

## 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 「未分化細胞に対する過酸化物質と放射線の損傷の量的相関関係解析およびセシウム線量推定と発がんの解析」
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	石原 弘	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	福津久美子	量子科学技術研究開発機構

研究要旨	放射性セシウム内部被ばくによる生体影響評価を精細化するために活用可能な分子生物学実験による知見を公表することを目的として二つの研究を進めた。第一の研究は、環境中の放射性セシウムを想定し、低線量被ばく時の吸収線量に比例して増加する生体影響の定量指標の測定技術の開発を進めた。その結果、マウス白血球を使用した DNA 二本鎖切断率と DNA 損傷応答 RNA の同時定量によるバイオドジメトリー実験系を確立した。さらに、遺伝毒性物質である臭素酸塩が放射線に酷似した遺伝毒性を呈することを示し、Msh2(-/-)マウスの臭素酸塩がんモデルの放射線影響研究としての妥当性を示した。第二の研究は、セシウムの小腸吸収をマイクロレベルで放射光解析し、セシウムが局所集中することなく均質に小腸再吸収されることを示した。このことから、Msh2(-/-)マウスの放射性セシウム摂取による小腸粘膜の吸収線量は従来の線量評価方法で問題ないことが示唆された。
キーワード	バイオドジメトリー、DNA 損傷応答 RNA、 $\gamma$ H2ax、遺伝毒性、過酸化物質

## I 研究目的

我々は原子力災害後の不安の原因のうち、第一に低線量放射線の生体影響、第二に放射性セシウムの体内動態において、放射線感受性細胞への集中被ばくの原因となる特定細胞へのセシウム蓄積の無いことが証明されていないという曖昧さに注目し、それらの曖昧さを軽減し、主任研究者らのセシウム影響研究に寄与する定量的データを提供することを目的として、以下の研究計画1（過酸化物用量と<sup>137</sup>Cs内部被ばく線量の量的相関の解析）および研究計画2（腸管循環セシウムのドジメトリー精細化のためのセミマイクロ解析研究）を計画した。それぞれの研究目標は以下のとおりである。

### I-1. 過酸化物用量と<sup>137</sup>Cs内部被ばく線量の量的相関の解析

原子力災害後に指摘されてきたことは、低線量・低線量率被ばく影響についての根拠に含まれる「曖昧さ」である。100mGyを越える被ばくについては、吸収線量とDNA損傷やその惹起する生体影響の「程度」については直線性のあることが予想されている。この生体影響の「程度」を量的に示す指標としては、白血球の染色体損傷量やDNA二本鎖切断量、DNA損傷応答RNA量が客観性の高いバイオドジメトリー指標として実用化段階となり、大規模被ばく事故に備えた国際協力のための技術標準化や国際訓練がRENEB（Realising the European Network of Biodosimetry）プロジェクトとして欧州で実施され、その共同研究の範囲は米国や全世界に拡大されている(16~20)。この国際プロジェクトの主目的は、医学的措置の必要な被災者のトリアージであるため、1000mGyを越える被ばく影響の測定技術の再現性とその普及にあり、100mGy以下の線量域については重視していない。100mGyを大きく越える線量を照射した白血球では細胞増殖抑制機構が活性化してApoptosisなど自己破壊的機構の活性化することが知られており、生体指標の線量依存性増加の直線性は低下し、100mGy以下の低線量域の影響については「曖昧さ」が残る。しかし、疫学的に有意差なしとされる100mGy以下の指標変化については、RENEBプロジェクトでは対象としていないため、国外での低線量影響を表す定量指標の研究の発展は余り期待できない。

我が国では東京電力福島第一原子力発電所F1事故およびその後の事象では、100mGy以下の被ばく影響が問題視されてきた。実験生物学的観点からは、総放射線線量が数mGy程度の極低線量被ばく、特に低線量率被ばくでは、放射線の標的であるDNA損傷の量が、生体に内在する過酸化物や生活環境で体内侵入する遺伝毒性物質による自然発生量の変動幅に埋没するため、DNA損傷の有意な増加や線量-影響の直線性を実験的に提示することは不可能に近いことが予想される。しかしながら、この数mGy程度から100mGyの線量範囲について、吸収線量と生体影響量の直線性を示すことができ、実験的な有意差の下限線量を100mGyから引き下げることができれば、「曖昧さ」の範囲を縮小できるのではないかと考えた。その場合、相関性を示す際の妨害要因である生体試料側の偏差を軽減または制御するために、生体内在指標である活性酸素の暴露量と生体影響量の相関性の把握が必要になることが予想された。

上記RENEBプロジェクトで使用されてるバイオドジメトリー指標のうち、DNA二本鎖切断量およびDNA損傷応答RNA量の二指標は100mGy以下の被ばくで増加することが知られているが、RENEBプロジェクトで推奨されている測定技術は数百mGy以上の被ばく測定に適した方法であり、100mGy以下の線量域の定量には適していない。したがって、100mGy以下の低線量域に適した実験系ならびに測定計を独自に確立することが必要である。DNA損傷応答RNA量の線量

依存性増加を実験的に示す技術については、低線量域被ばく後のマウスから採取した循環血液を使用して筆者らは既に報告している(21~23)。ここでは、循環白血球に含まれる増殖能力を持つ白血球 (Myc RNA+) あたりのDNA損傷初期に発現誘導される $cdkn1a$ 遺伝子のmRNA (Cdkn1a)の比率を定量することにより、被ばく線量20mGyによる有意な増加と線量依存性増加を示しているが、ここで確立した生物試料採取から定量RT-PCRに至る定量技術の確立により、吸収線量-DNA損傷応答RNA量の相関下限線量を100mGyから大幅に引き下げたことを意味している。

しかしながら、この定量実験系をそのまま放射性セシウムや過酸化物質などの遺伝毒性評価に使用することは困難である。その理由は、実験系に使用される短時間に預託線量が100mGyに到達するようにマウス個体に $^{137}\text{Cs}$ を投与して定量実験を実施する場合、マウス集団への投与 $^{137}\text{Cs}$ 総量が数百MBq以上と多くなり、予算的にもアイソトープ施設の能力的にもその実施が容易でないことである。従って、細胞の照射または物質投入から調製までのプロセスのマイクロスケール化は必須である。

低線量域の被ばく影響定量値には、様々な物質による影響が加わることが予想されるので、被ばく後に発生する一連の生体反応プロセスのうち、複数の過程の生体反応を定量指標にすること、さらには異なる定量思想に基づく値を同時に算出することで、遺伝毒性解析の信頼性が高まるのみならず分子機構解析などへの発展性は広がる。そこで本研究計画では、異なるプロセスの定量指標としてDNA二本鎖切断量に注目し、細胞集団分析の可能な顕微定量技術を確立することを第一の目標とした。

過酸化物質である臭素酸塩は小麦粉改良剤として古くから使用されてきた食品添加物であるが、Msh2ノックアウトマウスに経口投与することで空腸粘膜腫瘍を誘発する遺伝毒性作用がある。当該マウスを使用した放射性セシウム影響研究の解析精度を高めるために、本研究項目では臭素酸塩と放射線の遺伝毒性に関して類似性または相違を上記指標を利用して定量的に示すことを最終目標とした。

初年度は顕微定量技術開発に適した系列培養細胞であるRAW264.7細胞を使用し、DNA損傷量に比例して増加するgH2ax指標について、放射線・ $\beta$ エミッター・過酸化物質の用量との相関を求めつつ、低線量域の被ばく影響測定に適する顕微定量法を決定することを目的とした。二年目は、使用細胞を実際の生体に近づけるために、マウス個体から分離した細胞を使用した実験系を模索した。そして、低線量域における照射線量とDNA損傷応答RNAなどの影響量の相関性を示すことのできる、マイクロスケール実験系の確立を目的とした。三年目は、二年目までに確立した低線量放射線影響評価法を使用して、空腸粘膜組織白血球ならびに循環血液白血球における臭素酸塩と放射線の影響を比較することを目的として、研究を実施した。

