

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	動物モデルと数理モデルを用いた放射線発がん線量率効果が生じるメカニズムの解明
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	今岡達彦	量子科学技術研究開発機構・グループリーダー
分担研究者	服部佑哉	呉工業高等専門学校・准教授
若手研究の活用状況	永田健斗	量子科学技術研究開発機構・博士研究員

	氏名	所属機関・職名
研究協力者	渡邊（横谷）立子	量子科学技術研究開発機構・上席研究員
研究協力者	横谷明德	量子科学技術研究開発機構・統括グループリーダー

研究要旨	<p>原子力事故等に影響された環境において生じ得る低線量率放射線被ばくの影響は、高線量率の影響より低いと考えられているが（線量率効果）、その機序については十分に理解されていない。本年度は乳腺発がんの線量率効果の組織レベルの機序を究明するために予定した実験と数理解析を完了した。まず、乳腺組織中の内腔細胞の割合が線量率依存的に変化することを発見し、線量率効果の機序となり得ることを示した。また、実験結果に基づいて乳腺の内腔細胞が乳がんの起源であると推定した。さらに、低線量率放射線被ばくで起こるような照射細胞と非照射細胞が混在し競合し得る状況において、前者のみが顕著に除去されることはない結論した。数理解析では、従来のように物理学的予測を直接的に長期的動態（発がん）のモデルと連結するのではなく、短期（損傷の蓄積と細胞死）、中期（細胞動態）的動態を含めたモデルで発がんを予測した結果、放射線によって短期的動態で失われる内腔細胞を補う細胞がどの程度の変異を持つかによって線量率効果が現れる、と結論した。以上のように、発がんの線量率効果を決定しうる新たな要因の存在を示した。</p>
キーワード	低線量率放射線、がんリスク、メカニズム、モデル、線量率効果

I. 研究目的

1. 本研究課題の背景

放射線の健康への影響に関する不明点の科学的解明とその国民による理解は、東京電力福島第一原子力発電所事故（以下、福島原発事故）の影響を受けた住民の健康管理及び放射線への不安の対処において重要であるのはもちろん、福島原発事故という特異な経験を有する我が国の社会が、原子力利用の負の面に正しく目を向けて、我が国にとって最適な方法でカーボンニュートラルを推進するためにも、本質的に重要な課題である。

福島原発事故では、放出された放射性物質により、生活環境において線量率が増加した時期があった。このことは、その後の住民の健康不安につながっている。現在も、線量率が増加した地域は帰還困難区域等に残っている。このような低線量率の放射線被ばくによるがんのリスクが、原爆被爆のような十分解析された高線量率のリスクと比べてどれくらい低いと考えるべきか、国際的機関の間でも見解が一致していない。低線量率における生体への影響が高線量率と比べて低くなることを「線量率効果」と呼ぶが、実際、福島原発事故のリスク評価で線量率効果を考慮するかどうかは、機関によって異なっていた¹⁻³⁾。

低線量率被ばくした人間集団を対象とした疫学の精度は十分でない。そのため、人間集団においてがんのリスクに線量率効果があるのかどうかは、十分な証拠がない。一方、動物実験では、発がんの線量率効果が存在することがよく知られている。動物実験で得られた知見を人間にあてはめて良いかどうかを考えるには、動物で線量率効果のメカニズムを十分に理解し、それが人間でも起こりえる性質のことかどうかを検討し、そのメカニズムが人間に働いた場合にどれくらいリスクになるかを定量的に予測する必要がある。実際に国際的機関でもそのような研究を行う必要性が提言されている^{4,5)}。現状では、放射線ががんの原因となる遺伝子変異を起こす確率が高線量率と低線量率では異なることが、線量率効果の唯一のメカニズムであるとされている。しかし、それ以外のメカニズムの可能性も指摘され始めており⁶⁾、線量率効果のメカニズムが十分に理解されているとは言いがたい。

放射線による発がんは、組織幹細胞やそれに近い細胞から発生すると推測されている。主任研究者らは、本事業が開始される前に、ラットを用いた発がん実験によって、低線量率（6 mGy/時）では高線量率（30 Gy/時）と比べて、乳がんの発生率が1/8倍程度と大幅に低くなることを見いだした⁷⁾。また、そのメカニズムを解析するため、ラットの乳腺にある各種細胞の増減や放射線への反応を定量的に評価する種々の実験系を確立した。さらに、ラットの乳腺幹細胞系の細胞数を定量的に記述する数理モデルのプロトタイプを開発した⁸⁾。

2. 研究期間全体を通じての目的

以上の背景に基づき、本事業では、動物実験で見られるような線量率効果が人間集団にも起こりえることかどうかの検証につなげるため、線量率効果が明確に見られる動物モデルを利用して、これまでに提唱されていない新たな線量率効果メカニズムの証拠を提示することを目的とする。

3. 環境行政との関連

得られる科学的成果は、放射線のリスク評価や規制を扱う国際的機関における科学的知見のとりまとめを通じて、冒頭に述べた福島原発事故による低線量率放射線被ばくのリスク評価の課題解決に貢献する。また、本研究で得られる成果を最新知見として発信することを通じて、住民の

放射線不安に対応する情報を提供する。さらに、カーボンニュートラルを推進するにあたって二酸化炭素排出の少ない原子力エネルギーをどのように利用するかが課題であるが、そのためには原子力事故のリスクを正しく評価することも必要である。放射線の健康リスクの評価のみならず、それを防止するための各種対策が及ぼす社会経済的リスクを最小限にするに当たっても、低線量率放射線の影響評価の精緻化は重要な課題であり、本研究はその精緻化に貢献する。また、研究の過程で若手研究者を育成し、国内で減少している放射線影響・放射線リスクの専門家を輩出する。以上を通して、本研究課題は環境行政の課題の解決に貢献する。

4. 前年度までの成果の概略

本研究課題では、生物学的な機序を解明するための研究項目 1（「実験モデルにおける幹細胞解析」、担当：主任研究者）と、得られた結果を定量的に解釈して発がんリスクの予測につなげるための研究項目 2（「幹細胞動態数理モデルの構築」、担当：分担研究者）を実施している。

平成 31（令和元）年度は、乳腺の幹細胞動態の数理モデル化に必要な、乳腺の幹細胞系を構成する細胞種ごとの前駆細胞活性とその放射線による不活性化のデータを得た。また、がんの起源細胞を推定する実験系及び照射された細胞が非照射細胞の中に少数存在する場合の細胞間の競合を測定する実験系の改良を行った。さらに、数理モデルの一部である乳腺幹細胞系モデル（Terminal End Bud モデル、以下「TEB モデル」）を構築した。令和 2 年度は、放射線被ばく後のラットの乳腺における DNA 損傷修復等を評価し、数理モデル化に必要な数値を得た。また、発がんがどの細胞から生じるか（「がんの起源細胞」と呼ばれる。）を解明するための実験と、放射線に被ばくした細胞が除去される「細胞競合」と呼ばれる過程を解明するための実験の設定を完了した。また、放射線による細胞死と線量率の関係を記述する数理モデル、発がんの過程を記述する数理モデルの基本型を構築した。数理モデルの挙動を解析したところ、低線量率でがんリスクが低くなる条件を整理できた。

5. 本年度の目的

令和 3 年度の研究項目 1 においては、乳腺の内腔細胞の分化と死に対して放射線が与える影響を解析して、線量率効果を説明しうる機序について情報を取得すること、また、発がんの起源細胞を解明するための実験と、放射線に被ばくした細胞が除去される細胞競合と呼ばれる過程の解明のための実験の解析を完了して、数理モデルに反映する方針を決定することを目的とする。特に、乳腺細胞の分化と死への影響の解明では若手研究者の能力と技術を活用する。研究項目 2 においては、これまでに構築した数理モデルを統合して様々な条件でシミュレーションを実施し、線量率効果の機序について結論を得ることを目的とする。

本報告では研究項目 1、分担研究者の報告において研究項目 2 について報告する。

II. 研究方法

1. 幹細胞動態の実験データ取得

① 放射線照射

発情期のラット（Jcl:SD 系統、日本クレア株式会社）を対象に、 γ セル照射装置（Nordion 社、線量率 30 Gy/時）による高線量率照射、あるいは連続 γ 線照射装置（ポニー工業株式会社。線量率 6 mGy/時となる条件を使用。）による低線量率照射を行った。照射の週齢と線量は研究結

