより得られる低線量域での研究であったが、高線量率放射線の単回照射により惹起された影響の研究は、放射線治療などのリスクに関する研究には有用であるが、低線量率の長期間被ばくによる健康影響リスク推定には単純に応用できない。特に、福島第一原子力発電所事故（以下「今般の事故」という）などにより大きな関心が寄せられている低線量率放射線長期被ばくの健康影響を明らかにするためには、低線量率放射線を照射できる施設での研究が重要となる。2007年に発表した低線量率長期連続放射線照射が B6C3F1 マウスの健康にどのような影響を及ぼすかに関するデータの中で、0.05 mGy/22 時間/日、1.0 mGy/22 時間/日および 21 mGy/22 時間/日の低線量率 γ 線を 400 日間連続で照射したマウス肝臓病理解析の結果、雄では有意な肝腫瘍発生率の増加が見られるにもかかわらず、雌では 0.05 mGy/22 時間/日および 1.0 mGy/22 時間/日照射群で肝腫瘍の発生率増加が見られないことから、低線量率放射線照射による肝腫瘍発生には性ホルモンが関与する可能性が示唆された。

そこで実験初年度である今年度は、照射実験に用いる B6C3F1 雄マウスを交配により作製し、低線量率（0.05 mGy/22 時間/日、及び 20 mGy/22 時間/日）放射線照射を開始した。また、男性ホルモンと肝腫瘍の関係を明らかにするために、B6C3F1 オスマウスの去勢による影響を検討した後、去勢マウスへの極低線量率（0.05 mGy/22 時間/日）放射線照射を開始した。また、肝機能への放射線影響を解析するための手法および精巣組織の蛍光染色法による解析方法の検討を行った。

キーワード：低線量率放射線、雄マウス、肝腫瘍、去勢、精巣

研究協力者 田中 聡（環境科学技術研究所生物影響研究部主任研究員）、田中イグナシヤ（環境科学技術研究所生物影響研究部研究員）

I 研究目的

現在まで、低線量率高線量(8 Gy)放射線照射による生物への影響研究データは蓄積されつつあるものの、今般の事故で健康影響が懸念される低線量率低線量（200 mGy 以下あるいは 0.1 mGy/日以下）被ばくによる病理・分子レベルでの影響は、未だによくわかっていない。環境研ではマウスに 0.05 mGy/22 時間/日、1.0 mGy/22 時間/日および 21 mGy/22 時間/日の低線量率放射線を照射した実験（寿命試験）を実施し、その結果の中で、最も低い線量率である 0.05 mGy/22 時間/日の 400 日間照射（総線量 20 mGy）によって有意に肝腫瘍発生率が増加することを報告した。この結果は、極低線量率（0.05 mGy/22 時間/日）放射線の連続被ばくがヒトになんらかの健康影響を及ぼす可能性を示唆している。そこで、本研究では、極低線量率低線量放射線照射（0.05 mGy/22 時間/日の 400 日間連続照射、総線量 20 mGy）雄マウスの経時的な剖検を行い、放射線照射及び去勢による肝機能、血清中因子、遺伝子発現等の生理学的変化を調べることで、肝腫瘍発生率の増加に関する極低線量率低線量放射線影響の科学的根拠を明らかにすることを目的とする。

II 研究方法

本年度は低線量照射施設での B6C3F1 雄マウスへの放射線照射開始にあたって、必要となるマウスを交配によって作製する。B6C3F1 雄マウスの去勢処置は麻酔下で開腹し、精巣を摘出することにより行う。環境研で保存している肝臓を用いて、肝腫瘍中の遺伝子発現変化や血清の生化学検査には PCR 法やスポットケム法を用いた予備的検討を行う。また、精巣組織のパラフィン切片を用いて、部位特異的なレクチン蛍光染色を行う。自家交配により得られる B6C3F1 雄マウス（8 週齢）を去勢処置群と非去勢処置群および照射群と非照射群に分け、照射群マウスには低線量率（0.05 mGy/22 時間/日及び 20 mGy/22 時間/日＜非去勢群のみ照射＞）放射線照射を実施する。（倫理面の配慮）

環境研内の動物実験委員会規程に基づき、申請書を提出し、動物実験委員会による審査、所内承認を経て研究を行った。

III 研究結果

1. B6C3F1 雄マウスへの放射線照射開始に必要なマウスを交配によって作製（計 398 匹+予備マウス数匹）した。
2. 100 日おきの解剖実験のために、B6C3F1 雄マウスに低線量率（0.05 mGy/22 時間/日、20 mGy/22 時間/日）放射線照射を開始した。
3. 雄マウスの去勢処置を実施し、非去勢処置マウスとともに低線量率（0.05 mGy/22 時間/日）放射線照射を開始した。
4. PCR 法やスポットケム法を用いることで、肝腫瘍中の遺伝子発現変化や血清の生化学レベルの変化を検出できることを明らかにした。
5. 精巣組織パラフィン切片を用いて、部位特異的なレクチン蛍光染色により、精子の分化状態の確認ができることを明らかにした。

IV 考察

実験に必要なマウス全てへの照射を開始出来たため、次年度以降の計画では、今後の低線量率照射マウスのサンプリングを遅滞なく行えると考えられる。また、肝腫瘍を検出するための技術および精巣組織切片を用いた解析方法が確立でき、今後の低線量率放射線照射による肝臓および精巣への影響について、明らかにできると考えられる。

V 結論

マウス極低線量率低線量放射線照射（0.05 mGy/22 時間/日の 400 日間連続照射、総線量 20 mGy）実験（肝機能、血清中因子あるいは組織中の遺伝子の発現変化、精巣への影響等）に必要な実験条件を整備することが出来た。

VI 次年度以降の計画

照射開始から 100、200、300 日目の血清、肝臓組織やその他採取可能な臓器の組織サンプリングを実施し、肝臓での肝機能の指標となるマーカー、ELISA によるテストステロン量測定、マウスの精巣重量の測定や病理学的解析等を行う。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Sugihara T Murano H Nakamura M et al. In vivo partial bystander study in a mouse model by chronic medium-dose-rate γ -ray irradiation, *Radiat Res* 2013; 179(2): 221-231.
- 2) Sugihara T Murano H Tanaka K. Increased γ -H2A.X Intensity in Response to Chronic Medium-Dose-Rate γ -Ray Irradiation, *PLoS One* 2012; 7(9): e45320.
- 3) Sugihara T Murano H Nakamura M et al. Activation of interferon-stimulated genes by γ -ray irradiation independently of the ataxia telangiectasia mutated-p53 pathway, *Mol Cancer Res* 2011; 9(4): 476-484.
- 4) Sugihara T Murano H Nakamura M et al. p53-mediated gene activation in mice at high doses of chronic low-dose-rate γ radiation, *Radiat Res* 2011; 175, 328–335.
- 5) Sugihara T Murano H Tanaka K et al. Inverse dose-rate-effects on the expressions of extra-cellular matrix-related genes in low-dose-rate γ -ray irradiated murine cells, *J Radiat Res (Tokyo)*. 2008; 49(3): 231-240.
- 6) Tsuruga M Taki K Ishii G et al. Amelioration of Type II Diabetes in db/db Mice by Continuous Low Dose-Rate γ -Irradiation, *Radiat Res* 2007; 167: 592–599.
- 7) Tanaka 3rd I.B Tanaka S Ichinohe K et al. Cause of death and neoplasia in mice continuously exposed to very low dose rates of gamma rays, *Radiat Res* 2007; 167(4): 417–437.
- 8) Sugihara T Magae J Wadhwa R et al. Dose and dose-rate effects of low-dose ionizing radiation on activation of Trp53 in immortalized murine cells, *Radiat Res* 2004; 162(3): 296-307
- 9) Tanaka S Tanaka 3rd I B Sasagawa S et al. No lengthening of life span in mice continuously exposed to gamma rays at very low dose rates, *Radiat Res* 2003; 160(3); 376–379.

総説（和文）

- 1) 杉原 崇, 田中公夫. 低線量率放射線によるマウス培養細胞への影響. *放射線科学*. 2005; 48: 118-122
- 2) 杉原 崇. 低線量率放射線照射された培養細胞の細胞応答とその分子機構. *放射線生物*. 2005; 40(2): 156-167
- 3) 杉原 崇. 血清成分にみられる低線量率放射線の影響. *放射線生物*. 2014; 49(1): 85-97.

引用文献

- 1) Taki K B Wang Nakajima T et al. Microarray analysis of differentially expressed genes in the kidneys and testes of mice after long-term irradiation with low-dose-rate gamma-rays, *Journal of Radiation Research* 2009; 50(3), 241–52.
- 2) Uehara Y Ito Y Taki K et al. Gene expression profile in mouse liver after long term low dose-rate irradiation with gamma-rays, *Radiat Res* 2010; 174(5): 611-617.
- 3) Nakamura S Tanaka 3rd I.B Tanaka S et al. Adiposity in female B6C3F1 mice continuously irradiated with low-dose-rate gamma rays, *Radiat Res* 2010; 173(3): 333–341.
- 4) Okudaira N Uehara Y Fujikawa K et al. Radiation dose-rate effect on mutation induction in the spleen and liver of gpt delta mice, *Radiat Res* 2010; 173(2): 138–147.
- 5) Tanaka K Kohda A Satoh K et al. Dose-rate low-dose-rate gamma rays, *Radiat Res* 2009; 171(3): 290–301.

- 6) Tanaka K Kohda A Toyokawa T et al. Chromosome aberration frequencies and chromosome instability in mice after long-term exposure to low-dose-rate gamma-irradiation, *Mutat Res* 2008; 657(1): 19–25.
- 7) Takabatake T Fujikawa K Tanaka S et al. Array-CGH analyses of murine malignant lymphomas: genomic clues to understanding the effects of chronic exposure to low-dose-rate gamma rays on lymphomagenesis, *Radiat Res* 2006; 166(1 Pt 1): 61–72.
- 8) Nakajima T Taki K Wang B et al. Induction of rhodanese, a detoxification enzyme, in livers from mice after long-term irradiation with low-dose-rate gamma-rays, *Journal of Radiation Research* 2008; 49(6): 661–666.
- 9) Ito A Takahashi T Watanabe H et al. Significance of strain and sex differences in the development of ²⁵²Cf neutron-induced liver tumors in mice, *Jpn J Cancer Res* 1992; 83(10): 1052-1056.
- 10) Nakatani T Roy G Fujimoto N et al. Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin, *Jpn J Cancer Res* 2001; 92(3): 249-256.
- 11) Marshall A Lukk M Kutter C et al. Global gene expression profiling reveals SPINK1 as a potential hepatocellular carcinoma marker, *PLoS One* 2013; 8(3): e59459.

Health effects of continuously very low-dose rate radiation exposure in male B6C3F1 mice.

Takashi Sugihara

Department of radiobiology, Institute for Environmental Sciences

Keywords: Low-dose-rate irradiation; male mouse; Liver tumor; Castration; Testis

Abstract

Conventionally, low dose radiation effects have been estimated using data obtained from studies using acute high-doses rate (HDR) -ray radiation exposures. These data are useful for assessing risks associated with procedures such as radiation therapy. However, it is difficult to use HDR-irradiation data to correctly estimate health effects due to chronic low-dose rate (LDR) radiation exposures, such as those of the Fukushima nuclear power plant accident. Previously, the institute for environmental sciences (IES) reported significant increased liver tumor incidence in male mice chronically exposed to LDR (0.05 mGy / 22 hours / day, 1.0 mGy / 22 hours / day and 21 mGy / 22 hours / day) -rays. In order to further elucidate the effects of LDR exposure on the development of liver tumors, we have started exposing male B6C3F1 mice (bred in-house) to LDR -ray (0.05 mGy / 22 hours / day, and 20 mGy / 22 hours / day). Furthermore, to study the effect of LDR -rays on androgen levels in relation to liver tumor incidence, castrated B6C3F1 male mice will be exposed to similar doses of LDR -rays. Fluorescence staining techniques will be used to analyze radiation effects on testicular tissue.