## I-2. 腸管循環セシウムのドジメトリー精細化のためのセミマイクロ解析研究

セシウムの体内動態について批判される「曖昧さ」には、マイクロレベルでの情報の不足があげられる。放射性セシウムの体内動態は1960年代から研究が進められ、臓器レベルでの臓器被ばく線量評価の信頼性は高い(24)。ところが、その後の医学生物学研究はマイクロ化が進み、実際の発がんの原因となる標的細胞が臓器内に散在する半径数十マイクロメートルの幹細胞にあると信じられるようになった。そして、遷移金属が組織レベルで臓器内局在することが示されるようになると、アルカリ金属であるセシウムも臓器内に局在して幹細胞を被ばくさせるのではないかという想像が生ずるが、それを否定する実験結果が不在であり、曖昧さの要因となる。

この曖昧さを軽減するためには、現代技術を使用してセシウムの臓器内における局在の程度を提示し、現在の臓器被ばく線量評価の正当性を示すことにあると考えた。

セシウムの体内循環における腸粘膜がある。体内に滞留したセシウムは排出量の80%相当量が唾液腺などの消化管から消化管腔に放出され、67%が腸管からカリウムとともに再吸収され、消化管循環することが知られている(24)。すなわち、腸粘膜は体内の放射性セシウムが排出されるまで、β線に晒され続けることになる。

カリウムは絨毛の粘膜上皮細胞で吸収されたのち、ただちに絨毛内の血管に移送されて肝臓に送られる。細胞内カリウムは細胞膜のポンプ蛋白とチャネル蛋白で細胞内外を往来するが、セシウムはイオン半径の相違により細胞内から外に移行しがたく、細胞内に滞留しやすいことが知られている(24)。このようなセシウム滞留細胞が小腸粘膜組織の特定に存在するならば、小腸幹細胞の預託線量はマクロ臓器預託線量の平均が同等であったとしても、分散の拡大により安全域を更に高く設定することも検証が必要になる。

従来の動物臓器における放射性セシウムのオートラジオグラムはβ線の飛程の長さから解像度がmmオーダーとなり、組織レベル解析は困難であった(25)。しかし、特性X線分析技術の進展により組織切片中の非放射性セシウムの存在部位と量がマイクロレベルで解析可能となってきた(注3)。我々は組織切片に1マイクロメートルに収束した陽子線ビーム(PASTA-SPICE, 注3)または高エネルギー放射光(SPring-8, 注3)を照射して凍結組織切片中のウランのセミマイクロ定量分析技術開発を進め、腎臓尿細管組織におけるウランの局在を示してきた(26)。本研究計画では、これまで開発を進めてきた特性X線解析装置とソフトウェアの改良により、腸組織内セシウムのマイクロレベルでの分布を分析し、極端な濃集の有無を判定することを最終目標とした。

初年度は組織切片中のセシウムの励起X線分析を行う準備のために、天然セシウムを投与したマウス臓器のICP-MS定量系を確立し、切片作成のための至適投与量および採取時間等を決定するとともに、セシウム励起X線分析用の種々の定量用標準系列試料の調製など放射光分析の基盤整備を目的とした。二年目は大型放射光施設であるSPring-8(Super-Photon ring-8 GeV)のセシウム分析のためのビームライン使用申請が承認されたので、セシウム投与マウス空腸の組織連続切片の定量分析のためのソフトウェアおよびハードウェアの最適化ならびに定量検量線と定量限界濃度の算出、ならびに小腸粘膜組織内の金属分布を分析するためのメタデータ獲得を目的とした。三年目は二年目に得られたメタデータについてソフトウェア開発ならびに解析を進め小腸粘膜内セシウム滞留の有無を確認すること、また、量研機構のPASTA-SPICEを使用した場合のセシウム定量範囲の算出を目的とした。

注1: 食品および環境基準の科学的な安全性の確保について

当該災害発災直後の平成23年3月17日、放射性セシウムによる内部被ばく線量の抑制のため、厚生労働省は食品衛生法(昭和22年法律第233号)に基づき放射性ヨウ素・セシウム・ウラン類の飲食物摂取制限に関する指標を通知した(1)。これが通称、暫定規制値であり、放射性セシウムについては、セシウム汚染飲食物の連続摂取による年間許容線量を5mSvと設定して当時の原子力安全委員会が算出した値から逆算したものである。その年間許容線量の妥当性は食品安全委員会でも認められた(2)。この暫定規制値に基づく流通管理により(3)、食品等の検査ならびに出荷制限が関連省庁のみならず、東日本の各自治体により実施された。これらのデータならびに人体のホールボディカウンター検査による体内放射性セシウム量のデータは食品安全委員会でも精査・検証され

(4)、放射性セシウム等の基準値の決定に至った(5)。その経緯、算出根拠ならびに検査と出荷制限についての一般向けの簡単な解説は環境省から公表された(6)。

#### 注2: 食品および環境基準の遵守

半減期の長い放射性セシウムの検査は事故10年を超えた現在でも実施されている。原子力災害対策本部は「検査計画、出荷制限等の品目・区域の設定・解除の考え方」の改正を現在も継続しており(7)、それに基づき中央省庁による食品(8)、水道(9)、農産物(10)、山菜類(11)、水産物(12)、酒(13)のみならず、都道府県産物については所掌の都道府県庁が現在も実施・公表を続けている。

放射性セシウムは環境中の土壌・微生物・生物残渣などからも容易に人体に侵入することが知られているので、放射性セシウム濃度の検査は、行楽地・海岸などは立地都道府県により、福島県の海水浴場は原子力災害対策本部(14)により、空港や港湾(15)は国土交通省により実施され公表されている。同様に、公営プールの水、ゴミ処理場、衛生処理場、終末処理場、土壌、河川等の放射能調査は市区町村が実施・公開している。測定値に基づいて適切な管理がなされているだけ、健康影響リスクの有意に増加するほどの内部被ばく事故等の発生は現在まで報告されていない。

#### 注3: ミクロレベルでの特性X線分析

組織切片の任意の場所に1 $\mu$ m x 1 $\mu$ mに収束した陽子線ビーム[PASTA-SPICE, Pixe (Particle Induced X-ray Emission) Analysis System and Tandem Accelerator-Single Particle Irradiation system to Cells, 粒子線励起X線放出分析用加速器システム-細胞への単粒子線照射装置]または高エネルギー放射光(SPring-8, Super-Photon ring-8 GeV)を照射すると、被照射部に存在する原子のK殻電子が放出され、生じた空のK殻軌道にL殻電子が移動する。K軌道とL軌道のポテンシャルエネルギー差が特性X線として外部に放出されるが、その波長は金属元素の場合金属毎に著しく異なるので特性X線の波形解析から、照射野内に存在する金属とその量が解析可能となるので、解像度4ないし1 $\mu$ m以下のミクロ金属分布分析が可能となる。

## II 研究方法

第一の課題である過酸化水素用量とセシウム 137 内部被ばく線量の量的相関の解析については、初年度は培養細胞系を使用して低線量域被ばく影響解析に適用可能な DNA 二本鎖切断量の顕微定量技術を確立し、照射線量との相関を求めた。また、DNA 損傷応答 RNA 値と放射線量との相関を求め、複数の過酸化水素やセシウムの暴露実験をモデルケースとして行った (II-1)。二年目は初年度で確立した技術を正常細胞に適用するとともに、定量線量範囲を低線量化するために、C3H/He マウスの骨髄滞留白血球の微量培養系を *ex vivo* 照射して DNA 損傷応答 lncRNA の挙動を分析した (II-2)。三年目は測定線量範囲を更に低線量とするために、Msh2(-/-)の野生型である C57BL/6 マウスから採取した血液の保温系を導入し、*ex vivo* 照射実験で放射線量と gH2ax 値ならびに DNA 損傷応答 lncRNA の検量線を求め、臭素酸影響を定量化した (II-3)。また、低線量被ばくマウスから採取した小腸粘膜を用いて線量と DNA 損傷応答 lncRNA 量の定量相関を求め、臭素酸塩経口投与影響を調べた (II-4)。

第二の課題である腸管循環セシウムのドジメトリー精細化のためのセミマイクロ解析研究についてはセシウム含有腸組織切片やセシウム定量標準標本を初年度に調製し、組織内セシウム分布の定量準備を二年目は SPring-8 (II-5)、三年目はマイクロ PIXE (II-6) を使用して分析した。

