

## 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	不溶性セシウム粒子による生物影響の解明に向けた分野横断的共同研究
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	鈴木正敏	東北大学災害科学国際研究所・講師
分担研究者	二宮和彦	大阪大学放射線科学基盤機構附属ラジオアイソトープ総合センター・准教授
分担研究者	遠藤暁	広島大学大学院先進理工系科学研究科・教授
分担研究者	山田裕	量子科学技術研究開発機構放射線医学研究所放射線影響研究部・専門業務員

氏名		所属機関・職名
研究協力者	森口祐一	東京大学・教授
研究協力者	五十嵐康人	京都大学・教授
研究協力者	末木啓介	筑波大学・教授
研究協力者	福本学	理化学研究所・客員主幹研究員
研究協力者	三浦富智	弘前大学・教授
研究協力者	香崎正宙	産業医科大学・学内講師
研究協力者	佐藤志彦	日本原子力研究開発機構・研究員
研究協力者	千田浩一	東北大学・教授
研究協力者	稲葉洋平	東北大学・助教

研究要旨	<p>福島第一原子力発電所事故に特徴的な放射性微粒子である不溶性セシウム粒子の生物影響の解明を目指して分野横断的共同研究を実施した。環境試料から単離した不溶性セシウム粒子には放射性セシウム以外に放射性のストロンチウムやプルトニウムが含まれており、定量結果より放射性セシウムに比べて含有比が極めて低いことを明らかにした。この知見を参照して作成した放射性模擬粒子のマウス気管内投与による中期発がん性試験では腫瘍結節数が非放射性粒子投与や均等被ばく時よりも増加するなど、高感度肺がんモデル動物を用いた解析によって低濃度放射性セシウムを含む放射性微粒子が腫瘍発現を増強する可能性が示された。肺胞中の粒子近傍領域の局所</p>
------	--

	<p>線量をモンテカルロシミュレーションを用いて評価すると、国際放射線防護委員会の換算係数で評価した結果より 2~3 桁高いことを明らかにした。不溶性セシウム粒子をヒト正常上皮細胞と共培養し、粒子近傍細胞の遺伝子発現変化を網羅的に解析すると、放射線被ばくの影響を受けた可能性が考えられる遺伝子候補が見つかった。以上のように不均一な局所被ばくの線量評価と高感度検出系を用いた解析を紐付けることによって、低濃度放射性セシウムを含む粒子近傍の局所被ばくによって放射線依存的な生物影響が生じている知見が得られた。</p>
<p>キーワード</p>	<p>不溶性セシウム粒子、細胞影響、遺伝子発現</p>

## I 研究目的

大規模な原子力発電所事故を伴う放射線災害が生じると、環境中に放射性物質が放出されるリスクが生じる。放射性物質による環境汚染が一度生じるとその回復には長い期間を要し、約30年の半減期を持つ放射性セシウムは環境汚染回復期において持続的な放射線被ばくをもたらす放射性物質の一つとなる。国際放射線防護委員会（ICRP）は人間を対象とした放射線防護体系に加えて、2007年勧告では環境防護の概念を明確に示し<sup>1)</sup>、Publication108においてその具体的な枠組みについて述べている<sup>2)</sup>。その中では、汚染微粒子が被ばく経路の一つとして示される一方で、放射線被ばくを包括的に評価するためには、汚染微粒子に関するデータを収集することの必要性を指摘している。

福島第一原子力発電所（福島第一原発）事故によって環境中に放出された放射性セシウムは水溶性の形態以外に、不溶性の特徴を示す微粒子（以後、不溶性セシウム粒子とする）の形状として放出されたことが報告されている<sup>3)</sup>。主要な放出形態である水溶性放射性セシウムについては、過去の原子力災害事故の教訓として環境および体内での分布・動態に関する知見が収集されている<sup>4)</sup>。他方、福島第一原発事故の水素爆発時に形成したと考えられている不溶性セシウム粒子が環境中に放出された後は、エアロゾルに含まれて関東地方などの広範囲に放散していたことや、福島県内の旧警戒区域の土壌に沈着していることが確認されている<sup>3,5)</sup>。福島第一原発事故から5年以上が経過した後に採取した土壌からも発見されていることから、陸域に沈着している不溶性セシウム粒子は長期にわたって環境中に存在し続けることになる<sup>6)</sup>。福島第一原発事故以前にも核実験やチェルノブイリ原発事故の際に放出された不溶性の放射性微粒子（ホットパーティクル）が環境中で確認されていた<sup>7,8)</sup>。このホットパーティクルは核燃料断片に由来していたので、生物作用が大きい $\alpha$ 線を含む様々な放射線を放出し、 $10^6$  Bqオーダーの高い放射能を有する粒子も含まれていた。このような高い放射能を有するホットパーティクルは急性障害や肺がんなどの晩発影響を誘発することが報告されており、福島第一原発事故時に放出された不溶性セシウム粒子が環境リスクとなることが懸念されていた。

