

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度年次報告書（詳細版）

研究課題名	動物実験を用いた慢性的低線量内部被ばくによる突然変異と発がんの非相関性のメカニズム解明
研究期間	令和3年4月1日～令和4年2月28日

	氏名	所属機関・職名
主任研究者	中島 裕夫	大阪大学放射線科学基盤機構・准教授
分担研究者	大野 みずき	九州大学大学院医学研究院・助教
分担研究者	石原 弘	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・専門業務員

	氏名	所属機関・職名
研究協力者	續 輝久	九州大学アイソトープ総合センター・学術研究員
研究協力者	遠藤 暁	広島大学大学院工学研究科 環境解析学、放射線・化学物質影響科学・教授
研究協力者	宇野 賀津子	公益財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター 免疫機能と病気との関連の研究・研究員
研究協力者	中島 裕美子	九州大学アイソトープ総合センター・教授

研究要旨	<p>東日本大震災に伴って発生した福島原発事故直後よりクローズアップされ社会問題となった低線量放射線内部被ばくの懸念は、究極的には被ばくによる突然変異と発がんへの影響の存否とその度合いにある。</p> <p>放射線は、遺伝子突然変異とがんの誘発に有力な因子であると考えられている。さらに、ICRPの放射線防護では閾値なしの直線的作用仮説¹⁾が採択されていることから、微量の放射線でもこの突然変異を起こすことで致死的発がんが誘発されると考えられている。しかし、我々の行った突然変異やがんを起こしやすい <i>Msh2</i> 遺伝子改変マウス系統を用いた先行研究では、誘発突然変異率が同じでも酸化ストレスを誘発する化学物質 (KBrO_3) の飲水投与では発がんするのに対して、放射性崩壊に伴い γ 線を発生する ^{137}Cs 放射線の慢性的低線量内部被ばくでは発がんが認められないことを観察している。この突然変異と発がんが相関していない現象のメカニズムを突然変異の高感度検出系であるマウス系統を用いて解明するとともに、どの程度の内部被ばくまでは発がんの心配をしなくて良いのかの判断材料を実験結果として提示し、これまでの我々の研究成果や多くの疫学研究によって示されている</p>
------	---

	<p>結果と合わせて総合的に評価することを目的として実験を行った。</p> <p>その結果、<i>Msh2</i> (-/-)マウス系統における小腸の体細胞突然変異率は4週間の¹³⁷Cs水 (2500000Bq/l) (76.6 mGy)、もしくはKBrO₃水 (0.15%)の摂水で同じになることがわかった。この、同じ突然変異率を示す条件下でも腸管の発がん率は¹³⁷Cs群で33.3%、KBrO₃群で100%。個体あたりの平均腫瘍数では¹³⁷Cs群で0.4個、KBrO₃群で13.5個と、同等突然変異を生じる¹³⁷Cs放射線量の発がんへの寄与率は化学発がん物質 (KBrO₃) より低いことがわかり、放射線の発がんは化学物質よりもマイルドであることが示された。また、放射線高感受性系統である<i>Msh2</i> (-/-)マウスでは、総被ばく線量38.4mGyと76.7mGyの間に突然変異率増加の閾値が認められた。</p> <p>血漿サイトカイン測定では、¹³⁷Cs群において対照群に比して有意な抗腫瘍免疫系 (Th1) の活性化が認められ、発がんの抑制に関わっている可能性が示唆された。そこで、遺伝子発現解析を行った。その結果¹³⁷Cs投与群で非投与群に比較して多くの遺伝子で発現変動が見られ、KBrO₃投与群と¹³⁷Cs投与群の比較においては、免疫系、炎症系のシグナルパスウェイに相違が見られた。加えて<i>Msh2</i> (-/-)マウスでは細胞死や細胞増殖に関わる経路に関与する遺伝子で発現変動が見られた。このことより上記で認められている¹³⁷Cs群におけるがん抑制結果とともに、がん治療で散発的に認められるアブスコパル効果にも関与している可能性が考えられた。</p> <p>100000Bq/lの¹³⁷Cs水を18世代飲み続けたA/J野生型マウス (一世代あたり約37mGy)の全ゲノム解析では対照群との間で塩基配列変異に差はなかったことと合わせて、一般食品中の放射性セシウム濃度の基準値100Bq/kgは、本研究条件での無作用量の1000分の1、高感受性マウスでの作用量の25000分の1にあたり、妥当な設定値と考えられた。</p> <p>¹³⁷Csのセミマイクロ濃度測定 (Photon 励起 X線発光分析 1.4MeV-Photon (microPIXE))を行った結果、顕著な¹³⁷Csのピークを認めず、腸管内の微小構造域での特異的な¹³⁷Csの集積はなく、ほぼ均一に¹³⁷Csが分布して、特段の濃度差はないことがわかった。このことから、線量評価においては、これまでの組織重量当たりのBqで問題ないと考えられた。</p>
キーワード	低線量放射線、セシウム 137、内部被ばく、突然変異、発がん、福島第一原発事故

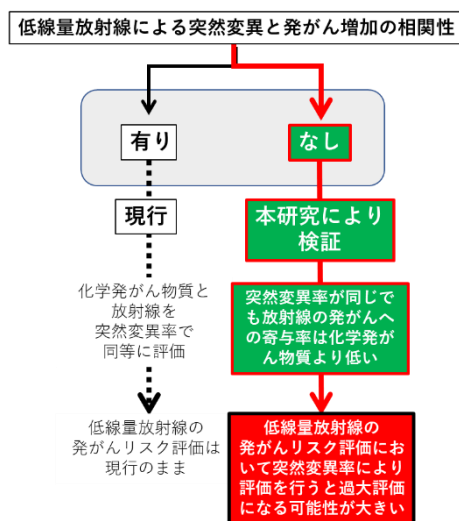
I 研究目的

福島原発事故による低線量被ばくが人々の遺伝子や発がんへの影響の不安を招く要因のひとつになっている。これまでの我々のマウスを用いた研究では、20世代以上にわたりセシウム-137水 (^{137}Cs) (100 Bq/ml) を摂取し続けて慢性的曝露 (マウス体内で80~160 Bq/g体重。ヒトでは100,000 Bq/kg体重で400年の世代交代に相当) したA/Jマウス子孫において、同一祖先由来の同世代対照群に比べて塩基配列変異率の有意な変化が認められなかった。また、ウレタン誘発肺腫瘍の発がん率は ^{137}Cs 投与群と対照群で有意差は認められなかったが、腫瘍増殖は ^{137}Cs 投与群で線量依存的に抑制された。さらに、*Msh2*遺伝子改変マウス系統を用いた突然変異と発がん性を同時に高感度検出できる系²⁾では、化学物質で認められる突然変異と発がんの相関性が低線量放射線では認められなかった。このことから、低線量放射線被ばくではこれまでの常識とされている次世代への影響や突然変異と発がんのメカニズムが異なっている可能性や、発がん作用が化学物質よりマイルドである可能性が示唆された³⁾。 ^{137}Cs は放射性崩壊の過程で、その約95%が β 線と γ 線を出して、また残りの約5%が β 線を出してバリウム137に変化する。低LET放射線である γ 線の生物影響は、水の放射性分解による活性酸素種の生成によるものが約3分の2と言われているが⁴⁾、酸化ストレスを誘発する化学物質 (KBrO_3) とは異なる酸化DNA損傷を誘発するのかもしれない。このことは遺伝子改変マウスに導入したレポーター遺伝子の変異スペクトラムの詳細な解析並びに全ゲノム解析を行うことで、明らかにすることが可能である。どのような変異スペクトラムが発がんに大きく寄与するのかの解明を試みた。

図1に示すように、この現象の原因を解明することで、これまで、放射線と化学物質で突然変異率が同じになる量であれば、発がんリスクも同じとして評価していた発がんリスクを、変異スペクトラムまでを含めた新たな観点によるリスク評価を提案することが本申請研究の目的である。また、DNA修復欠損の*Msh2*遺伝子改変マウスを放射線高感受性のヒトと想定すれば、低線量内部被ばく影響が自然状態 (DNA修復能がある野生型) では検出限界以下でも放射線感受性が高く鋭敏に影響を受ける可能性のあるヒトの検出モデルとみなせる。この感受性の幅を考慮し、突然変異と発がんの相関性を検討する本研究成果は、これまでのリスク評価にはなかった、ヒトでの放射線感受性の幅を考慮した世界でも初めての影響評価であり、放射線の基準値設定に際して安心の根拠として役立てられるのではないかと考えた。

さらに、本研究で見出される放射線誘発による特異的な免疫反応や臓器の発現遺伝子の同定には、微量放射線による健康影響リスク評価のための根拠解明のみならず、被ばく線量の推定や低線量被ばくを利用した新たな疾病治療への応用の可能性も考えた。

図1 研究概要と予想される成果

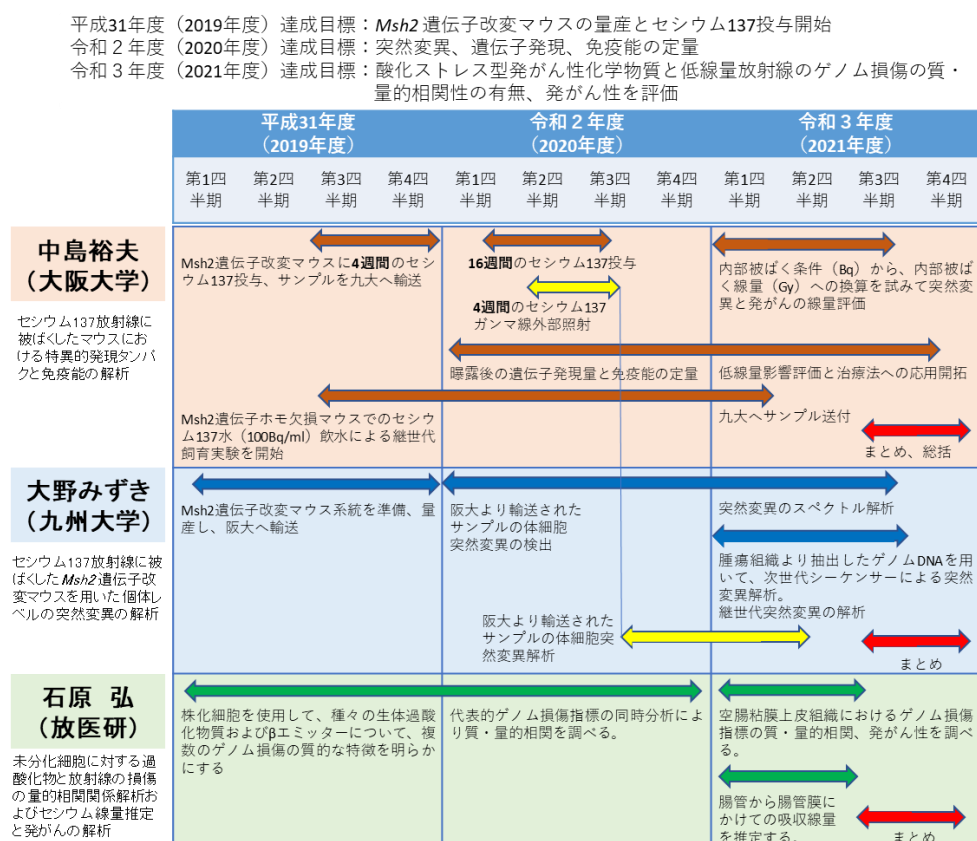


II 研究方法

II-1 研究の概略と3年間の研究計画

以下に3年間における各年度の達成目標と、図2には、そのための各研究者のマイルストーンを示す。矢印で囲まれた期間内で、それぞれの研究を行い、年度目標の達成を試みた。黄色矢印は、平成31年度の結果報告に対する審査委員からの提案に対応して、新たに加えた研究計画を示している。当初の予定通り年度の目標は期間内に大方達成された。

図2 各研究者のマイルストーン



II-1-1 平成31年度 (2019年度) 達成目標: *Msh2* 遺伝子改変マウスの量産と ¹³⁷Cs 投与開始

- *Msh2* 遺伝子改変マウス系統、*Msh2* 遺伝子改変+*rpsL* レポーター遺伝子トランスジェニックマウス系統の準備と量産体制の整備。(石原)
- *Msh2* 遺伝子改変マウスを阪大へ輸送し、突然変異実験としての ¹³⁷Cs 水 (2500 Bq/ml) を自由摂水させる4週間の投与。(中島)
- 九大で同じマウスを用いて、KBrO₃ 投与による突然変異と発がんの実験を開始。(大野)
- *Msh2* 遺伝子改変マウス系統での ¹³⁷Cs 水の飲水による継世代飼育実験を開始。(中島)

II-1-2 令和2年度 (2020年度) 達成目標: 突然変異、遺伝子発現、免疫能の定量

- ¹³⁷Cs 水または KBrO₃ (0.15%) 水を4週間飲水投与したマウスの小腸における体細胞 DNA 塩基配列変異率が KBrO₃ 水の DNA 塩基配列変異率と同等な変異率を示す ¹³⁷Cs 線量を求めた。(大野)
- 曝露後の遺伝子発現量と免疫能の定量。(宇野・大野・中島)
- 小腸発がん実験のために *Msh2*^{-/-}マウスに ¹³⁷Cs 水、もしくは KBrO₃ 水を16週間飲水投与

- させ、臓器組織サンプルを採取して凍結保存。(大野)
- 内部被ばくと同等線量の外部被ばくをさせるために4週間の¹³⁷Csガンマ線(2.74mGy/day)(合計線量 76.72mGy)外部照射を行い、同等線量の内部被ばくと外部被ばくの突然変異率を比較。(中島)
 - 消化管部位ごとの¹³⁷Cs分布分析のために放射光 eV と¹³⁷Cs量の検量線を求めた。(石原)

II-1-3 令和3年度((2021年度))達成目標:酸化ストレス型発がん性化学物質と低線量放射線のゲノム損傷の質・量的相関性の有無、発がん性を評価

- ¹³⁷Cs(2500 Bq/ml)、KBrO₃((0.15%))水溶液16週間飲水投与による小腸発がん実験(大野)
- ¹³⁷Cs(2500 Bq/ml)、KBrO₃((0.15%))の4週間飲水投与後の小腸での遺伝子発現解析(大野)
- 内部被ばく条件(Bq)から、内部被ばく線量(Gy)への換算を試みて突然変異と発がんの線量評価(遠藤)
- 腫瘍組織より抽出したゲノムDNAを用いて、次世代シーケンサーによる突然変異解析
- 小腸組織内セシウムのセミマイクロ濃度測定(石原)

II-2-1 実験用マウス系統の選定と準備

Msh2 遺伝子遺伝子改変 C57BL/6J マウス系統

低線量被ばく影響の主な要因を酸化ストレスと想定して、酸化ストレスに高感受性を示し、酸化剤(KBrO₃)によって消化管がんを高発するDNAのミスマッチ修復ができない*Msh2*遺伝子をホモ欠損させた遺伝子改変マウスを用いることとした。変異検出用遺伝子(レポーター遺伝子)を導入した*Msh2*遺伝子ホモ欠損マウス(*Msh2*^{-/-}・rpsL-Tg⁺)と野生型(*Msh2*^{+/+}・rpsL-Tg⁺)、およびそのコントロールとしてレポーター遺伝子を保持しない*Msh2*遺伝子ホモ欠損マウス(*Msh2*^{-/-}・rpsL-Tg⁻)と野生型(*Msh2*^{+/+}・rpsL-Tg⁻)をそれぞれ九州大学で作成、繁殖させ、曝露実験を行う大阪大学へ輸送した(大野)。