## II-1. 第一課題 1. RAW264.7 細胞における放射線量と DNA 損傷応答 RNA 量および DNA 損傷量の相関

培養細胞はマウス破骨細胞系ライン化細胞である RAW264.7 細胞の高速増殖サブクローン（倍加速度 18 時間）を使用した。10%FCS を含む RPMI-1640 培地で培養した細胞を 20°C で X 線（200V, 200mA, Al-Cu-0.5mm-filter）照射した。照射装置の線量率はそれぞれ AirKerma から水吸収線量率 Gy/min として求め、0.5~1.0Gy/min の範囲で照射した。β エミッターとしてはセシウム 137 を使用し、Ge 半導体検出器で放射能測定した <sup>137</sup>CsCl を 0.1mL 培地に 488kBq を投入した。セシウム 137 の β 線平均エネルギーが 188.4keV であることから、488kBq/0.1mL/1hr では 500mGy 相当と見積もられた。過酸化物質としては過酸化水素（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）と臭素酸ナトリウム（NaBrO<sub>3</sub>）、遺伝毒性金属はクロム酸カリウム[K<sub>2</sub>Cr(VI)O<sub>4</sub>]を使用した。これらは pH7 付近の水溶液として調製したのちに培地に投入し、20°C で 1 時間培養した。物質実験の際には毎回線量既知の X 線を照射した細胞を調製して、DNA-damage 定量標準とした。

γ H2ax 定量分析は以下の方法で行った。薄ガラス底培養皿上で付着培養して上記処理した RAW264.7 細胞を新鮮な培地で 37°C 30 分培養した後にホルムアルデヒド蒸気固定した。DNA-damage 定量標準を含む一群の試料を同時に染色して蛍光顕微鏡画像作成した。すなわち、常法に基づいて DNA 損傷を γ H2ax 蛍光抗体染色した後に、試料中の生存細胞核の同定のためにヘキスト 33342 核染色し、一視野あたり 3 画像（gH2ax、ヘキスト、微分干渉）を撮影した。撮影は核蛍光減衰が 10%を超えない総励起時間内に行い、少なくとも 1 標本から 5 視野以上の画像セットを得た。画像セットのうち、γ H2ax 染色画像の陽性ドットを識別可能とするために Image-J の画像調節（Image-adjust）を使用して定量に至適な閾値（Threshold）を得た。すなわち、試料群のうち最高線量の X 線を照射した細胞試料を最高対照、Sham 照射細胞試料を最低対照とし、γ H2ax 陽性細胞率が最低対照では約 0.05 かつ最高対照でなるべく大きくなるように閾値を決定した。この閾値で全 γ H2ax ファイルから増強ファイルを作成し、ヘキスト核染色画像と対比させて、健康な核の数と、その γ H2ax 陽性細胞数を求めた。

低線量放射線影響を分析するための RNA 指標としては Cdkn1a mRNA を使用した。基準 RNA としてはハウスキーピング遺伝子の Gapdh mRNA を使用した。上記処理した細胞は 2 時間培養したのちに総 RNA を調製-定量し、300ng あたり 10unit の AMV 逆転写酵素で cDNA を合成し、上記 RNA に相当する primer を使用して quadruplicate で real-time PCR で定量した。real-time PCR 反応の際、毎回到 10 zepto(z)mole の標準 DNA を鋳型として増幅して定量標準とした。定量標準の増幅が 25 cycle 前後となる閾値における各試料のサイクル数から鋳型モル量を算出した。なお、定量有効桁数が 2 の場合の PCR 反応 well あたりの鋳型モル量は 0.5~40 zmole であるので、当該範囲から外れる場合は鋳型 cDNA 量を変えて再度 real-time PCR 定量した(21, 22, 23)。

## II-2. 第一課題 2. マウス組織白血球の ex vivo 照射による DNA 損傷 RNA 誘導

正常なマウス細胞における生体影響測定をマイクロスケール化するために、骨髓片培養系を採用した。すなわち、C3H/He マウスを安楽死させた直後に大腿骨を採取した後に実体顕微鏡下で切断破砕して骨髓組織を含む骨片とした。1 本の大腿骨あたり 5-6 個の骨片として、各骨片を 100uL の 10%FBS を含む RPMI 培地に浸漬し 2 時間予備培養した。この試料試験管を II-1 と同様の方法で X 線照射したのち、37°C で 2~8 時間緩やかに振盪培養した後に、II-1 と同様の方法

で総 RNA 定量ならびに DNA 損傷応答 RNA 定量を行った。種々の DNA 損傷応答 RNA 種のうち、最も DNA 損傷に感受性が高く背景量の少ない long non-coding RNA であることが知られる (27) Primary miR34a (34a) を指標とした。また培養試料中の白血球の増殖活性を示す指標として総 RNA あたりの *gapdh* および *myc* の mRNA モル数を求めた。

### II-3. 第一課題 3. 保温血液中の白血球の *ex vivo* 低線量照射による DNA 二本鎖切断および DNA 損傷応答 RNA

正常細胞に対する照射から試料調製までのプロセスをミクロスケール化するために、マウス個体から採取した白血球集団を微量培養する必要があるが、細胞を個体から培養環境に移すことによる環境変化により DNA 二本鎖切断量や DNA 損傷応答 RNA 量が著しく増加してしまう。これが背景量になるので低線量影響分析は不可能となる。二年目に種々の初代培養系を比較した結果、C57BL/6 マウスの保温血液が最も背景量の低くかつ放射線応答性の高いことが判明した。

循環白血球濃度の概日リズム影響(21)を制御するために採血時刻は昼時間(ZT)-03:00 とした。セボフルラン麻酔した 8~10 週齢の C57BL/6 の頸部を切開し、全血液を採取して 20mM EDTA 抗凝血環境下 40 $\mu$ L ずつに分注した。血液の維持と照射は 20 $^{\circ}$ C として作業は 1 時間以内とした。実験毎に 0 から 100mGy の範囲の放射線照射血液試料を試料群定量標準として含ませ、 $\gamma$  H2ax と RNA 分析を行った。照射後の血液は 37 $^{\circ}$ C で 30 分から 24 時間振盪保温した後に溶血後サイトスピン法で  $\gamma$  H2ax 用標本を、グアニジン溶解で RNA 試料を調製した。臭素酸塩はナトリウム塩を使用して、容量比 0.02 として分注血液に投入し、37 $^{\circ}$ C 保温後に上記と同様の方法で標本と RNA 試料を調製した。同一実験群の  $\gamma$  H2ax 標本については同時に固定~染色~蛍光顕微鏡撮影した。

### II-4. 第一課題 4. マウスの空腸粘膜滞留白血球における DNA 損傷応答 RNA の測定

4mM の臭素酸を長期摂取した *Msh2* ノックアウトマウスでは小腸粘膜が癌化することが報告されている。*Msh2* ノックアウトマウスでは遺伝子修復機能に欠損のあるために、小腸粘膜上皮の未分化幹細胞の核酸損傷が蓄積して腫瘍化に至ることが推定されるが、小腸粘膜組織が臭素酸塩に暴露された直後の時点では、野生マウスもノックアウトマウスも同等の核率で核酸損傷の発生することが予想される。小腸粘膜上皮細胞の未分化細胞は粘膜下組織に存在することが予想されているが、粘膜下組織の細胞外液に臭素酸イオンが侵入して当該細胞の核酸を損傷するならば、粘膜下組織に存在する未分化白血球も同等の核酸損傷を受けることが予想される。小腸上皮細胞の未分化細胞は造血系細胞の 4-5 倍の放射線耐性があるため、小腸上皮細胞を使用して低線量影響を実験的に測定することは不可能であるが、共存する白血球が粘膜下組織におけるセンサーになる可能性を考慮して一群の実験を行った。

空腸粘膜下組織における増殖中の上皮細胞および増殖中の滞留白血球を識別するための BrdU 投与~染色法は定法に従った。小腸粘膜白血球の損傷量の指標は DNA 損傷 RNA を使用した。マウス処理は筆者らの既報(28, 29)に準じた。すなわち、吸収線量が 100mGy となるように全身照射したマウスおよび非照射マウスを 4 時間後に安楽死させた後に小腸を分離、粘膜を溶解して RNA 用試料とした。臭素酸処理群は 2, 4 ないし 8mM の臭素酸塩をマウスに強制経口投与し、4 時間後に安楽死させて同様に RNA 用試料とした。RNA 用試料は上述と同様の方