しかしながら、福島第一原発事故時に形成された不溶性セシウム粒子の性状解析を通じて、過去に生じた核燃料断片であるホットパーティクルとは性状が異なることが報告された<sup>3)</sup>。不溶性セシウム粒子の主成分は二酸化ケイ素（ $\text{SiO}_2$ ）であり、福島第一原発事故時に高温となった炉内でガス状に存在していた放射性セシウムが $\text{SiO}_2$ を材質とする構造物に濃集したことが、不溶性セシウム粒子形成のメカニズムの一つとして考えられている。このため、不溶性セシウム粒子に含まれる主要な放射性物質は放射性セシウムであり、その他の放射性物質は放射性セシウムに比べて極微量しか含まれていないことが昨年度までの本研究成果を含めて明らかにされてきた<sup>9)</sup>。不溶性セシウム粒子から放出される主な放射線は放射性セシウムに由来する $\beta$ 線、 $\gamma$ 線であり、不溶性セシウム粒子が有する放射能は高いもので数千Bq程度と、核燃料断片のホットパーティクルと比べて低い。以上のように不溶性セシウム粒子は放射性微粒子ではあるが、福島第一原発事故以外で放出された核燃料断片由来の放射性微粒子と比べて放射能が低く、粒子に含まれる放射性物質の種類が異なる。このため、不溶性セシウム粒子が環境リスクとして考慮すべきか否かの判断には不溶性セシウム粒子を用いる独自の科学的検証が必要である。また、不溶性セシウム粒子は粒径や放射能によって主に2種類に区分されており、このような特徴の違いによる生物影響に着目した知見も必要である。以上のことから、本課題では福島第一原発事故時に形成された放射性微粒子を不溶性セシウム粒子とし、核燃料断片とは区別して取り扱う。

放射性微粒子の体内動態はICRPや米国放射線審議会（NCRP）が作成したヒト気道モデルにもとづいて予測されている。酸化ウラン燃料粒子を投与した後の放射性セシウムの消化管吸収が1割に満たないことが動物実験の結果で報告されており<sup>10)</sup>、不溶性セシウム粒子の吸入が主な被ばく経路になると想定されている。放射性微粒子を体内に吸入摂取すると呼吸気道内、特に肺内での半減期が粒子の沈着部位によって約250日や約700日となり、水溶性の形態と比べて体外に排出されにくくなるので、長期内部被ばく要因となる<sup>11)</sup>。肺内、特に肺胞内に到達するサイズを有する不溶性セシウム粒子は数Bqから数十Bq程度の放射能を有することがこれまで環境中で発見された不溶性セシウム粒子の測定結果から示されているが、微粒子の体内動態で示されている半減期を考慮すると粒子の近傍に位置する細胞が持続的に放射線に暴露することによる局所被ばくが、従来得られてきた均等被ばく影響と等しいのか否かについて十分な知見は得られていない。このため、福島原発事故特有の不溶性セシウム粒子を用いて環境動態や健康影響に結びつく科学的知見を収集することは、環境保健行政における不溶性セシウム粒子に対する判断材料として重要な資料となる。

本課題では、不溶性セシウム粒子による生物影響を明らかにすることを目的に環境試料からの不溶性セシウム粒子の分離、放射化学的手法に基づいて粒子の性状を解析するとともに生成過程の知見を人工模擬粒子の作成にフィードバックさせることで、実物に近い粒子を生物実験に提供する研究体制を構築している。土壌から回収する不溶性セシウム粒子や人工模擬粒子を細胞実験や動物実験に用いることで、不溶性セシウム粒子の分子レベルの影響から肺内分布、動態、および病理組織変化について検討する。また、放射線被ばくと生物影響を関連付けるためには被ばく線量評価が必須である。不溶性セシウム粒子の比放射能が非常に高く、線量は空間的な分布をもつことが予想される。不溶性セシウム粒子に含まれる主な放射性核種はCs-134、Cs-137であるため、不溶性セシウム粒子近傍の細胞に与えられる線量はβ線に起因する。ICRPが推奨する臓器・組織単位で平均化した線量は実際に体内に取り込んだ不溶性セシウム粒子が周囲に与える線量と異なる値になることが予想される。そこで、本研究では体内に取り込んだ不溶性セシウム粒子が周囲の細胞に与える線量分布について、PHITSモンテカルロコードを用いて計算する。