テーマ（3） 放射線による健康不安対策の推進に関する研究

- 3-1 保健師による実際的な放射線防護文化のモデル開発・普及と検証：放射線防護専門家との協働によるアクションリサーチ
麻原 きよみ（聖路加看護大学看護学部地域看護学分野）
- 3-2 福島県川内村の帰村促進のための取り組み
浦田 秀子（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）
- 3-3 地域特性を生かしたリスクコミュニケーターによる放射線健康不安対策の推進
大野 和子（京都医療科学大学医療科学部・放射線技術学科）
- 3-4 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）
- 3-5 放射線測定と行動調査による子どもの線量低減化と健康不安の軽減に関する研究
細野 眞（近畿大学医学部附属病院）
- 3-6 まるごと線量評価に基づく詳細なリスク分析に伴ったリスクコミュニケーションの確立
宮崎 真（福島県立医科大学医学部）
- 3-7 里山地域の生活・生産活動を支える放射線被ばくと里山資源汚染の実態調査と動向予測研究
原田 浩二（京都大学大学院医学研究科）
- 3-8 放射線による健康不安対策を実践する保健師・養護教諭のための教育プログラムの検討
川崎 裕美（広島大学大学院医歯薬保健学研究院）
- 3-9 リスクの多元性を考慮したリスクコミュニケーションの実施とそのあり方に関する研究
中川 恵一（東京大学医学部附属病院放射線科）
- 3-10 福島の乳幼児を原発事故の影響から守るための統合的支援システムの開発
氏家 達夫（名古屋大学大学院教育発達科学研究科）
- 3-11 原子力災害事故後の中長期的にわたる放射線ヘルスプロモーションの確立に向けて～なみえまちからはじめよう。～
西沢 義子（弘前大学大学院保健学研究科）

保健師による実際的な放射線防護文化のモデル開発・普及と検証： 放射線防護専門家との協働によるアクションリサーチ

麻原きよみ（聖路加看護大学・教授）

研究要旨

目的：原子力災害復旧期の住民の被曝に対する不安やストレスの軽減と質の高い生活のために、住民に実際的な「放射線防護文化」を形成するための実践モデルを明らかにすることを目的とした。

研究方法：低線量の放射線影響下の自治体保健師と放射線防護専門家、および公衆衛生看護研究者が協働して行うアクションリサーチを用いた。実践モデルは3つに類型化し、①住民に対する支援：既存の保健事業における保健師との協働実践、②保健師活動の支援：協働ミーティングの実施と住民向けリーフレットの作成、③全国への実践モデルの普及・啓発：全国自治体へのリーフレットの送付などを行った。

結果：①地区の母子、高齢者などに対して、放射線に関する教育・相談などを既存の保健事業に組み込んで5回実施した。その結果、参加者の放射線に対する不安が軽減された。②協働事業と協働ミーティングを実施することで、保健師は、復旧期の住民の不安やニーズを把握し、今後の放射線に関する住民支援のあり方や、保健師の役割について考えることができるようになった。住民向けリーフレットは保健師との協働で6種類（食事、水、外遊び、住環境、生活習慣）作成した。保健師のリーフレットに対する評価は低くなかったが、協働で事業を実施した保健師の方が、多様な対象に、多様な場で広く活用していた。③リーフレットを配布した自治体より、「参考になる」との反応を得た。

結論：住民の放射線防護文化形成のためには、住民と直接接する既存の保健事業に組み込んで、放射線に関する知識提供や相談を実施することが効果的であることが明らかとなった。また、放射線防護文化形成の鍵となる保健師が、長期的に、自立して、住民の生活に関わる、あるいは子どもの成長に伴う、放射線に関する不安に対応できるようになるためには、保健師と放射線防護の専門家との協働事業や、リーフレットなどのツールの活用が効果的であることが示唆された。

キーワード：原発事故、保健師、放射線防護文化、アクションリサーチ

研究協力者：小西恵美子（鹿児島大学医学部客員研究員）、菊地 透（自治医科大学 RI センター管理主任）、荒木田美香子（国際医療福祉大学小田原保健医療学部学科長・教授）、大森純子（東北大学大学院医学系研究科・教授）、矢吹敦子（福島県いわき市保健所・指導保健技師）、折田真紀子（長崎大学医歯薬学総合研究科・助教、福島県川内村長崎大学復興推進拠点）、川崎千恵（国立保健医療科学院・主任研究官）、北宮千秋（弘前大学保健学研究科・准教授）、吉田浩二（福島県立医科大学災害医療総合学習センター・助手）

I 研究目的

原子力災害から3年以上が経過した。原子力災害の影響下の自治体住民は、表面的には落ち着

きを取り戻したように見える地域もあるが、被曝に対する不安やストレスが潜在して継続している場合も多い。健康上の心配をする空間線量でない地域でも、今でも避難している人々も多く、水道水や地産の食材を摂取することに不安を覚えて控えたり、子どもが外遊びを制限するなどの行動も見られる。

国際放射線防護委員会¹⁾は、原子力災害復旧期を焦点とした勧告において、「公衆の健康と教育を担う専門職による国民的な放射線防護文化の普及が災害復旧の鍵である」と述べている。ICRPがいう「放射線防護文化」とは、平常時でも事故・異常時でも、法令による規制だけでなく、作業員も公衆も、放射線防護の知識とスキルをもち、日常生活に放射線防護の行動を取り入れることができるようになることであり、このことで放射線被ばくをできるだけ低減することである。ここでいう知識やスキルとは、人々が賢明な判断と行動をとることができるようにするものである²⁾。放射線防護文化を普及することによって、人々の放射線に関する不安やストレスが軽減され、健康的なライフスタイルを取り戻すことをめざしている。放射線防護文化は、専門家も含め、被ばく地域の人々が、放射線防護の価値を社会的に共有することでもあり、このことで、放射線防護行動を日常生活に定着し、継続することが可能となる。また、ICRPがいう「公衆の健康と教育を担う専門職」とは、医療者や学校の先生などであり、これらの専門職が核になって「人々」、被ばく地の地域住民に、放射線防護文化を形成・普及することである³⁾。われわれは、原子力災害復旧期において、放射線防護文化形成のための鍵となるのはICRPの言う「公衆の健康を担う専門職」である保健師であると考えた。なぜなら、保健師は、公衆衛生の専門職であり、多くが自治体に所属する。保健師は、地域の生活実態をよく知っており、それに基づいて、住民が健康に関する知識とスキルをもち、より健康的なライフスタイルとなるための活動、すなわち健康文化をつくるための活動を行っているからである。

そこで本研究は、原発事故後、低線量下にある地域住民に、実際的な「放射線防護文化」を形成するための実践モデルを明らかにすることを目的とし、「公衆の健康を担う専門職」である自治体保健師と、放射線防護の専門家および公衆衛生看護の研究者がチームを組んで、協働で研究活動を行うアクションリサーチ⁴⁾を行った。

最終年度である今年度は、3つに類型化した放射線防護文化形成のための実践モデルについて、効果的な実践を明確化して抽出するための活動を行った。

II 研究方法

1 研究対象のフィールド

研究フィールドは、福島県いわき市である。いわき市は、浜通り南部に位置する人口 325,709人 (2015.3.1 現在) の福島県内最大の人口と面積をもつ中核市である。災害による被害としては、死亡者数 460 名 (2015.2.23 現在)、建物は全壊 7,917 棟 (2015.2.20 現在)、住民票を異動せず市外に避難している市民は 1,522 名 (2015.2.1 現在)、市内へ避難している市民は 24,150 名 (2014.12.1 現在) である。放射線量レベルは市の中心部 (平) で 1 時間あたり 0.09 μ Sv (2014.6.2 現在) と報告されている。

2 研究方法

本研究の用いるアクションリサーチ⁴⁾は、①現実問題を実際に解決する②研究者と当事者が協

働する研究方法論である。直面する問題に対して、それぞれの専門性を生かし相互作用、試行錯誤しながらその時その場でもっともよい対応を見出し実践するという特徴がある。したがって、問題が生じている現場に応じたアップデートな解決方法を明らかにでき、さらに類似した状況下において適用できる実践方法論を見出すことが可能であると考えた。

放射線防護文化形成のための実践モデルは、対象別に3つに類型化した(図)。

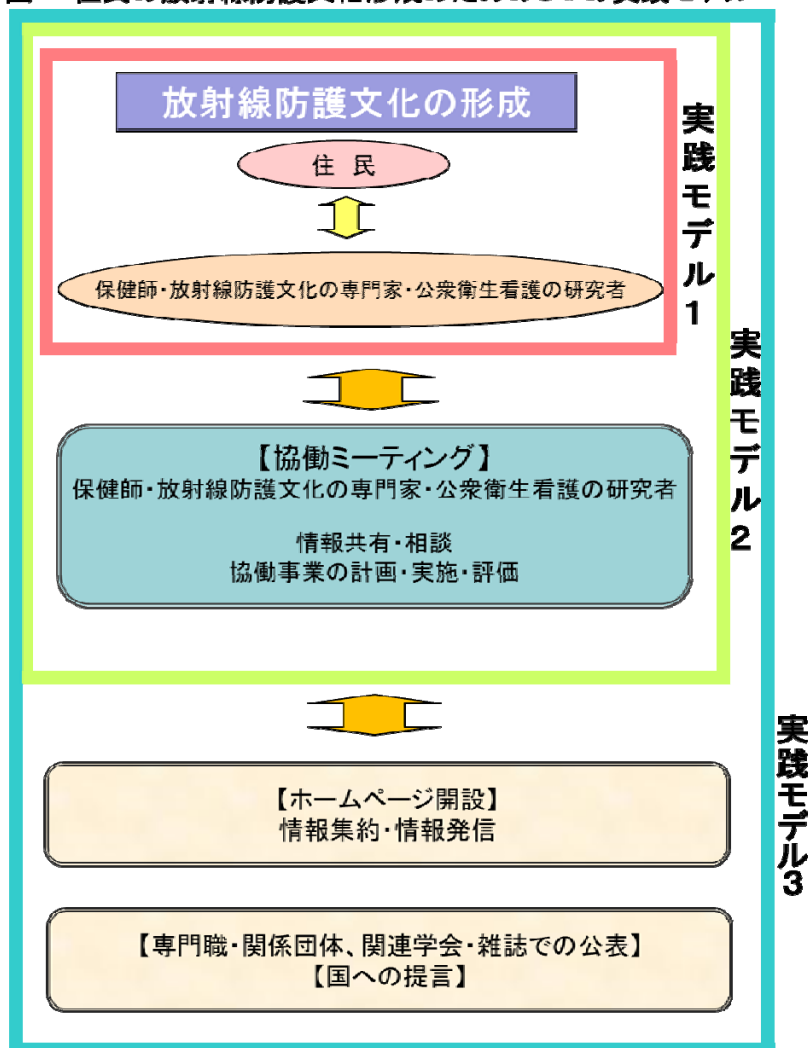
実践モデル1：放射線防護文化形成のための住民に対する実践は、市の保健師と打ち合わせを行い、4つの地区で保健師が行っている子育てひろばや高齢者のデイクラブなどの既存事業に、地区担当の保健師と放射線防護の専門家と公衆衛生看護の研究者が数名、放射線に関するQ&A方式の相談や講話を組み込み、5つの協働事業を実践した。実施結果は、公衆衛生看護の研究者、保健師、住民から評価し、効果的な実践を抽出した。

実践モデル2：保健師活動の支援として、実践モデル1を開始する前に地区担当の保健師と公衆衛生看護の研究者が地区の状況や対象者についての情報共有や協働事業の計画を行ったほか、既存事業実践後、今後の活動や保健師からの放射線に関する相談について話し合う機会を設けた(協働ミーティング)。

また、保健師が住民に対して保健事業において活用できるツールとして、保健師と公衆衛生看護の放射線防護の専門家と公衆衛生看護の研究者が協働でリーフレットを作成した。リーフレットについては、保健師が使用して評価した。

実践モデル3：近隣市町村、福島県、全国への実践モデル(普及・啓発)として、関係団体への情報提供、学会等での研究知見の発表に加え、今年度は住民ならびに住民を支援する保健師への相談・支援体制づくりの一環として、ホームページの開設を行った。また、作成したリーフレットをホームページでダウンロードできるようにするとともに、冊子化して全国の都道府県、市町村の自治体に配布し、評価を求めた。

図 住民の放射線防護文化形成のための3つの実践モデル



(倫理面への配慮)

本研究は、疫学および臨床研究におけるガイドラインを適用した。具体的には、質問紙調査に関して、調査協力は自由意思によるものであり、回答をもって研究に同意が得られたものとした。面接調査（インタビュー）、参加観察、資料の閲覧に関しては、許可された範囲のみとし、実施に当たっては、責任者および対象者に十分な説明を行い実施した。データに含まれる個人情報にはコード化し、収集した調査データの保管は鍵のかかる場所に厳重に保管した。

本研究は、研究者が所属する研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

III 研究結果

1 研究結果の概要

今年度5回の研究班会議を実施して、研究の方針、実施方法および内容に関する検討やデータの分析を行なった。放射線防護文化形成のための住民に対する実践（実践モデル1）は、既存の保健活動の中で保健師と計画・実施・評価した（表1）。この協働事業から保健師は、住民ニーズや放射線防護の専門家の対応を学び、放射線防護の専門家と公衆衛生看護の研究者は保健師の放射線に関する住民からの相談について話し合う機会をもった（実践モデル2）。このように、この

協働事業は、放射線防護文化形成のための住民に対する実践モデル1と保健師活動の支援である実践モデル2が同時に行われた。

ここでは放射線防護文化形成のための有効な実践モデルが、現状の実践に容易に適用できるように、対象別の実践モデルごとに今年度の実践内容、結果および実施評価と、平成25年-26年度の実践の結果明らかとなった、有効な実践モデルを示す。