法で RNA を精密定量した。

## II-5. 第二課題 1. SPring-8 による腸切片中のセシウム定量技術開発

セシウムを含有する小腸切片作成のために、kg 体重あたり  $19 \mu\text{mole}$  の天然セシウムをマウスに皮下投与した。投与 2 時間後にマウスを放血-安楽死させたのちに小腸を分離し、凍結切片用に包埋して凍結保存した。凍結小腸から  $10 \mu\text{m}$  厚の切片をポリアクリライト板にマウントして SPring-8 用試料とした。また、検量線作成のための定量標準試料としてに 0, 20, 50 または 100ppm のセシウムを含む包埋ゲルから調製した  $10 \mu\text{m}$  厚の凍結切片をポリアクリライト板にマウントした。

各種組織切片およびセシウム標準凍結切片を使用して、SPring-8 のビーム径を  $1 \mu\text{m}$  から  $0.1 \mu\text{m}$  に変化させて照射し、セシウムから放出される  $31\text{keV}$  付近の  $\text{K}\alpha$  放射光を適正に分析するために、照射室内の切片設置装置や計測機器の配置、ソフトウェアの適正化を進めつつ、検量線を作成した。

セシウム投与マウスの腸切片については、小腸のルーメン-絨毛-粘膜-平滑筋を含む  $400\text{mm} \times 400\text{mm}$  エリア内の 625 箇所  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$  ビームを 10 秒ずつ照射し、セシウムの濃度分布を調べた。

## II-6. 第二課題 2. マイクロ PIXE による腸切片中のセシウム定量技術開発

II-5 で調製した凍結腸管から切片をポリプロピレンフィルムにマウントした。SPring-8 より検出感度が低いことが予想されたので、セシウムの定量標準系列の濃度範囲は 50~1000 ppm として検量線作成に使用した。プロトンビームサイズは  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$  として分析した。

### (倫理面への配慮)

本研究における放射線照射実験、アイソトープ使用実験、Pixe使用実験については事前に計画書を初年度と二年目は国立研究開発法人量子科学技術研究開発（量研）機構量子医学・医療部門放射線医学総合研究所（放医研）技術安全部放射線安全課、三年目は量研機構量子生命・医学部門技術安全部放射線安全課に提出し、その内容確認および指導のもとに適正に実施した。SPring-8大型放射光施設の使用については、国立研究開発法人理化学研究所播磨事業所安全管理室による安全管理教育を受講して適正に実施した。遺伝毒性物質使用実験については事前に作業計画を初年度と二年目は量研機構放医研技術安全部安全管理課、三年目は量研機構量子生命・医学部門技術安全部保安管理課に提出するとともに、製品のMSDSに基づいた安全作業および適切な廃棄を作業者に指導した。また、動物実験は動物愛護の観点から適切な作業計画を作成し、初年度と二年目は量研機構放医研生物研究推進室、三年目は量研機構量子生命・医学部門生物研究推進室に提出し（受付番号15-1009-3および18-1010）、外部委員を含む実験動物委員会による内容審査および承認後に実施した。

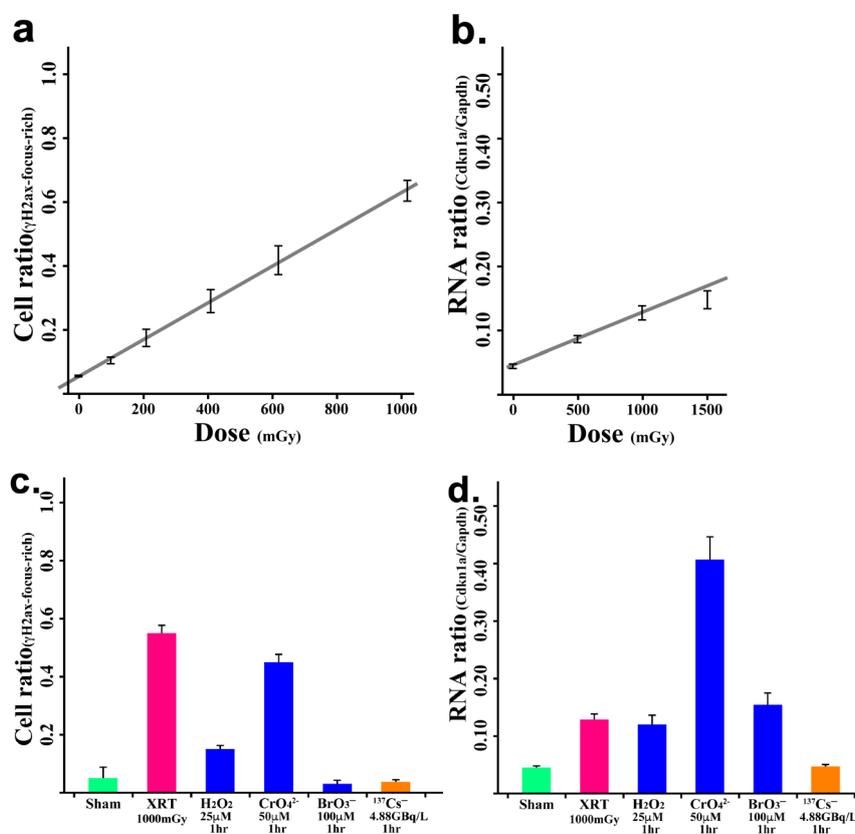
## III 研究結果

### III-1. RAW264.7細胞における放射線量とDNA損傷応答RNA量およびDNA損傷量の相関

RAW263.7細胞は白血球よりも放射線に耐性であるが培養液の溶存酸素にも耐性で背景レベ

ルが上がりにくいので顕微定量技術開発のために使用した。照射線量と細胞の $\gamma$ H2ax陽性率の相関を求めるため、100mから1000mGyの範囲でRAW264.7細胞をX線照射して $\gamma$ H2ax染色した。最高線量の1000mGyを最大対照、0mGyを最小対照として至適なImage-J増強閾値を決定し、全試料の $\gamma$ H2ax陽性率を求めた結果が図III-1aであり、きわめて高い直線性が得られた。また、同様に500~1500mGyのX線で照射したRAW264.7細胞について、DNA損傷応答RNAとしてCdkn1a mRNAを定量した結果が図III-1bである。1000mGy以下では高い直線性が得られた。

この $\gamma$ H2ax頻度ならびにCdkn1a RNA比を定量指標として、DNA損傷作用を持つ遺伝毒性物質の影響を比較した。過酸化物として過酸化水素と臭素酸ナトリウムのほか、オキソ酸金属であるクロム(VI)酸を使用し、 $\beta$ エミッターは $^{137}\text{Cs}$ を使用し、20°Cで1時間接触させた後の $\gamma$ H2ax率を図III-1cに、CDKN1a mRNA率を図III-1dに示した。

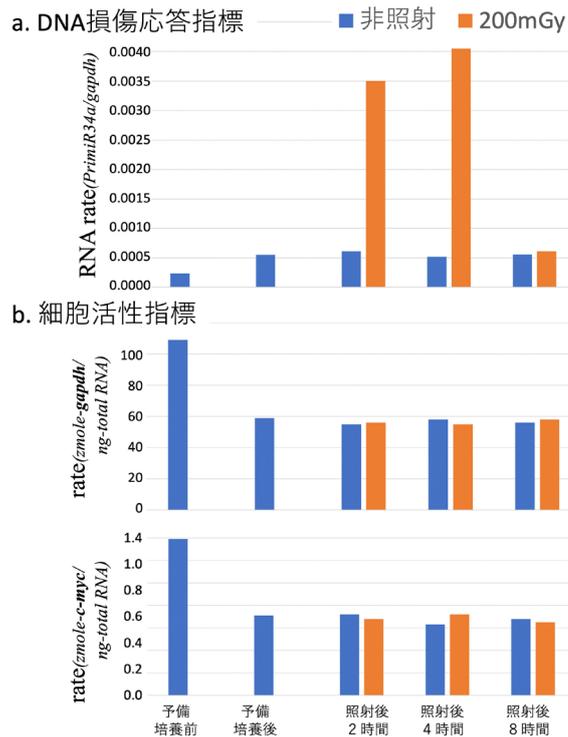


図III-1. RAW264.7細胞における照射線量と $\gamma$ H2ax頻度(a)とDNA損傷応答性CDKN1a発現量(b)の相関 (バーはSDを示す)、遺伝毒性物質処理 (条件は横軸下に記載) による $\gamma$ H2ax頻度(c)およびCDKN1a発現(d)への影響 (平均値およびSDを示す)。