以上のように、本課題では粒子の性状と生物実験体系をシミュレーションで再現して推定される被ばく線量と生物影響との相関を調べるための分野横断共同研究を立ち上げ、不溶性セシウム粒子によるリスク推定に寄与する基礎的知見を収集することを目指す。特に、非放射性模擬粒子の影響と比較することで、不溶性セシウム粒子による影響の特異性についても明らかにする。

## II 研究方法

### 1. 全体計画

本課題では図1に示す4項目を分担して実施し、得られた不溶性セシウム粒子や模擬粒子、および粒子の性状解析結果を参照した被ばく線量評価や粒子を利用した生物影響評価結果など、試料や情報を各項目間で共有することによって不溶性セシウム粒子の生物影響の解明を目指す分野横断的課題を実施した。福島第一原発事故時に形成された不溶性セシウム粒子は過去の放射線事故事例で生じた粒子とは異なる特徴を示すため、本課題では福島県内の土壌から不溶性セシウム粒子を収集し、生物解析担当者に提供することで細胞レベルでの影響解析を実施した。収集した不溶性セシウム粒子を提供する他に、物理化学性状の分析を通じて線量評価に関連する情報の収集や事故時の炉内事象を推測する知見の収集を通じて不溶性セシ

ウム粒子を模擬する放射性微粒子の作成に取り組んだ。動物実験で使用する粒子量を環境試料から収集することが困難であったことから、本課題で作成した放射性模擬粒子を利用することで不溶性セシウム粒子を想定する動物実験の実施体制を整備した。被ばく線量評価では、PHITS コードを用いたモンテカルロシミュレーションによって粒子からの距離に依存する不均一な線量率分布を計算し、培養細胞実験計を想定した線量評価と、動物実験を想定したマウス肺の被ばく線量を評価した。細胞影響解析では、環境試料から回収した不溶性セシウム粒子を用いて、1 粒子近傍に存在する細胞影響について、1 細胞レベルで DNA 損傷の誘発を粒子からの距離および被ばく線量評価結果と紐付けて解析した。また、不溶性セシウム粒子近傍細胞における遺伝子発現変化について網羅的に解析し、不溶性セシウム粒子の主成分である非放射性的の二酸化ケイ素で構成される粒子による影響との比較を行った。動物実験では微粒子の気管内投与法や微粒子投与後の病理組織解析方法の検討を行なった上で、高感度に肺がんを検出できる実験動物モデルに放射性模擬粒子を投与する実験系を用いて低濃度放射性セシウムを含む放射性微粒子が肺がんの誘発に及ぼす影響について、局所被ばくと均等被ばくを比較しながら放射性微粒子による影響について解析を行った。

本報告書の研究結果欄では細胞影響解析結果について報告し、不溶性セシウム粒子の性状解析と模擬粒子の作成、被ばく線量評価、不溶性セシウム粒子の体内分布と病理解析の研究結果は各分担研究者の報告書で報告する。