表1 既存事業における実践モデル1

日時	事業名	内容	担当者	参加者数
8月7日	いきいきデイクラブ (川前12地区)	ミニ講話(30分)と質疑 放射線とのつきあい方	小西、三森、 永井	7名
8月8日	ひよこ教室 (内郷・好間・三和地区)	ミニ講話(15分)と質疑 母と子の健康と放射線	小西、北宮、 川崎	10組
10月9日	ひよこ教室 (内郷・好間・三和地区)	ミニ講話(15分)と質疑	菊地、麻原、 大森	14組
12月11日	学校保健と地域保健連絡 会	講話(1時間)と質疑	小西、三森	5名(養護教 諭・公民館長)
1月26日	いきいきデイクラブ (川前・志田名地区)	ミニ講話(30分)と質疑 放射線とのつきあい方	菊地、小野、 小林	18名

2 放射線防護文化形成のための住民に対する実践(実践モデル1)

住民に対する実践はもっとも重要な活動であり、住民に放射線防護の知識が広がり、日常生活のなかでその知識が活用される必要がある。平成26年度は平成25年度に続き、保健師が行っている子育て広場や高齢者のデイクラブといった既存の事業に、地区担当の保健師と放射線防護の専門家と公衆衛生看護の研究者数名が放射線に関する講話やQ&A方式の相談などを組み込む協働事業を計画・実施した。平成26年度は既存事業に取り込む協働事業4回に、協働事業の結果、必要性を見出した、学校保健と地域保健の連絡会における、講話と協働ミーティング1回を加え、計5回実践した。

1) 川前12地区(担当:小西・三森・永井)

①方法・内容

年に2回の60歳以上の高齢者を対象とした「いきいきデイクラブ」において、地区の保健師による血圧測定など個別の健康相談の後に、「生活習慣、水、食事、住環境」というテーマでミニ講座を行った。1つのスライドを大きめに印刷したパワーポイントの配布資料を用いて、約1時間、一方的な講話というよりも住民の方々と対話をしながら進めた。

②実践結果

参加者は住民5名(男性2名、女性3名)と、民生委員1名、社会福祉協議会職員1名の計7名であった。そのうち住民3名(男性1名、女性2名)が単身者であった。地区の集会所の畳の

部屋で座布団と長机を並べ、住民、保健師、研究班が近い距離で実施することができた。お盆の前の開催だったため、準備等で参加者は少なかったものの、反応がよく、女性は熱心にメモを取りながら発言も活発であった。男性はメモをとることや話に入ることはなかったが、資料を追って話は聞いていたため、個別に関わり、反応を知ることができた。講話の前に、生活の様子を聞いてみると、震災後は放射能が高いといわれている山に散歩に行かなくなったり、外での運動を控えたり、川の水が心配でペットボトルを買っていたり、震災後の生活の変化について語っていた。しかし、講話を進めている中で「ペットボトルの方がいいと思っていた」「いつから（ペットボトルを）やめるかな」という言葉がきかれ、さらに「このことを、どう息子たちに伝えればよいか」という声、「自分たちはいいけれど、子どもや孫が来たらペットボトルを用意して使う」という自分たち以外の次世代への介入という新たな問題の側面を知ることができた。さらにアンケートからは、「今まで気にしすぎていたと感じた」、「話を聞いて安心した」、「早く聞きたかった」という一方で、「放射線のことは気にせず生活していること」、「一人暮らしゆえに（放射線のことばかり）気にしては生きていけない」という、山間部に住む高齢者の現実を知る必要性を感じた。

③実践評価

放射線に関する情報がないことへの不安があり、対話できたことで安心感を得られたという反応から、情報提供のニーズがあることがわかった。今後も WBC での測定（バス検診）を続けるという意見が聞かれ、意識をもって主体的に向き合おうとする姿も知ることができた。しかし、70 歳以上の高齢者で単身者が多い地区であったことから、肥満のことや、家族団らんの食事の大切さといった資料の内容が実態にそぐわない部分もあった。

④効果的な実践

住民の方々との距離が近く、保健師さんとの関係性があったからこそ協働実践であった。特別ではない、いつもの雰囲気の中で伝えていくことの大切さを再確認した。また実施者側が 3 人いたことで、観察者という役割のほかに、話の中に入れたい方々の間に入り、つなぐ役割も見出されたため、実施者の人数は 3 人が妥当であることが示唆された。

⑤実践上の課題

山間部での暮らし、一人暮らし、そして離れて暮らす子どもや孫の若い世代に対する介入の課題が明らかとなり、その地域での家族形態など生活実態を踏まえた情報提供を考えていく必要がある。

2) 内郷・好間・三和地区（担当：小西・北宮・川崎）

①方法・内容

地区に居住する生後 4 か月までの子どもと母親を対象とした、仲間づくりと育児不安の軽減を図ることを目的とした「ひよこ教室」（2 回制）において、対話形式のミニ講話「母と子の健康と放射線」を約 45 分（質疑応答含む）行った。事前質問（ニーズ調査）では、「庭を除染していない。上の子が遊んでいるが大丈夫か少し心配」、「水道水が心配。食材をゆでたり、炊飯、食器洗いに使用している」、「食べ物からどの程度放射性物質が母乳に出るか。いわきのものを食べても大丈夫か」などの質問があり、講座に反映し、車座でおこなった。

②実践結果

参加者は、10 組の母子であった。床に敷いたマットの上で、母親が輪になって座り、赤ちゃんを前に寝かせて車座で行った。水について、「ペットボトルの水の方が良いと思っていた」、「（ペ

ットボトルの水の)硬水がよくないのはわかるが、軟水だとどうなのか？(水道水の)塩素より安全ではないのか？」、「家庭菜園で採れた野菜を食べてよいか悩んでいる」などの発言が聞かれ、「ペットボトルのお水でなくても大丈夫なんだって。今日からペットボトルやめようね」と子どもに声掛けする母親もみられた。途中で、子どもが母乳を欲しがったり、おむつを替えなければならぬために、場を離れる母親がみられたが、参加者の多くは資料を見ながら真剣に聞いていた。終盤では、場を離れずにその場でおむつ交換をする姿も見られたが、おむつ交換や授乳ができる場所と近ければ良かったと考えられた。事後アンケートからは、「外で洗濯物を干していいのかなと思っていましたが大丈夫だと分かり安心した」、「一人で悩んでいたことを皆さんに聞けてとてもよかった」などの回答がみられ、表面上は放射線についての疑問や不安などの訴えはみられなくなっているが、実際には疑問や不安を抱いていた。

③実践評価

「放射線についての基本的な考え方を話し、だからこのように生活すればよい」という形で講話を展開したが、月齢の小さな子どもでなかなか落ち着いて話を聞くこともできない状況において、本日のトピックスとしていくつかのテーマ(例えば、水、いわきの食べ物等)を提示し、「この中で皆さんが日頃気になっているのはどのテーマですか？」と最初に聞いて、そのテーマについて重点的に話すこととよいと考えられた。放射線についての相談がほとんど見られないという地区だったが、不安がまったくないわけではなく、潜在的に不安を抱きながら生活していることが示唆された。子どもに「ペットボトルやめようね」と声掛けをしていた母親は、子どもに語りかけながら自分にも言い聞かせ、安心を確かめているように感じられた。

④効果的な実践

関心のあるテーマについて聞いた上で、「このように生活してよい、その理由は(根拠を示して説明する)…」と講話を展開することで、限られた時間内にニーズに合った内容を重点的に伝えることが出来ると考えられた。子どもがぐずる・オムツの交換が必要になるなど、長時間集中して聞くことのできない母親が、最も気がかりなことに関連する知識を確実に得て、日常生活に反映するためにも有効であると考えられた。

母親が子どもをどのように育てていくか素直に表現できる場(事業)であるため、こころを解放する準備ができており、素直に放射線に関する話が母親の心に入っていくと考えられた。月齢が低い対象だったためか、食べ物や飲み物など摂取に関する心配事が出されたが、土遊びや外遊びについては関心が低いと感じられた。このことから、子どもの成長に伴い、心配する部分も変わっていくことが考えられた。子育てを始めて間もないこの時期に、説明と資料により情報を得ることで、次の心配への心の準備になると思われた。

⑤実践上の課題(今後の実践モデル1のあり方)

子どもの成長過程で、その都度抱く不安や疑問に対し支援していく必要があると考えられた。出産後初めて他の母親と交流し、育児に関する悩みなどを表現できるこのような場で、放射線に関する話を聞いて、育児に関する悩みと同列で放射線に関する疑問も表出する機会を得る経験が、今後新たな不安や疑問が生じたときに表出することができるようにすることが課題と考えられた。

3) 内郷・好間・三和地区(担当:菊地・麻原・大森)

①方法・内容

地区内に居住する2~4ヶ月児と親を対象とした、仲間づくりのための交流を主目的とする集い、

ひよこ教室（2回制）にて実施した。事前のニーズ調査をもとに、対話形式で進めた（30分間、配布資料なし）。マットの上に母親が輪になって座り、赤ちゃんを前に寝かせ、車座で行った。講話の間、地区担当保健師2名は、全体を見ながら、むずがる赤ちゃんを抱いて寝かしつけたり、おむつ交換や授乳を促すなど、母親への配慮を中心に担った。

②実践結果

今回のひよこ教室の参加者は、事前にテーマを知らされて集った、2～4ヶ月児の母親14名（すべて女性）であった。福島県外からの転入者も数名いた。講話が進むにつれて、自分の日常生活に関する質問がいくつか挙がり、他者の質問や質問への回答にうなづくなど、全体として共有する様子がみられた。教室の最後（解散のタイミング）で、作成中の飲料水のリーフレットについて持ち帰りの希望をきいたところ、全員から手があがった。

対話形式の内容は、以下の通りである。

- A. 最初に手を挙げてもらった「ペットボトルの水を買っている人（14人中13人）」「福島県産の食品を買っている人（14人中14人）」「外干し嫌な人（14人中1人）」
- B. 挙手の状況を見ながら参加者からの表出を引出し、飲料水、食べ物（商品、実家からの露地野菜）、原発に近い実家周辺の散歩、洗濯物の外干などについて話した。
- C. Bについて答えながら、いわきは原発からの同心円状で一番影響が少ない、いわきの気候に守られたことを伝えた。
- D. Bについて答えながら、山の物・海の物の放射線を吸収する生態について、アンボ柿、山菜、きのこ、あんこうなどを例に挙げ説明した。
- E. Bのうち、原発に近い広野の実家での散歩については、1時間の線量（0.3～0.5 μ Sv）を伝えた（どう考えるか、どう判断するかは「自分で」というスタンス）。
- F. Bに関連して根拠を示しながら、子どもの健やかな成長と将来を考えてリスクと向き合うことの大切さを伝えた。（洗濯物を日光に当てると清潔で気持ちよい、ミルクには軟水が適している、外遊びによる社会性の発達、こどもメタボやくる病の問題、母親の心の安定など）
- G. 教室の最初に子どもの名前の由来を紹介し合ったことを受け、この子のために何が大切か、自分で考え、判断することの大切さを伝えた。

③実践評価

形式、時間、内容、事前からのプロセスともに適切であったと考える。対話形式で実施したことにより、潜在的なニーズも含め、把握することができた。同時に、住民のニーズを直接受けとめ、今後の活動への具体的な示唆を得ることができた。

事前に不安はないと言っていた母親からも、質問が出ていた。今日の母親たちは、自分の中の不安に向き合っていることや、不安を表出する場を求めていることが把握でき、ニーズはなくなっていないことがわかった。後半は、活発に質問が出てきたことから、自分の生活に落として、自分がどこまでわかっているか、その場で確認することができていたと考えられる。漠然と「もう大丈夫」と思っていた母親たちは、専門家から直接、自分の生活に結びつく情報を受け取ることで、確かな安心を得ることができていたと思われる。

④効果的な実践

事前のニーズ調査をもとに対話形式で進めたこと、「いつもどうしている？」と問いかけ、最初は挙手をしてもらうことから始め、徐々に誰でも自由に発言できる雰囲気をつくるように努めた。母親たちが最も気にしていることを予め共有しておき、全体の話の流れの中で、それらすべて答

えるようにした。現在、不安に感じていることに焦点を当て、そこから対話を広げることが大切であることがわかった。これから仲間づくりをしようとする、同じ月齢の乳児を持つ母親の場合は、自分だけが不安を抱えているのではないことがわかり、その場で不安や思いを表出することができ、安心を得ることができていた。

専門家もエプロンを着用し、母親と同じマットの上で座って話をしたことで、気持ちが和み、自分の不安や思いを表出しやすくなったと思われる。赤ちゃんを自分の前に寝かせ、お互いの顔と子どもたちの様子を見渡せる車座も、この子の未来のためにという共通の関心事をテーマに、話しやすくするために有効であったと考えられる。

⑤実践上の課題（今後の実践モデル1のあり方）

子どもの成長と共に、不安も変化することが予測された。今後、どのような不安がどのような形で出てくるかわからないが、状況をフォローし、予防的に支援していく必要がある。そのためにも、子どもの健やかな成長にとってのリスクとベネフィットや、いわきの元気な乳幼児の生活について、母親と一緒に考え、それを発信することも必要である。