果の項目に記載した。

② 細胞周期標識物質の投与

細胞周期が S 期にある細胞を標識するため、生理食塩水（大塚生食注 10 mL、大塚製薬）に 5-エチニル-2'-デオキシウリジン（EdU、Thermo Fisher Scientific 社）あるいは 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU、Thermo Fisher）を溶解して 5 mg/mL とし、50 mg/kg 体重あたりとなる量を腹腔内投与した。発情期の動物を用いて、組織採取の 4 時間前に EdU を投与し、さらに 2 時間後に BrdU を投与して、解剖後に乳腺を 10%リン酸緩衝ホルマリン中で化学固定した。また、細胞の分化を検証する実験においては、発情期の動物を用いて組織採取の 4 日前に EdU を投与し、解剖後に化学固定した。

③ 蛍光染色

ラットから採取してホルマリン固定パラフィン包埋を行った組織を 3 μm 厚に薄切し、パラフィン除去後に 0.01 M トリス塩酸緩衝液（pH 9.0）中 95°C40 分で抗原賦活化処理を行い、10%ブロッキング液（Dako 社）を含む 0.5% Tween-20 含有トリス緩衝生理食塩水（TBS-T）に希釈した一次抗体（抗 BrdU 抗体、抗 cleaved caspase 3 抗体、抗 Ki-67 抗体、抗サイトケラチン 14 抗体、抗サイトケラチン 8+18 抗体を使用）と 37°C で 2 時間もしくは 4°C で一晩反応させ、TBS-T で洗浄後、同様に希釈した蛍光標識二次抗体を 37°C で 1 時間反応させ、TBS-T で洗浄した。EdU の染色には Click-iT EdU Cell Proliferation Kit（Thermo Fisher Scientific 社）を使用した。その後、4',6'-ジアミジノ-2'-フェニリンドール（DAPI）を含む封入剤（Vector 社）で封入した。

④ 細胞調製

野生型ラット（Jcl:SD 系統、日本クレア株式会社）より乳腺を摘出し細切した後、0.1% III 型コラゲナーゼ含有ハンクス平衡食塩水（HBSS）で 37°C3 時間消化し、2%ウシ胎仔血清（FBS）含有 HBSS、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄したのち、20 μm 孔径メッシュを抜けなかった組織小片を回収、0.25%トリプシン含有エチレンジアミン四酢酸（EDTA）溶液、5 mg/mL デイスパーゼ溶液で順に消化し、40 μm 孔径及び 10 μm 孔径メッシュを順次通して、通過した単離細胞を細胞数が 1~2×10⁶ 個/mL となるように 1%FBS 含有 HBSS に懸濁した。その後、HBSS にて 2 度洗浄したのち、1 mL の HBSS に細胞を懸濁させ 1 μL の死細胞染色液（LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit, for 633 or 635 nm excitation, Thermo Fisher 社）を添加し氷上にて 30 分静置し、遠心後に 5%リン酸緩衝ホルマリン中で細胞を固定し、-80°Cにて保存した。

⑤ フローサイトメトリー解析

凍結細胞を室温で完全に解凍し、96 well V-bottom に必要量を移し遠心機（300 g、5 分、4°C）で遠心した。上清を吸引後、200 μL の 1%FBS/PBS で再溶解して 30 分ブロッキングした。遠心後上清を吸引し、抗体（CD31-PE/Cy7、CD49f-FITC、CD45-PE/Cy7、CD24-PE）を添加して氷上にて 30 分反応させた。遠心後上清を吸引し、200 μL の 1% FBS/PBS を添加して再度遠心し、沈殿した細胞を 1%FBS/PBS で再懸濁し、卓上型フローサイトメーターGuava easyCyte システム（Merck-Millipore 社）で測定した。測定データは、フローサイトメトリー解析ソフト FlowJo（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）にて実施した。

⑥ 画像データ取得及び解析

画像データ取得にはディスク走査型共焦点顕微鏡システム (DSU-IX81、オリンパス株式会社) 及びオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X800、株式会社キーエンス) を、画像解析ソフトウェアとしては ImageJ (米国国立衛生研究所) を、それぞれ使用した。

2. 放射線誘発乳がんの起源細胞の推定

① 発がん処理

野生型 Jcl:SD ラットと GFP ラットの自然交配によって雑種第一代の個体に対し、3~4 週齢においてイソフルラン全身麻酔下で乳腺組織の摘出、皮下脂肪組織への細胞懸濁ゲル (GFP 及び野生型ラットの細胞を 1:99 で混合したもの) の注入を行い、外科用クリップで閉創、消毒したのち、覚醒させて飼育ケージで飼育した。7 週齢において、1-メチル-1-ニトロソ尿素 (MNU) を 50 mg/kg で腹腔内に注射した。

② 組織標本の解析

前年度までに細胞移植及び放射線照射等を行った個体、上記 MNU 投与後の個体の触診を 1 週間に 1 回行い、移植部位に発生した触知可能な病変を麻酔下で外科的に摘出し、ホルマリン固定パラフィン包埋連続切片を作製した。その後、最大 96 週齢に至るまでにすべての個体から乳腺細胞が移植された皮下脂肪組織を摘出して、定法によりヘマトキシリン染色乳腺全体標本を作製した。この標本上で病変を検索し、病変周辺の組織を採取して、ホルマリン固定パラフィン包埋連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色して病理診断を行った。また、「1.③」と同様に抗緑色蛍光タンパク質 (GFP) 抗体 (MBL 社) による免疫染色を実施し、3,3'-ジアミノベンジジン染色キット (Vector 社) により GFP 局在を可視化して、BX53-DP73 (オリンパス社) により画像を取得した。一部の標本は、抗 GFP 抗体、抗サイトケラチン 14 抗体、抗サイトケラチン 8+18 抗体による蛍光免疫染色を実施し、DAPI を含む封入剤で封入して、「1.⑥」と同様に画像を取得した。

3. 放射線照射後の細胞競合の解明

① 透明化標本の作製及び観察

前年度までに細胞移植を行った個体の解剖を行い、乳腺細胞が移植された皮下脂肪組織を摘出した。組織をゲル化し電気泳動することによって脂質を除去し透明化する方法 (CLARITY 法) を用いて、これを透明化した。具体的には、摘出した乳腺組織をスライドガラスに貼付して、50 mL プラスチック遠心管内で 4℃において 4%パラホルムアルデヒドにて一晚以上化学固定した。その後、Sheild 組織固定液 (LifeCanvas Technologies 社) により組織を再固定した。その後 PBS にて洗浄して、電気泳動システム (SmartClear II、LifeCanvas Technologies 社) で脂質を除去した。その後、DAPI 染色 (Thermo Fisher 社) を実施した。屈折率調整透明化試薬 (EasyIndex、LifeCanvas Technologies 社) に浸漬した。写真撮影にはディスク型共焦点顕微鏡システム (オリンパス株式会社) を使用し、画像解析システム ImageJ (米国 National Institutes of Health) で解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験及び遺伝子組換え実験については、量子科学技術研究開発機構でのみ実施し、同機構の動物実験委員会（承認番号 19-1003、19-1004、20-1008）及び遺伝子組換え実験委員会（承認番号 R2-07）の承認を得て行った。人を対象とする研究には該当しない。

III. 研究結果

本研究では、発がんの数理的モデル化において、従来はあまり考慮されてこなかった組織幹細胞系のふるまいを考慮することとした。そのふるまいを実験によって定量的に解明するため、放射線やその線量率が幹細胞系の動態に及ぼす短期（損傷の修復と細胞死の誘導）、中期（組織を構成する細胞の割合、増殖・分化・死）、長期（がんの起源、細胞の競合）の影響に関する実験データを取得した。最終年度である本年度は、中期及び長期のデータを以下のように得た。