### III-2. マウス組織白血球のex vivo照射によるDNA損傷RNA誘導

マウス大腿骨片 (骨髄を含む) を培養するマイクロスケール照射-測定系を使用してRNA発現量の変化を測定した。DNA損傷応答RNAのうち34a lncRNAは予備培養2時間で2倍に増加したのちそのレベルを維持していた (図III-2a, 青) が、200mGy照射したところ培養2~4時間にかけてさらにその6-8倍に増加した (図III-2a, 赤)。この時点での骨髄片中の白血球の生育状態を総RNA量 (ng) あたりのgapdhおよびmyc RNAのzept mole量として図III-2bに示す。白血球集団は培養系に移植することで増殖指標は半減するが、その後の培養で少なくとも8時間までは明瞭な減少は

認められなかった。また、200 mGyの照射による影響も現れなかった。



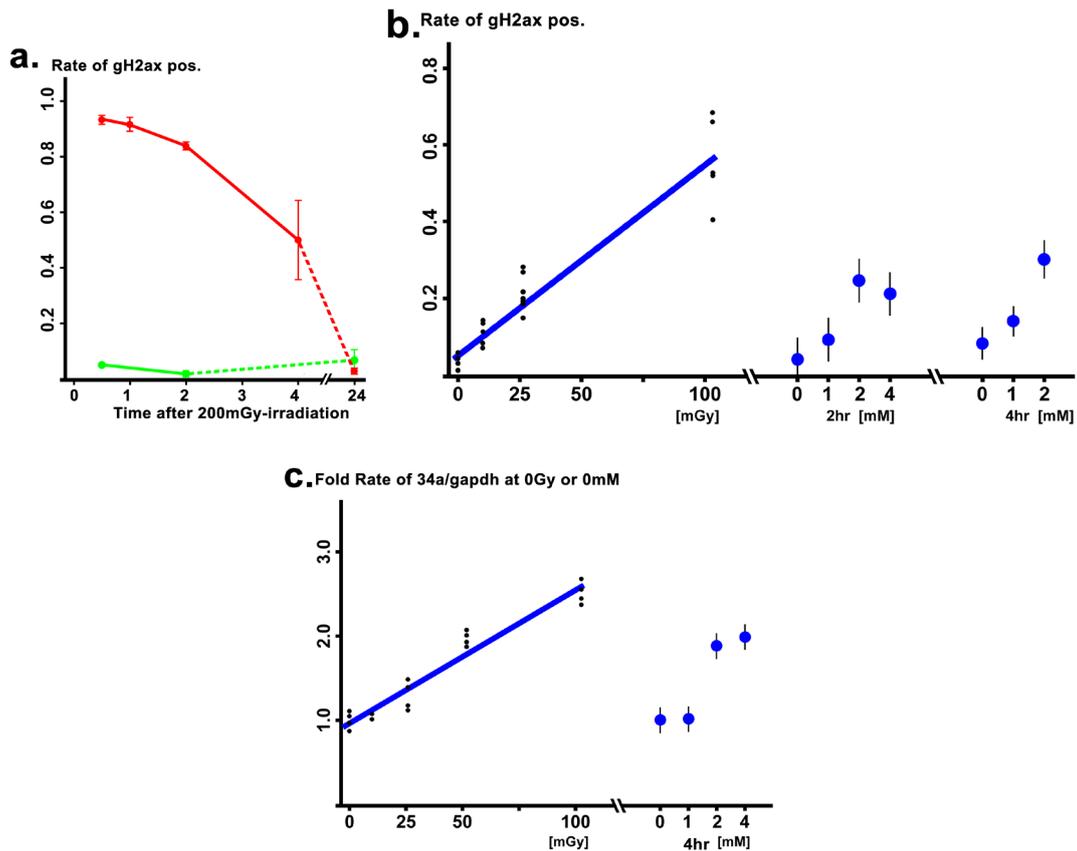
図III-2. マウス培養骨髄におけるDNA損傷応答RNA(a)および増殖指標RNA(b)の発現の推移  
a. 200mGy照射 (赤) もしくは0mGy照射 (青) 後のRAW264.7細胞 (採取タイミングは横軸下に記載) における、DNA損傷応答指標の平均値(a)、および細胞活性指標の平均値(b)。

### III-3. 保温血液中の白血球のex vivo低線量照射によるDNA二本鎖切断およびDNA損傷応答RNA

ミクロスケール保温血液をex vivoで非照射 (緑) または200mGy照射 (赤) した後の $\gamma$  H2ax陽性率の推移を図III-3aに示す。一般に照射30分後に最大かつ最も再現性の高い $\gamma$  H2ax陽性率の得られることが広く知られている。この保温血液系でも30分後が最大値を示し、その後緩やかに減少することが示された。図III-3bには $\gamma$  H2ax率による臭素酸と放射線の影響対比の結果を示す。

10mGyから100mGyの放射線照射後30分保温後の血液における白血球の $\gamma$  H2ax陽性率は直線相関性を示した (図III-3b, 左) ので、定量検量線となる。1-4mMの臭素酸で2時間 (図III-3b, 中) ないし1-2mMの臭素酸で4時間 (図III-3b, 右) 保温した後の $\gamma$  H2ax陽性率と対比した。なお、4mMの臭素酸とした血液試料は保温4時間前後から酸化ヘモグロビンの増加が見られた。

ここに示すデータの元となる試料はすべて同一日時に実験～染色～撮影を行い、同一閾値で画像を加工しているため、対比が可能である。その結果、2mMの臭素酸は2時間で約30mGy、4時間で約60mGyに相当するDNA損傷を付与することが推定された。これと同様にDNA損傷応答RNA比を指標とした線量と値の相関図 (図III-3c, 左) と臭素酸と4時間保温 (図III-3c, 右) した結果から、2mMの臭素酸は4時間で約60mGy相当のDNA損傷応答RNA発現していることが示唆された。なお、ここに示すデータは現時点で得られているデータの一部であり、最終的には全データの統計処理により精密化をはかる予定である。



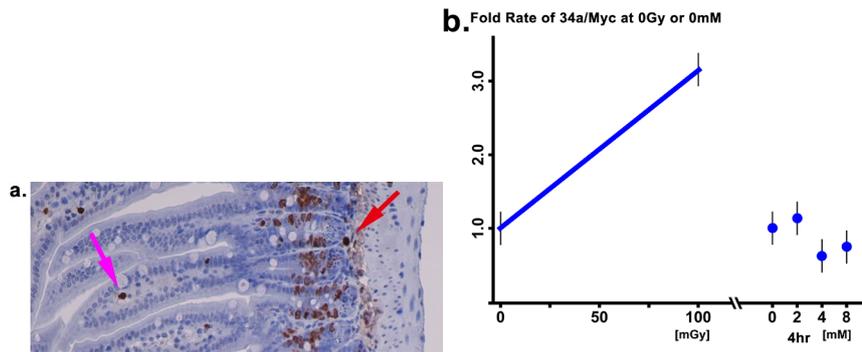
図III-3. マウス保温血液における  $\gamma$  H2ax頻度(a, b)とDNA損傷応答RNA(c)

a. 200mGy照射 (赤) または0mGy-sham照射 (緑) 後の保温時間 (横軸) 後に採取した試料の平均値をドットでSDバーとともに示した。b. 左は照射後30分後の保温血液について各試料のgH2ax比の値を黒ドットで散布図として回帰直線 (青線) を示した (相関係数0.9657, 寄与率0.9326,  $P < 0.001$ )。b右は臭素酸処理 (濃度と時間は横軸に記載) 後の値の平均値 (青●) および95%CI (黒バー) を示す。c. 左は照射後4時間後の保温血液のRNA比について0mGy処理時の平均値あたりの各試料の増減率を黒ドット、その回帰直線 (青線) を散布図として示した (相関係数0.9652, 寄与率0.9400,  $P < 0.001$ )。c. 右は臭素酸処理 (濃度は横軸に記載) 4時間後の値の平均値 (青●) および95%CI (黒バー) を示す。