また、すべての母親にとって、初めての子育てには不安がつきものである。放射線に関連することで、不必要なストレスを抱え込むことがないように、すべての母親に、今回のひよこ教室のような経験ができる場を提供する必要がある。

4) 学校保健と地域保健連絡会（担当：小西・三森）

①方法・内容

小学校、中学校の養護教諭と地区保健師による「学校保健と地域保健連絡会」において、定例の連絡会のあと、放射線に関する対話を約70分行った。震災後の学校生活について、お互いの学校の状況を説明し合い、学校が抱えている課題などを共有した。その中で「生活習慣、水、食事、住環境」のパワーポイント資料、リーフレットを示しながら放射線についての知識やつきあい方について話をした。

②実践結果

参加者は小川地区の小中養護教諭4名と公民館館長1名の計5名であり、地区の公民館の一室で会議机を囲んでおこなった。養護教諭でありながら住民として、震災当時のことや、これまでの経過について一人ひとりの養護教諭が話すことが多く、フリートークのような雰囲気となった。震災後の暗く寒い中での水汲みのときの生々しい体験を語り、3年以上経過しても震災のことをまだ鮮明に思い出せるほど抱えている様子がわかった。放射線に関する講話には、うなずきながら熱心にメモをとっていた。

震災後の学校の状況として、「保護者対応と放射線量の測定について」、「プールや草むしりなどの教育活動」、「給食」、「学校における放射線教育」、「肥満やストレスなどの子どもの健康問題」について養護教諭から報告、説明があり、それらに対して養護教諭自身は「どうしたらよいかわからない」「放射線に関する研修会に行く機会が多いが、理解しているかどうか、伝えられるかどうか自信はない」という発言が聞かれた。養護教諭は学校の中で子どもや教職員に健康な生活について伝えていく立場にあるが、放射線についてはよくわからず怖い意識があることから、地域という視点で学校との協働実践もニーズとして考えられた。また、県の教育計画として学校の教員が子どもたちに放射線教育をするように言われているが、実際は自信がもてず、困惑しているということからも、学校教育全体の課題も示唆された。

③実践評価

他の事業と違う対象であったが、養護教諭も住民であり、子どもや保護者と関わる立場として、保健師が抱えていた不安と同じように感じた。保健師自身も知らなかった学校の現状を知ることとなり、協働実践の意義は大いにあった。しかし、通常の連絡会であったため、放射線について話す時間が少なく、お互いに話を聴く時間が必要であった。実施後、時間の都合上、参加者からはアンケートを受け取るのみとなってしまう不全感を抱いたが、実践と振り返りが参加者と保健師と研究者にとって必要であることを再確認した。

④効果的な実践

地域の中にある学校の状況も把握し、放射線教育を実施しなくてはならない教員とも話し合う機会が必要であることから、学校も協働実践の場として有効である。協働実践の際には、実践と振り返りに十分な時間の確保が重要である。

⑤実践上の課題

高齢者対象に実施した時に、次世代への介入の課題を挙げたが、学校現場はまさしく次世代への介入に相応しい場である。しかし、養護教諭は専門職なので知識があると思われがちであるが、安全性や正しい知識がわからずに不安を抱えていることから今後は養護教諭との協働実践も必要であると考えられた。

5) 川前・志田名地区（担当：菊地、小野、小林）

①方法・内容

社会福祉協議会主催の高齢者を対象とした「いきいきデイクラブ」において、担当保健師と共に2時間の事業に参加し、日常生活における放射線との付き合い方について、作成したリーフレット5種類を配布して、1時間30分ほど放射線の専門家から講話および質疑応答を行った。

②実践結果

参加者は60-80代の高齢者18名（男性5名、女性13名）と保健師2名、社会福祉協議会職員1名、研究者3名であった。

「大震災以降は子供や孫が来ても泊まっていけなくなった、お盆やお正月しか来ない。」「孫に農作物を送る気にはなれない。これ送ったら何か言われそう、とってしまう。」など、震災後の家族との関係についての思いが聞かれた。また、「空間線量がまだ国の基準にならないが、どう生活したらよいか?」「田畑を休んでいるけど、今後どうなるのか・・・。」などの不安が挙がった。国の空間線量の基準はあまり意味がなく、バランスよい生活が大切であること、山菜やきのこは少量食べている人はおり、その際どのような調理法でも放射性物質の量は変化がないことを説明した。田畑の農作業については、試作として畑仕事を再開するとしても補償金との関連があり、なかなか難しいという実情が語られた。

③実践評価

今回の参加者は放射線の話があると思っては来ていなかったもので、活発な質疑には至らなかったが、キノコや山菜の話になってくると話への集中も高まり、若手の高齢者が心配や疑問を出してくれて、それについて皆で聞いたり更に質問したりという相互作用が見られた。教室内容について、事前周知をした方が良かったかもしれない。また、後期高齢者が多く、話がほとんど聞き取れていない参加者もいたことから、難聴や文字が見にくい参加者に対する実施上の工夫が必要と考えられた。

④効果的な実践

今回の地区は除染対象地区のため、住民はこれまでも放射線専門家の話などを聞いた経験があ

るが、今回のように健康を切り口に日常生活について話をすることは大変意義が大きいと考えられる。また、参加者の質問に1つ1つ丁寧に答えていくという実施方法が安心につながり、参加者特性からみて適切であった。

⑤実践上の課題（今後の実践モデル1のあり方）

自家消費用に、原発事故前のように再び農作物を作って活性化しましょうと言っても、4年間も畑仕事をやっていないと、荒れ果てた田畑で高齢者が今から再び農作業をするのは難しく、以前と同じ生活に戻ることを目指すよりも、今後どのように充実した生活を送ることが出来るかを共に語り合い、考えていく必要があるのではないか。

3 保健師活動の支援（実践モデル2）

協働事業の前後で時間を取り、協働事業の評価、住民の放射線や放射線防護に関連するニーズの検討、保健師自身の悩みを共有し支援するために、協働ミーティングを実践した。また、保健師活動に有用な住民相談・教育用のパンフレット作成のための検討を行った。

1) 協働事業における保健師活動の支援

(1) 川前12地区（担当：小西・三森・永井）

①方法・内容

住民の方々との昼食後に、集会所内の小部屋で実施した。地区の保健師2名と研究班3名、計5名で約1時間、住民の様子、子どもたちの様子をふまえ、川前地区の保健活動について話を聞いた。

②実践結果

保健師からの相談は特になかったが、(放射線の) 専門家ではないので、研究班にもっと来てほしいという協働実践のニーズを表明していた。研究班に対して「来るならどうぞ」ではなく、パートナーとしての関係性が構築されていることを感じた。

保健師は、震災から3年以上が経過し、放射線についての関心が薄れたように見えたが、講話を通して内面では心配している方もいたことに有意義であったという意見があった。また、地区保健師の活動として、住民へは、データを集めて比較すること、検出されないという安心を増やすことを目的に、WBC測定を続けるように話していること、若い世代の住民が“ここで生活している”という気持ちになれるよう、学校保健との連絡会を行っているが専門家ではないゆえ養護教諭へ伝えられないことを課題として話していた。

③実践評価

参加者とは昼食を共にしながら振り返り、さらにその後、スタッフのみで時間と場所を設定することができたことが良かった。保健師と研究班が実際に現場で生活に触れながら話し合うことで、保健師自身の安心につながっていた。

④効果的な実践

保健師が研究班に対して“出来るだけ来て欲しい”というスタンスであるため、悩みや不安、相談事、ではなく、地区や住民の現状をシェアしながらお互いがどのように活動をしていくことが出来るかを話し合いながら探ることが効果的な実践につながると考えられた。

⑤実践上の課題

本地区での実践が昨年が続いて3回目であったことから、保健師と研究班がパートナーとなり得ていたと感じている。保健活動・事業に関わり、住民とふれあう実践を重ねること、保健師と

対話を重ねることが関係性の構築に有効であり、他地区においては課題である。

(2) 内郷・好間・三和地区（担当：小西・北宮・川崎）

①方法・内容

協働事業の前に30分程度、地域の母子の育児や産後の育児支援のしくみ、住民の放射線への考え方についての保健師の見解などについて情報交換を行った。また、協働事業の実施後、1時間程度、昼食を食べながら感想などを話し合った。

②実践結果

担当保健師は、震災後放射線についての相談や避難者への対応を行った。保健師自身の中に災害発生直後からの被災経験が心の中に痕跡として残っており、未だ癒されていないと感じられた。

今年に入り相談を受けることもなかったため、保健師には住民が放射線のことを気にしないようにしているように見えていた。しかし協働事業を通して、保健師は参加者（住民）が放射線についてどのようなことを心配しているか知ることができたと語られた。また、事故後3年以上経ち、それぞれの事業の中で放射線に対する不安をくみ取る努力が薄らいでいることを自覚するとともに、住民から相談がなくても会える機会を利用して情報提供していくという自分たちの役割に気づいたと語られていた。今年度もう1度協働事業を行うので、そこでまた今日のことを振り返り生かしたいという発言もみられた。

③実践評価

保健師が今も抱えている思いを、少しずつでも表出する場が必要であり、協働ミーティングは1つの機会になったのではないかと感じられた。

協働事業を通じて、住民のニーズを把握し自分たちの役割を確認するだけでなく、自分たちが現実的に何をすることができるかということ、協働事業の中で見出していた。

④効果的な実践

事前の顔を合わせての打合せで現状や課題を共有することで、一体感を得られた。事後、「こう考えていたけれどこうだったね」という話をする中で、地域の課題と一緒に取り組もうという関係を築くことができたと考えられた。事後、参加者からのアンケートに対して研究者（放射線の専門家）より回答を保健師に返し、2回目の教室時に参加者にフィードバックしてもらった。保健師も安心して自分の口で回答を伝えられていたことから、1回目の経験が自信につながっていたと考えられた。

⑤実践上の課題

保健師が住民からの相談がなくても情報提供して行くには何らかのきっかけとなるものが必要と考える。普段の事業の中で放射線の専門家が参加したことが一つのきっかけとなり、参加者は放射線のことを話すことが出来ていた（もちろん、事前にお知らせしていたことも大きい）。事業の中で保健師が自ら住民に話し出すときにきっかけが必要であり、そのハードルは比較的高いと想像できた。研究班で作成したパンフレットはそのきっかけの媒体として利用していくことで、自分たちの役割として気づいた放射線について住民と語り合うことにつながることを期待したい。ただし、パンフレットなどの活用を行っても、今後継続的に事業や住民と会う場で放射線についての情報を提供していくためには、やはり専門家に相談したいときに相談できる体制の整備が必要であると考えられた。

(3) 内郷・好間・三和地区（担当：菊地・麻原・大森）

①方法・内容

事前にメールでニーズに関する情報を共有し、当日の会場準備の前に進め方や問いかけの方法（挙手をしてもらった方がよいなど）について打ち合わせを行った。教室終了後は、地区担当保健師（2名）と、赤ちゃんと母親を見送り、会場の片づけをしながら、協働で実践したことの手ごたえを共有した。その後、地区センター内のカンファレンス室でお昼時間の1時間を利用し、昼食をとりながら、振り返りを行なった。アンケートの記載内容を見ながら、教室の雰囲気と母親たちの反応の良さについて、その理由を掘り下げて話し合った。

②実践結果

会場の様子や母親たちの反応を振り返るうちに、保健師から、3年半経過した今だからこそできる自分たちの役割やこれからの活動について、前向きで意欲的な発言が続いた。保健師の思いに沿うカタチで、この地域の保健師だからこそできることについて提案を出し合い、意見交換を進めた。

保健師からは、ストレートに放射線の話をするのではなく、生活の中ででてきた放射線に関連する困りごとについて話をしていけばよいこと、それが保健師の日頃の活動であること、震災から3年半たった今だからこそできることがあるのではなかなど、次々と自分たちの役割が語られた。

③実践評価

ひよこ教室の年間の運営計画にこの講話を組み込み、実施しながら何かを感じ、保健師としての役割を考えていた様子であった。特定の放射線に関する相談事ではなく、保健師自ら、今後の自分たちの役割と具体的な活動の構想について、事業を通して実感した課題意識を言葉にしようとしていた。今後の保健師活動に結びつく、効果的なリフレクションになったと考えられる。専門家にとっても、住民や保健師の現在の不安や思い、潜在的ニーズや将来の課題について、現地の生活を肌で感じながら、学ぶ貴重な機会となった。

④効果的な実践

事前のメールによるニーズに関する情報共有や直前の打ち合わせ、片づけをしながらの実感の共有など、一緒に動きながら取り組むプロセスを通じて、協働関係を築くことができた。このような協働形態により、保健師が自らの役割を見出したと考えられる。このことは、保健師活動に変化をもたらすことが期待でき、放射線防護文化を形成していくための保健師活動の支援として有用と思われる。専門家による情報提供、是認、支持的共感などが、保健師としての責務の意識を高め、思考を深め、活動の構想を豊かにする触媒となったと考えられる。