1. 幹細胞動態の実験データ取得（若手研究者が主体となって実施）

ラット乳腺幹細胞系は 2 つの主要な細胞種（基底細胞、内腔細胞）によって構成される。それぞれは増殖性の前駆細胞と非増殖性の成熟細胞からなり、計 4 種類の細胞が存在する。これらを識別する方法として、(1)細胞表面抗原の違いを利用したフローサイトメトリー解析、(2)病理組織切片を作製して抗原と増殖・細胞死マーカーで識別する免疫組織学的解析がある。これらの実験データを取得し組み合わせることによって、線量率効果の新たな機序を示す実験的証拠の取得を試みた。

① 細胞構成割合

まず、細胞増殖マーカー Ki67 抗体を用いた増殖細胞の検討を行った。実験動物には、3~5 週齢において累積線量 2 Gy の低線量率照射、もしくは 5 週齢において 2 Gy の高線量率照射を施した。その結果、累積線量 2 Gy の放射線を照射した 2 週間後（7 週齢）において、被ばく群の TEB 領域の乳腺細胞（基底細胞、内腔前駆細胞）では、非照射群と比べて、増殖している細胞を示す Ki67 陽性細胞の割合が有意に減少していた（図 III-1）。放射線照射の 4、6 週後には、非照射群と同じ割合に回復した。

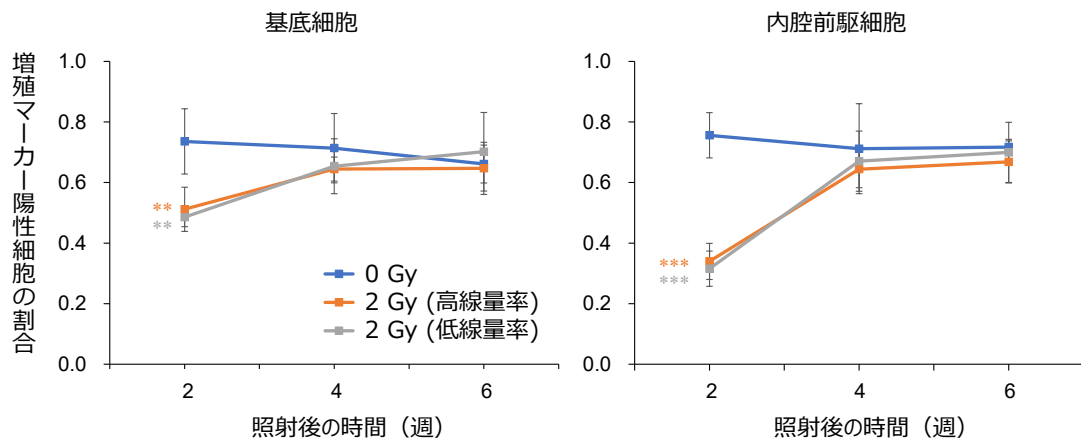


図 III-1. 増殖マーカー陽性細胞の割合の放射線による変化。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (0 Gy との比較)。

次に、幹細胞表面マーカーを用いたフローサイトメトリーによって、乳腺上皮を構成する基底細胞、内腔前駆細胞、内腔成熟細胞の構成割合を定量化した。その結果、非照射群の組織の生理的変化として、内腔前駆細胞の割合が週齢を経ると低くなること、逆に内腔成熟細胞の割合は高くなることがわかった（図 III-2）。照射群においては内腔成熟細胞の割合が有意に減少し、その減少の強さは高線量率照射群の方が低線量率照射群よりも有意に大きいという線量率効果が認められた（図 III-2）。これと入れ替わるように、基底細胞、内腔前駆細胞の割合は高線量率照射群において照射によって有意に増加した（図 III-2）。これらの細胞における S 期の長さ、および細胞周期全長を解析すると、累積線量 2 Gy の放射線によっては統計学的に有意になるような顕著な影響は見られないことがわかった（図 III-3）。

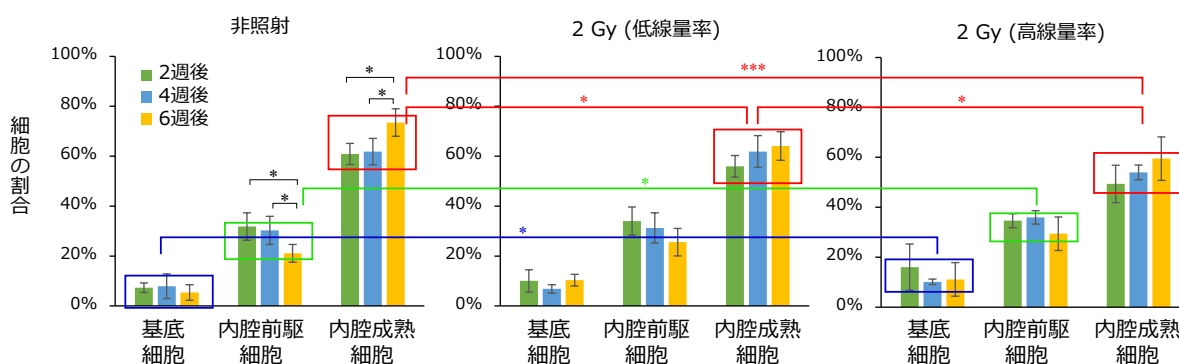


図 III-2. 基底細胞、内腔前駆細胞、内腔成熟細胞の構成割合の放射線による変化。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

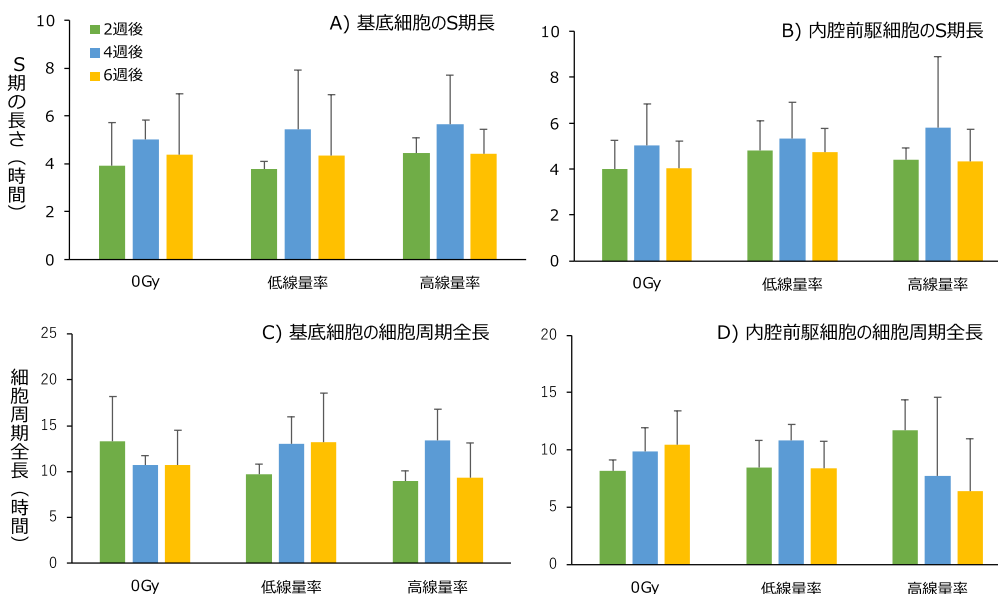


図 III-3. 細胞周期の長さの放射線による変化。A. 基底細胞の S 期。B. 内腔前駆細胞の S 期。C. 基底細胞の細胞周期全体。D. 内腔前駆細胞の細胞周期全体。いずれも有意差なし。

② 細胞分化及び細胞死

ラット乳腺における内腔細胞の分化（内腔前駆細胞から内腔成熟細胞への変化）について、細胞周期がS期に存在する増殖細胞（すなわち内腔前駆細胞）に取り込まれるEdUが、内腔成熟細胞に移行するかどうかによって測定した。EdU投与は、3~5週齢において累積線量2Gyの低線量率照射、もしくは5週齢において2Gyの高線量率照射を施し、その2週間後（生後7週齢）の個体に対して行った。その結果、EdUは投与4日後の非照射群の個体の内腔成熟細胞において確認されたが、照射群の個体の内腔細胞においては確認されなかった（図III-4）。また、アポトーシスのマーカーであるcleaved caspase 3 蛍光免疫染色像の観察により、放射線照射2週間後のアポトーシス細胞について、基底細胞、内腔細胞ごとに計数したところ、アポトーシス数は照射群でも非照射群と同程度の頻度で存在した（図III-5）。