A/J マウス系統

平成27年~29年に行った放射線健康管理・健康不安対策事業の受託研究より引き継いだ¹³⁷Cs水(100Bq/ml)を自由摂取させて兄妹交配により世代交代させているA/Jマウス系統と同腹仔由来の対照(真水の飲水)系統を本研究においても、さらに30世代以上継続的に維持した(中島)。

II-2-2 ¹³⁷Csのマウス体内動態

これまでの実験結果から図3aに示すように、マウスが100 Bq/mlの¹³⁷Cs水を自由に摂取した場合には、3~4週以降において体内の¹³⁷Cs量は、定常状態になることがわかっている。図3bは、100 Bq/mlもしくは、10 Bq/mlの¹³⁷Cs水を8ヶ月間自由摂取し続けたときの¹³⁷Csの臓器組織内分布量をオートマチックガンマカウンター(2480 WIZARD2, PerkinElmer Co., Ltd., Waltham, MA, USA)を用いて測定したものである^{5,6)}。(中島)

図3 毎日 ^{137}Cs 水を自由摂取したときの臓器別 ^{137}Cs 量の変化と蓄積量

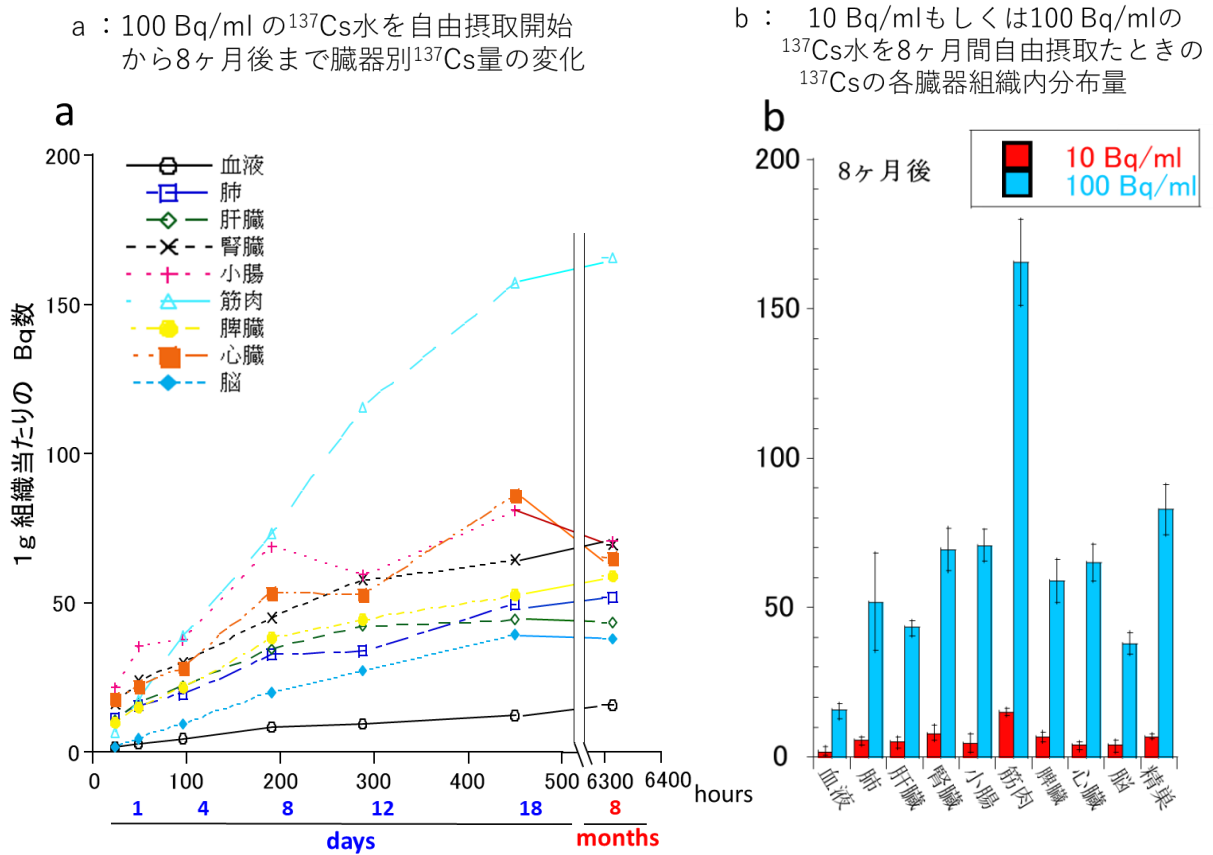
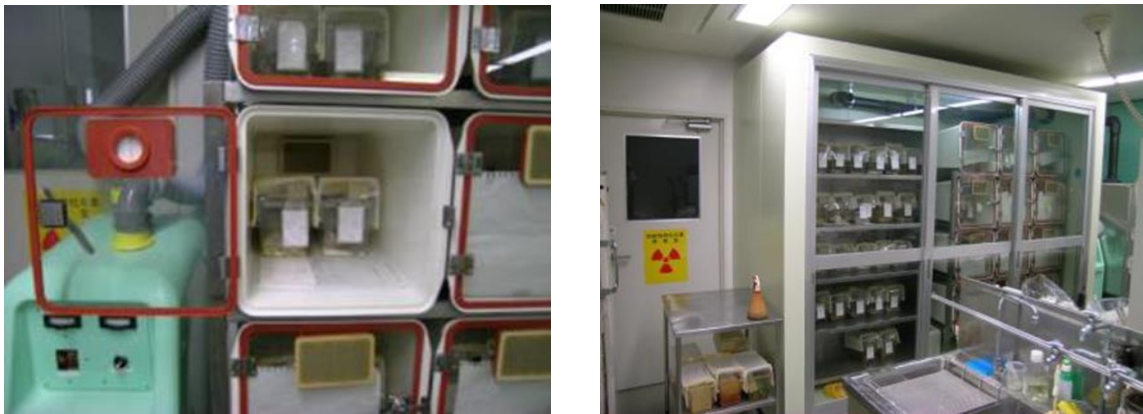


図4 A/J マウスへの ^{137}Cs 水 (100q/ml) 給水による内部被ばく実験



II-2-3 ^{137}Cs 水 (100 Bq/ml) 飲水 A/J マウスの内部被ばく線量評価

表 1 の測定値は、3 か月齢の 4 匹の雄マウスそれぞれ 1 個体の全身をゲルマニウム半導体検出器 (Ge semiconductor detector GC3018 : Canberra Inc., Meriden, CT, USA) にて γ 線測定した基礎データ (雄マウス平均体重 24.8 g、1 個体平均 2313Bq、全臓器組織平均 93.54 Bq/g) を示す。これを基にして、マウス全身を円筒形の水と考えると内部被ばく線量を算出した。算定には、マウス個体を殆ど透過する γ 線の透過率の設定により線量が変わる可能性があるの

で、正確な線量を求めるために、単純物理計算のみならず PHITS、EGS5 コードシステムで求められる線量を総合的に検討した（遠藤・中島）。

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

また、EGS5（Electron Gamma Shower Version 5）はスタンフォード線形加速器センター、高エネルギー研究所、ミシガン大学の協力で開発された電子光子輸送モンテカルロ計算コードで、数 keV から数 100 GeV のエネルギー範囲での電子・光子輸送をシミュレートする汎用モンテカルロ計算コードである。これらの方法を使うことでこれまでに測定された ^{137}Cs を長期投与された A/J、C57BL/6J(Msh2)マウスの体内 ^{137}Cs の Bq 数からマウスの1世代における ^{137}Cs による内部被ばく線量 (Gy)、被ばく線量率を求めた。

表2に単純物理計算 (^{137}Cs のベータ線の平均エネルギーを 0.227MeV、100%吸収、ガンマ線エネルギーは 0.66MeV、5%吸収と仮定して計算)、PHITS、EGS5 コードシステムを用いて得られた1世代(平均108日)あたりの平均積算線量 (mGy) を示す。

その結果、それぞれの算定結果は近い値であり、体重 24.8 g で 93.54Bq/g の条件が続いたと仮定した場合、おおむね1世代(平均108日間)の被ばく線量が 34.55~37.87mGy と算定された。

表 1

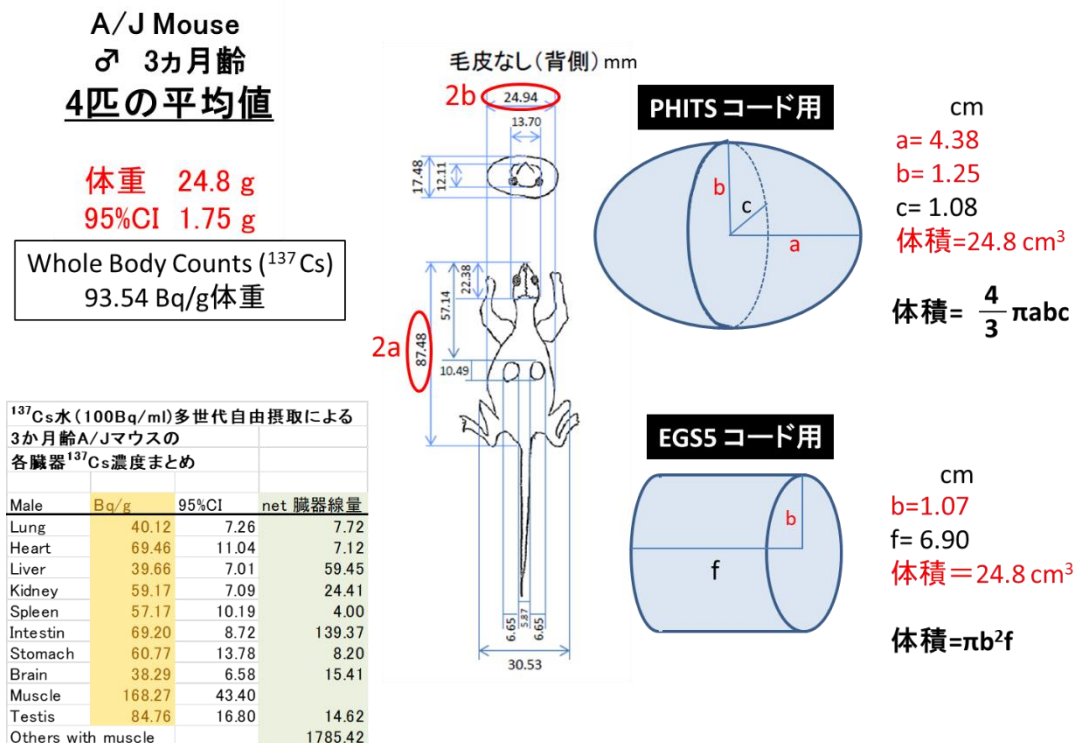


表 2 実験マウスの内部被ばく線量評価

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

*Electron Gamma Shower Version 5

(by Daiji Endoh, Rakuno Gakuen Univ.)

**Particle and Heavy Ion Transport code System

(by Satoru Endo, Hiroshima Univ.)

II-2-4 ^{137}Cs 水 (2500 Bq/ml) 飲水 Msh2 マウスの内部被ばく線量の算定

^{137}Cs 水 (2500 Bq/ml) を自由摂取して体内平衡状態に達すると、筋肉内の ^{137}Cs の濃度は、飲水濃度の 1.6 倍である 4000 Bq/g となる。 ^{137}Cs 水の給水開始時に 4000 Bq/g 体重量のセシウム水を強制的に経口単回投与すると、強制投与分の減衰と日々の自由摂取による平衡までの増加分によって、給水開始時から平衡状態の体内 ^{137}Cs 量による一定線量を暴露させることができる。そこで、 ^{137}Cs 高線量群 (Cs-2) では、4000 Bq/g 体重量の ^{137}Cs を強制的に経口単回投与し、この条件で ^{137}Cs 水を 4 週間自由摂水させ続けた時の各臓器線量 (Bq/kg) とマウス CT 画像より作成したマウスボクセルファントムをもとにして PHITS コードを用いて肝臓の内部被ばく線量率を求めた (遠藤)。なお、低線量群 (Cs-1) では、初日から 2500Bq/ml の ^{137}Cs 水を自由摂取させた (図 5) (中島)。



図 5 Msh2 マウスへの ^{137}Cs 水 (2500 Bq/ml) 投与

II-2-5 外部照射実験

^{137}Cs による内部被ばくと外部被ばく影響の同等性、差異を検討するために内部被ばくと同様のマウス条件で、産業科学株式会社製ガンマ線照射装置 (^{137}Cs 線源、2017.12.1 現在 53.45GBq) にて A/J マウスへの ^{137}Cs ガンマ線外部照射実験を行った (図 6)。(中島)

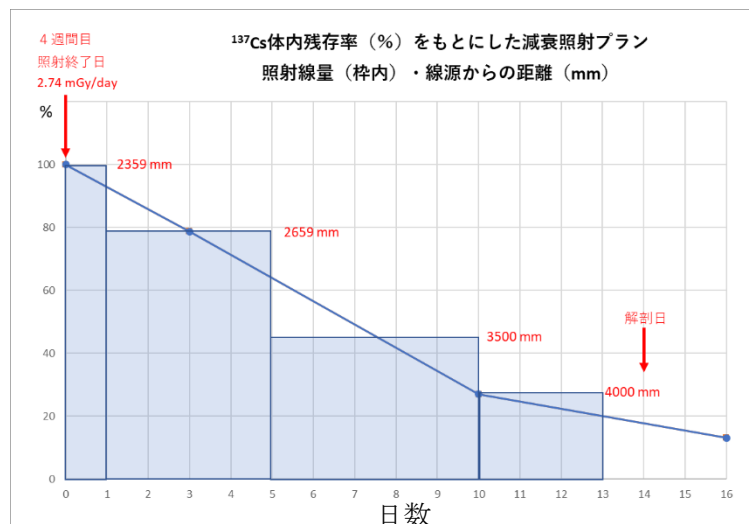
図6 A/J マウスへの¹³⁷Cs ガンマ線外部照射装置と照射状況



4週間にわたる¹³⁷Cs水(2500 Bq/ml)への曝露を停止後、遺伝子解析のノイズを下げるために、飲料水を¹³⁷Cs無添加の水に変更して2週間の休養期間を施している。

外部照射実験では、4週間の¹³⁷Cs水(2500 Bq/ml)飲水による曝露期間の¹³⁷Cs体内平衡状態の被ばく線量率を2.74 mGy/dayと算定し、線源からの距離2359 mmにて、¹³⁷Cs線源からの同等の線量率による照射を行った。また、この休養期間の内部被ばく線量も考慮するために、図7に示す経時的なマウス体内¹³⁷Csの減衰率(青実線)をもとに、内部被ばく線量と外部被ばく線量の被ばく線量率が同等になるようにしながら、総線量が同じになるようにマウスステージと¹³⁷Cs線源の距離を調整して外部照射を行った(中島)。