⑤実践上の課題

この地域の保健師だからこそできる活動について、保健師間で話し合い、いわきの実践知を組織的に蓄積する取組みが必要である。今回の保健師の自発的な課題意識は、専門家との協働を通じて起ったものである。随時、専門家から情報提供、是認や支持的共感などを得ることが、放射線防護文化の形成を促すための保健師活動の継続的支援として求められる。

また、このような現地での活動は、専門家にとって学びを深める機会となる。長期的な視野に立ち、放射線防護文化の形成を進めていくためには、保健師と専門家の双方が住民と共にいわきの今を共有し、その時々々のニーズに応じて活動を発展させることが必要である。

(4) 学校保健と地域保健連絡会:小川地区（担当：小西・三森）

①方法・内容

時間の関係で、その場では保健師との振り返りはできなかったが、翌日電話にて30分程度実施した。

②実践結果

地域の保健師であるにも関わらず、これまで震災に関連した学校にいる子どもや保護者の様子、教員の様子を聞く機会がなかったため、水面下にある声を拾えていない、知らないことが多く驚くことばかりだったという保健師自身の振り返りが聞かれた。実態とし測定している放射線量のデータの意味は何かを考えることが教育であり、子どもたちには細やかな放射線教育が必要であると考えている。しかし、その担い手として教員や養護教諭に対して研修が多く行われていても、そのような子どもや保護者を支える側が未だケアされていないことが課題としてあることが理解できた。

③実践評価

電話での振り返りであったが、話す中でお互いに新たな気付きが促進されたこともあり、話せて良かったと確認できた。実施後にその場で振り返りたかったという想いも共通で抱き、実践と振り返りを行う必要性を実感した。

④効果的な実践

書面やメールではなく、声を通じた会話のやり取りのもとで振り返りや確認が出来たことで、お互いによりエンパワメントされた。

⑤実践上の課題

協働ミーティングの場と時間の確保も踏まえた企画、打ち合わせが課題である。

(5)川前・志田名地区（担当：菊地、小野、小林）

①方法・内容

事業実施後に、保健師2名、社会福祉協議会1名、研究班3名で、30分程度のふり返りのミーティングを行い、志田名地区の現況、保健活動などについて自由に話し合った。

②実践結果

今回の地区は1番線量が高い地区だったこと、土や自然に触れなくなって外部から人が来なくなったこと、高齢独居が多いが不動産を持っていることがしぼりになって動けないという状況があることが分かった。また、次月に開始するヨウ素剤の配布に際して、震災の時に自宅避難のために食材を配ってもらえなかったという不満や不公平感を、4年近く経つ現在でも言われて戸惑うことや、県の中でも放射線への温度差を感じ、被災者間のしこり、生活格差、意識の差、思いの差が存在することなどが挙げられた。放射線に関する住民の意識は、最近住民から放射線の相談があることはないが、意図的に聞いてみると少し出てきたりすることが分かった。だが、食物は検査しているから大丈夫、水は水道水を飲むようになってきたなど、住民の中に安心が増してきた感触があることも分かった。

保健活動のなかで、放射線のパンフレットを住民の集まる機会ごとに配布している。線量が心配ないことを伝えても不安を取り除くのは簡単ではない。高齢者には、人生の中の役割として、食べるかどうかは置いておき、野菜を作って線量を測って将来のためにデータを残して欲しいと伝えている。この地域のこれからの課題は限界集落の問題であり、外からボランティアなどで若い人を入れていくことが必要とされることが分かった。

保健師はこれまでの活動であまり放射線をテーマにすることはなかったが、こういった事案を機に話題に取り上げて話したり、保健師自分も勉強してみようと思うようになったこと、放射線については何回も聞いて、やっとなんかということかと分かってきたことが語られた。

③実践評価

地域のこれまでや現況、保健師の感じる課題などを教えていただいた。保健師が住民に対して、どのように生活を営んでいって欲しいかというメッセージを送ることが、大切であると考えられた。

④効果的な実践

地域の実情、住民の様子について教えてもらう中で、保健師として地域およびそこに生活する地域住民に対して抱えている思いや考えが語られた。

⑤実践上の課題（今後の実践モデル2のあり方）

保健師など専門職に対する放射線の研修や講義でも、何回か実施して理解度が深まったり、関心が高まったりしていくため、4年経過後も、研修など保健師等専門職への直接的・継続的な支援ニーズがあると考えられる。原発事故以前から存在するその地域の健康課題や生活課題があり、放射線を含めて、それに対して何をどのように支援しうるのかをともに考えていく必要があるのではないかと。

2) 保健師活動で活用できる住民向けリーフレットの作成

今年度は、住民の放射線に関するニーズを明確にし、日常の保健活動で活用できる媒体のテーマと内容について検討した結果、6つのテーマ①食事（ワカメ、山菜、イノシシ、キノコ）、②飲み水（水道水、井戸水、ペットボトル、湧き水）、③子どもと外遊び（砂遊び、泥遊び、海水浴、外気浴）、④生活環境（庭、野山での活動）、⑤健康管理（放射線以外の健康障害を含む）、⑥子どもの健康管理を選定し、リーフレットを作成した。

このリーフレット作成のプロセスは、Van Kaam⁵⁾の手順を援用し、具体的に次のような手順で行った。

(1) Pre-scientific Phase（前科学的段階）

すべての研究期間にわたり協働事業（実践モデル1）、保健師との協働ミーティングを含む、頻回に行った保健師・住民との対話の記録、今までに使用されているリーフレット等を、作成の基礎資料とした。

(2) Scientific Phase（研究者によるリーフレット項目の抽出・選定）

i) Listening

前項の基礎資料からリーフレットに関わると考えられるトピックスを全153件抽出し列挙した。

ii) Preliminary grouping

暫定的に類似したものをグループに分類した。

iii) Reduction and elimination

いわき市の地域の実情に合わせて、必要なものとそうでないものを選別した。

iv) Hypothetical identification

i)～iii)を実施した結果、6つのトピックス①食べ物（ワカメ、山菜、イノシシ、キノコ）、②飲み水（水道水、井戸水、ペットボトル、湧き水）、③生活環境（庭、野山での活動）、④子どもと外遊び（砂遊び、泥遊び、海水浴、外気浴）、⑤健康管理（放射線以外の健康障害を含む）、⑥子どもの健康を選定した。

v) Application and final identification

上記6つのトピックスを研究フィールドの保健師に提示し、内容の適切性（地域住民の最大の関心事であるかどうか）や実践での必要性などを確認した

(3) 執筆

①執筆担当者決定

全研究班メンバーを、放射線防護の専門家と公衆衛生看護の研究者からなる6グループにわけ、6つのトピックスのいずれかを担当し、頻回の修正を重ねて執筆した。その際の留意点は、イラストを多くする、文章はできる限りシンプルにし、わかり易く書く、数値は多すぎないように留意し、理解を進めるために効果的な場合は使用する、などである。

②研究チーム内フィードバック

作成したリーフレットの原稿を研究班メンバー全員に提示し、フィードバックを求め、修正した。この作業を何度も繰り返し、最終第一版とした。

③使用する実践者（保健師）のフィードバック

最終第一版を研究フィールドの保健師全員に提示、使いやすさ、わかりやすさ等のフィードバックを得た。また、研究班メンバー以外の放射線防護専門家3名に提示し、保健師だけではなく、一般の人々にも役立つとのフィードバックを得た。

④それらのフィードバックを第一版に反映させ、最終版とした。

食べ物や飲み水、生活環境、子どもの外遊びについては、いわき市の豊かな自然や長年の生活習慣、文化を反映していると考えられたため、住民の生活習慣や文化を考慮した媒体案を作成した。

①リーフレット 放射線と健康① 健康な心と身体は食事から

健康な心と身体は食事から 食事と放射線の話

食は健康な心と身体につながっています。食事で食卓の時間を大切にするには、私達自身の健康の維持や子どもの成長のためにも大切です。

☆食を楽しみ、食で豊かな心をつくる☆
自然に恵まれたいわきには、さまざまな農産物や水産物、魚を召し上げてきた郷土料理や行事食が数多くあります。こうした「伝統的」に継承することは健康の楽しみ、豊かな心の育成につながります。

◎食事と放射線◎
原子力発電所、放射線を知って食事が変わり、地元の農村に不安を感じた方もいらっしゃいます。

1. 市販の食品について
放射線物質の基準値を超えたものが検出されないように、米、農作物（野菜・果物・畜産加工品）、水産物の検査が実施され、結果は市のホームページに公表されています。

2. 飲食店について
県庁裏のものは、市内各地の公設館・支所等、検査を受けることができます。また、その結果は、店舗名や住所なども市のホームページに公表されています。

3. 野生のもの(キノコ・山菜)について
野生のキノコや山菜、野生動物の一部から基準値を超える放射線が検出されています。放射線物質は、市のホームページに公表されています。

放射線物質の入った食品を食べると、どのくらいの内部被ばくになりますか?

★食品中のベクレルをシーベルトに換算するには
食品は、自然由来の放射性物質を除き、1kgあたり100ベクレル以下の放射性物質を含有する食品は、放射線物質を含有する食品として扱われます。換算は、ベクレルの値で割ります。換算は、放射線物質1kgあたり100ベクレルの食品が1kg検出されています。そのような食品を食べるとどのくらいの内部被ばくになるのでしょうか。放射線防護係を持って換算することができます。

放射線量(Bq/kg)	millisievert(mSv)
10	0.000010
100	0.000010
1000	0.000010
10000	0.000010

★換算例で考えてみましょう
成人の場合、セシウム137を1kgの食品あたり100ベクレル含むキノコを1kgの食品を食べると、内部被ばく(換算)は0.0013mSv(13μSv)になります。
計算: 0.000010 (mSv/Bq) × 100 (Bq) = 0.0010 (mSv)

通常、キノコを食べる量は多くても100グラム程度なので、換算は、その10分の1の0.00013mSv(1.3μSv)以下となります。

これは、食品に自然に含まれる放射線から年間の内部被ばく換算と比較しても7分の1以下の値です。自然由来の放射線から年間の内部被ばく換算と比較しても7分の1以下の値です。自然由来の放射線から年間の内部被ばく換算と比較しても7分の1以下の値です。

◎よい生活は放射線の影響から身を守ります◎

- ◎私たちの身体には有害な放射線から身を守る生体防御機構が働いています。
- ◎放射線防護は健康へのダメージを与えますが、この生体防御機構により自身のダメージが軽減されます。
- ◎よい生活習慣による生体防御機構を高めることができます。
- ◎食生活改善による食生活としては、健康寿命を延ばす多く食べてビタミン・ミネラルを積極的に取り入れること、多量種の野菜をバランスよくとること、食卓の時間を長くしなどが大切であるとされています。

発行：「放射線防護と放射線」編集委員会 放射線防護委員会 (2011-2012年度) 発行
ホームページ <http://jprn.or.jp/>

いわき市保健所
ホームページ <http://www.city.iwaki.fukushima.jp/index.html>

©2014年11月現在

⑤リーフレット 放射線と健康⑤ 生活習慣を見直し、もっと健康な生活にしましょう！



⑥リーフレット 放射線と健康⑥ 健やかな成長のための生活習慣とからだづくり



作成したリーフレットのうち、内容が確定し、印刷が完成した①～⑤（前述）を、研究フィールドの保健師の配属部署に送付し、使用場所、使用場面、対象者、使用したリーフレット、使いやすさなどについてアンケートを配布した。

3) リーフレットの活用結果と評価

市内5つの地域より回答を得られた。

(1) リーフレットの使用場所、使用場面、使用したリーフレットの種類

※リーフレットの種類（①～⑤）は前述

リーフレットは5地区にて、様々な場面で使用された。リーフレットを活用した保健師活動の対象者は、新生児や乳幼児の母親から中高年齢者、高齢者に及んだ（表2）。

表2 リーフレットの使用

使用場面（保健師活動）	使用場所	対象者	使用したリーフレット
地域サロン	公民館、集会所	高齢者	①、②、⑤
健康相談	支所、公民館、集会所、 保育園	乳幼児（在園児）の保護者 高齢者	①～⑤ ⑤
健康教育 ※健康教室、骨粗しょう症予防教室等	雇用促進住宅集会所、 公民館、集会所、保育園	被災者（中高年齢の女性） 乳幼児（在園児）の保護者 中高年齢者、	③ ① ②
家庭訪問	一般家庭	新生児・乳児と母親	①～⑤
乳幼児健診	健診会場	乳幼児と母親	③④

(2) リーフレットの評価

各リーフレットの使いやすさや気づいた点などについて、アンケートにて質問し、結果に基づき、リーフレットの評価を行った。

i) 概要

リーフレット①～⑤の5段階評価の中央値は、リーフレット①は3.2、リーフレット②は3.1、リーフレット③は3.6、リーフレット④は4.5、リーフレット⑤は4.6であった。複数回協働事業を実施した地区とそれ以外では、5段階評価や気づいた点に違いがみられた。複数回協働事業を実施した地区では使用したリーフレットの種類が多く、すべての種類のリーフレットを様々な場所・場面で使用していた。また、5段階評価も高かった（表3）。