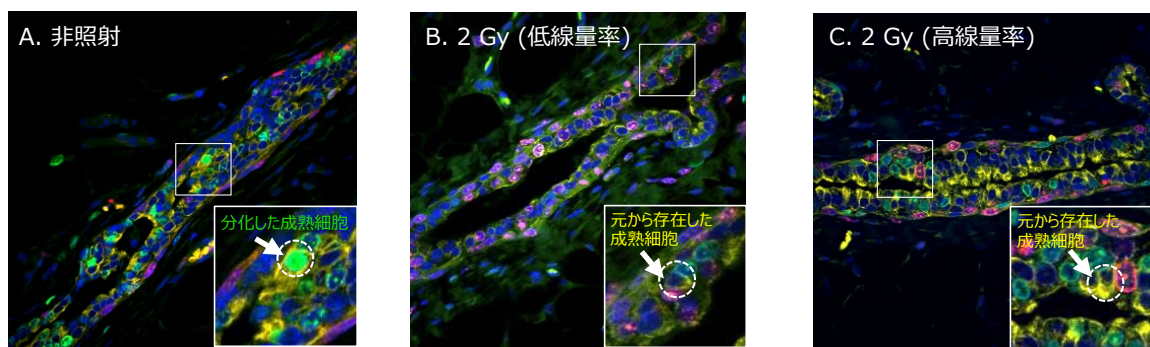


図 III-4. 内腔前駆細胞から成熟細胞への放射線による変化。右下の枠内の画像は、図中の細い白枠内を拡大したもの。点線の円は、矢印が指す成熟細胞を囲ったもの。A. 非照射群、B. 低線量率2Gy照射群、C. 高線量率2Gy照射群。

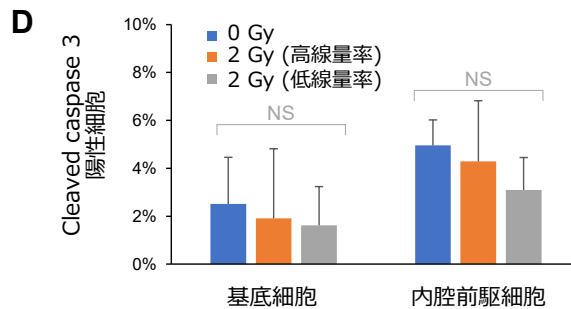
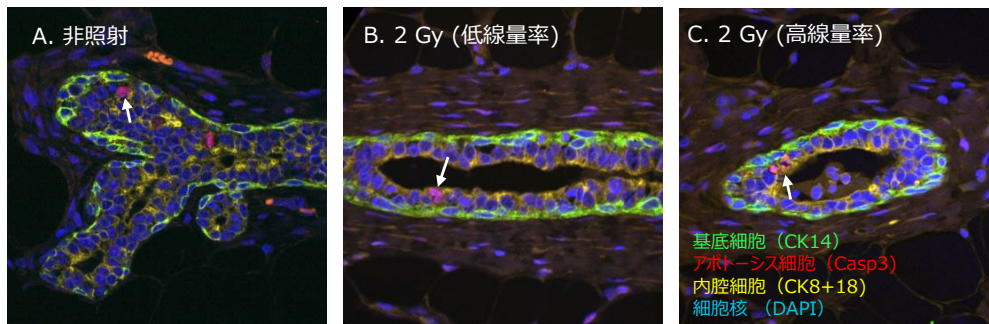


図 III-5. アポトーシスの放射線による変化。白い矢印はアポトーシス細胞で、照射によって顕著な変化はない。A. 非照射群、B. 低線量率2Gy照射群、C. 高線量率2Gy照射群、D. 陽性細胞カウントの結果。平均及び標準偏差。NS, 有意差なし（二元配置分散分析）。

2. 放射線誘発乳がんの起源細胞の推定

基底細胞と内腔細胞のうち、どちらが放射線誘発乳がんの起源細胞となるかは、数理モデルの結果を解釈するために重要な情報であるが、実験的な証拠が乏しい。そこで、がんの初期病変における基底細胞・内腔細胞の増生の有無やクローン性を確認する実験を行った。

昨年度の実験では、野生型ラットと GFP トランスジェニックラットから蛍光以外は同等の乳腺細胞を採取し、1:1 で混合して、第三のラット（あらかじめ自身の乳腺組織を外科的に除去したものに）移植し成長させることで、2 種の細胞をモザイク状に有する乳腺組織を形成させた。この組織を持つ個体 31 匹に高線量率 γ 線 4 Gy を照射し、16 匹を無処理群とした。また、発がん物質 MNU を 18 匹に投与した。これらのラットを解剖して、移植部位に肉眼的に確認された、あるいは乳腺全体標本の顕微観察によって確認された増殖病変の病理組織標本を作製して分類した。その結果、無処理群で 0 個、 γ 線群で 5 個（腺腫）、MNU 群で 2 個（腺腫 1、異型過形成 1）の増殖病変が得られた。腺腫は内腔細胞が増生を示す病変であり、その内腔上皮は GFP 陽性細胞と陰性細胞のモザイクであった（図 III-6A）。異型過形成でも内腔細胞が増生を示しており、内腔上皮は GFP 陽性細胞と陰性細胞のモザイクであった（図 III-6B~D）。

この結果から、これらの増殖病変は内腔細胞に起源を持ち、単クローン性ではないことが推定された。この推定に基づいて、数理モデルでは内腔細胞を扱うこととした。また、これらの初期病変は単一の変異細胞が増殖してできたものであるとは解釈しにくく、複数の細胞の増殖が同時に促進される「場」が存在していると推察された。

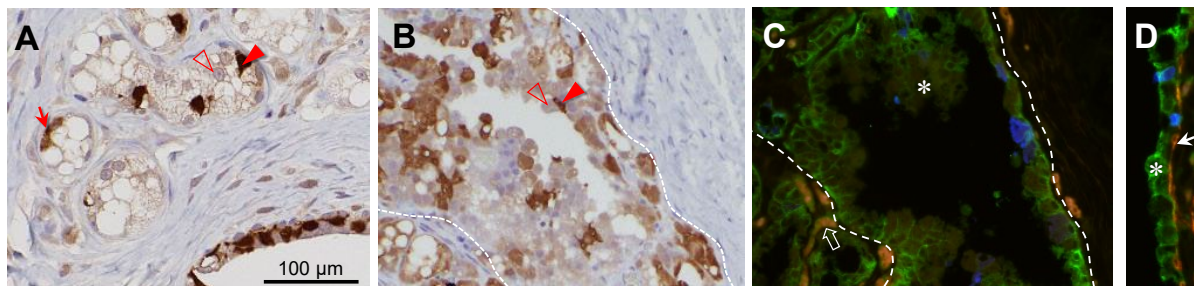


図 III-6. GFP 陽性細胞と陰性細胞より成るモザイク状の乳腺組織に見られた増殖病変。A. 腺腫。B 及び C. 異型過形成。D. 増生を示さない乳腺上皮。A 及び B は抗 GFP 抗体による免疫染色を行っており、茶色が GFP 陽性を表す。C 及び D は抗サイトケラチン 14（赤）、抗サイトケラチン 8+18（緑）、抗 GFP（青）抗体による蛍光免疫染色。スケールバーは A~D に共通。赤矢尻：GFP 陽性内腔細胞、赤棒矢尻：GFP 陰性内腔細胞、赤又は白の矢印：基底細胞、白点線：病変と周囲組織の境界、白棒矢印：二次抗体由来バックグラウンド、*：サイトケラチン 8+18 陽性の内腔細胞。

3. 放射線照射後の細胞競合の解明

細胞競合とは、細胞集団の中に適応度の異なる 2 種類の細胞が混在している場合に、適応度の低い細胞が選択的に集団から除外される現象である。細胞競合が放射線と関連するかどうかを研究することの重要性は、国際放射線防護委員会（ICRP）出版物 131 でも指摘されている。そこで本事業では、放射線による DNA 二重鎖切断（DSB）を修復した履歴のある細胞（すなわち変異を