#### III-4. マウスの空腸粘膜滞留白血球におけるDNA損傷応答RNAの測定

図III-4aは正常マウス空腸のBrdU染色像でありDNA合成中の各は褐色で示される。粘膜上皮の未分化細胞は絨毛の根元の陰窩内で活発に増殖し、複製した細胞は絨毛方向 (左側) に送り出される。粘膜下組織には球状の白血球が散在し、その一部はDNAを合成している (赤矢印)。絨毛の上皮細胞の直下にも分化した白血球が埋め込まれて異物侵入に備えているが、絨毛内で増殖した白血球 (紫矢印) により供給される。あらゆる組織には白血球が混在しているが、存在比は数%程度であるために、RNA試料中の白血球の寄与率はごく僅かである。しかし、c-myc mRNAの発現は増殖白血球の一部に限られ、34a lncRNA誘導も白血球に限られるため、34a lncRNA/c-myc mRNA比をもって、組織内に滞留した白血球の遺伝的損傷の程度を推定することが可能である(21, 23)。図III-4bの左には吸収線量と34a/myc比が示されているが、100mGyの被ばくにより34a/myc値は非照射の約3倍に増加する。2mMの臭素酸塩を経口投与しても空腸粘膜の

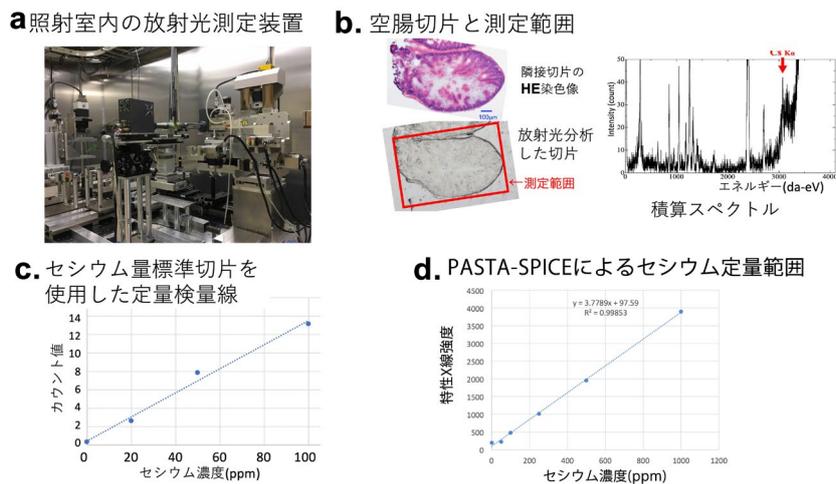
34a/myc値は変動しなかったが、4mMと8mMの臭素酸塩を投与すると、34a/myc値は半減した(図III-4b, 右)。



図III-4. a. マウス空腸切片のBrdU染色像(a) (褐色は増殖中の白血球)。b. 粘膜の白血球細胞集団におけるDNA損傷応答RNA発現をX線照射後 (左パネル、平均値とSDを示す) と臭素酸塩影響 (右パネル、平均値を青ドットでSDバーと共に示す) の比較(b)。

## II-5. SPring-8およびPASTA-SPICEによる腸切片中のセシウム定量技術開発

切片をSPring-8のビームラインにセットして照射し、照射した切片部位のセシウムから放出される蛍光X線スペクトルを測定した (図III-5a)。測定装置の配置や照射角度などでスペクトル波形が大きく変わり、スペクトル解析処理も異なるので種々の条件で測定を行った。最終的にビームサイズ1 $\mu$ メートル平方として腸管切片をランダムスキャンしてスペクトルを積算することで3000 eV付近のセシウムのピーク (図III-5b) が測定できた。定量標準切片試料を使用した定量検量線が得られた (図III-5c)。SPring-8に比してマシンタイム承認率の高いPASTA-SPICEについてセシウムの定量検量線を作成したが、その感度はSPring-8使用時の10%程度であることがわかった (図III-5d)

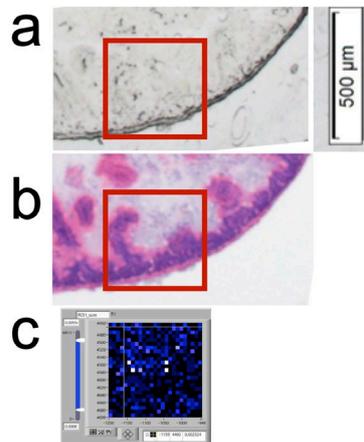


図III-5. SPring-8ビームラインの切片照射部と測定装置(a)、測定した腸切片と積算蛍光スペクトル(b)、定量標準切片試料を使用したセシウムの検量線(c)、PASTA-SPICEを使用したセシウムの検量線(d)。

## III-6. 小腸粘膜組織におけるセシウム滞留部位の測定

上部空腸切片 (図III-6a) では組織構造が判別し難いが、その連続切片試料をHE染色 (図III-

6b) 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400um x 400umの部位 (図III-6aおよびb赤枠内) について、X軸-Y軸をそれぞれについて16umずつの間隔で25箇所ずつ合計625箇所を1um x 1umビームを10秒ずつ照射した。各625箇所ごとの推定セシウム量を図III-6c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。



図III-6. 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(a)と連続切片のHE染色画像(b)、400 um x 400 umの赤枠部分について分析。当該部分のセシウム分布(c)。

1um x 1umビームでセシウム分布を測定X軸Y軸それぞれに16um ピッチx 25箇所ずつ回したビームラインの切片照射部と測定装置(a)、測定した腸切片と積算蛍光スペクトル(b)、定量標準切片試料を使用したセシウムの検量線(c)。

#### IV 考察

##### IV-1. 過酸化水素用量と<sup>137</sup>Cs内部被ばく線量の量的相関の解析

本研究では初年度に系列培養細胞を使用して低線量域の被ばく影響測定に適する $\gamma$  H2ax顕微定量方法を開発した。二本鎖DNA切断に結合する $\gamma$  H2ax-DNA複合分子を抗体に結合させ、その結合数を定量することで、二本鎖切断DNAに比例する値が得られる。定量方法としては顕微鏡像の画像解析による定量である顕微定量法を使用した。RENEBプロジェクトグループの中には生化学的なELISA定量やフローサイトメトリー定量を採用しているグループも含まれるが、いずれも高線量分析に適した定量原理に基づく(20)。また、顕微定量法も高線量分析に至適な画像解析法を推奨している。我々は独自の画像解析フローチャートを作成し、線量と $\gamma$  H2ax陽性率の直線性が得られた (図III-b)。この線量は低線量域ではないが、その理由は使用したRAW264.7細胞が白血球などに比べ放射線に耐性であることによる。DNA損傷応答RNAの発現量も生体の白血球より高い線量で照射したときに有意な増加と線量依存性を示した (図III-a)。また、DNA損傷応答mRNAであるCdkn1a発現量も1000mGy以下の線量に直線性が見られた (図III-1b)。それらを検量線として種々の遺伝毒性物質のDNA損傷率を比較した (図III-1c, 図III-1d) ところ、25  $\mu$  Mの過酸化水素は約200mGy相当量 ( $\gamma$  H2ax) と約1000mGy相当量 (Cdkn1a)、100  $\mu$  Mの臭素酸塩は0mGy相当量 ( $\gamma$  H2ax) と1000<mGy相当量 (Cdkn1)、50  $\mu$  Mのクロム酸は約800mGy相当量 ( $\gamma$  H2ax) と1500<<mGy相当量 (Cdkn1a) であり、いずれも $\gamma$  H2axにより見積

もられた値は低く、Cdkn1a mRNAによる値は高かった。このことはCdkn1a mRNAはあらゆるDNA損傷に応答して発現することに対し、過酸化物による二本鎖DNA切断効率が高くない古くからの知見 (BEIR-V) と矛盾しないが、RAW264.7細胞は癌化した細胞であるため一般化には無理がある。今回の実験ではCs137による細胞の被ばく線量は500mGyに相当することが予想されたが、 $\gamma$  H2axおよびCdkn1a RNAとも有意な増加は認められなかった。初年度の本研究の結果、細胞処理から顕微定量に至るフローチャートが確立したので正常細胞を使用した影響定量に研究を進めることができた。