表3 リーフレットの評価

リーフレット	5段階評価中央値	気づいた点
①食事	3.2 (A地区:5)	・文字数が多く、難しいというイメージに受けとられやすい ・自由にお取りくださいコーナーに設置したが、リーフレットを持ち帰る人、希望する人はいなかった
②水	3.1 (A地区:5)	・養護教諭からも好評 ※ ・「放射線と健康」という資料なのに、水の規準、硬度の説明など放射線以外の情報が多く何の資料かわからない ・質問しにくいリーフレットだと思う
③外遊び	3.6 (A地区:5)	・放射線についてどの程度安全なのかわかりにくい
④環境	4.5 (A地区:5)	・もう少しパッと見て概要がわかるほうがよい ・内容的には要点が整理されている
⑤生活習慣	4.6 (A地区:5)	・一般的な話題で利用しやすい ・活動が減っていると感じる高齢者が多いので、高齢者にも活用できる※ ・震災前後のデータを示していれば、より利用しやすかつ

		た
①～⑤	A 地区	<ul style="list-style-type: none"> ・リーフレットをきっかけに今まで聞かなかった放射線についての住民の思いに触れられた ・これからも話をしていきたい

補足) A 地区は協働事業を複数回実施した地域。「気づいた点」※印は A 地区からの意見・感想

ii) 協働事業実施地区と実施しない地区との比較

地区により評価や保健師の感想が異なり、地域差がみられた。複数回協働事業を実施し深くかわり、保健師と放射線防護の専門家および公衆衛生看護の研究者が同じ気持ちで実践できた地区では、使用場面や使用場所が多く、5段階評価も高く、「リーフレットをきっかけに今まで聞かなかった放射線についての住民の思いに触れられた」、「これからも話をしていきたい」などの前向きな感想が聞かれた。しかし、それ以外の地区の中には、「健康相談や電話で相談されることがなく、リーフレットを設置しておいたが持ち帰る人がいない」、「リーフレット配布時期が妥当なのか(もっと早い時期が妥当ではないか)」、「災害直後なら利用する機会もあったと思うが、今更な感じがする。リーフレットの内容で市民が安心できると思えない」、「リーフレットだけでなく、直接支援のほうがありがたい」など、やや後ろ向きな感想も聞かれ、これらの地域では5段階評価も低かった。これらの地区では、リーフレットを積極的に活用しておらず、相談を受けたら使用する、あるいは保健センターに設置しておくという活用方法であった。

iii) 評価結果のまとめ

これらのアンケート結果から、リーフレットは事業の際に手渡して説明するなど意識して活用する必要があること、保健師の意識によってリーフレットの使用方法が変わること、同じ自治体の中でも同じ方法が保健師、住民に受け入れられる(通用する)わけではなく、保健師の心構えや意図によって住民に影響を及ぼすことなどが考えられた。保健師が住民のニーズに気づき、自分たちの役割を認識し、リーフレットを活用して住民と放射線についての話題に触れるためには、保健師と放射線防護の専門家等との継続した協働事業と協働ミーティングが必要であると考えられた。

今後の課題として、保健師と率直な意見を交換し合う関係性を維持しながら、繰り返しの対話を通してよりニーズに合った媒体を継続して協働で作成していく必要があると考えられた。

4 近隣市町村、福島県、全国への実践モデルの普及・啓発(実践モデル3)

1) 全国の都道府県への住民向けリーフレットの配布

全国に普及・啓発を行うために、住民向けリーフレット①～⑥を冊子にまとめ、47都道府県に保健所設置数分と全国の市町村の地域保健責任者宛て配布した。配布後、東北から四国まで6都道府県(平成27年3月3日現在)より、冊子がわかりやすく参考になるため、追加で送付を希望する旨の問い合わせがあった。都道府県保健師全員に配布したいという内容から、保健所のみならず市町村(汚染状況調査重点地域)に配布したいという内容があった。これらの問合せに対し、追加郵送を行うなどで対応した。

これら福島県外の自治体からの反応をみると、放射線に関する情報は福島県以外の自治体では、十分得られなかった可能性があり、広域的にこのような情報を必要としていると考えられた。特に子育て世代にはリスクゼロ志向が強く、放射線の危険性を訴えられると揺れ動きやすい。この

冊子を全国の自治体に配布したことで、事故後4年経過してもなお不安を抱いている人たちがまだいる可能性があること、被災地以外の自治体で活用ニーズがあり、また活用できる可能性があると考えられる。

2) HP 開設と運営

昨年度、住民ならびに住民を支援する保健師への相談・支援体制づくりの一環として、保健師等専門職、住民等への情報提供、放射線防護文化の普及を図るホームページ「保健師の活動と放射線」<http://www.phnradiation.jp/>を開設した。内容は、本事業の紹介ならびに本事業の活動で明らかになったことや放射線に関する有用な情報として学会等で発表した活動報告(以下参照)、情報を得るため環境省、消費者庁、復興庁、放射線医学総合研究所の放射線関連のサイトへのリンクとした。

今年度は、保健師活動に使用できるコンテンツとしてリーフレットを掲載し、ダウンロードできるようにし、またリーフレットへの意見と感想を記載できるように設定した。

3) 国内および国外の関係団体および学会、雑誌等での公表

本研究事業の結果を協働実践研究活動の結果を国内および国外の学会、雑誌等で公表した。とくに、保健師がもっとも閲覧する雑誌に「健康課題としての放射線某と-保健師による実際的な活動も出るに向けて」をテーマとして、本研究事業について、全9回の連載を行った。また保健師に関する関係団体への情報提供を行った。

【活動報告一覧】

掲載誌 2014

(「この研究に関する現在までの研究状況、業績」参照)

学会発表

1 第3回 日本放射線看護学会学術集会(2014.9.5~6 大阪市中央公会堂)

- ・小野若菜子, 折田真紀子, 麻原きよみ

『山間部に住む高齢者への放射線に関するミニ講座の取り組み: 効果的实践と課題』

- ・小林真朝, 菊地透

『精神ケアでの放射線に関するミニ講座の取り組み: 効果的实践と課題』

- ・三森寧子, 小西恵美子, 菊池透, 大森純子, 荒木田美香子, 川崎千恵

『母子保健事業における放射線に関するミニ講座の取り組み: 効果的实践と課題』

2 第73回日本公衆衛生学会総会(2014.11.5~7 栃木県総合文化センター)

- ・大森純子, 麻原きよみ, 矢吹敦子, 川崎千恵, 荒木田美香子, 小野若菜子, 小林真朝, 三森寧子, 北宮千秋

『放射線防護文化形成のための実践モデル2「保健師との協働ミーティング」の効果と課題』

- ・川崎千恵, 麻原きよみ, 矢吹敦子, 大森純子, 荒木田美香子, 小野若菜子, 小林真朝, 三森寧子, 北宮千秋

『放射線防護文化形成のための実践モデル1「既存事業における健康講話と対話」の効果』

3 平成26年度医療放射線防護連絡協議会年次大会 第25回「高橋信次記念講演・古賀佑彦記念シ

ンポジウム (2014. 12.12)

小西恵美子『看護師・保健師等に対する放射線防護の教育』

4 第3回日本公衆衛生看護学会学術集会 (2015.1.10~11)

永井智子, 小西恵美子, 麻原きよみ, 小林真朝, 小野若菜子, 三森寧子

『保健師基礎教育における放射線の授業に関する学生の学び』

5 第18回 EAFONS (2015.2.5~6 NTUH 国際コンベンションセンター)

- ・小西恵美子, 矢吹敦子, 菊地透, 三森寧子, 大森純子, 荒木田美香子, 折田真紀子, 川崎千恵, 小野若菜子, 小林真朝, 麻原きよみ

『Multidisciplinary approach to promote a practical radiation culture in Fukushima, Japan』

- ・川崎千恵, 矢吹敦子, 小西恵美子, 小野若菜子, 菊地透, 折田真紀子, 大森純子, 荒木田美香子, 小林真朝, 三森寧子, 麻原きよみ

『Developing radiation teaching materials for Public Health Nurses of Fukushima, Japan. 』

5. 放射線防護文化形成のための効果的な実践モデルの抽出

平成 25-26 年度における実践モデル 1 と 2 に関する研究結果から、効果的な実践と実践上の課題を抽出した。

1) 放射線防護文化形成のための住民に対する効果的な実践 (実践モデル 1)

	ポイント	解説 (留意点・効果)
体制	既存の保健活動に放射線に関する相談・教育を組み込んで実施する	<ul style="list-style-type: none"> ・既存の事業に組み込むことで無理なく継続して実施できる ・住民との距離が近く、保健師との関係性があることから実践できる ・住民が素直に表現できる場 (事業) であるため、心を解放する準備ができており、放射線に関する話も受け入れられる ・住民が、育児や健康についての相談と同様に、放射線に関する疑問も表出できる機会と認識できれば、今後新たな不安や疑問が生じたときに表出することができる ・保健師と放射線防護の専門家が放射線に関する住民のニーズを把握できる ・今後の活動を考える機会になる ・保健師が、住民からの相談がなくても、放射線に関する情報提供していくきっかけとなる
	その都度不安や疑問を表現できる機会をつくる	<ul style="list-style-type: none"> ・例えば母子では、子どもの成長過程で不安や疑問は変化する。成長に伴い生じた新たな不安や疑問を相談することができるようにする
	事業の対象や連携・協働事業を拡	<ul style="list-style-type: none"> ・多様な対象者に対して行い、地域にある様々な施設・資

大する	源と協働することで、住民の現状と問題を把握し、対応できる ・地域に放射線防護文化を広げることができる
-----	---

	ポイント	解説（留意点・効果）
実施方法	地区ごと、対象ごとに行う	<ul style="list-style-type: none"> ・地区により生活、文化が異なるため、地区ごとの実施が必要 ・多様な対象ごとに実施することで、対象特性に応じた実践ができる ・その地域での家族形態など、生活実態を踏まえた情報提供ができる
	地区や参加者の行事・イベントに合わせて行う	<ul style="list-style-type: none"> ・小さなイベントや行事に合わせて実施することで、住民は放射線の話もスムーズに受け入れることができる
	事業実施前に保健師と放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者が参加者の特性と日頃の対応について情報共有する	<ul style="list-style-type: none"> ・事業実施前に参加者の様子や留意点を共有することで、対象者の反応を想定しながら実施できる
	事前に周知する	<ul style="list-style-type: none"> ・事前に放射線の講話があることを周知することで、準備性が高まり、質疑応答などが活発に行われる
	事前のニーズ調査をもとに対話形式ですすめる	<ul style="list-style-type: none"> ・住民の関心事や心配を予め把握でき、当日のテーマを焦点化できる ・住民のニーズに合った内容の講話を実施できる
	参加者が話を聞き話題を共有できる場の設定と雰囲気をつくる	<ul style="list-style-type: none"> ・対象に応じて車座にするなど、場の設定と意見交換できる雰囲気をつくる ・いつもの雰囲気の中で伝えていく ・誰でも自由に発言できる雰囲気をつくる ・放射線防護の専門家も母子の事業ではエプロンを着用するなど、住民と同じ目線で話をする
	皆で共有できる形で、質疑応答の時間を十分設ける	<ul style="list-style-type: none"> ・質問の内容は、参加者に共通の疑問や課題である ・質疑への回答内容は参加者間で共有でき、共通の認識を持つこと（文化の形成）に寄与する ・保健師が住民の生活上の課題やニーズを把握する機会になる
	対象に合わせて資料や実施方法を工夫する	<ul style="list-style-type: none"> ・資料の内容を見ながら理解できる ・後期高齢者を対象とする場合、文字を大きくする、スライドを拡大印刷するなど、難聴や文字が見えにくい参加者への実施上の工夫を行うことが必要
	最初に、「いつもどうしてるか」問いかけ、挙手してもらう	<ul style="list-style-type: none"> ・誰でも自由に発言できる雰囲気づくりにつながる ・参加者が最も気にしていることを中心に、講義を始めら

		れる
	現在不安や関心のあるテーマに焦点を当てて行う	<ul style="list-style-type: none"> ・関心のあるテーマ(例えば、水、いわきの食べ物等)を聞いたうえで、そのテーマについて重点的に伝える・話す ・自分だけ不安に感じているのではないことがわかり、不安や思いを表出し安心を得ることができる
	観察者 2 名と講話を行う者 1 名 (計 3 名) で行う	<ul style="list-style-type: none"> ・観察者の他に、話に入れない人などに個別に対応し、話に入ることができるように支援する役割を果たす者がいることが望ましい
	対話形式で行う	<ul style="list-style-type: none"> ・話しやすくする