持つ可能性のある細胞)が細胞競合によって集団から排除されやすくなるという作業仮説を検証するために、次の実験を実施した。すなわち昨年度、発がん実験で顕著な線量率効果が見られた条件(累積線量 4 Gy、高線量率として 0.5 Gy/分、低線量率として 0.1 mGy/分)で照射した GFP ラット、非照射の DsRed ラットを用意し、発がんが見られる時期より前に乳腺細胞を採取して、混合して第三のラットに移植した。上述の作業仮説のように、低線量率でのみ DSB 修復履歴のある細胞が排除されるとすると、次の結果が予想される。すなわち、高線量率照射した GFP ラットに残っている細胞はすべて DSB 修復履歴を持つため、非照射の DsRed 細胞と混合して移植した後には集団から排除されやすく、低線量率照射した GFP ラットに残っている細胞からは細胞競合によって DSB 修復履歴のある細胞が除かれているため、混合して移植した後も存続すると予想される。

本年度は、昨年度に移植を行ったラットの飼育を継続し、照射した GFP 細胞を非照射の RFP 細胞と個体中で約 6 ヶ月間競合させた。続けて解剖を行い、移植部位に形成された乳腺組織における細胞構成を透明化標本の観察によって評価した。その結果、約 6 ヶ月が経過した後も、照射群の細胞が非照射群の細胞に対する競合において顕著に敗者となることはなく、線量率の顕著な影響も見られなかった(図 III-7)。そこで数理モデルでは、「DNA 損傷履歴のある細胞が敗者となる」という細胞競合は、積極的に考慮しないこととした。

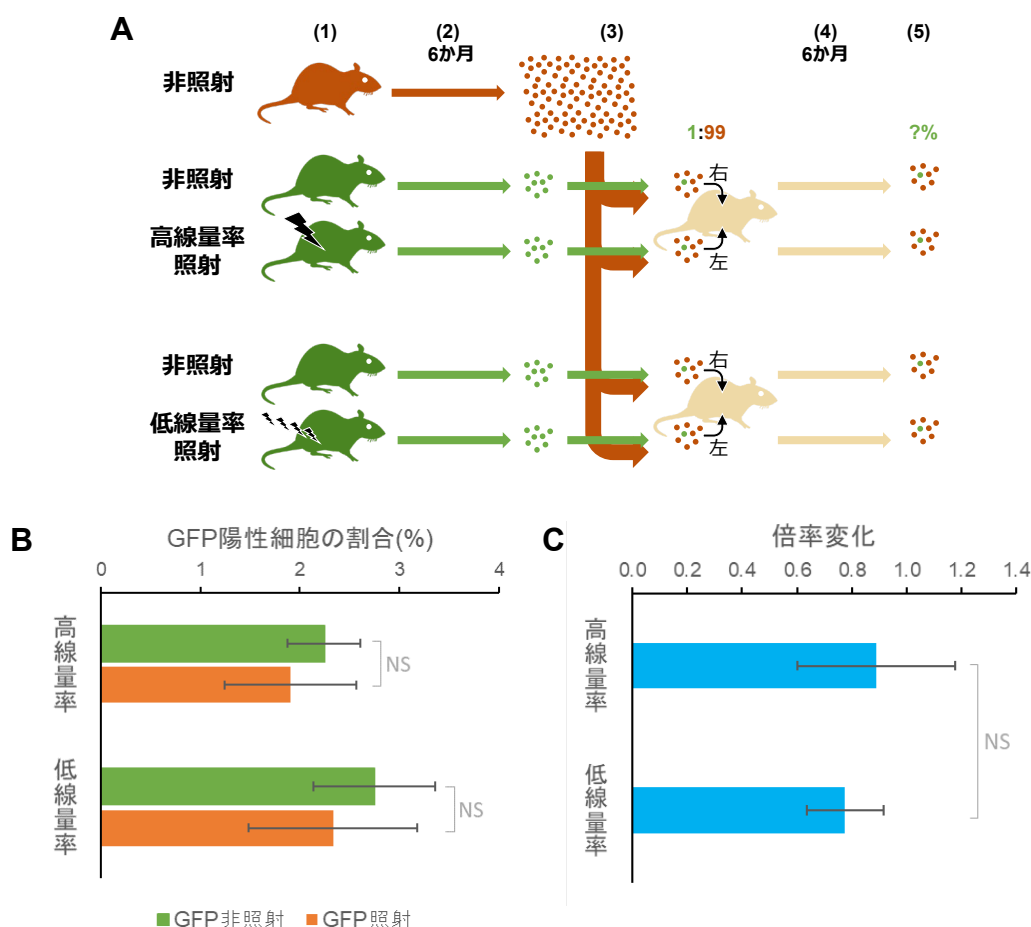


図 III-7. 放射線照射後の細胞競合の評価結果。A. 実験概要。(1) GFP (濃緑色) 及び RFP (濃赤色) の遺伝子導入ラットに非照射、高線量率照射 (0.5 Gy/分、4 Gy)、低線量率照射 (0.1 mGy/分、4 Gy) の処置を行う。(2) 約 6 ヶ月置く。(3) GFP ラット、RFP ラットから乳腺細胞を採取し、1:99 で混合して、別の個体の乳腺脂肪組織 (あらかじめ自身の乳腺細胞を除去済み) に移植する。その際、移植された体内環境の個体差の影響を最小限にするため、非照射 GFP 細胞を含む検体を右半身、照射した GFP 細胞を含む検体を同じ個体の左半身に移植する。(4) さらに約 6 ヶ月置く。(5) 乳腺細胞を採取し、GFP 細胞の割合を評価する。B, C. 実験結果。平均及び標準誤差 ($n=4$)。NS: 群間の有意差なし。B は非照射群と照射群の比較 (対のある t 検定) で、照射群の割合が非照射群より低い場合に、照射された細胞が敗者となったことを示す。C は、GFP 陽性細胞の割合の照射による倍率変化に関する高線量率群と低線量率群の比較 (非等分散 t 検定)。

IV. 考察

本項目では、まず本年度の研究項目 1「実験モデルにおける幹細胞解析」(本報告書)の個々の結果に関する考察を行う。また、それらの考察と、研究項目 2「幹細胞動態数理モデルの構築」(分担研究者報告書)の結果を総合して研究の結論を導き、実験研究と数理研究の相乗効果について述べる。さらに、本研究の結論と疫学的知見の関係を考察し、本研究の成果が環境行政に貢献する道筋を述べる。

1. 本年度の結果に関する考察

① 放射線被ばく後の中期的な幹細胞動態

まず「III. 結果」の「2. 放射線誘発乳がんの起源細胞の推定」において、内腔細胞が乳がんの起源であると推定されたことが、以下で内腔細胞の動態に注目することの根拠となる。

「1. 幹細胞動態の実験データ取得」では、放射線被ばく後の中期的な幹細胞動態に注目し、放射線発がんの線量率効果の新たな機序に関する知見の取得をめざした。TEB 領域の内腔細胞では増殖マーカー陽性細胞の割合が一時的に減少していた。このような放射線被ばく後の中期的な動態変化は、放射線によって細胞老化が誘導され、一定期間後に除去された結果と理解できるかもしれない。合わせて、放射線照射を受けた組織の TEB 領域付近の乳管では内腔前駆細胞から内腔成熟細胞への分化が遅れていることが示された。これらは思春期後に乳腺組織を作る TEB 領域付近で見られた現象であるため、その結果として乳腺全体の細胞構成にも変化が起こることが予想される。実際、フローサイトメトリーによって高線量率照射を受けた乳腺組織全体の細胞構成を調べると、内腔成熟細胞の割合が減少し、内腔前駆細胞の割合が増加していた。このような状態は、内腔前駆細胞に発がん性の変異が入った場合にその細胞を増殖させ得る環境を提供するため、発がんのプロモーションを起りやすくと考えられる。さらに、内腔成熟細胞の割合の減少の程度は高線量率照射後の方が、低線量率照射後よりも有意に大きかった。すなわち上記の現象には線量率効果が認められた。