図7 ¹³⁷Cs水摂取を停止した後の経日的な臓器別¹³⁷Cs量の減衰



(倫理面への配慮)

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

本実験の動物実験に関して、大阪大学においては、大阪大学動物実験規程のもと、動物実験委員会の承認を得た（動物実験計画書：福島原発事故シミュレーションとしての多世代微量放射線内部被ばくによるマウス子孫での遺伝的、生理的影響の検討、承認番号：第 動医 02-005-000号、有効期限：2025/03/31）。なお、放射性同位元素利用施設内での動物飼育については、大阪大学医学系研究科飼養保管施設等設置の承認を受け（承認番号 飼医19-01-0 号）、放射性同位元素利用施設内での実験操作に関しては、大阪大学ラジオアイソトープ総合センター放射線障害予防規程を遵守して行った。

九州大学における遺伝子組換え実験に関しては、「ゲノム安定性維持に関する分子制御機構の生体における機能解析」「DNA傷害の防止並びに修復に関する分子機構の解明」（承認番号：1-57、有効期限：令和6年8月31日）で、また動物実験計画に関しては、「DNA修復機構の破綻による突然変異と発がんの分子遺伝学的研究（A30-147-1） 有効期限：令和2年3月31日）」で機関の承認を得た（2年毎の更新なので期限前に必要な手続きを行った）。令和2年4月より新たに「DNA修復機構の破綻による突然変異と発がんの分子遺伝学的研究」が承認番号：A20-089-0（有効期限：令和4年3月31日）で承認された。研究の遂行にあたっては学内規則を遵守すると共に、動物（マウス）については、規程に従った安楽死措置を施す等、動物愛護に配慮して適切に実験を行った。

放射線医学総合研究所での動物実験では、放射線医学総合研究所の計画承認[受付番号15-1009-3および18-1010実施期間2018/3/16～2022/3/31迄]を受け、実験動物委員会および技術安全部生物研究推進課による指導のもとに行った。また、本研究における外部被ばく・内部被ばく実験に関連する施設等は計画承認を受け[放射線発生装置[承認番号: X-実動-(31-7, 1-6, 2-6)・X-(31-9, 1-8, 2-8)・照-標-(31-1, 1-1, 2-1)・照-C1-(31-1, 1-1, 2-1)・照-低連(31-2, 1-2, 2-2)・照-低-γ(31-4, 1-4, 2-3)、ラジオアイソトープ[承認番号: 非-被-(31-1, 1-1, 2-1)・非-E-(31-6, 1-5, 2-5)]、核燃料物質[承認番号: 非核-被-(31-5-6, 31-20-21, 2-6-7)]はいずれも半年毎に更新し、技術安全部放射線安全課による確認と指導のもとに実施した。本計画における化学物質を使用する実験室は、放射線医学総合研究所技術安全部保安管理課による確認のもと、承認を受けて実施した。

III 研究結果

III-1-1 平成 31 年度（2019 年度）達成目標：*Msh2* 遺伝子改変マウスの量産と ^{137}Cs 投与開始

- マウスの供給体制、各実験群の投与環境、臓器サンプル採取と保存方法の体制確立。
- ^{137}Cs (2500 Bq/ml 水) を自由摂水させて 4 週間投与する突然変異解析実験を行い、サンプル採取して凍結保存を完了した。
- KBrO_3 投与による突然変異と発がんの実験を行い、サンプル採取して凍結保存を完了した。
- Msh2* 遺伝子改変マウス系統での ^{137}Cs 水 (2500 Bq/ml) を飲水した雄に被ばくをしていない C57BL/6 雌マウスを交配して 1 世代目の出生仔体を凍結保存した。

III-1-2 令和2年度（2020年度）達成目標：突然変異、遺伝子発現、免疫能の定量

^{137}Cs 水を自由摂取し続けても3週～4週間ほどで、筋肉では飲料水の ^{137}Cs 濃度の約1.6倍、その他の臓器ではその半量から3分の1の濃度で平衡状態になる（図3）。したがって毎日一定量の摂取を続けても、 ^{137}Cs が体内に蓄積して、右肩上がりに増え続けることなく各臓器での一定の平衡濃度が決まるので PHITS コードなどを用いて、平均内部被ばく線量や1日当たりの被ばく線量率を算定できることがわかった。

レポーター遺伝子を導入したミスマッチ修復欠損の *Msh2* 遺伝子改変マウスでは、酸化剤である臭素酸カリウム (KBrO_3) 0.15%水を飲料水として給水することで、高感度に突然変異を検出することができると同時に高頻度に小腸腫瘍を発生させることが可能である。このマウス系統の特徴を生かして0.15%の KBrO_3 水溶液を4週間給水した時と同じ突然変異率を示す ^{137}Cs 水の投与条件を決めた（2500 Bq/ml 水を給水したときの平衡状態におけるg体重当たりの放射能濃度で4週間給水し続けた場合、総被ばく線量は76.7 mGyとなる）。

突然変異頻度の比較とスペクトラム

図8 突然変異頻度の比較

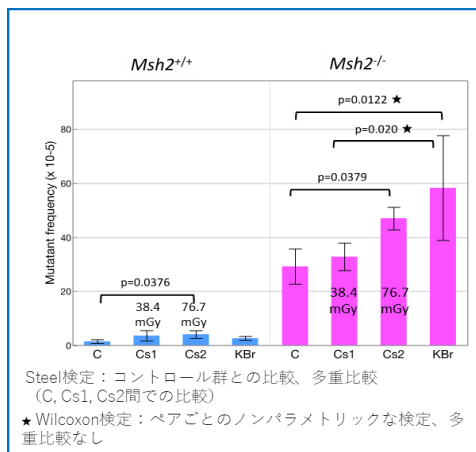


表3 変異スペクトラム

MF ($\times 10^5$)	<i>Msh2</i> ^{+/+}				<i>Msh2</i> ^{-/-}			
	cont.	¹³⁷ Cs-1	¹³⁷ Cs-2	KBrO ₃	cont.	¹³⁷ Cs-1	¹³⁷ Cs-2	KBrO ₃
Base Substitution								
G:C→A:T	0.24	0.23	0.10	0.55	2.10	1.19	3.93	2.41
A:T→G:C			0.42	0.16	1.30	1.19	0.82	1.48
G:C→T:A	0.08	0.23	0.10	0.23	0.17	0.30	0.18	0.19
G:C→C:G					0.11	0.30	0.27	0.19
A:T→T:A	0.08	0.23	0.31		0.23	0.30	0.18	
A:T→C:G			0.10		0.34		0.46	
Frameshift								
1-indel	0.24	0.68	1.15	0.94	0.79	2.09	1.65	1.30
1-indel_A-run	0.16	0.68			23.07	25.66	36.30	51.22
2-indel_Arun			0.10		0.23			
>2bp_del	0.63	1.58	1.67	0.62	0.91	1.79	3.20	1.48
>2bp_ins				0.08				
other			0.10	0.08				
Total	1.41	3.60	4.06	2.66	29.25	32.82	46.99	58.27

Cs-2 群 (76.7mGy) での突然変異頻度は対照群 (非投与群) に比較して有意に上昇し、その値は0.15% KBrO_3 投与群と同程度であった (図8)。

Msh2^{-/-}マウスを使用することで効率的に ^{137}Cs 投与の影響が解析可能となった。なお、Cs-1 群 (38.4mGy) では対照群と差がなかった。 ^{137}Cs 投与によって、両遺伝子型マウスで2塩基以上の欠失が増加した。*Msh2*^{-/-}マウスでは欠失に加えてA塩基の連続配列での1塩基の挿入/欠失の増加を認めた (表3)。

DNA 塩基の欠失変異は、放射線影響の特徴として重要な指標であるが、本研究における解析方法では、欠失が長鎖になるほど検出の制度は落ち、信頼性も悪くなる欠点がある。これを克服するための解析方法には、現時点で多大な費用が必要である。

なお、本研究で得られた、野生型マウスの対照群における突然変異率 ($1.4 \pm 0.70 \times 10^{-5}$) は、これまでの遺伝毒性試験に利用されている種々のトランスジェニックマウスを用いた方法⁷⁻¹⁰⁾での生後約12週齢のC57BL/6マウスの小腸の自然突然変異率とほぼ同程度で得られたデータの信頼性については担保されていると考えている。

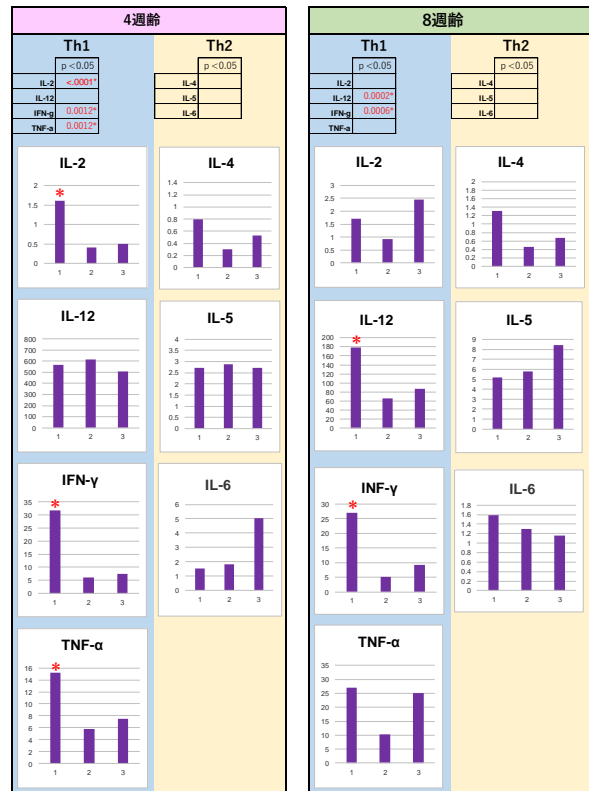
• **免疫能の定量**

¹³⁷Cs 群で認められた発がん抑制は、低線量では、高線量や化学物質とは異なり、炎症が起こらないためであると仮定して炎症反応を確認するために各群の血中サイトカイン (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 13, 17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP1, MIP-1(CCL3, CCL4), RANTES(CCL5), TNF- α) を指標にして免疫能の測定を行った。その結果、炎症反応性を示すサイトカインの上昇は認められなかった。しかし、¹³⁷Cs 群では Dunnett 検定 ($p < 0.05$) により KBrO₃ 群や対照群では認められていない抗腫瘍免疫に関係する IL-2、IFN- γ の有意な上昇が認められた。

表 4 実験マウス匹数

カラムNO.	1	2	3
実験群	¹³⁷ Cs群	対照群	KBrO ₃ 群
4週齢	6	11	19
8週齢	6	7	10

図 9 4週齢、8週齢に ¹³⁷Cs 水を4週間摂取した直後のサイトカイン量



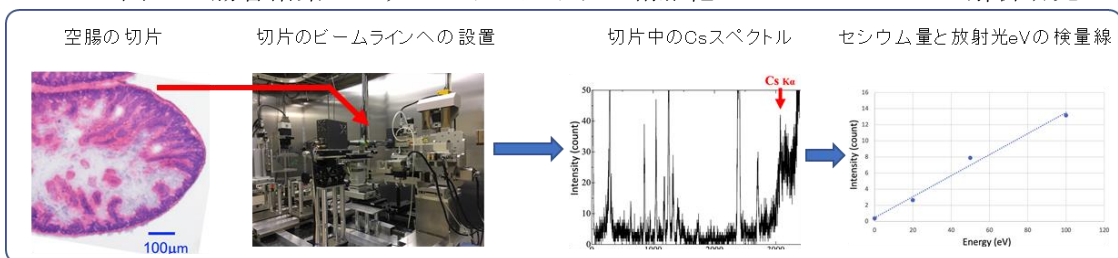
縦軸 pg/ml
 横軸 1: ¹³⁷Cs 2.5kBq/ml 水投与群
 2: Control 対照群
 3: KBrO₃(酸化剤) 0.15% 水投与群

さらに、腫瘍壊死因子である TNF- α の有意な増加も認められることから抗腫瘍作用と炎症作用の免疫能バランス (Th1/Th2) は抗腫瘍性に傾いていることが考えられた。(図 9) (表 4)。

• **放射光 eV と ¹³⁷Cs 量の検量線**

消化管部位ごとの ¹³⁷Cs 分布分析を行うための検量線の検討を行った結果、¹³⁷Cs 量と放射光 eV の検量線を求めることができた (図 10)。(詳細については、研究分担者：石原弘の報告書の SPring-8 による腸切片中のセシウム定量技術開発を参照)

図 10 腸管循環セシウムのだジメトリー精細化のためのセミマイクロ解析研究



- ¹³⁷Cs 水 (2500 Bq/ml) 給水 *Msh2* マウスの内部被ばく線量の算定

マウス CT 画像より作成したマウスボクセルファントムをもとにして PHITS コードを用いて各臓器からの肝臓に対する線量を求める換算係数を算出した (遠藤) (表 5, 6)。¹³⁷Cs 水の給水により ¹³⁷Cs が体内で平衡状態になった時に *Msh2* マウスの各臓器の線量測定を行い、表 5 の換算係数をもとにして肝臓における被ばく線量率を求めた。その結果、2500 Bq/ml の ¹³⁷Cs 水を給水し ¹³⁷Cs の平衡状態時における肝臓の被ばく線量率は、2.74mGy/day で 4 週間の被ばく線量は 76.7 mGy と算定された。

突然変異率の実験における内部被ばく線量 (図 8) は、Cs-1 で 38.4mGy、Cs-2 で 76.7 mGy、発がん実験 (表 7) では、306.9 mGy であった。

表 5 ¹³⁷Cs 内部被ばく臓器線量率換算係数 単位 (μGy/day)/(Bq/kg)

Target organ	¹³⁷ Cs Source organ								total
	Brain	Heart	Stomach	Spleen	Pancreas	Liver	Kidney	Lung	
Liver	1.04x10 ⁻⁸	6.54x10 ⁻⁶	2.21x10 ⁻⁵	4.94x10 ⁻⁶	3.66x10 ⁻⁶	3.08x10 ⁻³	1.39x10 ⁻⁵	1.40x10 ⁻⁵	3.15x10 ⁻³

表 6 *Msh2* マウス全身からの¹³⁷Csによる肝臓の推定内部被ばく線量率

	Brain	Heart	Stomach	Spleen	Pancreas	Liver	Kidney	Lung	Liver 被曝合計 線量mGy/day
Bq/kg	726092	1801202.2	1837707	1226023.7	1832335.4	851826	2367247.5	1252530.4	2.74
μGy/day	0.008	11.852	40.613	6.057	6.706	2623.624	32.905	17.535	76.72 mGy
								4 Weeks	