	ポイント	解説 (留意点・効果)
住民との関わり方	同じ地区・属性・背景の対象者で質疑応答を行う	<ul style="list-style-type: none"> ・参加者間で共有でき相互理解が進む ・参加者間の共通認識となり、放射線防護文化形成につながる
	個別の健康相談で表出された放射線に関する生活上の心配・不安に対応する	<ul style="list-style-type: none"> ・放射線に関連した話が出た時に適切な情報提供を行うことにより、住民に無理なく受け止められ、生活に関連した話ができる ・住民が放射線防護の生活習慣を無理なくとらえることができる
	保健師が放射線に関する知識を住民にわかりやすく伝える	<ul style="list-style-type: none"> ・住民に信頼されている保健師が放射線に関する専門的な内容をわかりやすく住民に伝えられることが住民の理解を促進し安心を高める
	根拠を伝えるようにする	<ul style="list-style-type: none"> ・なぜそうする必要があるのか (ないのか) 考えるように返すことが効果的
	対象者にとって有益な放射線に関する情報提供であることを示す	<ul style="list-style-type: none"> ・(乳幼児を持つ母親の場合) 子どもの健やかな育ちを一番に考えるようにメッセージを伝え続けることで、母親の信頼を高め安心につながる
	参加者の個別の相談には丁寧に答える	<ul style="list-style-type: none"> ・参加者の特性にもよるが、質問に 1 つ 1 つ丁寧に答えることが安心につながる ・全体の話の流れのなかで、疑問すべてに答える
	住民自身が判断することを伝える	<ul style="list-style-type: none"> ・メリット、デメリットを示し、住民自身が行動を選択することを伝える

2) 保健師活動の支援の効果的な実践 (実践モデル 2)

	ポイント	解説 (留意点・効果)
体制	既存の保健師活動に組み込み協働事業を行う	<ul style="list-style-type: none"> ・地区や住民の現状を共有しながらお互いがどのように活動していくことが出来るか話し合いながら探ることが、効果的な実践につながる ・協働事業を通して保健師は放射線や放射線防護文化に

		<ul style="list-style-type: none"> 関する知識を得、住民対応を学ぶことができる 放射線については何回も聞くことで理解できる 保健師自身も勉強してみようという気持ちが湧く 住民のニーズや潜在的な問題を知ることができる 自然な形で自発的に課題意識を抱くことができる 放射線防護の専門家は地域や保健師のことがわかる 保健師と放射線防護の専門家の信頼関係ができる
	協働事業の前後で事業の話し合いや保健師の相談支援の時間を設ける	<ul style="list-style-type: none"> 協働事業についての振り返りを無理なく実施できる 保健師は、普段一同に会した場では表出できない悩みや問題認識を表出できる 地区特性に応じた問題に対応できる。 本事業を踏まえ、次の事業を考えることができる 放射線防護の専門家が、放射線防護文化形成の核として機能する保健師の専門性を認識できる
	地域課題の共有を行う	<ul style="list-style-type: none"> 長期的視野に立ち、放射線防護文化の形成を協働で進めていくことができる
	保健師の相談に放射線の専門家が関わる	<ul style="list-style-type: none"> 何度か実施することで放射線についての理解が深まる 相談者が市や地区関係者以外の放射線防護の専門家であることで、思いを表出できる 放射線に関する保健師からの質問にはきちんと返す 放射線について、放射線防護の専門家に相談したいときに相談できる 放射線について放射線防護の専門家に聞くことが出来るという安心感が得られる 保健師は地区独自の放射線についての問題・疑問を相談できる

	ポイント	解説（留意点・効果）
実施方法	事前に顔を合わせて打ち合わせを行い、現状や課題を共有する	<ul style="list-style-type: none"> 保健師と放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者が一体感を得られ、地域の課題と一緒に取り組もうという関係を築くことにつながる 住民が最も気にしていることを予め共有しておく
	食事をともにしながら話し合うなど、気持ちを表出できる場の設定と雰囲気づくり	<ul style="list-style-type: none"> 落ちついた雰囲気をつくり、雑談や最近の話題から話し始めるなどにより、保健師の思いが表出される
	協働事業前後で継続してコンタクトを取る	<ul style="list-style-type: none"> 事前事後を通じてメール等でコンタクトを取り続けることがお互いの認識の共有と関係づくり、思いの表出、今後の事業の検討に重要

	事業の準備から実施、振り返りまで対話しながら共に行う	<ul style="list-style-type: none"> ・実際に現場で生活に触れながら話し合うことで、保健師自身の実施上の安心につながる ・保健師と放射線防護の専門家との関係性の構築に有効 ・地域の課題と一緒に取り組もうという関係を築くことができる
--	----------------------------	--

	ポイント	解説（留意点・効果）
保健師との話し合い・相談支援の方法	保健師と放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者が共に考える	<ul style="list-style-type: none"> ・支援だけでなく、共に考えることで、保健師と放射線防護の専門家がお互いにエンパワメントされる ・放射線に関する事業に前向きになることができる
	放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者が事業を通じて感じたことを伝える	<ul style="list-style-type: none"> ・保健師が振り返ることができる
	放射線防護の専門家が学ぶ姿勢を持つ	<ul style="list-style-type: none"> ・現地での活動は、専門家にとって学びを深める機会である
	保健師自身が自分たちの思いや経験を表出できるようにする	<ul style="list-style-type: none"> ・保健師の思いや経験を聴く時間、振り返りの時間を持つ ・保健師は今も抱えている思いを表出することができ、自分の気持ちを整理することができる ・保健師は、地域及びそこに生活する地域住民に対して抱えている思いや考えを語るすることができる ・保健師が、経験や事業の効果、今後の活動、役割を言葉にすることが大切 ・保健師のケアにつながる ・保健師活動に変化をもたらすことが期待でき、放射線防護文化を形成していくための保健師活動の支援として有用 ・実施後にその場で振り返りたかったという思いも共有できる
是認、指示的共感などを示す	<ul style="list-style-type: none"> ・保健師が自身の役割に気づくことができる ・前向きに保健師だからできることについて考えることができる ・放射線防護文化の形成を促す保健師活動の継続につながる ・保健師がエンパワメントされる ・保健師としての責務の意識を高め、思考を深め、活動の構想を豊かにする触媒となる 	

IV 考察

1 放射線防護文化形成のために有効な実践モデル

本研究では、「人々が放射線防護の知識とスキルをもち、日常生活に放射線防護の行動を取り入れることができるようになる」ことを放射線防護文化と定義し、①住民に対する実践モデル、②保健師の活動支援の実践モデル、③近隣市町村、福島県、全国への実践モデルと類型化して、放射線防護文化形成のための実践モデルを明確化し、抽出するための活動を行った。その結果、既存の保健事業に放射線の相談・講話等を組み込んで保健師と協働する実践が有効であることが明らかとなり、住民および保健師に対して有効な具体的な実践を見出した。以下では、これら具体的実践に通底する重要な要素に着目して述べたい。

1) 住民に知識とスキルを伝え、日常生活に放射線防護行動を取り入れることにつなげるための有効な実践

従来の放射線教育は、放射線に関する概念の説明から、一般的な放射線防護行動の説明を伝える内容が多かった。しかし、原発事故を経験した住民にとっては、自身が抱える日々の生活における不安や疑問が最優先課題であり、それが解消されなければ、放射線防護行動を受け入れることはできない。住民に対する有効な実践モデルとして、「事前のニーズ調査に基づいて」「現在、不安や関心のあるテーマに焦点を当てて行う」「最初に、いつもどうしているか問いかけ、挙手してもらおう」が明らかとなり、「質疑応答の時間を十分設けて」、これらの不安や疑問に対して、一つ一つ「丁寧に答え」、「表出された放射線に関する生活上の心配・不安に対応する」ことが有効な実践として抽出された。講義形式で一方向的に知識を伝えるのではなく、住民のもっとも不安や疑問を抱えていることに焦点を当て、丁寧な個別の対話が有効であった。また、住民が生活上の心配や不安を表出できるためには、それができる「場と雰囲気の設定」が不可欠であった。親子広場や高齢者のデイクラブなど、既存の事業の中で放射線防護の事業を組み込むことで、住民はいつもの雰囲気の中で、不安や疑問の表出がし易くなる。顔見知りの地区担当保健師がいることで、住民が安心できる雰囲気がつくられ、また、保健師が専門家の放射線に関する内容をわかりやすく、地元の言葉で住民に翻訳することで、住民の理解を促進すると考えられた。また、放射線防護の専門家も住民に緊張や脅威を与えないように、その場や雰囲気になじむ行為を意識して行うことが大切であった。

放射線防護行動を日常生活に取り入れることにつなげるためには、住民の生活に即した放射線の知識とスキルを伝える必要がある。「地区や対象ごと」に、対象特性や生活実態に即した情報提供を行うよう努力しないと住民には受け入れられない。また、自分のこととして問題を捉え、自分自身が判断することが、日常生活において放射線防護行動を行うためには必要となる。住民の不安や疑問について、どのような行動をとるべきか、選択肢を示し、「住民自身が判断することを伝える」ことを意識して行うことが必要であることが明らかとなった。

2) 放射線防護文化形成のために有効な実践

住民が、日常的に放射線防護行動ができるようになる、すなわち放射線防護文化を形成するためのキーワードは、「継続」と「社会的価値として共有されること」である。

(1) 地域住民（地域社会）に認知され、共有された知識・行為とするための実践

放射線防護に関する知識やスキルをもち、日常生活に放射線防護行動を取り入れることが、住民の住む地域社会で重要な価値として共有されれば、人々の放射線防護行動は当たり前となり、ネガティブな感情を伴うことなく継続されると考えられる。

本研究事業における放射線防護文化形成のための住民に対する実践においても、社会的価値として共有されることにつながる具体的な実践が抽出された。「地区ごと、対象ごとに行う」「地区や参加者の行事・イベントに合わせて行う」「同じ地区・属性・背景の対象者で質疑応答を行う」「皆で共有できる形で、質疑応答の時間を十分設ける」といった、住民が居住する地域社会を意識し、放射線防護の知識・スキルを住民間で共有できるような実践が重要である。そのために、地区や対象の生活実態を踏まえた情報提供が不可欠である。

(2) 放射線防護文化形成のための継続システムの構築

既存の保健事業は、住民のもっとも基本となる地域社会（community）で行われる。研究フィールドでは、それは「地区」と呼ばれ、地区ごとに担当保健師がおり、対象や目的に基づいて毎年行われていることから、既存の保健事業に放射線防護事業を組み込む形態自体が放射線防護行動を当たり前に行うという価値を、地域社会で共有するための継続システムとして機能すると考えられる。復旧期の現在では、放射線に関する講演会等で特別に実施される事業には、住民が抵抗感を示す場合があり、また、不安や心配を抱えていても、表面的には放射線に関するニーズを表出しない、あるいは地域社会が表出できない雰囲気にあることもある。放射線防護事業を既存の保健事業に組み込むことで、無理なく放射線防護の知識とスキルを伝えるきっかけになると考えられる。

一方で、このような既存の事業と放射線防護に関する事業を組み込むだけでなく、対象となる住民を拡大したり、民生委員あるいは養護教諭など、地域社会における重要な関係者との連携・協働を拡大して行う事業を考えることによって、放射線防護文化を広げ、根付かせることができると考えられる。

(3) 放射線防護文化形成の核となる保健師支援

①放射線防護の専門家との協働事業における支援

既存事業に、放射線防護事業を組み込む形態は、地区の保健師がその必要性を認識しない限り、実施されない。本研究では、保健師と放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者との協働事業を通して、保健師は住民のニーズや潜在的な問題を知ることができ、また、放射線や放射線防護の知識やスキルを理解し、放射線防護の専門家の住民対応を学ぶことができていた。このことは、保健師が、放射線に関する住民支援の必要性について意識を高め、放射線に関する学習への意欲につながった可能性が考えられた。

「協働事業の前後で事業の話し合いや保健師の相談支援の時間を設ける」ことは、スムーズな事業実施に貢献しただけではない。事業実施後の保健師と放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者との話し合いの時間では、保健師から地区に特有な放射線に関する問題が専門家に相談され、回答を得ることで、保健師の安心につながっていた。また、事業実施やその振り返りによって、保健師は住民には潜在的な不安や心配があることに気づき、また協働事業に参加して、住民からの安心したという言葉聞いたことから、地区の放射線に関する問題に目を向けることの重要性に気づいていった。さらに、保健師は、住民の生活の中で日々生じる健康問題や、子どもの成長に伴って生じる問題に関連して放射線の話ができ、放射線の基礎知識を持ちながら、生活に即した助言を提供できるのは保健師であることなど、保健師の役割に気づいていった。このように、保健師が放射線防護文化形成における自身の役割を認識し、自身の役割遂行のためにエンパワーメントされるためには、放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者と「事業の準備から実施、振り返りまで対話しながら共に行う」必要があり、特に実施後の振り返りが重要であった。

また、放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者の「保健師自身が自分たちの思いや経験を表出できるようにする」「是認、支持的共感などを示す」ことが有効な実践として抽出された。

放射線防護文化形成のためには、核となる保健師と協働で事業を実施すること、保健師が自身の役割を認識し、その役割遂行に動機づけられるような、放射線防護の専門家や研究者との関係性やかかわりが必要である。