これらをまとめると、次のシナリオを描くことができる。まず放射線は（おそらく細胞老化等の機序で）TEB 領域の内腔前駆細胞の増殖を一時的に抑制する。抑制を免れた内腔前駆細胞は、分化を抑制して数を相対的に増加させることで組織成長を維持する。このような TEB が形成した組織は、内腔前駆細胞の割合が高く発がんのプロモーションが起りやすい場となる。このような場の形成の効果が線量率依存的であることが、発がんの線量率効果の機序となっている。

② 放射線被ばく後の長期的な幹細胞動態

「III. 結果」の「2. 放射線誘発乳がんの起源細胞の推定」において、乳がんの前病変と考えられる異型過形成内に内腔細胞の増生が見られたが、これが単クローン性ではないことを支持する結果が観察されたことは注目に値する。この結果は、病変の原因ががん原性の突然変異によるものであることを直接否定するものではない。変異細胞が原因となって周囲の非変異細胞を巻き込んだ活発な細胞増殖の場が形成されているという解釈も可能である。これは従来「field cancerization」と呼ばれてきた考えとも符合する。そのため、突然変異の蓄積を原理とする従来のがん多段階説の考え方は、数理モデルにおいても維持することとした。

「III. 結果」の「3. 放射線照射後の細胞競合の解明」においては、照射された細胞を約 100 倍の非照射細胞集団の中に置いた場合でも、細胞競合が顕著には起こらないことが示された。この研究において検討した作業仮説は、「照射された細胞」を 1 つの集団として見ている。この仮説は、骨髄の造血幹細胞をモデルに行われた実験⁹⁾で示されたものであり、本実験はこれを乳腺に応用したものである。本実験の結果は、別の細胞競合の形を否定するものではない。別の形の競合として、変異細胞と非変異細胞の間の細胞競合がある。変異細胞は照射された細胞のごく一部に過ぎないため、この形の細胞競合は本実験では検出されない。そのため数理モデルにおいては、照射細胞と非照射細胞の間の細胞競合を取り入れないこととしたが、変異細胞と

非変異細胞の競合については可能性を残した。

2. 動物モデル研究及び数理モデル研究の総合的考察

① 線量率効果の機序

以上、研究項目1「実験モデルにおける幹細胞解析」でラット乳腺モデルの実験的研究によって明らかになったことを総括すると以下のようになり、**Aが線量率効果の新たな機序を示す**。

A) 放射線照射後の組織において、内腔細胞の動態が中期的に変化し、それは発がんのプロモーションに寄与すると考えられる。その変化の程度が線量率に依存するため、発がんにも線量率効果が現れる可能性がある。

B) 内腔細胞が乳がんの起源細胞であると推定される。

C) 「照射された細胞」と「非照射細胞」が一对多で共存する場合、前者が選択的に除去されるという形式の細胞競合は、(造血系とは異なり) 乳腺では顕著でない。

一方、研究項目2「幹細胞動態数理モデルの構築」(分担研究者報告書を参照。)では、放射線照射後の短期、中期、長期の動態に関する数理モデル(それぞれダメージ修復モデル、TEBモデル、発がん過程モデル)を統合した、いわば「ラット乳腺幹細胞系発がんシミュレータ」を構築し、様々な条件でシミュレーションを実施した。その際、実験で得られた知見B及びCを反映させて、主に内腔細胞に関する実験で得られた情報をパラメータ決定に使用したほか、照射された細胞と非照射細胞の間の細胞競合は考慮しなかった。シミュレーションの結果、以下のいずれか1つもしくは2つの条件によって、発がんリスクの線量率効果が生じることが示された。

D) 放射線による変異誘発の線量反応が下に凸の二次式であること

E) 放射線照射後の短期動態で失われた細胞を、(正常細胞より)変異細胞が優先的に補うこと

このうちDは従来の放射線防護の基礎となる放射線生物学ですでに確立している条件であり、本研究でもそれが確認された。一方、**Eは線量率効果の新たな機序を示す**知見である。これは、変異細胞と非変異細胞の間の競合的關係と理解することのできる条件であり、細胞競合研究においては「supercompetition」と呼ばれるタイプの競合形式である¹⁰⁾。線量率 $6 \times 10^0 \sim 6 \times 10^4$ mGy/hにおけるラットの乳がんリスクをシミュレーションにより予測したところ、**Dによる線量率効果が 10^4 mGy/hの前後で現れる**のに対し(分担研究者報告書の図 III-8(A))、**Eによる線量率効果は $10^1 \sim 10^2$ mGy/hの前後で現れた**(分担研究者報告書の図 III-9)。従って、2つの線量率効果の原理のうち、ラット乳がん罹患リスクの線量率効果⁷⁾(次ページ図 IV-1の緑色のデータ)をよく説明するのはEの原理の方である。

以上のように、発がんの線量率効果の機序解明という当初目的に対して、「発がんプロモーション効果のレベル」(A)と「変異細胞と非変異細胞の競合のレベル」(E)に、これまで知られていなかった線量率効果の機序が存在し得るという証拠を得た。

② 実験研究と数理モデル研究の組み合わせの有効性

物理学、化学、地球科学、天文学等の分野では、数理的に表された理論やモデルの正当性を実験的証拠によって検証することを通して、理論やモデルによって自然を理解する。生物学においても状況は似ているが、理論やモデルは定性的であることが多い。放射線生物学は、これらの境界領域に属する分野であり、低線量放射線の影響を解明するという課題においても、定

量可能な放射線に対する生体の応答を数理的に理解するニーズがある。

そのため本研究では、動物発がん実験で明瞭に観察される線量率効果を説明するためのアプローチの一つとして、生物学的メカニズムに基づいた数理モデルを構築してその挙動を解析するという方法をとった。数理モデルが現実的なものであるためには、その設計が生物学的知見に基づいていて、用いられるパラメータが現実の数値に近いことが望ましい。本研究では、乳がんの起源細胞解明実験と細胞競合実験（令和 2～3 年度）は数理モデルの設計に役立っており、前駆細胞活性評価実験（平成 31 年度）、発がんデータ再解析（平成 31 年度）、TEB の細胞数・細胞サイズ等の形態測定（本研究以前の成果）も、パラメータ設定に役立っている。こうして構築した数理モデルを用いた解析から、変異細胞と非変異細胞の間の競合が線量率効果を決定するという原理が導かれた。この成果は、生物学的なデータを数理モデルにインプットして、数理モデル解析によって生物学へのフィードバックをアウトプットしたものである。今後の課題は、実験的研究によってこの仮説を支持する証拠を得ることである。

実験的研究だけではパラメータ値を得ることはできてもそれを使って予測できることは限られており、数理モデルだけではシミュレーションを行うことはできてもその根拠が現実的とは限らない。生物学的な根拠に基づいた定量的予測を可能とするためには、両者のキャッチボールが有効であることがわかる。

③ 本研究成果と疫学的知見の整合性

表 IV-1 及び図 IV-1 は、低線量率放射線のがんリスクを推定するために重要な疫学研究のうち、代表的なものの結果を示したものである。図 IV-1 には、これに主任研究者らのラット乳がん実験のデータ⁷⁾を加えて示した。

表 IV-1. 主な疫学の線量率等と結果^a

研究	線量率 ¹²⁾	平均累積線量 (範囲)	集団サイ ズ (人)	ERR/Gy (95% CI)
ケララ住民	1 μGy/h 未満 ¹²⁾	161 mGy	69,958	固形がん 罹患 -0.13 (-0.58, 0.46)
ケララ住民 (続報) ¹³⁾	0.09–1.7 μGy/h ^b	40–617 mGy ^b	149,585	固形がん 罹患 -0.05 (-0.33, 0.29)
テチャ川流域	外部被ばく 4.3 μGy/h、内部被 ばく 14 μGy/h ¹²⁾	400 (0–9000) mGy (外部+内部) ¹²⁾	29,730	固形がん 罹患 0.77 (0.13, 1.5) 死亡 0.61 (0.04, 1.27)
チョルノービ リ (チェルノ ブイリ) 緊急 作業員	320 μGy/h ¹²⁾	132 mGy 160 mGy ¹²⁾	67,568	固形がん 罹患 0.47 (0.03, 0.96) 死亡 0.58 (0.002, 1.25)
マヤック作業 者	<150 μGy/h ¹²⁾	354 mGy 510 (0–6800) mGy ¹²⁾	25,757	固形がん 死亡 0.12 (0.03, 0.21)
原爆被爆者	0.6–25 kGy/h ¹²⁾ (爆心地から 1– 2 km)	~200 (0–4000) mGy	105,444 ¹⁴⁾ 86,611 62,534 ¹⁵⁾	固形がん 罹患 0.47 (0.39, 0.55) ¹⁴⁾ 死亡 0.42 (0.32, 0.53) 乳がん 罹患 1.40 (0.85, 2.15) ^{15)c}