初年度に決定した $\gamma$  H2ax定量技術を正常細胞に適用する前に、正常細胞を使用した照射・過酸化物投与から試料調製までをミクروسケールで行う実験プロセスを決定する必要がある。ところが、マウス体内の白血球は、個体から培養系に移すことで急速な細胞死が発生し、DNA二本鎖切断量やDNA損傷応答RNA量が著しく増加して背景量が高めるために、低線量影響分析は不可能である。そこで、二年目は種々のC3H/HeおよびC57BL/6系統のマウスを使用して、種々の初代培養-照射系を比較した。図III-2はその一例を示すが、大腿骨の骨髄に保持された白血球のRNA発現を測定した値である。培養により増殖能力は半減 (図III-2b)、DNA損傷応答RNAのうち34a lncRNAの背景量は倍増したが、放射線による誘導発現量は数倍に増加した (図III-2a)。大腿骨髄の多くの細胞は放射線耐性であるため、200mGyの放射線で損傷応答RNAを発現する集団は細胞集団の5%以下の単核白血球であることが予想された。

マウス体外への移動と後培養という環境変化があっても白血球のDNA損傷応答RNAの変動が最も少なく、かつ、低線量照射で有意な増加が測定しやすく、 $\gamma$  H2ax分析に適用可能な系を比較したが、最終的にII-3~III-3~IV-3に示すC57BL/6マウスの保温血液が最も良好な結果が得られたので三年目は当該保温血液系で定量分析を進めた。その結果、100mGy以下の線量と30分保温後の白血球の $\gamma$  H2ax陽性率に相関性が認められ (図III-3b,左)、2mM臭素酸存在下4時間保温した血液中で白血球の $\gamma$  H2ax陽性率は概ね60mGy前後で照射した血液に相当することが推定された (図III-3b, 中, 右)。DNA損傷応答RNA率と線量の相関性は低下していたが (図III-3c, 左)、2mM臭素酸存在下4時間保温した血液における白血球のDNA損傷応答RNA率は $\gamma$  H2axと同様に60mGy前後で照射した血液に相当する可能性があった。白血球細胞に対する2mM臭素酸塩4時間処理により、両定量指標がともに60mGy-X線相当であったことは、臭素酸塩と放射線の遺伝毒性作用は極めて類似した様式を示すことを示唆していた。

こうした方法を使用してMsh2ノックアウトマウスにおいて空腸発がんを誘発する臭素酸塩の経口投与影響を空腸粘膜下組織内の白血球RNAを指標として調べた。小腸の絨毛上皮組織には主にT細胞系の腸管上皮細胞間リンパ球 (IELs, Intraepithelial lymphocytes) が異物侵入や上皮細胞破損に対応し、クリプト周囲の粘膜下組織には主にB細胞系の粘膜固有層リンパ球 (LPLs, lamina propria lymphocytes) が存在してルーメンへのIgAを分泌することが知られ、全身から腸組織に至る白血球の供給系が近年明らかにされつつある(30)。これらの分化した白血球は絨毛内またはクリプト付近で分化増殖する白血球から供給されていることが知られており、これらの分化増殖白血球は通常のBrdU染色と核形で同定することができる (図III-4a, 赤矢印はLPLs, 紫矢印はIELs)。これらの組織滞留白血球は循環白血球と同様に被ばく線量に依存してDNA損傷応答RNA発現量を増加させることは図III-4b左でも確認できる。図III-4b右に示すように、2mMの臭素酸塩を一回経口投与したマウスの空腸粘膜白血球のDNA損傷応答RNA量は増加せず、小腸

粘膜組織における臭素酸濃度は1mM以下であることが示唆された。4mMおよび8mMの臭素酸塩を投与したところ、当該RNAの発現量は半減した。精細な遺伝子発現分析の結果、小腸粘膜下組織における白血球数の著しい減少が推定された（data not shown）ため、4mM以上の臭素酸塩では小腸粘膜組織内における免疫反応の発生が示唆された。したがって、空腸粘膜組織における臭素酸影響は遺伝毒性以外の要因を考慮する必要のあることが示唆された。

以上のように、C57BL/6系の循環血液のマイクロスケール保温系を使用した低線量域放射線の生体影響を定量的に示す $\gamma$ H2ax陽性率の顕微定量とDNA損傷応答RNAの分子定量の同時解析方法を確立し、少なくとも循環白血球細胞において、2mM臭素酸塩4時間で60mGyの放射線に相当かつ、類似した遺伝毒性様式であることが示された。この定量マニュアルが完成したので、低線量率の放射線による連続被ばくや、放射性セシウム内部被ばくによる影響を量的に比較するとともに、種々の生体内在性の遺伝毒性物質や、環境中のDNA損傷要因物質の影響との定量比較を進めることで、様々な遺伝毒性物質に暴露されて生活している人類における、自然放射線や放射性セシウムによる寄与率の把握のために有用なデータを提供できるものと考えられる。

#### IV-2. 腸管循環セシウムのドジメトリー精細化のためのセミマイクロ解析研究

放射性セシウムの臓器内における偏在はオートラジオグラムを使用して古くから研究されてきた(25)が、 $\beta$ 線飛程の長さから解像度は低く、組織中の細胞レベルでの偏在の有無の検討は不可能であったが、SPRING-8の組織切片解析用のビームライン(26)を使用すれば可能であることが予想された。

二年目にSPRING-8ビームラインのセシウム実験として3日間の使用が承認されたので当該ビームラインで初めてのセシウム分析に着手した。近年のビームライン改修により、セシウムのK殻由来の放射光である31keV付近は、極めてバックグラウンドの高い領域であったことが判明し（図III-5b）、今後の使用承認時に備え照射測定装置のセッティングやソフトウェアの検討を行いつつ種々の疑似測定を行った。結果として、組織切片中の平均セシウム濃度が100ppmクラスでないと精度の高い定量が困難であることが判った（図III-5c）。それでもPASTA-SPICEの定量範囲より10倍程度高感度であることが示された（図III-5d）。

搬入した組織切片は定量下限に近かったが、小腸組織を含む部位（図III-6a-赤枠）について、X軸25箇所 x Y軸25箇所の625箇所の比較的濃度の高い白ドット部位はランダムであり、セシウム蓄積部は発見できなかった（図III-6c）。少なくとも腸粘膜組織にセシウム滞留細胞は見出されず、腸粘膜組織における預託線量評価において従来法を否定する材料は不在であった。

なお、本実験では約5 $\mu$ m径の小腸粘膜細胞の滞留を分析するために、16 $\mu$ m x 16 $\mu$ mの組織範囲あたりに1 $\mu$ m平方のビームが照射されていたため、見落としの発生した可能性も否定できない。今後は蓄積部位の不在証明のため、今回の50倍濃度のセシウムを投与した小腸切片を使用して、更なる密度で分析する必要があり、令和4年度中に得られる予定である。

## V 結論

低線量域の放射線照射したC57BL/6マウス血液における白血球の遺伝毒性影響をDNA二本鎖切断率およびDNA損傷応答IncRNA発現率により同時定量化する方法を確立し、2mM-臭素酸塩4時間処理がX線60mGy照射に相当すること、臭素酸塩とX線の遺伝毒性に質的な相違のないこ

とを示唆された。

また、小腸組織にマイクロレベルでのセシウム滞留を示唆する結果の不在から、小腸粘膜組織の放射性セシウム預託線量評価は従来のマクロレベルでの方法で問題のないことが示唆された。

## VI 次年度以降の計画

本研究計画は令和3年度で終了し、本受託研究に関しては次年度以降の継続の予定はないが、以下の仕上げの研究は現研究参加者が継続して研究を進める予定である。(現分担研究者は令和3年度で退職するのでアドバイスのみ行う予定である。)