②保健師が住民支援に活用できる媒体の作成

すべての保健事業において、また長期にわたって、保健師が放射線防護の専門家との協働事業を行うことはできない。住民の日常生活の中で生じた放射線に関する問題にタイムリーに対応し、今後、主体となって放射線防護文化を形成するのは保健師である。しかし、保健師は看護師・保健師の基礎教育において、放射線に関する基礎的な教育を受けていない現状にある⁶⁾。そこで、本研究では、保健師が住民支援に活用できるリーフレットを研究フィールドの保健師と協働で作成した。リーフレットは様々な場面で使用されていたが、放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者と複数回協働事業を実施した経験のある保健師は、より多くの場面でリーフレットを使用しており、またリーフレットについても肯定的な評価であった。放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者との協働事業の経験のない保健師は、リーフレットを保健センター内に置いておくのみなど、消極的な活用であった。リーフレットは相談の際に手渡して説明する、講話の際に資料として配布して説明するなどの活用が必要であり、保健師の活用しようとする意識と活用方法の理解が必要となる。協働事業を実施する中で、活用方法を伝えていく、あるいはリーフレット活用のための研修を実施するなどが必要であろう。今後も継続して、さらに使いやすいリーフレットにするために、保健師と協働で修正・作成していく必要がある。

(4) 住民と保健師支援に不可欠な専門家のあり方

協働事業において、住民に知識とスキルを伝え、日常生活に放射線防護行動を取り入れることにつながるために有効な実践には、放射線防護の専門家・研究者自身が、協働事業実践の場や雰囲気になじむ行為を意識して行うこと、住民との対話が重要であった。また、放射線防護文化形成の核となる保健師が、自身の役割を認識し、その役割遂行に動機づけられるようエンパワーメントするためには、「事業の準備から実施、振り返りまで対話しながら行う」「保健師と放射線防護の専門家・公衆衛生看護の研究者が共に考える」「放射線防護の専門家が学ぶ姿勢を持つ」といった専門家の姿勢と保健師との関係性がとりわけ重要であった。

これは、放射線防護の専門家が一方的に教えるという一方通行の関係ではなく、専門家は住民や保健師と対等で、互いに学び、かつ信頼し合える関係性を築く必要があり、そのためには、共に活動し、対話し、専門家はむしろ、学ぼうとする姿勢が必要であることを示している。これは、放射線防護文化形成のために、**stakeholder** と関わること、共に活動すること、対話の場をつくることの必要性を示した **Lochard²⁾** の見解と一致するものである。

2 放射線防護の知識とスキルの全国への普及：全国規模の放射線防護文化形成に向けて

本研究事業で作成したリーフレットを冊子化して、全国の市町村に配布し、感想を求めたところ、冊子がわかりやすく参考になるとの理由から、追加で送付希望があった。これは、リーフレットが被災地以外でも求められていること、および活用可能であることを示している。原発事故から現在まで、放射線と放射線防護の情報提供は主に被災地中心であった。被災地以外の自治体の地域保健担当者や保健師も、原発事故発生に伴う住民の不安に向き合ったと推察されるが、十

分な専門的な知識の提供がなかったのではないだろうか。今後は、原発災害被災地以外の自治体への情報提供も必要であろう。

3 放射線防護文化形成のための体制整備

放射線防護文化形成のために、放射線防護の専門家と保健師が既存の保健事業で協働することが有効であることがわかった。放射線防護の専門家との協働事業に関しては保健師からの要望もあり、このような協働事業が継続して可能となるような予算措置、人員配置等の対策が望まれる。

また、放射線防護文化形成のためには、日常生活上の放射線に関する住民からの相談に応じることができる、保健師に対する放射線教育が必要である。看護師・保健師の基礎教育並びに保健師の現任教育において、必要な内容を吟味した上で、放射線に関する教育を充実するための対策が早急に必要である。

V 結論

本研究は、原発事故後、低線量下にある地域住民に、実際的な「放射線防護文化」を形成するための実践モデルを明らかにすることを目的とし、自治体保健師と、放射線防護の専門家および公衆衛生看護の研究者がチームを組んで、協働で研究活動を行うアクションリサーチを行った。放射線防護文化形成のための実践モデルを①住民に対する実践、②保健師活動の支援、③近隣市町村、福島県、全国への実践モデル（普及・啓発）、の3つに類型化し、効果的な実践を明確化して抽出するための活動を行った。その結果、以下が明らかとなった。

- (1) 放射線防護文化形成の実践モデルとして、既存の保健事業に放射線に関する相談・講話等事業を組み込んだ、保健師と放射線防護の専門家との協働事業が有効であることがわかった。
- (2) 住民に知識とスキルを伝え、日常生活に放射線防護行動を取り入れることにつなげるために、住民のもっとも不安や疑問を抱いていることに焦点を当て、丁寧な個別の対話が有効であった。また、住民が心配や不安を表出できる場と雰囲気の設定、および対象特性や生活実態に即した情報提供、住民自身が判断することを意識して伝える実践が必要であることが明らかとなった。
- (3) 放射線防護文化形成のためには、放射線防護の知識とスキルをもち、日常生活に放射線防護の行動を取り入れることができるようにすることが、社会的価値として共有される必要がある。そのための実践として、地区や対象の生活実態を踏まえた情報提供、住民が居住する地域社会を意識し、放射線防護の知識・スキルを住民間で共有できるような実践が必要であった。
- (4) 放射線防護文化形成の核となる保健師の支援として、事業の協働実践、事業前後の協働ミーティング、実施後の放射線に関する相談と振り返りが重要であった。保健師は、協働事業から住民ニーズ、放射線防護の専門家から放射線に対する知識と住民対応を学び、放射線に関する相談から安心感を得、振り返りから自身の役割を認識し、役割遂行に向けてエンパワーメントされていた。それには放射線防護の専門家との関係性や専門家の姿勢およびかかわりが重要であった。
- (5) 保健師支援のための住民向けリーフレットを保健師と協働で作成した。保健師の評価では、放射線防護の専門家・研究者と複数回協働実践した経験のある保健師は、リーフレットをより多様な場で、積極的に活用し、評価も高かった。

- (6) 保健師と協働実践するには、放射線防護の専門家・研究者が保健師と共に活動すること、対等で信頼し合える関係性の構築、学ぶ姿勢が必要であることが示唆された。
- (7) 冊子化したリーフレットを全国の自治体に配布したところ、追加配布希望があり、原発事故被災地以外の自治体でのリーフレットの活用可能性と、放射線および放射線防護の情報提供の必要性が示された。
- (8) 放射線防護の専門家と保健師が既存の保健事業で協働する事業が継続されるような対策が必要であること、また、保健師が住民の日常生活上の放射線に関する相談に応じることができ放射線教育について、早急に検討する必要があることを提案した。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) 麻原きよみ. 健康課題としての放射線防護—保健師による実際的な活動モデルに向けて① 原子力災害復旧期における保健師活動—放射線防護文化の形成をめざして—. 保健師ジャーナル. 2014; 70: 424 - 428.
- 2) 川崎千恵, 小西恵美子, 小野若菜子. 健康課題としての放射線防護—保健師による実際的な活動モデルに向けて② 自治体保健師が抱える住民支援困難とそこから見えてきた課題. 保健師ジャーナル. 2014; 70: 538-541.
- 3) 大森純子, 小西恵美子, 麻原きよみ. 健康課題としての放射線防護—保健師による実際的な活動モデルに向けて③ 保健師の実践へのヒント①ベラルーシ視察報告から学ぶ. 保健師ジャーナル. 2014; 70: 626-630.
- 4) 折田真紀子. 健康課題としての放射線防護—保健師による実際的な活動モデルに向けて④ 保健師の実践へのヒント② 川内村における放射線専門保健師の活動報告. 保健師ジャーナル. 2014; 70: 726-730.
- 5) 三森寧子, 小西恵美子, 大森純子,他. 健康課題としての放射線防護—保健師による実際的な活動モデルに向けて⑤福島県A市の保健師と放射線防護専門家・公衆衛生看護研究者との協働実践—母子保健事業における実践モデル. 保健師ジャーナル. 2014; 70: 828-833.
- 6) 小野若菜子, 折田真紀子, 麻原きよみ. 健康課題としての放射線防護—保健師による実際的な活動モデルに向けて⑥ 山間部に住む高齢者への放射線に関するミニ講座の取り組み—効果的实践と課題. 保健師ジャーナル. 2014; 70: 914-918
- 7) 小林真朝, 菊地透. 健康課題としての放射線防護—保健師による実際的な活動モデルに向けて⑦保健師と放射線防護専門家・公衆衛生看護研究者との協働実践—精神保健事業におけるミニ講座の取り組みを通して考えること—. 保健師ジャーナル. 2014; 70: 1014-1017.
- 8) 矢吹敦子, 小西恵美子, 川崎千恵, 他. 健康課題としての放射線防護—保健師による実際的な活動モデルに向けて⑧保健師の健康支援に必要な情報と媒体—協働によるリーフレットの作成—. 保健師ジャーナル. 2014; 70: 1104-1108.
- 9) 小西恵美子, 菊地透, 麻原きよみ. 健康課題としての放射線防護—保健師による実際的な活動モデルに向けて⑨保健師と看護学生に放射線を教える・学ぶ—2つのアクションリサーチから—. 保健師ジャーナル. 2014; 71: 78-82.
- 10) 麻原きよみ. 保健師に求められる放射線教育. 医療放射線防護. 2014; 70: 34-37.
- 11) 小西恵美子. 看護師と保健師の放射線教育. 医療放射線防護. 2014; 70: 49-52.

引用文献

- 1) International Commission on Radiological Protection: Application of the Commission's Recommendations to the Protection of People Living in Long-term Contaminated area after a Nuclear Accident or a Radiation Emergency. ICRP Publication 111. London: Elsevier, 2009; 12.
- 2) Lochard J. The ICRP System of Radiological Protection and the Human Dimension –Some Reflections about Chernobyl and Fukushima-. Dec. 12, 2014,平成 26 年度医療放射線防護連絡協議会年次大会講演資料.
- 3) 小西恵美子. 放射線災害からの復興支援における専門看護師の役割. 日本放射線看護学会誌. 2014; 2: 55.
- 4) 岡本玲子. アクションリサーチ, グレグ美鈴他, 編. よくわかる質的研究の進め方・まとめ方. 東京: 医歯薬出版, 2008; 141-158
- 5) Anderson J Eppard J. Van Kaam's Method Revisited, Qualitative Health Research 1998; 8: 399-403.
- 6) 小西恵美子. 看護師と保健師の放射線教育. 医療放射線防護. 2014; 70: 49-52.

Multidisciplinary action research on the Public Health Nurses' initiative in promoting a practical radiation protection culture in Fukushima

Kiyomi Asahara

St. Luke's International University

Keywords: Fukushima Nuclear accident; Public health nurses; Practical radiation protection culture; Action research

Abstract

Purpose

This collaborative study aimed to promote a practical radiation protection culture in an exemplar community in Fukushima. The residents' unhealthy and unnecessarily protective lifestyle persists due to fears and misunderstandings about radiation exposure.

Design

The study was framed by the concept 'practical radiation protection culture' which was understood as 'practical knowledge and skill enabling each resident to make choices and behave wisely in a post-nuclear accident low level radioactively contaminated environment'. Action research was directed to: the residents in the community (practice model 1), the public health nurses (PHNs, practice model 2), and the larger society (practice model 3).

Method and Results

Practice model 1: To deal with post-nuclear accident public health challenges, PHNs in sub-communities developed radiation teaching sessions as part of their routine health programs for specific target populations such as elderly persons, mothers of young children or persons with psychiatric problems. Working with those PHNs, we gave face-to-face interactional lectures to the targeted residents' small group that addressed issues in their daily life such as eating, drinking and outdoor activities in combination with the provision of updated radiation monitoring data related to those activities. The interactions, conducted in five sub-communities, eased the residents' anxieties about radiation and encouraged them to regain their normal life style.

Practice model 2: To assist PHNs' practice, we had regular meetings with PHNs to share their concerns, evaluate the effectiveness of radiation teaching sessions given to residents, and explore residents' needs. Also, we developed an informative pamphlet that described the residents' daily living and activities in a low-level radioactively contaminated environment. These assistive efforts promoted mutual understanding and trustful relations with the PHNs and served as a practical radiation teaching for those nurses. The effectiveness of the pamphlet is being evaluated as PHNs have begun to use it in their practice.

Practice model 3: the pamphlet was distributed to major municipalities outside Fukushima. The feedback comments will be analyzed and reported when the collection of feedbacks is completed.

Conclusion

PHNs are professionally prepared to collaborate with appropriate professionals, thus they can take the initiative in the promotion of a practical radiation culture in the communities where they serve. Effective and practical risk communication with residents who live in low level radioactively contaminated areas is achieved when this is given face-to-face as part of the local PHNs' health programs. This collaborative approach has empowered the residents, PHNs and researchers by promoting mutual understanding and trustful relations.