^a 特記なき場合、米国放射線防護測定審議会 (2018)¹¹⁾による。

^b 線量率は、線量率カテゴリーの平均年間線量の範囲 0.8–14.6 mGy より 24 時間×365 日で除して計算。累積線量は、線量カテゴリーの平均値の範囲。

^c 被ばく時 15 歳の値。

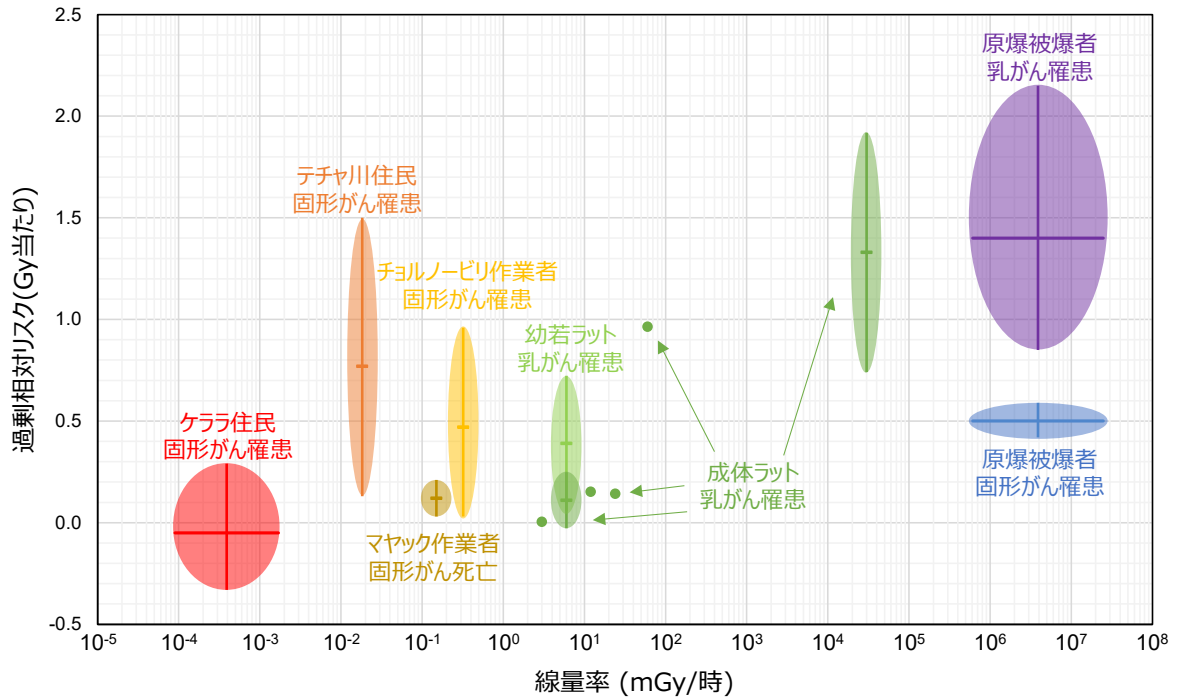


図 IV-1. 疫学研究及びラット乳腺実験における様々な線量率とがんリスク。疫学データは表 IV-1 内の文献、ラット実験データは文献⁷⁾に基づく。テチャ川住民、チョルノービリ作業員の線量率は平均、マヤック作業員の線量率は上限、ケララ住民と原爆被爆者の線量率は代表的な範囲。

研究項目 2「幹細胞動態数理モデルの構築」において、線量率 $6 \times 10^{-4} \sim 6 \times 10^5$ mGy/h の範囲におけるラット乳がん罹患リスクを予測した。この中で、これまでに知られている線量率効果の原理と本研究で明らかにした原理の両者を含む条件での予測（分担研究者報告書の図 IV-1(D)）では、2種類の原理による線量率効果はそれぞれ 10^4 mGy/h の前後と $10^1 \sim 10^2$ mGy/h の前後で現れ、 10^0 mGy/h 以下では同じ累積線量によるリスクはそれ以上低下しない。 10^0 mGy/h 以下でのがんの相対リスクは、累積線量 0.08 Gy において約 1.006 であり、過剰相対リスクは約 0.075 (Gy 当たり) である。これを上述の図 IV-1 の疫学研究におけるがんリスクの推定値 (95%信頼区間を含む) の知見と比較すると、がんの種類や生物種の違いがあるにもかかわらず、テチャ川住民及びチョルノービリ作業員のリスクの下限値、ケララ住民及びマヤック作業員のリスクの平均値等の値と、比較的よく一致していることがわかる。

3. 本研究成果の環境行政への貢献

本研究成果は、環境が放射性物質によって汚染された際の主要な被ばく形態である低線量率放射線被ばくの健康への影響の機序の一端を科学的に解明するものである。今後、その成果を科学コミュニティに対して所定の手続きを経て公表する。このように公表された科学的知見は、原子放射線の影響に関する国際連合科学委員会 (UNSCEAR)、ICRP 等が不定期に実施する科学的知見のとりまとめ、ICRP 勧告や国際原子力機関 (IAEA) 安全基準への反映を通して、放射線に関する我が国の環境行政に貢献する。

福島原発事故の影響を受けた住民等の不安の内容の一つに、放射線の健康影響への不安がある。それには、科学情報が様々な要因のために正しく伝わっていないというコミュニケーションの間

題の他に、低線量放射線の影響に関する科学的な予測そのものに不確実性があるという問題もある。本研究はその不確実性を減らす取り組みの一端であり、**本研究を含めた事業全体の成果をわかりやすく適切な形で住民等に示すことにより、理解増進と不安解消に貢献する。**

国際社会がカーボンニュートラルを推進する上で、原子力エネルギーを効果的に活用することに関する議論や社会的受容が必要である。我が国では、原爆被爆や福島原発事故を体験しているという事情もあり、原子力利用の負の側面を科学的に精緻に評価して国民的議論を続けることは特に重要である。低線量影響をどのように評価するかは、この議論に直結し、かつ科学的知見が不十分な領域である。**本研究成果は、上記の国際的機関の勧告等への反映を通じて、低線量影響の評価に関連する科学的知見を加えるものであり、カーボンニュートラル推進にも貢献する。**

なお、本研究成果は動物モデルを材料としていることから、ヒトへの外挿が必要である。用いた動物モデル(ラット)は医学研究においてヒトの病態と共通性を持つものとして扱われており、放射線による発がんに関してもラットとヒトには様々な定性的な共通性が見られることが分かっている¹⁶⁻¹⁸⁾。ラットとヒトで大きく異なると考えられるのは、定量的な面である。本研究で構築した数理モデルでは、ラットの実験的観察で得られた数値を利用してパラメータを決定したため、ラットにおける観察結果を予測できたとしても、ヒトに適用できるという根拠はない。そこで今後、ヒトを対象とした先行研究の成果を活用することによってヒトに適用できるパラメータを決定し数理モデルを改良すること、改良した数理モデルによる予測結果を疫学における観察結果と比較して整合性を検証することが必要である (VI も参照)。

V. 結論

発がんの線量率効果の機序解明という当初目的に対して、放射線照射による細胞増殖停止を補う発がんプロモーション効果のレベルと、変異細胞・非変異細胞間の競合のレベルの2つに、これまで知られていなかった線量率効果の機序が存在し得るという証拠を得た。

VI. 次年度以降の計画

上記 IV.3 に記載したように、本研究で構築した数理モデルのパラメータを、ラットのものからヒトのものへと置き換えることによって、生物学的機序に基づいてヒトの疫学データを説明可能な数理モデルへと改良し、線量率と乳がんリスクの関係を予測する。