III-1-3 令和 3 年度 (2021 年度) 達成目標：酸化ストレス型発がん性化学物質と低線量放射線のゲノム損傷の質・量的相関性の有無、発がん性を評価

- 発がん解析の結果

KBrO₃ 群と ¹³⁷Cs 群で突然変異率が同じになる条件で、それぞれの突然変異の DNA 塩基配列変異スペクトルを求めるとともに (表 9)、16 週間の KBrO₃ 群 (26 匹) もしくは ¹³⁷Cs 群 (17 匹) の曝露実験を行って小腸腫瘍の発生率を調べた。その結果、*Msh2*^{-/-}マウスの KBrO₃ 群では 100%のマウスに平均 13 個の腫瘍が発生したのに対して、¹³⁷Cs 群では、33.3%のマウスにしか腫瘍が発生しなかった (個体あたりの平均腫瘍発生数は 0.5 個) (表 7、図 11, 12)。先の実験では、外部照射で 0.5Gy/週 (総線量 4Gy)、4Gy/週 (総線量 68~72Gy)、8Gy/隔週 (72~88Gy) を合計 32 匹に行ったが、小腸腫瘍を発症したマウスは 0 匹であった。このような線量でも発がんが認められなかったことは、放射線による発がん過程が検出できていない可能性が考えられたが、今回の ¹³⁷Cs 水給水実験では、腫瘍が発生していることから、検出系が機能していることは確認できた。

各実験群の処置が終了した時点でマウスから剔出した小腸組織を用いて腫瘍の有無を解析し集計した値を表 7 に示す。*Msh2*^{-/-}マウスでは、酸化剤である臭素酸カリウム (KBrO₃) の 0.15%水溶液を飲料水として経口的に投与することで全ての 4 個体で病理学的組織診断により複数 (平均 13 個) の腫瘍の発生を認めたのに対して (図 11、表 7)、¹³⁷Cs (高

線量 Cs-2) 投与群では 10 匹中 4 匹で腫瘍が検出された (33.3%、うち 3 匹は 1 個の 1 匹は 2 個の腫瘍) (図 12、表 7)。野生型マウスの KBrO₃ 群では 22 匹中 7 匹 (22.7%) で 1 個から 3 個の腫瘍が検出されたが、Cs-2 群では全く検出されなかった。遺伝子型ごとに 3 つの実験群で腫瘍数データを用いた多重検定を行ったところ、*Msh2* 遺伝子欠損マウスの KBrO₃ 群と対照群、KBrO₃ 群と Cs-2 群間でのみ有意差を認めた (Kruskal-wallis test $p=0.0005$ Dunn test $p=0.0004, 0.0156$) (表 7)。同等突然変異率を示す条件での化学発がん率と放射線発がん率が異なることが示された。なお、いずれの遺伝子型マウスでも今回の解析では自然発がんは検出されなかった (対照群)。

表 7 各実験群における解析マウス匹数と小腸の発がん頻度

	<i>Msh2</i> ^{-/-}			<i>Msh2</i> ^{+/+}		
	C	Cs-2	KBr	C	Cs-2	KBr
解析マウス匹数	9	10	4	7	7	22
消化管腫瘍総個数	0	4	54	0	0	7
個体あたりの平均腫瘍個数	0.0	0.4	13.5	0.0	0.0	0.3
標準偏差	0.0	0.7	1.3	0.0	0.0	0.7
腫瘍発生マウス数	0	3	4	0	0	5
腫瘍発生率 (%)	0.0	33.3	100.0	0.0	0.0	22.7

図 11 野生型 (WT)、*Msh2*^{-/-} マウスにおける KBrO₃ 誘発小腸腫瘍のマクロ象と病理組織象 (HE 染色)

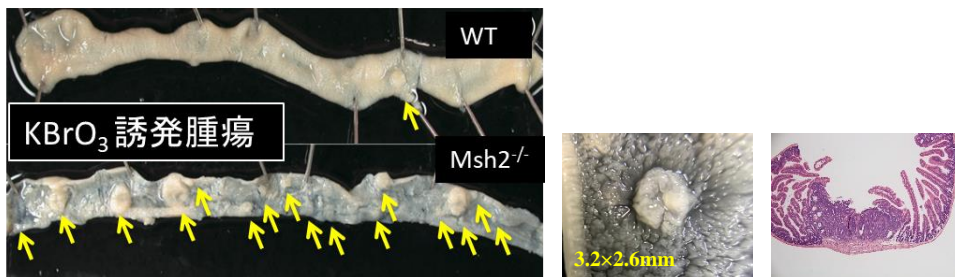


図 12 *Msh2*^{-/-} マウスにおける ¹³⁷Cs 誘発小腸腫瘍のマクロ象と病理組織象 (HE 染色)



• 免疫能の定量と Th1/Th2 バランス

Th1/Th2 バランスとは、免疫能の状態を示すもので、値が 1 より大きいと抗腫瘍性に、1 より小さいと炎症性に傾いていることを意味する。この Th1/Th2 バランスを調べるために図 13 では、対照群に対する ¹³⁷Cs 群もしくは、KBrO₃ の Th1 もしくは Th2 に関するサイトカイン量の相対的な増減を比として求めたのが、¹³⁷Cs/Cont と KBrO₃/Cont である。もし、血漿中サイトカイン量が対照群と同じであれば、値は 1.00 となり、1 より大きければ対照群より高値、1 より小さければ対照群より低値となる。そして、¹³⁷Cs/KBrO₃ は KBrO₃ 群に対する ¹³⁷Cs 群のサイトカイン量比で、1 よりおおきければ ¹³⁷Cs 群が高値、1 より小

さすれば、KBrO₃群が高値であるとなる。その結果、Th1細胞に關係するサイトカイン量は、¹³⁷Cs群で高値、Th2細胞に關係するサイトカイン量は、¹³⁷Cs群とKBrO₃群でほぼ同じ量であった。Th1/Th2の比を求めると、2.5であり、このことから、¹³⁷Cs群では、Th1/Th2バランスが、Th1側に傾いており、抗腫瘍性が優位の状態にあると考えられた(図13)。また、Th1細胞、Th2細胞に關係しない他のサイトカインにも¹³⁷Cs群が有意であるものがいくつか認められた(図14)。図上段は、抗腫瘍性に関係し、下段は炎症に關係するサイトカインである。

図13 対照群に対するサイトカイン量の比とTh1/Th2バランス

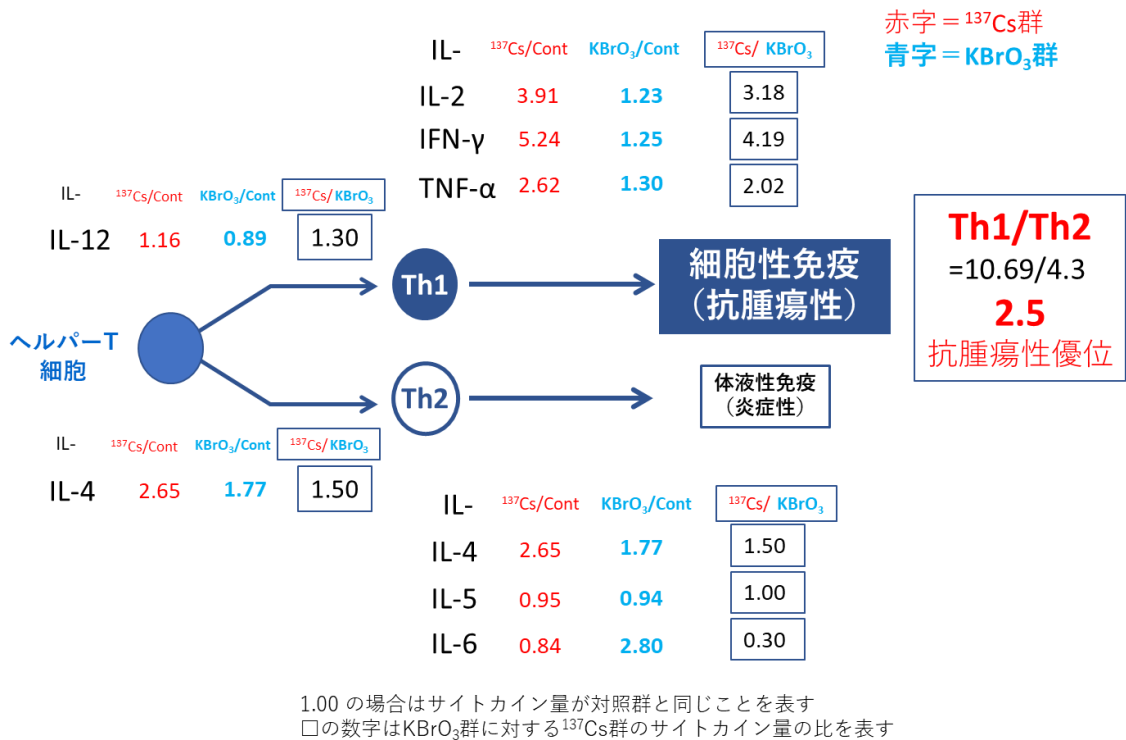
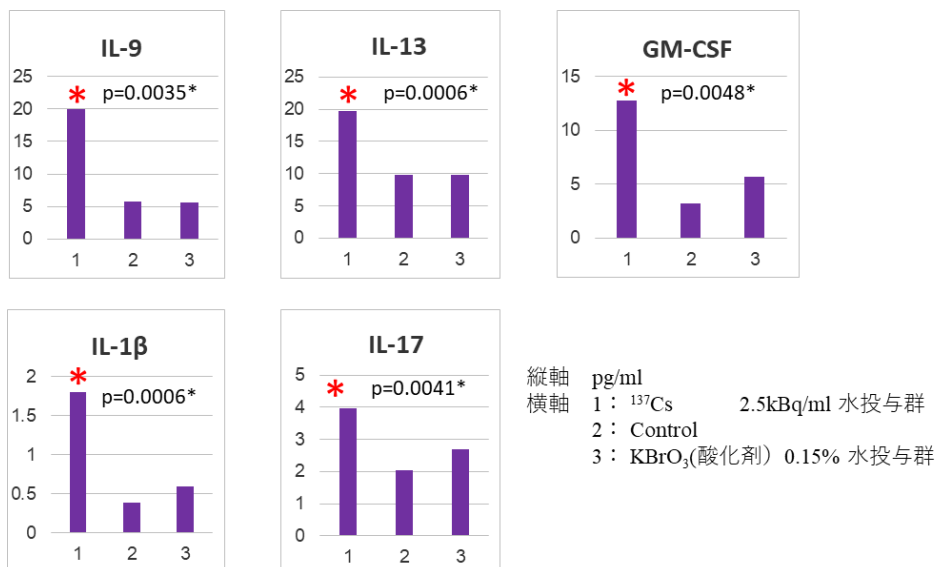


図14 ¹³⁷Cs群においてTh1、Th2以外で有意性が認められたサイトカイン



• 同等線量の内部被ばくと外部被ばくの突然変異率

内部高被ばく群である ^{137}Cs (Cs-2) 群 (76.7mGy) と同等の線量率、総線量の $^{137}\text{Cs}\gamma$ 線を外部より照射した後の突然変異率を両群間で比較した結果、*Msh2* 遺伝子欠損マウスの内部被ばくによる平均突然変異率は

48.32×10^{-5} で、対照群の 29.25×10^{-5} に対して 1.56 倍と有意に高い値を示した (Kruskal-Wallis test $p=0.0075$, Dunn test $p=0.0112$) にもかかわらず、同等の外部照射では 29.74×10^{-5} であり、対照群との間で有意な差が認められなかった。また、野生型のマウス系統では、*Msh2* 遺伝子欠損マウスと同様に対照群の突然変異率が 1.41×10^{-5} に対して Cs-2 群では 4.28×10^{-5} と有意に高い値 (Dunn test $p=0.045$) が認められたが、外部照射群においては、対照群より変異率が

表 8 rpsL トランスジェニックマウスの小腸を用いた突然変異解析の結果

遺伝子型	実験群	サンプル#	総スクリーニング数	KmSm 耐性コロニー数	MF ($\times 10^{-5}$)	mean MF ($\times 10^{-5}$)	SD ($\times 10^{-5}$)
Msh2 -/-	C	1	299880	66	22.01	29.25	6.53
		2	320000	92	28.75		
		3	144200	46	31.90		
		4	57000	22	38.80		
		5	847000	210	24.79		
	Cs-1	1	54600	18	32.97	32.85	4.43
		2	107000	33	30.81		
		3	65800	23	34.95		
		4	104000	28	26.85		
		5	59500	23	38.66		
	Cs-2	1	345800	152	43.96	48.32	4.69
		2	246400	111	45.05		
		3	171500	92	53.64		
		4	146300	67	45.80		
		5	312200	166	53.17		
	IR	1	253400	58	22.89	29.74	7.10
		2	80150	18	22.46		
		3	99400	30	30.18		
		4	277900	96	34.54		
		5	207200	80	38.61		
KBr	1	36000	32	87.91	58.27	19.39	
	2	95900	51	53.18			
	3	89000	59	66.37			
	4	216300	90	41.61			
	5	187000	79	42.27			
Msh2 +/+	C	1	178500	3	1.68	1.41	0.70
		2	482580	11	2.28		
		3	334880	3	0.90		
		4	128380	1	0.78		
	Cs-1	1	63000	2	3.17	3.61	1.89
		2	63000	2	3.17		
		3	160000	10	6.27		
		4	111000	2	1.81		
	Cs-2	1	107100	4	3.73	4.28	1.65
		2	424900	17	4.00		
		3	291060	8	2.75		
		4	105700	7	6.62		
	IR	1	244300	5	2.05	2.14	1.15
		2	788200	5	0.63		
		3	177100	6	3.39		
		4	362180	9	2.48		
	KBr	1	195720	7	3.58	2.66	0.74
		2	243180	7	2.88		
		3	481880	11	2.28		
		4	426160	8	1.88		

2.14×10^{-5} と増加している傾向は認められるものの統計学的に有意な差は認められなかった。

令和 2 年度 (2020 年度) の突然変異頻度の比較とスペクトラムの結果に、外部被ばく実験結果の突然変異率を IR の表記で追記した表を表 8、表 9 に示す。

(MF:突然変異率、SD:標準偏差、KmSm:カナマイシン・ストレプトマイシン)

表9 スペクトル別変異頻度

変異率 MF (×10 ⁻⁵)		<i>Msh2</i> ^{-/-}					<i>Msh2</i> ^{+/+}				
		C	Cs-1	Cs-2	IR	KBr	C	Cs-1	Cs-2	IR	KBr
1塩基置換	G:C > A:T	2.10	1.01	4.88	1.67	2.41	0.24	0.23	0.11		0.55
	A:T > G:C	1.30	1.26	1.04	1.77	1.48			0.44	0.09	0.16
	G:C > T:A	0.17	0.25	0.24	0.31	0.19	0.08	0.23	0.11	0.09	0.23
	G:C > C:G	0.11	0.25	0.40	0.10	0.19					
	A:T > T:A	0.23	0.25	0.32			0.08	0.23	0.33		
	A:T > C:G	0.34		0.48	0.31				0.11	0.09	
塩基挿入欠失	1_indel	0.79	2.27	1.52	1.57	1.30	0.24	0.68	1.21	0.17	0.94
	1_indel_A-run	23.07	26.03	36.48	22.85	51.22	0.16	0.68		0.43	
	>2_indel	1.13	1.52	2.96	0.94	1.48	0.63	1.58	1.87	1.20	0.70
	other				0.21				0.11	0.09	0.08