計画Iのバイオドジメトリー研究については、連続被ばく影響の定量化と放射性セシウム内部被ばくモデルによる定量化、他の過酸化物質暴露による影響の定量化の実験を行い、研究を完成させる予定である。計画IIのSPring-8のセシウム使用実験申請は令和4年度7月に承認されたので、小腸粘膜領域のセシウムマイクロ濃縮の不在証明を行い、研究を完成させる予定である。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) 上原章寛, 鮮樹輝, 佐藤遼太郎, 他. プルトニウムの体外排出に向けたキレート剤による除染に関する基礎検討: X線吸収分光法によるプルトニウム模擬元素とキレート剤との結合性評価、X線分析の進歩. 2022; 53: 223-229.
- 2) 薬丸晴子, 田中泉, 田中美香, 他. マイクロ PIXE による腸管の元素分布解析、X線分析の進歩. 2022; 53: 195-202.
- 3) Takeda S, Fujishiro A, Tanaka I, et al. Single-Cell Imaging for Studies of Renal Uranium Transport and Intracellular Behavior, Minerals, 2021; 11; 191.
- 4) Uehara A, Oikawa M, Tanaka I, 他. Quantitative Analyses of Urinary Uranium by  $\mu$ -PIXE, Minerals. 2021; 11:196.
- 5) 上原章寛, 及川将一, 田中泉, 他. マイクロ PIXE を用いた生体液中の元素定量のための迅速・簡便な試料作製法の検討. X線分析の進歩. 2020; 51: 81-90.
- 6) 武田志乃, 吉田峻規, 沼子千弥, 他. 元素イメージングのための組織試料作製手法の検討: 自家蛍光を利用した組織構造および元素局在部の抽出. X線分析の進歩. 2020; 51: 91-96.
- 7) 吉田峻規, 武田志乃, 及川将一, 他. 骨の2次元元素分析に適する粘着膜の検討. X線分析の進歩. 2019; 50: 313-319.
- 8) Nagayasu A, Kakinuma S, Nishimura M, et al. Kinetics of cytokine mRNA and protein expression by plastic adherent cells in the thymus after split-dose irradiation. Cytokine. 2018; 114: 92-97.
- 8) 武田志乃, 吉田峻規, 沼子千弥, 他. 腎臓におけるウラン濃集部の形成と組織影響. J Toxicol Sci. 2019; 44: S285.
- 10) 上原章寛, 薬丸晴子, 田中泉, 他. 生体成分と結合したアクチノイドイオンの除染用キレート剤による配位子置換反応. SPring-8 利用課題実験報告書 2020; .
- 11) 薬丸晴子, 武田志乃, 田中泉, 他. 細胞内ウラン分布解析の基礎的検討. SPring-8 User Experiment Report 2021; Oct.

- 12) 薬丸晴子, 武田志乃, 田中泉, 他. 内部被ばく核種の組織局在解析. *SPring-8 User Experiment Report 2020*; Oct.
- 13) 上原章寛, 武田志乃, 松村大樹, 他. アクチノイドイオンと生体内関連物質との局所構造解析. *SPring-8 利用課題実験報告書*, 2020; Mar.
- 14) 武田志乃, 吉田峻規, 上原章寛, 沼 他. 2次元マイクロ XAFS によるウラン投与ラット腎尿管におけるウラン化学形解析. *Spring-8 User Experiment Report 2018*; Oct.

#### 引用文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、放射能汚染された食品の取り扱いについて、食安発0317第3号、平成23年3月17日
- 2) 食品安全委員会、放射性物質に関する緊急とりまとめ、2011年3月
- 3) 原子力災害対策本部、検査計画、出荷制限等の品目・区域の設定・解除の考え方(初版)、平成23年4月4日
- 4) 食品安全委員会、評価書、食品中に含まれる放射性物質、2011年10月
- 5) 厚生労働省、食品衛生法第11条第1項の規格基準、食品中の放射性物質の新たな基準値、交付平成24年3月15日、施行平成24年4月1日
- 6) 環境省、放射線、統一的な基礎資料、第4章 食品中の放射性物質、2013年8月 s1-s64.
- 7) 原子力災害対策本部、検査計画、出荷制限等の品目・区域の設定・解除の考え、改正令和3年3月26日
- 8) 厚労省、医薬・生活衛生局食品監視安全課、食品中の放射性物質の検査結果について（1224報）令和3年2月24日
- 9) 厚労省、医薬・生活衛生局水道課 水道水質管理室、水道水中の放射性物質の調査結果について（第422報）令和3年3月12日
- 10) 農水省、生産局総務課、農産物に含まれる放射性セシウム濃度の検査結果
- 11) 林野庁、経営課特用林産対策室、きのこや山菜の出荷制限等の状況
- 12) 水産庁、増殖推進部 研究指導課、水産物の放射性物質調査の結果・出荷制限・自粛
- 13) 国税庁、酒類等安全確認調査、
- 14) 原子力災害現地対策本部(放射線班)、福島県、海水浴場の環境放射線モニタリング調査結果
- 15) 国土交通省港湾局海岸・防災課危機管理室、空港・港湾近辺の放射線測定状況、
- 16) Rothkamm K, Beinke C, Romm H, et al. NATO Biodosimetry Study: Comparison of established and emerging biodosimetry assays. *Radiat Res.* 2013; 180: 111-119.
- 17) Kulka U, Ainsbury L, Atkinson M, et al. Realising the European Network of Biodosimetry (RENEB). *Radiat Prot Dosimetry.* 2015; 151: 621-625.
- 18) Kulka U, Wojcik A. Special issue: Networking in biological and EPR/OSL dosimetry: the European RENEB platform for emergency preparedness and research. *Int J Radiat Biol.* 2017; 93: 1.
- 19) Manning G, Macaeva E, Majewski M, et al. Comparable dose estimates of blinded whole blood samples are obtained independently of culture conditions and analytical approaches. Second RENEB gene expression study. *Int J Radiat Biol.* 2017; 93: 87-98.
- 20) Abend M, Amundson SA, Badie C, et al. Inter-laboratory comparison of gene expression biodosimetry for protracted radiation exposures as part of the RENEB and EURADOS WG10 2019

- exercise. *Sci Rep.* 2021; 11: 9756.
- 21) Ishihara H, Tanaka I, Yakumaru H, et al. *J Radiat Res* 2010; 51: 265–275.
  - 22) 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 blood cells. *J Radiat Res*, 2016; 57: 25-34.
  - 23) 石原弘. 低線量被ばくによる生体影響を利用したバイオドジメトリー. *放射線生物研究* 2016; 51: 241-254.
  - 24) Leggett RW, Williams LR, Melo DR, et al. A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body. *Sci Total Environ*, 2003; 317: 235-255.
  - 25) Matsusaka N, Yamakawa Y, Sato I, et al. Organ Distribution of <sup>137</sup>Cs in Mouse Fetuses and Their Dams. *Radioisotopes*, 1997; 46: 214-218.
  - 26) Takeda HS, Numako C, Kitahara K, et al. Phosphorous localization and its involvement in the formation of concentrated uranium in the renal proximal tubules of rats exposed to uranyl acetate. *Int J Mol Sci* 2019; 20; 4577.
  - 27) Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Mol Biol Rep.* 2014; 41:1525-1531.
  - 28) Ishihara H, Tanaka I, Yakumaru H, et al. Acceleration of Regeneration of Mucosa in Small Intestine Damaged by Ionizing Radiation Using Anabolic Steroids. *Radiat Res.* 2011; 175: 367–374.
  - 29) Ishihara H, Tanaka I, Yakumaru H, et al. Pharmaceutical drugs supporting regeneration of small-intestinal mucosa severely damaged by ionizing radiation in mice. *J Radiat Res.* 2013; 54: 1057-1064.
  - 30) Agace WW, McCoy KD. Regionalized Development and Maintenance of the Intestinal Adaptive Immune Landscape. *Immunity.* 2017; 46: 532-548.

# Quantitative comparison of immature cell-damage by radiation and superoxides, for dose estimation of internal radiocesium, and their effects on tumorigenesis.

Hiroshi Ishihara

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

*Keywords:* biodosimetry, gamma-H2ax, DNA damage-induced RNA, quantitative PCR, genotoxicity

## **Abstract**

The present study was a 3-year project that aimed to obtain data for dose estimation of internal exposure of radiocesium. First, we established procedures to quantify DNA-damage by low-dose X-irradiation below 0.1 Gy in normal mouse cells. Normal leukocytes in blood of C57BL/6 mice were isolated and irradiated. The levels of DNA-damage and DNA damage-responsive RNA were simultaneously measured by microscopic imaging analysis to detect gamma-H2ax-positive cells and by real-time reverse transcription PCR quantification of long non-coding RNA, respectively. Both of the measured values linearly increased in an absorbed dose-dependent manner. Using this methodology, we found that the genotoxicity of bomate, one of reactive oxygen species, was correlated with radiation. Second, we confirmed the arrangement of a sample and devices for measurement of x-ray fluorescence from cesium atoms following synchrotron irradiation by Super Photon ring-8 GeV to measure cesium levels in small intestinal tissue sections to develop a microdosimetric procedure. Conventional coefficient of committed effective dose of radiocesium in small intestine was supported.