また、本研究を含め、一般的な放射線健康影響の情報は、大きな集団を解析して得られた「平均的な人」の情報である。日本人の一定割合が保有し健康への影響が比較的大きいと考えられる遺伝的要因を選択して、動物モデルによって低線量率放射線影響の評価を実施し、数理モデルの改良に利用する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 論文・雑誌等

- 1) Kudo KI Takabatake M Nagata K et al. Flow cytometry definition of rat mammary epithelial cell populations and their distinct radiation responses, Radiation Research 2020; 194: 22-37.
- 2) Imaoka T Nishimura M Daino K et al. Dose rate effect of radiation on rat mammary carcinogenesis and an emerging role for stem cell biology, Radiation Protection Dosimetry (in press)

イ) 学会発表等

- 3) Nagata K Nishimura Y Hattori Y et al. Dynamics of DNA double-strand break repair in progenitor and mature cells of the rat mammary gland, 第 18 回幹細胞シンポジウム, オンライン, 2021 年 5 月.
- 4) Imaoka T Kudo KI Nishimura Y et al. Effect of ionizing radiation on balance between basal and luminal cell populations in rat mammary epithelium, 第 18 回幹細胞シンポジウム, オンライン, 2021 年 5 月.
- 5) Nagata K Nishimura M Daino K et al. Histological analysis of DNA double-strand break repair in progenitor and mature cells in rat mammary gland, 日本放射線影響学会第 64 回大会, 水戸及びオンライン, 2021 年 9 月.
- 6) Nagata K Nishimura M Daino K et al. Radiation-induced DNA double-strand break repair of progenitor cells in rat mammary gland, Institute for Environmental Sciences 30th Anniversary International Symposium, Aomori and online, Sep. 2021. (国際発表)
- 7) Imaoka T Nishimura M Daino K et al. Dose-rate effect of rat mammary carcinogenesis, Institute for Environmental Sciences 30th Anniversary International Symposium, Aomori and online, Sep. 2021. (招待講演・国際発表)

ウ) 環境行政への活用・貢献実績

- 8) 東京都立大学人間健康科学研究科講義「放射線影響科学特論」における資料への研究成果の利用
- 9) 茨城大学理学部・理学研究科講義「量子線科学入門」、「放射線生物学概論」、「放射線生体分子科学」、「量子線科学研究 I」、「量子線科学研究 II」における資料への研究成果の利用
- 10) 福島県立医科大学実習「MD-PhD プログラム実習」における資料への研究成果の利用
- 11) 千葉大学融合科学研究科講義「組織情報機能科学」における資料への研究成果の利用
- 12) 第 35 回日本放射線公衆安全学会講習会「放射線による人体への影響‘情報 up-date’」(令和 4 年 3 月)における講習資料への研究成果の利用

引用文献

- 1) 世界保健機関 World Health Organization. Health risk assessment from the nuclear accident after the 2011 Great East Japan earthquake and tsunami, based on a preliminary dose estimation, WHO Press, Geneva, 2013.
- 2) 原子放射線の影響に関する国際連合科学委員会 United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources, effects and risks of ionizing radiation, UNSCEAR 2013 Report to the General Assembly with Scientific Annexes, United Nations, New York, 2014.
- 3) 国際原子力機関 International Atomic Energy Agency. The Fukushima Daiichi Accident. Technical Volume 4/5, Radiological Consequences, IAEA, Vienna, 2015.
- 4) 経済協力開発機構・原子力機関 Organization for Economic Co-operation and Development, Nuclear Energy Agency. 2019 NEA Annual Report. OECD/NEA Publishing, Paris, 2019.
- 5) 米国放射線防護測定審議会 National Council on Radiation Protection and Measurements.

Approaches for Integrating Information from Radiation Biology and Epidemiology to Enhance Low-Dose Health Risk Assessment, National Council on Radiation Protection and Measurements, Bethesda, 2020.

- 6) Clement C Rühm W Harrison J et al. Keeping the ICRP recommendations fit for purpose, *J Radiol Prot* 2021; 41: 1390.
- 7) Imaoka T Nishimura M Daino K et al. Prominent dose-rate effect and its age dependence of rat mammary carcinogenesis induced by continuous gamma-ray exposure, *Radiat Res* 2019; 191: 245–254.
- 8) 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構. 「平成 30 年度文部科学省国家課題対応型研究開発推進事業英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業 幹細胞のキネティクスから発がんの線量率効果を紐解く 成果報告書」, 2019.
- 9) Bondar T Medzhitov R. p53-mediated hematopoietic stem and progenitor cell competition, *Cell Stem Cell* 2010; 6: 309–322.
- 10) Bowling S Lawlor K Rodriguez TA. Cell competition: the winners and losers of fitness selection, *Development* 2019; 146: dev167486
- 11) 米国放射線防護測定審議会 National Council on Radiation Protection and Measurements. Implications of recent epidemiologic studies for the linear nonthreshold model and radiation protection, National Council on Radiation Protection and Measurements, Bethesda, 2018.
- 12) Rühm W Azizova T Bouffler S et al. Typical doses and dose rates in studies pertinent to radiation risk inference at low doses and low dose rates, *J Radiat Res* 2018; 59: ii1–ii10.
- 13) Amma JP Nair RA Nair RRRK et al. Background Radiation and Cancer Excluding Leukemia in Kerala, India—Karunagappally Cohort Study, *Radiat Environ Med* 2021; 10: 74–81.
- 14) Grant EJ Brenner A Sugiyama H et al. Solid Cancer Incidence among the Life Span Study of Atomic Bomb Survivors: 1958-2009, *Radiat Res* 2017; 187: 513–537.
- 15) Brenner AV Preston DL Sakata R et al. Incidence of Breast Cancer in the Life Span Study of Atomic Bomb Survivors: 1958–2009, *Radiat Res* 2018; 190: 433–444.
- 16) Imaoka T Nishimura M Iizuka D et al. Radiation-induced mammary carcinogenesis in rodent models: what's different from chemical carcinogenesis? *J Radiat Res* 2009; 50: 281–293.
- 17) Moriyama H Daino K Imaoka T et al. Neutron-induced rat mammary carcinomas are mainly of luminal subtype and have multiple copy number aberrations, *Anticancer Res* 2019; 39:1135–1142.
- 18) Moriyama H Daino K Ishikawa A et al. Exome of radiation-induced rat mammary carcinoma shows copy-number losses and mutations in human-relevant cancer genes, *Anticancer Res* 2021; 41: 55–70.

Deciphering the mechanism underlying the dose rate effect of radiation carcinogenesis using animal and mathematical models

Tatsuhiko Imaoka,¹ Yuya Hattori,² Kento Nagata,¹ Rituko Watanabe,¹ Akinari Yokoya¹,
Daisuke Iizuka,¹ Mayumi Nishimura,¹ and Kazuhiro Daino¹

1 National Institutes for Quantum Science and Technology

2 National Institute of Technology Kure College

Keywords: radiation carcinogenesis, low dose rate radiation, dose rate effect, animal model, mathematical model, stem cell

Abstract

Low dose rate radiation exposure can occur in environments affected by nuclear accidents. Experimental observations support the dose rate effect, in which the radiation effect at low dose rates is smaller than that at high dose rates. However, how the dose rate effect appears has not been fully understood. In this fiscal year, we completed all planned experiments and mathematical analyses to explore new mechanisms of the dose rate effect on mammary carcinogenesis. In the experimental part, we first found that the percentages of luminal cells in mammary tissue changed depending on the dose rate. Second, based on the experimental results, we suggested that the luminal cells in the mammary gland are the origin of breast cancer. Third, since radiation-induced ionization occurs only in a subset of cells in the tissue at low dose rates, we continued the experiment to evaluate the competition between a few irradiated cells and a mass of non-irradiated cells in the tissue; we did not observe significant removal of irradiated cells. In the mathematical part, we constructed a model which combined the long-term dynamics (carcinogenesis) with short-term (accumulation of radiation-induced damage and cell death) and medium-term (tissue homeostasis) dynamics, rather than a model directly predicting the long-term consequence as had been done previously. We conclude that the dose rate effect emerges depending on the contribution of mutated cells in compensating for luminal cells lost shortly after radiation exposure. Thus, the present study identified two new factors that can determine the dose rate effect of carcinogenesis.