1_indel: 1塩基挿入/欠失、>2_indel: 2塩基以上の挿入/欠失、A-run: アデニン塩基の連続配列、other: リアレンジメント/複雑な変異
 C: 対照群、Cs-1: ¹³⁷Cs低投与群(38.4mGy)、Cs-2: ¹³⁷Cs高投与群(76.7mGy)、
 IR: 外部照射群(76.7mGy)、KBr: KBrO₃群 (0.15%)

実験群別に変異スペクトルごとの変異率を算出した結果を表9に示す。*Msh2* 遺伝子欠損マウスでは、ミスマッチ修復機構欠損の特徴と考えられるアデニン塩基の繰返し配列 (A-run 配列) での1塩基の挿入または欠失変異が大半を占めていた。(表3中の「1-indel_A-run」に対応)。(詳細については、研究分担者：大野みずきの報告書の体細胞突然変異解析を参照)

• **遺伝子発現解析の結果**

KBrO₃ 群と ¹³⁷Cs (Cs-2) 群での発がん頻度の差に影響する可能性のある因子として、前年度までのサイトカインの測定結果で、Cs-2 群で IFN-γ と TNF-α の上昇傾向が見られ免疫系反応の違いを見出している。そこで、免疫関係の遺伝子発現のちがいを解析するために血漿採取時に採取された凍結小腸サンプルを(株)ジーンウィズ社に委託して遺伝子発現量の解析を行った。その結果、種々の遺伝子の発現変動が認められた。

化学物質暴露群の KBrO₃ 群、そして、放射線被ばく群の Cs-2 群 (内部被ばく) と IR 群 (外部被ばく) のそれぞれで、対照群に対して有意に発現量が上昇した遺伝子を抽出し、それぞれの群において、KBrO₃ 群では上昇が認められないが、放射線被ばく群 (Cs-2 群、IR 群) では共通して遺伝子発現の上昇が認められる遺伝子をピックアップし、その遺伝子の役割について調べた。その結果を表10に示す。

この表から、放射線被ばく群に共通して、NK細胞の細胞障害活性を誘導する遺伝子 Cd226 が約2倍、サイトカイン測定で有意な上昇を検出したインターロイキン2 (IL-2) を誘導しT細胞の増殖と分化に関与する遺伝子 Itk が1.8倍上昇していることがわかった。この結果は、先のサイトカイン量測定結果による Th1 優位を裏付ける結果と考えられる。

このことにより Th1/Th2 バランスが抗腫瘍性に傾いていることが遺伝子発現レベルでも認められたことになる。したがって、低線量放射線には、化学物質 KBrO₃ の作用では認められない免疫賦活効果があると考えられた。

表 10 ¹³⁷Cs γ 線の内部被ばく群と外部被ばく群に共通して対照群より発現量が**増加**した遺伝子

遺伝子名	被ばく様式	ln 変化率	発現倍率	p値	染色体	遺伝子産物	機能
Apol7c	内部被ばく	0.64	1.9	<<0.001	15 : 36.40 cM	アポリポタンパク質L7c	塩化物チャネル活性と脂質結合活性を可能にする
	外部被ばく	0.61	1.8	<<0.001			
Cd226	内部被ばく	0.79	2.2	<<0.001	18 : 59.05 cM	CD226抗原	NK細胞の細胞障害活性を誘導するシグナル伝達分子で抗腫瘍性免疫に関わる
	外部被ばく	0.66	1.9	<<0.001			
Cyp2c55	内部被ばく	0.85	2.3	<<0.001	19 : 33.64 cM	チトクロームP450ファミリーの酸化還元酵素	チトクロームP450ファミリーの酸化還元酵素
	外部被ばく	0.74	2.1	<<0.001			
Gpr17	内部被ばく	0.80	2.2	<<0.001	18 : 17.89 cM	Gタンパク質共役型受容体17	Gタンパク質共役型プリン作動性ヌクレオチド受容体シグナル伝達系と炎症抑制に働く
	外部被ばく	0.60	1.8	<<0.001			
Itk	内部被ばく	0.60	1.8	<<0.001	11 : 27.75 cM	IL2誘導性T細胞キナーゼ	T細胞の増殖と分化に関与
	外部被ばく	0.60	1.8	<<0.001			
Krt12	内部被ばく	0.76	2.1	<<0.001	11 : 62.92 cM	ケラチン12タンパク質	上皮の発生や角膜上皮に発現しているケラチンタンパク質
	外部被ばく	0.67	2.0	<<0.001			

表 11 ¹³⁷Cs γ 線の内部被ばく群と外部被ばく群に共通して対照群より発現量が**減少**した遺伝子

遺伝子名	被ばく様式	ln 変化率	発現倍率	p値	染色体	遺伝子産物	機能
H1f5	内部被ばく	-0.62	0.54	<<0.001	13 : 7.97 cM	H1.5リンカーヒストン、クラスターメンバー	ヌクレオソーム構造に関与する基本的核タンパク質でヌクレオソーム間でリンカーDNAと相互作用し、クロマチンを高次構造に圧縮する機能を果たす
	外部被ばく	-0.70	0.50	<<0.001			
Hspb7	内部被ばく	-0.93	0.39	<<0.001	4 : 74.08 cM	熱ショックタンパク質ファミリーBメンバー7(心臓血管)	p53経路での腫瘍抑制因子
	外部被ばく	-0.60	0.55	<<0.001			

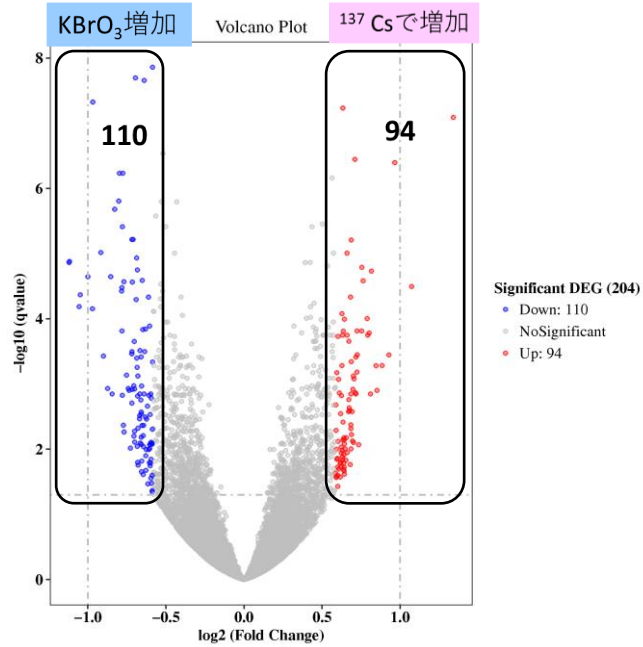
• **KBrO₃ 群と ¹³⁷Cs 群で発現量に差があった遺伝子**

多くの変動が見られた遺伝子発現の中で、KBrO₃ 群では変動していないNK細胞の細胞障害活性化誘導タンパクやT細胞の増殖、分化にかかわるIL-2誘導性T細胞キナーゼの遺伝子発現が¹³⁷Cs群のみならず外部照射したIR群でも同様に亢進していた(表10)。また、KBrO₃ 群では変動していないp53経路での腫瘍抑制因子関わるHspb7遺伝子発現が¹³⁷Cs群とIR群ともに対照群の半分以下に抑制されていた(表11)。この抑制が生理的どのような役割を担っているかは興味あるところである。

X軸をFold Change、Y軸をq-valueとしてKBrO₃群と¹³⁷Cs群間で遺伝子発現に差があるものをプロットした結果(volcano plot)を図15に示す。KBrO₃群に対して¹³⁷Cs(Cs-

2) 群で有意に発現上昇した 94 遺伝子 (赤)、発現低下した 110 遺伝子 (青) をそれぞれ示したが、中でも発現量の差が大きく有意差の p 値が小さい遺伝子群 (四角枠内) は生物学的意味を持つ可能性がある。

図15 KBrO₃ vs ¹³⁷Cs内部被ばくの遺伝子発現量の比較



• 内部被ばく群と外部被ばく群で発現量に差があった遺伝子

図16 対照群 vs 内部被ばく (Cs-2) の遺伝子発現量の比較

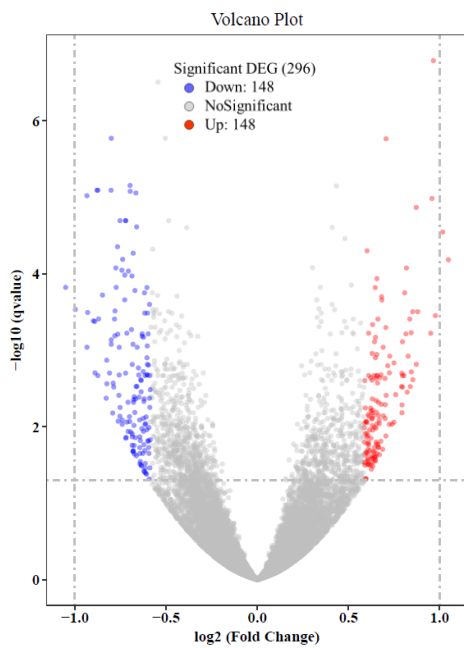


図17 対照群 vs 外部被ばく (IR) の遺伝子発現量の比較

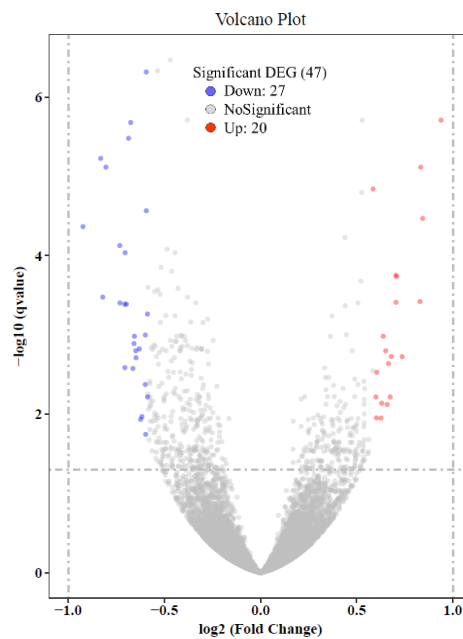


図18 内部被ばく(Cs-2) vs 外部被ばく(IR)の遺伝子発現量の比較

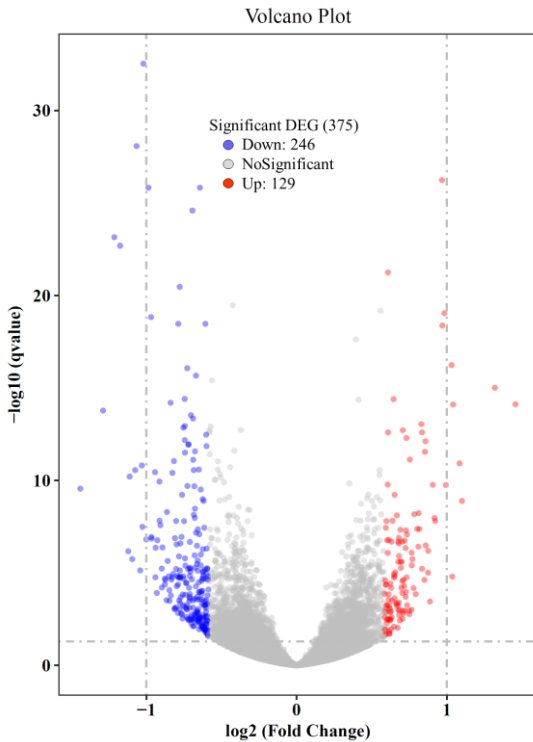


図 16 の対照群に対する内部被ばく群では、296 遺伝子が有意に亢進、もしくは低下した。

図 17 の対照群に対する外部被ばく群では、47 遺伝子が有意に亢進または低下した。

図 18 の内部被ばく群と外部被ばく群の比較では、有意に遺伝子発現が亢進した遺伝子の数は 129 (赤)、低下した遺伝子の数は 246 (青) であった。

同じ線量の ^{137}Cs 放射線への被ばくでありながら、対照群に対する内部被ばく群と外部被ばく群の遺伝子発現量の増減パターンに差があった。

そこで、増減した遺伝子が、どのような生理作用に関係しているのかについて分類した。

図 19 と図 20 は、遺伝子の主な生理活性や特徴を分子機能 (赤)、細胞成分 (緑)、生物学的プロセス (青) で分類した中のそれぞれ変動した遺伝子の数を示している。図 19 では、 ^{137}Cs の内部被ばく群と KBrO_3 群との間での変動遺伝子の数を示しているが、protein binding (タンパク質結合) 関係で 25、integral component of membrane (膜の一体型構成成分) 関係で 46、oxidation-reduction process (酸化還元プロセス) 関係で 12 の遺伝子が、赤緑青のそれぞれの分類で、最も変動していた。これらは、免疫反応に関わる細胞の接着、膜の活性化、また、酸化剤による反応に関係した遺伝子と考えられる。さらに、その他にも response to interferon-gamma (インターフェロンガンマへの応答: 5)、antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II (MHC クラス II を介した抗原プロセッシングと外因性ペプチド抗原の提示: 3)、humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin (循環免疫グロブリンによって媒介される体液性免疫応答: 2)、response to interferon-beta (インターフェロンガンマへの応答: 2)、regulation of complement activation (補体活性化の調節: 2) と免疫にかかる遺伝子の多くが変動している。

それに対して、図 20 では、内部被ばく群と外部被ばく群との間での変動遺伝子の数を示している。同様に、赤緑青のそれぞれの分類で、最も変動している遺伝子の特徴を見ると、protein binding (タンパク質結合) 関係で 30、nucleus (細胞の核内) 関係で 72、positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (RNA ポリメラーゼ II プロモーターからの転写の正の調節) 関係で 22 の遺伝子が最も変動しており、多くの細胞の核内、細胞質内に関係する遺伝子の変動が認められた。

図 19 KBrO₃ 群と ¹³⁷Cs (Cs-2) 群間で有意に発現変動した遺伝子数の機能的分類

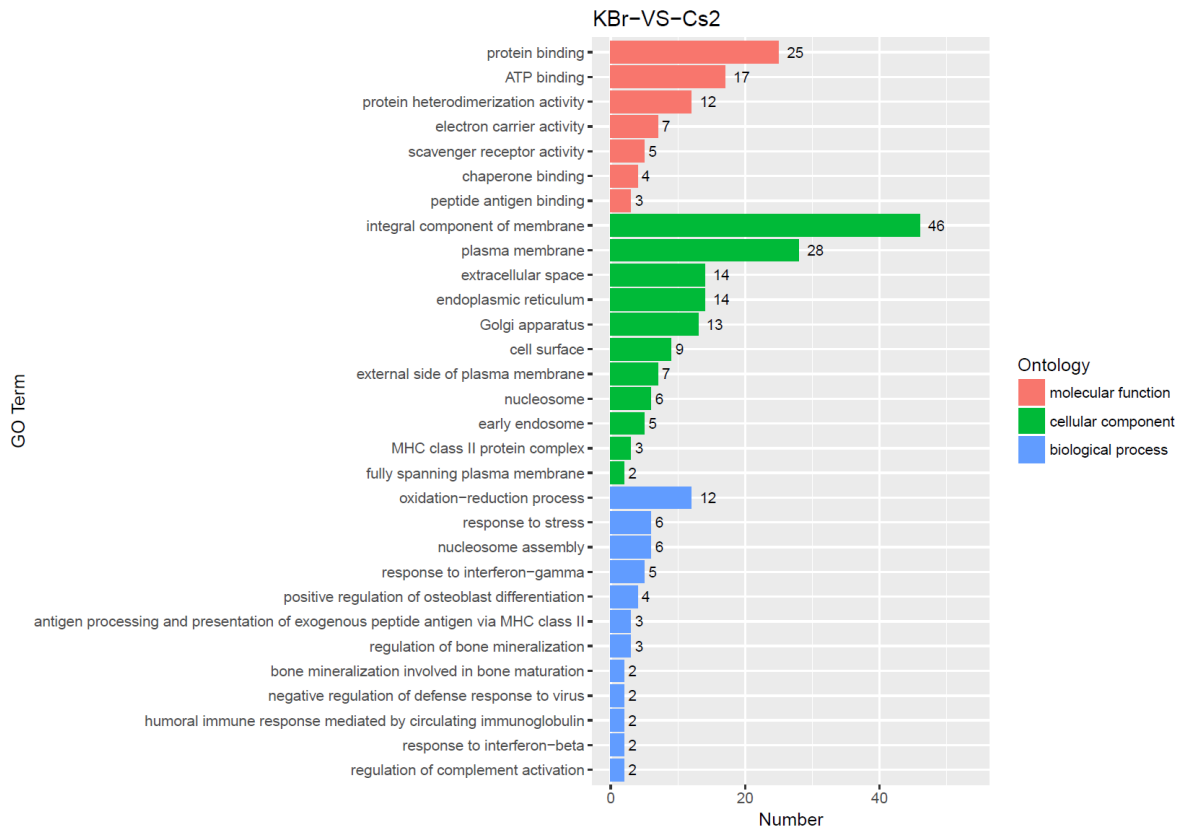
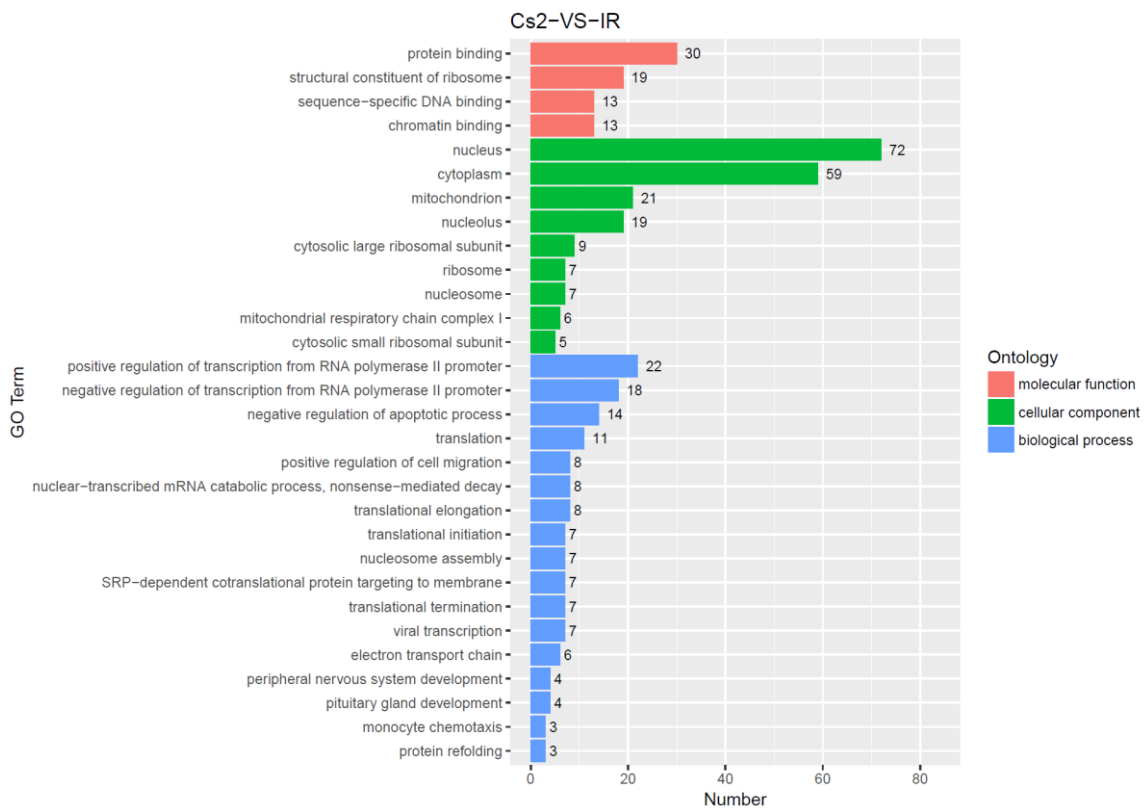


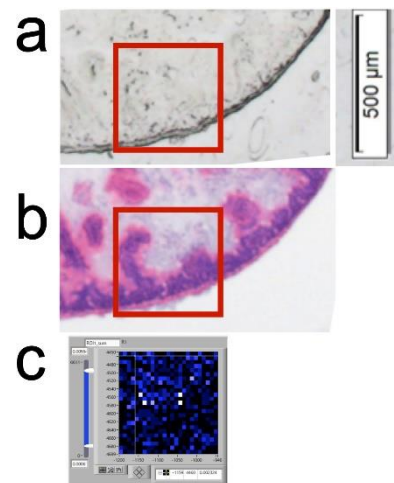
図 20 ¹³⁷Cs の内部被ばく群と外部被ばく群間で有意に発現変動した遺伝子数の機能的分類



• ^{137}Cs の小腸におけるセミマイクロ濃度測定

上部空腸切片 (図 21- a) では組織構造の判別が難しいので、その連続切片試料を HE 染色 (図 21-b) することで分析エリアを推定した。ルーメン-絨毛-粘膜下組織-平滑筋を含む $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ の部位 (図 21-a および図 29-b 赤枠内) について、X 軸-Y 軸をそれぞれについて $16\mu\text{m}$ ずつの間隔で 25 箇所ずつ合計 625 箇所を $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ ビームを 10 秒ずつ照射した。625 箇所ごとの推定セシウム量を図 c に示す。相対濃度を高 (白) -中 (青) -低 (黒) で示した。組織内セシウム濃度が不足気味であるので、ゼロ点を過剰に増強しているが、少なくとも当該 625 箇所にセシウム組織滞留は検出されなかった。腸管内の微小構造域での特異的な ^{137}Cs の集積はなく、ほぼ均一に ^{137}Cs が分布して、特段の濃度差はないことがわかった。このことから、 ^{137}Cs の経口摂取による線量評価において、これまでの組織重量当たりの Bq で問題ないと考えられた。

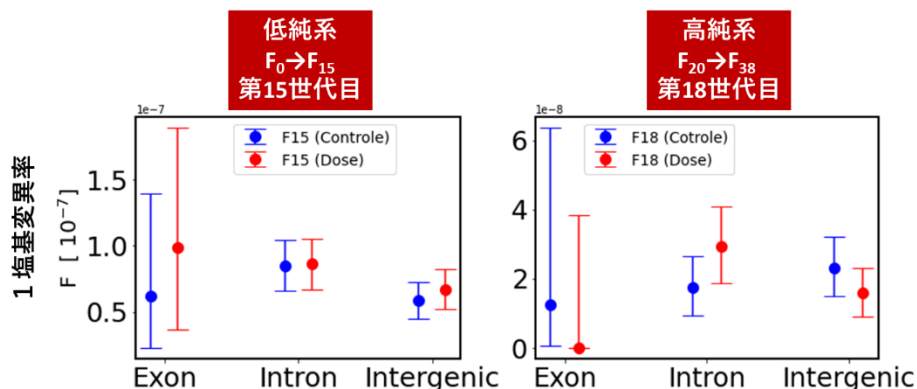
図21 セシウム分布分析のために SPring-8照射に使用した組織標本画像



• 次世代影響

3 年度に ^{137}Cs 水給水による世代交代マウスが第 38 世代 (F_{38}) に達したので F_{38} マウス雄における全ゲノム解析を (株) 理研ジェネシス社に委託して行い、グラフに追加した。図 22 は、各群 1 匹ずつのデータであるが、両群ともに比較対象の総塩基数は極めて多いのでポアソン誤差によりエラーバーを算出した。その結果、 F_{20} から F_{38} 世代間 (18 世代) の Exon、Intron、Intergenic それぞれの DNA の領域で ^{137}Cs 群と対照群では統計的に有意差がなかった。しかし、Intron と Intergenic の間のみで ^{137}Cs 群に統計的有意性はないものの対照群より変異率が高い傾向が見受けられた。また、図 23 では 1、2、5、18 世代と世代が増えるに従って、DNA 塩基配列変異率が対照群、 ^{137}Cs 群の両群で右上がりを示し、対照群、 ^{137}Cs 群ともに世代間で DNA 塩基配列変異の蓄積があると考えられた。

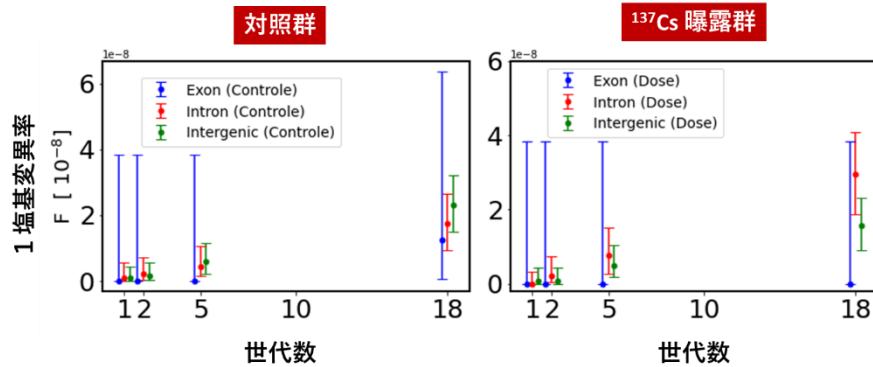
図22 A/Jマウス系統の対照群と ^{137}Cs 群間のExon、Intron、Intergenic における1塩基変異率の比較 (第15世代目・第18世代目)



100000Bq/lの水を飲み続けた時のマウスー世代 (37mGy) くらいの内部被ばくでは純系

度が低い15世代間 (F₀~F₁₅)、純系度が高い18世代間 (F₂₀~F₃₈)、いずれにおいても統計誤差 (ポアソン誤差) の範囲では放射線の影響は現れてない。

図23 A/Jマウス系統の1世代、2世代、5世代、18世代間での Exon、Intron、Intergenicにおける1塩基変異の蓄積状況



IV 考察

IV-1 これまでの研究と本成果の繋がり

本研究の課題は、実験動物の個体を用いた慢性的低線量内部被ばくによる突然変異と発がんの非相関性のメカニズム解明である。これまでに、A/J マウス系統の初期世代 8 ヶ月間の ¹³⁷Cs 水 (100 Bq/ml) 自由摂取において DNA 二本鎖切断の指標となる γ -H2AX フォーカスが定量的に検出されている。しかし、同腹子から開始した第 10 世代目の小核試験やマウス骨髄細胞のマルチカラー-FISH 法による染色体解析では、¹³⁷Cs 群と対照群の間で差異が認められなかった。また、15 代目雄マウスの全ゲノム解析による DNA 塩基配列変異については同腹仔由来の ¹³⁷Cs 群と対照群間で差がなかったことがわかっている。さらに、化学発がん物質 (ウレタン) 投与後 4 ヶ月と 8 ヶ月の誘発肺腫瘍の発生率では両群間で差は認められなかったが、慢性的低線量内部被ばく群では、肺腫瘍の増殖抑制が認められており、同様に、*Msh2* 遺伝子改変マウス実験でも、化学発がん物質と同等の体細胞突然変異率を起こす放射線線量において小腸腫瘍発生率の抑制が示唆されている。これらの結果から、低線量放射線による突然変異と発がんとの相関性がこれまでの突然変異変異頻度で発がんリスクを予測できる定説とは異なる可能性が考えられた。そこで、本課題にて動物個体を用いた突然変異と発がんの高感度検出系を開発し、それを用いることで、低線量放射線被ばくによる突然変異と発がんの相関性、次世代への遺伝性影響、腫瘍増殖抑制効果の存否についての検証実験を行った。その結果について以下に考察する。

IV-2 同じ突然変異率を起こす化学物質と放射線による発がん率の比較

図 8 に示すように ¹³⁷Cs 群と KBrO₃ 群の突然変異率が同等でありながら、なぜ表 7 に示すように ¹³⁷Cs 群では、KBrO₃ 群より発がん率が低いのかの仮説を立てた。

仮説として、突然変異率が同等であるが、KBrO₃ 群では、投与時に炎症を起こすのに対して、低線量の ¹³⁷Cs 群では、炎症を起こさないために、炎症組織の修復が腫瘍発生に関わっているのではないかと考えて KBrO₃、¹³⁷Cs 処理後の血漿サイトカイン量を測定して、KBrO₃ のみに炎症サイトカインの上昇があるか確認することを 4 週齢 (26 匹)、8 週齢 (23 匹) のマウスで試みた (表

4)。

その結果、予想に反して、炎症性の血漿サイトカイン量の上昇は、若干認められたものの、ほとんど対照群と同じで、差が認められなかった (図 9)。しかしながら、抗腫瘍性に働くとしてされている、IL-2、IFN- γ 、TNF- α の値が、 ^{137}Cs 群では、対照群や KBrO_3 群に比べて統計的に有意 (≤ 0.001) に高値を示していた。そこで、抗腫瘍性と炎症性のバランスを示す Th1/Th2 バランスを検討した結果、Th1 側 (抗腫瘍性) への傾きが確認され、 ^{137}Cs 群の腫瘍増殖にこの抗腫瘍性免疫が大きく影響した可能性が考えられた (図 13)。

この結果を遺伝子発現レベルで確認するために ^{137}Cs 群と KBrO_3 群の直接曝露を受けた小腸における炎症性と抗腫瘍性にかかる遺伝子発現量を調べた。

その結果、 KBrO_3 群と ^{137}Cs 群の比較において、 $Msh2^{+/+}$ と $Msh2^{-/-}$ の両群のマウスで免疫系、炎症系のシグナルパスウェイに相違が見られた。加えて $Msh2^{-/-}$ マウスでは細胞死や細胞増殖に関わる経路に関与する遺伝子で発現変動が見られた。サイトカイン量だけではなく、遺伝子発現量においても抗腫瘍性に働いていることが認められ、低線量放射線が抗腫瘍性免疫の惹起に働き、小腸腫瘍の増殖抑制をした可能性が検証されたと考えられる。

・派生的知見

この免疫能の定量より認められた抗腫瘍性免疫反応は、最近クローズアップされている腫瘍の放射線治療において散見される原因不明のアブスコパル効果の一因である可能性が考えられた。

アブスコパル効果とは、Mole RH (1953 年) が示唆した「標的から離れた」という意味でラテン語から派生した“abscopal”という言葉で放射線治療において放射線照射野外の病変の縮小効果が認められる稀な現象を指す¹¹⁾。当初は、懐疑的であり研究対象とはならなかったが、粒子線治療の増加に伴い、アブスコパル効果とみられる現象が多数報告されるようになった。また、免疫の研究が進歩したことで、免疫チェックポイント阻害剤との併用の効果も報告され、照射野の腫瘍が死滅する過程で、未知の免疫賦活効果が発生して、遠隔の腫瘍も同時に退縮する可能性が示唆されている。この「アブスコパル効果」という言葉が PubMed 科学出版物データベースで言及されたのが、10 年ほど前にはわずか 4 件だったのが、2019 年には 120 件近くまで、2020 年には、150 件を超え、2021 年 1 月には 802 件のヒットに増えているという報告がある¹²⁾。本研究においても、低線量であるが、抗腫瘍性のサイトカイン量 (図 9)、抗腫瘍にかかる遺伝子発現量の顕著な変動が認められ (図 12、13)、抗腫瘍性免疫が惹起されている状況が伺えることから、 ^{137}Cs 群の腫瘍発生頻度が低いのは、このアブスコパル効果の惹起による可能性も考えられた。

なお、 ^{137}Cs 群と KBrO_3 群のそれぞれで発生した腫瘍の DNA 突然変異のスペクトル、遺伝子発現量の解析を行い、化学発がんと放射線発がんの差異を検討する予定であったが、 KBrO_3 群に発生した消化管腫瘍が 54 個に対して ^{137}Cs 群では 4 個と少なく、非常に小さかったために、病理診断後の組織量が不足して遺伝子発現解析を行うことができなかった。

IV-3 外部被ばくと内部被ばくにおける線量同等性の検討

^{137}Cs のマウス臓器内分布から PHITS コードによって内部被ばく線量 (4 週間の合計線量 76.72mGy) を算定し (表 5、6)、同等の外部照射線量になるようにして突然変異高感度検出系 $Msh2$ 遺伝子改変マウスに、 ^{137}Cs 線源の γ 線 (2.74mGy/day) (合計線量 76.72mGy) を 4 週間かけて外部から照射を行った。照射後、 ^{137}Cs の内部被ばく実験と同じ条件になるようにマウスの臓器サンプルを採取し、突然変異率を比較した。その結果、外部被ばく群 (IR 群) の突然変異率は対照群と

差がなく、 ^{137}Cs の内部被ばく群より変異率が低く検出される結果となった (表 8)。

内部被ばくと外部被ばくの線量、線量率を同じにしたにもかかわらず、体細胞突然変異率が異なった原因として考えられるのは、以下の二つである。

IV-3-1 内部被ばくの Gy への換算値と外部照射線量が同じではなかった可能性。

IV-3-1-1

マウス腸管内には、常に内容物が存在しており、組織重量当たりの ^{137}Cs 線量の幅は内容物の量によって大きく変わる。そのため、常に安定した ^{137}Cs 線量が得られ、マウス個体の中央部に位置する肝臓の線量を代表線量として用いた。遺伝子解析用には、腸管洗浄により内容物を除去したものをサンプルとしていたので、小腸の組織線量としては、肝臓と大きく変わらないが、実験期間中の被ばくにおいては ^{137}Cs 水を含む腸管内容物からの腸管組織への線量が考慮されていないことになる。腸管内容物を含めた消化管全体の平均線量を調べたところ、腸管の内容物により変わり、肝臓の線量に対して 1~2 倍ほどの振れ幅になったので、内部被ばく線量の算定が最大 2 倍ほど異なっている可能性があり、そのため外部被ばく線量が内部被ばく線量より低く見積もられて照射した可能性が高い。

IV-3-1-2

外部照射では、マウス 5 匹を飼育ケージに入れた状態で照射した。そのため、照射中にマウスが線源に対して近位から遠位の方に重なって長時間過ごした場合に、遠位のマウスの平均被ばく線量が下がった可能性がある。

IV-3-2 内部被ばくと外部被ばくでは、被ばく線量、線量率が同じでも生物反応は異なる可能性。

γ 線と β 線は LET がほぼ同じであるで、エネルギーレベルで考えると、放射線被ばくによって発生する生体内での物理学的反応や化学的反応には、大きな差がないと考えるのが妥当である。しかし、生体分子への β 粒子の作用と、 γ 線による光電効果、コンプトン効果による生体への作用が生体では、微妙な違いとして作用し、同じ影響にはなっていない可能性がある。その根拠は、本研究で認められた外部被ばく、もしくは、内部被ばく後の遺伝子発現のパターンに大きな差が認められているからである。そのことについて次節で考察する (図 16, 17)。

IV-4 外部被ばくと内部被ばくで異なる遺伝子発現反応

^{137}Cs γ 線の内部被ばく、もしくは、外部被ばくしたそれぞれのマウスから剔出された小腸における遺伝子発現量の測定を行った。得られた結果から、対照群や KBrO_3 群では増減が認められず、被ばく群のみで共通して増減が認められた遺伝子とその生体反応を表 10、表 11 に示す。内部被ばくと外部被ばくともに、同じ線量、線量率で被ばくさせているので、遺伝子発現などの細胞内生理反応はほぼ同じパターンを示すと考えられた。しかし、全体の遺伝子発現の消長を比べると、図 18 に示すように、内部被ばくより外部被ばくの方で有意に遺伝子発現が亢進した遺伝子の数は 129 (赤)、低下した遺伝子の数は 246 (青) であった。また、対照群に比べて内部被ばく群で発現が亢進した遺伝子の数は 148、低下した遺伝子の数は 148 (図 14)、逆に対照群に比べて外部被ばく群で発現が有意に亢進した遺伝子の数は 20、低下した遺伝子の数は 27 (図 15)、と内部被ばくと外部被ばくでは、異なった遺伝子発現のパターンが認められた。

図 19 に示すように、 KBrO_3 群と ^{137}Cs (Cs-2) 群間で有意に発現変動した遺伝子の機能的分

類では、免疫にかかる細胞の接着、膜の活性化、また、酸化剤による反応に関係した遺伝子の多くが有意に発現変動していた。

一方、図 20 に示す ^{137}Cs の内部被ばく群と外部被ばく群間では、細胞の核内、細胞質内に関係する多くの遺伝子の変動が有意に認められ、突然変異の差に関係している可能性が考えられた。

このことから、内部被ばく群と KBrO_3 群、そして、内部被ばく群と外部被ばく群間では、それぞれの変動遺伝子の機能や特徴が大きく異なっていることがわかった。

また、本研究分担者の石原によって開発、確立された、放射線量と DNA 損傷応答 RNA 量および DNA 損傷量の相関性を検出できる系の指標である DNA 損傷応答 lncRNA は、上述の内部被ばく、外部被ばくによって大きく発現変動した「RNA ポリメラーゼ II プロモーターからの転写の正の調節」に関係する RNA ポリメラーゼ II により、多く転写される lncRNA の 1 つである¹³⁾。この開発した DNA 損傷応答 lncRNA の検出系を用いて、内部被ばくと外部被ばくの核内反応のちがいについての解析に応用できると考えられる。

外部被ばくと内部被ばくの遺伝子発現のちがいについては、さらに詳細な研究が必要である。

IV-5 ^{137}Cs の小腸におけるセミマイクロ濃度測定

K^+ と同じ 1 族の $^{137}\text{Cs}^+$ は、生体内では、 K^+ と同じ動態をして Na-K ポンプや K^+ チャネルを通る。しかし、 K^+ 径の 1.2~1.3 倍の大きさの $^{137}\text{Cs}^+$ は、 K^+ チャネルの小孔から漏出しづらく、細胞の中に停滞することになる。 K^+ あたりの $^{137}\text{Cs}^+$ の通過率はポンプで約 0.25、チャネルでは 0.2~0.02 以下であると見積もられており¹⁴⁾、 $^{137}\text{Cs}^+$ は K^+ チャネルのブロッカーとなっている。消化管などにある膜興奮性の高い平滑筋では、大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ 電流が最も重要な K^+ 電流成分であり、これが活動電位の脱分極相、後再分極相の形成に大きく関与している。 K^+ チャネルのブロッカーとして働く ^{137}Cs が崩壊すると ^{137}Ba となりさらに強力なブロッカーとなる。したがって、経口投与された ^{137}Cs が消化管において吸収される過程で K^+ チャネルブロッカーとして消化管細胞内に留まることとなれば、消化管内において局所的に集積している可能性がある。このような場合には、線量評価に影響すると考えられたが、セミマイクロ濃度測定によって、腸管内の微小構造域での特異的な ^{137}Cs の集積はなく（図 21）、ほぼ均一に ^{137}Cs が分布して、特段の濃度差はないことがわかった。このことから、 ^{137}Cs の経口摂取における線量評価においては、これまでの組織重量当たりの Bq で問題ないと考えられた。

IV-6 次世代への影響

放射線の DNA への影響としては、欠失変異の頻度が高いと考えられ、これについても検討する必要があるが、現在の全ゲノム解析方法では、ノイズが多く、また、多塩基欠失の検出が非常に困難であるために、本報告書では、1 塩基変異についての解析結果のみを報告する。ただ、低線量放射線の影響については、酸化ストレスも大きな要因と考えられ、1 塩基変異においても定量的な変異の検出の指標となると考えている。

マウスの摂取した 100Bq/ml の ^{137}Cs 水は、ヒトでの摂取量に換算すると 100,000Bq / ℓ の ^{137}Cs 水に相当する。そして、表 1 で示すようにマウス全身の平均 ^{137}Cs 濃度は約 94 Bq/g で、ヒトに換算すると 94,000Bq/kg に相当する。このようなレベルの内部被ばくを続けた時のマウス一代あたりの被ばく線量は 37mGy である。この内部被ばくを続ける中での兄妹交配で、純系度が低い 15 世代目 ($\text{F}_0\sim\text{F}_{15}$)、純系度が高い 18 世代目 ($\text{F}_{20}\sim\text{F}_{38}$) のいずれにおいても現在の実験の統計誤差

(ポアソン誤差) の範囲では放射線の影響は現れていない (図 22)。

このことを裏付けるもう 1 つの結果として、上記線量のセシウム水 (100Bq/ml) を 1 世代から 18 世代まで継続的に飲み続けた A/J マウスとその対照群とを比較した平均性比 (♂/♀ : 対照群 1.06、¹³⁷Cs 群 1.09) と平均産仔数 (一回に出産されるマウスの仔の平均匹数 : 対照群 5.13 匹、¹³⁷Cs 群 5.35 匹) において有意な差が認められなかったことがあげられる⁵⁾。

なお、図 23 に見られるように、世代を重ねるごとに ¹³⁷Cs 群、対照群ともに 1 塩基変異率が右肩上がりのグラフになっている。各世代 1 匹のマウスの全ゲノム解析による結果のグラフであるが、世代ごとに DNA 塩基配列変異が蓄積していることを示しており、既に報告のあるマウス 1 世代あたり全ゲノム当たりの 1 塩基変異率 (5.4×10^{-9})^{15,16)} の積算と矛盾せず全ゲノムの塩基数と各世代の塩基数の総計における変異を見ていると言え、たとえ 1 匹のマウスによる全ゲノム解析と言え、変異の 18 世代続けても対照群で自然に発生した 1 塩基変異率とほとんど差はなく、偏った DNA 塩基配列変異の蓄積傾向も認められないので結果の信頼性は低くないと考える (図 23)。

しかし、20 億を超える塩基配列に対しての変異率を検出しているとはいえ、高額解析費用の問題から 1 匹のマウスのデータによるものであることから、一般的な通念からは、統計学的脆弱性が指摘されることを否めない。そこで、次期研究において、各群のマウス匹数を増やし、統計学的に堅牢なデータのグラフを作成する予定である。

IV-7 本研究結果の疫学調査との考察

低線量放射線の遺伝性影響は、マウスなどの実験動物では確認されているのに、ヒトにおいては、原爆被爆二世や小児がん治療患者の 2 世における長年の膨大な疫学調査である原爆被爆二世における安定型染色体異常調査 (親の平均被ばく線量 600 mGy)¹⁷⁾、原爆被爆二世のがん罹患率調査 (親の被ばく線量 1~500mGy)¹⁸⁾、小児がん治療による医療被ばく者の二世の遺伝性影響調査 (親の生殖腺平均被ばく線量、母親 : 1260 mGy、父親 460 mGy)¹⁹⁾、また、全ゲノム解析における、原爆被爆者二世の近距離被爆群 3 家族の父母子解析 (父親 : 1.2km, 1.0km, 1.0km いずれも急性障害発症)²⁰⁾、チョルノービル原発事故後の除染者家族の子供 (最大被ばく線量、4000 mGy)²¹⁾、いずれにおいても認められていないことがしばしば問題となっている。しかし、本研究において放射線による遺伝性影響が認められてるマウスでも、遺伝性影響の発生しない線量があり、さらに、突然変異や発がんの感受性を高くした *Msh2* 遺伝子改変マウスにおいて、変異を検出できる線量とできない線量が観察されたことで (図 8、表 8)、少なくとも、ヒトで遺伝性影響が検出できていなかったと考えるより、これまでの調査の被ばくしたヒトの線量が、ヒトでの遺伝性影響が発生する線量に達していなかったと説明できると考えられる。

本研究における線量範囲は 0~306.8mGy で、ヒトでの疫学調査では影響が出ていない線量よりさらに低いところでの実験であり、この低い線量領域において、ヒトより突然変異や発がんの感受性が高く、これまでに次世代影響が多く報告されているマウスですら影響が出ない線量領域が認められた。

ネガティブデータの証明は困難であるが、統計学的な根拠づけと、疫学調査では影響が認められなかった低線量領域でも、ヒトより突然変異に鋭敏なマウスですら影響が認められない線量を示すことで、ネガティブデータは、より信頼性の高いデータとなり、憂慮に値しない安心な線量領域の存在を説明できているのではないかと考えている。このことについて次節で考察する。

IV-8 本研究結果の総括的考察

^{137}Cs の内部被ばくを含めた低線量被ばく影響は、福島第1原発事故以来、遺伝性影響と発がんの憂慮から大きな社会問題となっている。その中で、定量的な科学的根拠にもとづくリスク評価を示すことが重要となる。本研究は、その一助となることを目指して行った。

ヒトは、マウスに比べて体細胞の数が格段に多く、寿命も長いにもかかわらず、次世代への自然突然変異率がヒトでは、 3.6×10^{-6} 、マウスでは 6.1×10^{-6} ²²⁾ とほとんど変わらない。しかし、マウスの発がんは2年以内であるのに対して、ヒトの平均がん年齢は約50歳（生涯がん死亡率は11~30%）であり、総細胞数がマウスの約2000倍であることを考えるとヒトは、圧倒的にマウスより発がん率が低いことがわかる。このようなことから、マウスの実験をそのまま簡単にヒトに外挿することは難しいと考えられる。ただ、そのヒトよりがんになりやすいマウスでも、発がんや、次世代影響が増加しない放射線量を示すことで、その線量レベルでのヒトへの影響はさらに低いと考えられる。すなわち、放射線による次世代突然変異が多く報告されているマウスですら、次世代への影響を示さない線量を実験的に示すことで、ヒトの安心領域を説明できることになる。

本研究では、全ゲノム配列解析において100000Bq/lの18世代にわたる ^{137}Cs 水飲水で野生型のマウスの子孫（94Bq/g体重、30gのマウス1匹では2820Bqに相当）に同腹仔由来の対照群との間で有意差が認められていない（ヒト1kg当たり94,000Bq、50kgの体重では全身で4,700,000Bqに相当）（図22、23）。この線量より低い ^{137}Cs 内部被ばくでは、ヒトの子孫への影響の憂慮はほとんどないと考えられ、安心の根拠の一つとすることが出来る。

野生型マウスより突然変異や発がんに対して高感受性な*Msh2*遺伝子改変マウスを用いた実験においても2500000Bq/lの ^{137}Cs 水を4週間飲み続けて（Cs-1：38.4mGy）も突然変異率は対照群と変わらず（図8、表8）、16週間飲み続けて（306.8mGy）、同じ突然変異率を示すKBrO₃に比べて個体あたりの平均腫瘍発生数は33分の1で、腫瘍発生をやっと検出できる線量であったことから、本実験条件で、放射線は、KBrO₃（化学物質）と同じ突然変異率を示す線量であっても発がん率には、同等に寄与しておらず、化学物質より発がんに対してはマイルドであると考えられた（表7）。このことは、近交系でないヒトにおける発がん率も次世代影響と同様にマウスより低いと考えられ、発がんのリスク評価において、突然変異率を指標とすることは、過大評価につながっている可能性が示唆された。

また、本実験では、ヒトより感受性の高いマウスの遺伝子を改変（ミスマッチ修復欠損）させて、より一層高感受性なマウス系統を確立しての実験で、突然変異を対照群より有意に検出できた内部被ばく線量（2500000Bq/l水飲水：76.7mGy）と、検出できなかった線量（2500000Bq/l水飲水：38.4mGy）が求められた（図8、表8）。この高感度*Msh2*遺伝子改変マウスですら対照群との差が認められなかった線量の25000分の1以下、そして100000Bq/lの ^{137}Cs 水飲水による野生型A/Jマウスで作用が認められなかった実験の次世代影響無作用量の1000分の1以下に設定されている食品100Bq/kg、水10Bq/lの規制値は、放射線に高感受性なヒトの存在を考慮したうえでも憂慮に値しない基準設定であり、安心できる範囲として行政において説明できると考えられた。

V 結論

マウスを用いた3年間の低線量放射線内部被ばくの研究で以下のことがわかった。

1. 低線量放射線被ばくによる突然変異は、同じ突然変異率の化学物質よりも発がんへの寄与率が低かった。

2. 低線量放射線被ばく影響として抗腫瘍免疫にかかわるサイトカインの亢進が認められた。
3. 遺伝子発現の変動が ^{137}Cs 群内部被ばく群と KBrO_3 群では異なっており、 ^{137}Cs 群で抗腫瘍免疫にかかわる遺伝子の変動が顕著であった。
4. 同じ線量、線量率の外部被ばくと内部被ばくでは、発現遺伝子のパターンが異なっていた。
5. 放射線高感受性系統である $\text{Msh2}(-/-)$ マウスでは 38.4mGy と 76.7mGy の間に体細胞突然変異率増加の境目が認められた。
6. 経口摂取された水溶性 ^{137}Cs は、直接接触する消化管においても局所的に集積することはなかった。
7. 放射線の遺伝性影響が認められているマウスでさえ 100000Bq/l の ^{137}Cs 水を 18 世代飲み続けても子孫でのゲノム突然変異率は、対照群と差がなかった。

これらの結果から、低線量放射線被ばくによる突然変異と発がんの非相関性は、放射線による抗腫瘍性免疫の賦活によるものである可能性が示唆された。また、本研究条件における次世代影響を含む突然変異率の結果は、原爆被爆者、放射線治療された小児がん患者の 2 世での疫学調査結果を支持し、食品の線量限度 (100Bq/kg) に対しては、安心できる範囲内にあることを示す 1 根拠になり得ると考えられた。

謝辞

消化管腫瘍の病理判定は奈良間功博士（摂南大学名誉教授）に、統計解析（ポアソン誤差）に土岐博博士（大阪大学名誉教授・核物理研究センター）、突然変異解析は鷹野典子博士（九州大学）に、NGSデータ解析は日高京子博士（北九州市立大学）にご協力戴いた。ここに感謝申し上げます。

VI 次年度以降の計画

これまで突然変異と発がんについて研究を進めてきたが、原爆被爆二世、福島第一原発事故後の出生児への遺伝性影響は、二世訴訟を含めて社会的に非常に重要な問題であることを痛感している。先の研究ならびに本研究を通して、 ^{137}Cs 内部被ばくを続けた子孫における全ゲノム解析による DNA 塩基配列変異については、20 億を超える塩基配列に対しての変異率を多世代にわたって検出しているとはいえ、高額解析費用の問題から 1 匹のマウスのデータによるものであることから、一般的な通念からは、統計学的脆弱性を認めない。

前述したように、図 22、図 23 では、1 匹の約 20 億塩基対に対する変異数をポアソン誤差で表しているためにエラーバーの幅が大きい。そこで、このエラーバーの幅を小さくし、統計的に強固なものにするために、令和 4 年以降の課題に採択戴いた「セシウム 137 による慢性的低線量内部被ばくマウスの体細胞・生殖細胞における DNA 塩基配列への影響—全ゲノム解析による継世代影響の統計解析—」において、各群のマウス匹数を増やし、統計学的に堅牢なデータを得て、これまでのネガティブデータをより信頼性の高いものにする予定である。

本研究では、化学発がんと放射線発がんによる腫瘍のちがいを遺伝子発現解析と突然変異のスペクトル解析で試みる予定であったが、 ^{137}Cs 内部被ばく群で発生した腫瘍が予想以上に小さく、発生個数が KBrO_3 の 54 個に対して 4 個と少なかったために病理診断後の遺伝子解析のための十分な組織量を得られず解析を断念せざるを得なかった。この遺伝子解析とともに、外部被ばくと内部被ばくの遺伝子発現変動パターンが異なっていたことの原因究明も合わせて研究の機会を見つ

けたいと考えている。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 雑誌

- 1) 宇野賀津子、中島裕夫. 低線量放射線の寿命及び発がんへの影響:外的・内的因子の文献的考察, *PasKen Journal*, 2022 ; in-press.
- 2) Bando Masako, Kinugawa Tetsuhiro, et al. Study of Mutation from DNA to Biological Evolution *International Journal of Radiation Biology*, 2019; doi: 10.1080/09553002.2019.1606957.1-14
- 3) Yuichi Tsunoyama, Kazuyo Suzuki, Miwako Masugi-Tokita, et al. Verification of a dose rate-responsive dynamic equilibrium model on radiation-induced mutation frequencies in mice. *International Journal of Radiation Biology*, 2019;95(10):1414-1420.

イ) 単行本

- 4) Manabu Fukumoto, Hiroo Nakajima, et al. Low-Dose-Rate Radiation Effects on Animals and Ecosystem -Long-Term Study on the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident. Springer Nature, Singapore.2019 Paper, 2020 e-book. p221-235 (Chapter 18).

ロ) 国際会議、学会発表

- 5)中島裕夫、鈴木正敏、大野みずき、宇野賀津子、石原 弘、遠藤 暁福島シミュレーション実験としての ^{137}Cs のマウス多世代低線量率内部被ばくによる子孫での影響、日本放射線影響学会第 64 回大会（水戸）ワークショップ招待講演、2021 年 9 月
- 6)中島裕夫、宇野賀津子、大野みずき、石原弘、續輝久、米倉義晴、マウスにおけるセシウム 137 の低線量内部被ばくによる抗腫瘍免疫反応、日本環境変異原ゲノム学会 第 50 回大会（横須賀）2021 年 11 月
- 7) 中島裕夫、マウスを用いた放射性セシウムの慢性的低線量内部被ばくによる子孫への影響、日本遺伝学会第 93 回大会（東京）2021 年 9 月、ワークショップ招待講演
- 8) Hiroo NAKAJIMA, Katsuko UNO, Yoshiaki YAMAGUCHI, et al., Low dose-rate internal Cesium-137 radiation exposure may contribute little to carcinogenesis and transgenerational effects. The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEK) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS), Nov. 2019, Tokyo.
- 9) Nakajima H, Uno K, Yamaguchi Y, et al., Carcinogenicity and genome variation in descendant mice after the every generational low dose-rate internal Cesium-137 radiation exposure. 16th International Congress of Radiation Research (ICRR2019), Aug, 2019 (Manchester).
- 10) Hiroo Nakajima, Carcinogenicity and genome variation in descendant mice after the every generational low dose-rate internal ^{137}Cs radiation exposure. Oral presentation. The 9th Annual Meeting of the International Society of Radiation Neurobiology. Feb 2019 (Nagashima) (招待講演)

引用文献

- 1) ICRP (2005) *Annals of the ICRP*. ICRP Publication 99
- 2) Piao J., Nakatsu Y., Ohno M., *et al.* Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis. *Int J Biol Sci* 2013; 10: 73-79, doi:10.7150/ijbs.5750.
- 3) 中島裕夫、大野みずき、石原弘、環境省マウスを用いたセシウム 137 の慢性的低線量内

部被ばくによる成体と子孫への影響の定量的実験検証 (Quantitative assessment for the effects of chronic low-dose internal Cesium-137 radiation exposure on genomic, carcinogenic and hereditary effects in mice.) 環境省 原子力災害影響調査等事業 (放射線の健康影響に係る研究調査事業) 放射線による健康影響の解明及び放射線以外の要因による健康リスクの低減を含めた総合的な健康リスクに関する研究報告書、2018

- 4) Hall EJ, Giaccia AJ Radiobiology for the radiologist, 8th edn. Wolters Kluwer, USA, Philadelphia 2019; pp10. (9781496335418)
- 5) Nakajima H., Yamaguchi Y., Yoshimura T., *et al.* Fukushima simulation experiment: Assessing the effects of chronic low-dose internal ¹³⁷Cs radiation exposure on litter size, sex ratio, and biokinetics in mice. *J Radiat Res.*, 2015; 56: i29-i35, doi: 10.1093/irr/rrv079, Special Issue – Fukushima
- 6) Nakajima, H. Effects of Radioactive Cesium-containing Water on Mice. Low-Dose-Rate Radiation Effects on Animals and Ecosystem -Long-Term Study on the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident (Editors: Manabu Fukumoto), Springer Nature 2019; 221-235, Print book ISBN: 978-981-13-8217-8 / eBook ISBN: 978-981-13-8218-5
- 7) Aoki Y., Matsumoto M., Matsumoto M., *et al.* Mutant frequency is not increased in mice orally exposed to sodium dichromate. *Food Safety* 7, 2-10 (2019)
- 8) Dollé ME., Snyder WK., Gossen JA., Lohman PH., and Vijg J., Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *PNAS* 97, 8403-8408 (2000)
- 9) Arrault X., Michel V., Quillardet P., *et al.* Comparison of kinetics of induction of DNA adducts and gene mutations by a nitrofurantoin compound, 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-b]furan (R7000), in the caecum and small intestine of Big Blue™ mice. *Mutagenesis* 17, 353–359 (2002)
- 10) Lynch M., Gooderham NJ and Boobis AR., Organ distinctive mutagenicity in Muta™ Mouse after short-term exposure to PhIP. *Mutagenesis* 11, 505-509 (1996)
- 11) Mole RH. Whole body irradiation; radiobiology or medicine? *Br J Radiol.* 1953;26:234-241
- 12) 香崎正宙 放射線生物研究 Radiation Biology Research Communications. 56(1), 37-54, 2021.
- 13) Ishihara H, Tanaka I, Yakumaru H *et al.* Quantification of damage due to low-dose radiation exposure in mice: Construction and application of a biodosimetric model using mRNA indicators in circulating white bloodcells. *J Radiat Res* 57: 25-34 (2016).
- 14) Leggett, R. W. *et al.*: *Sci. Total Environ.*, 317, 235 (2003).
- 15) Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, *et al.* *Genome Research*, 2015; 25(8): 1125–1134.
- 16) Wobg WS, Solomon BD, Bodian DL *et al.* *Nat Commun* 2016; 7:10486.
- 17) Awa AA, Honda T, Neriishi S *et al.* *Cytogenetocs: Basic and Applide Aspects*(Obe G, Basler S) 1987, Springer, Berlin, p166-183.
- 18) 放影研要覧 p.32 (2014年発行、2017年改訂)
- 19) Green DM, Sklar CA, Boice, *et al.* *J Clin Oncol* 2009;27(14):2374-81.
- 20) Horai M, Mishima H, Hayashida C, *et al.* *Journal of Human Genetics* 2018;63:357-363.
- 21) Yeager M, Machiela MJ, Kothiyal P, *et al.* *Science* 2021 (May); 372(6543):725-29.
- 22) Dorst JB, Lee WR, *Environ Mol Mutagen*, 1995; 25(Suppl 26):48-64.

Mutation and carcinogenesis do not correlate under chronic low-dose internal radiation exposure: an experimental demonstration

Hiroo Nakajima¹, Mizuki Ohno², Hiroshi Ishihara³, Katsuko Uno⁴, Satoru Endo⁵,
Yumiko Nakajima⁶, and Teruhisa Tsuzuki⁷

1 Institute for Radiation Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

*2 Department of Medical Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medical Science, Kyushu University
Fukuoka, Japan*

*3 Internal Decorporation Research Group, Dept. of Radiation Regulatory Science Research, National Institute of
Radiological Sciences, National Institutes for Quantum Science and Technology, Chiba, Japan*

4 Louis Pasteur Center for Medical Research, Kyoto, Japan

5 Graduate School of Engineering, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

6 Central Institute of Radioisotope Science and Safety Management, Kyushu University, Fukuoka, Japan

7 Kyushu University, Fukuoka, Japan

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

Abstract

Radiation is considered a powerful factor in inducing gene mutations and cancer. Furthermore, since the ICRP has adopted the linear non-threshold hypothesis, it is believed that even a small amount of radiation could induce carcinogenesis. However, our previous studies suggested that, unlike under the action of chemicals, mutations do not correlate with carcinogenesis in response to low-dose internal radiation exposure.

In this study, we demonstrated that mutation and carcinogenesis were not correlated and determined experimentally what level of internal radiation exposure was required to induce carcinogenesis. In addition, we attempted a comprehensive evaluation of our research results and the results shown in many other epidemiological studies.

A three-year study of internal low-dose radiation exposure using mice revealed the following:

1. Mutations due to radiation exposure contributed less to carcinogenesis than that of chemicals causing the same mutation rate.
2. Increased cytokines involved in antitumor immunity were observed as an effect of radiation exposure.
3. External and internal exposure at the same dose and dose rate appeared to cause different gene expression patterns.
4. Orally ingested water-soluble cesium-137 did not accumulate locally, even in areas of direct contact in the gastrointestinal tract.
5. Even in mice with proven hereditary effects of radiation, somatic and genomic mutation rates in offspring did not differ from that of the controls, despite continued drinking of 100,000 Bq/l of cesium water.

These results supported the outcomes from epidemiological studies of second-generation atomic bomb

survivors and radiation-treated pediatric cancer patients and validated current food radiation dose limits (100 Bq/kg).