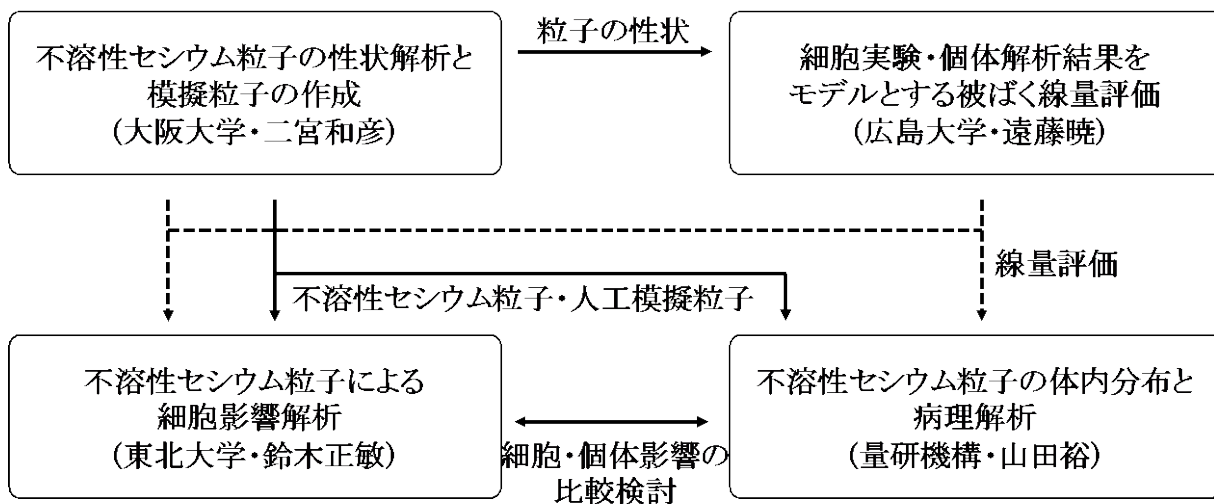


図1 本課題の実施体制

## 2. 不溶性セシウム粒子暴露細胞における遺伝子発現解析

昨年度までと同様に、ヒトテロメア逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子の導入で無限増殖能を獲得したヒト正常網膜色素上皮細胞 (RPE1-hTERT) を用いた。細胞の維持には 10% ウシ胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (ニッスイ) で対数増殖期を維持するように継

代操作を行った。不溶性セシウム粒子との共培養は、96 ウェルプレート内の 1 つのウェルを用いて行った。コンフルエント状態になるまで培養した細胞の上に直接接するように 1 個の不溶性セシウム粒子を 24 時間のせた。共培養開始から 24 時間後に細胞を回収する共培養方法を 3 回繰り返す、それぞれの共培養後に回収した細胞をひとまとめにして抽出した RNA 量は遺伝子発現解析 1 回分に相当する。遺伝子発現解析では共培養無し、および非放射性模擬粒子あるいは不溶性セシウム粒子との共培養の 3 条件で行い、いずれの条件においても 96 ウェルプレート内の 1 つのウェルでの培養を 3 回繰り返してひとまとめにした細胞を解析 1 回分の試料として用い、このような細胞回収を各条件で 2 度繰り返すことによって二重のサンプルを準備した。共培養に用いた粒子の粒径は約 250  $\mu\text{m}$ 、粒子に含まれる Cs-137 放射能は約 700~800 Bq であった。回収した細胞から抽出した Total RNA (RNeasy mini kit、キアゲン) のクオリティチェック (Bioanalyzer2100、アジレント・テクノロジー社) を行い、3D-Gene Human Oligo chip 25k (東レ) を用いてマイクロアレイ解析を行った。得られたシグナル値を Gene Spring GX ver14.5 (アジレント・テクノロジー社) に読み込み、標準化操作を行った。

### 3. 福島県浜通り野生動物の気管、肺における不溶性セシウム粒子の探索

福島県浜通りで有害鳥獣として駆除された野生ニホンザルから採取した肺や気管の一部をイメージングプレートに一定時間密着させることで、組織中の不溶性セシウム粒子の探索を行った。肺は約 1 mm 厚に切り出し、イメージングプレートに密着させた。切り出した片側の肺で検出を行った後に、反対側の検出を行い、切り出した肺の両側で不溶性セシウム粒子に相当する濃集点の検出を行った。気管は矢状面に切り込みを入れて内側をイメージングプレートに密着させた。イメージングプレートは画像解析装置 (Typhoon FLA9500、GE ヘルスケア ジャパン) を用いてオートラジオグラフィによる観察を行った。

(倫理面への配慮)

本課題で使用する野生動物試料は、本課題以外の事業で収集された試料の譲渡を受けて行うため、本課題において動物実験委員会の審査を必要としない。提供元の課題では、適切な手順によって試料が収集されていることを、東北大学動物実験専門委員会で確認されている。

## III 研究結果

### 1. 不溶性セシウム粒子暴露細胞における遺伝子発現解析

96ウェルプレート内で粒子と共培養を行った細胞を用いて遺伝子発現解析を行った。分担研究者の遠藤が計算した結果をもとに作成した、粒子からの距離と不溶性セシウム粒子に含まれる各放射性物質から放出される放射線の線量率換算係数の関連性 (図2) を参考にして、共培養実験系を設定した。700~800 BqのCs-137放射能を有する粒子を24時間共培養するとき、粒子から0.5 cm以内の範囲にある細胞はCs-134とCs-137から放出される $\beta$ 線と $\gamma$ 線の両方に暴露し、0.5 cm以遠にある細胞は主に $\gamma$ 線のみにも暴露することになる。このため、本研究では直径が1 cmである96ウェルプレート内の1つのウェルの中心に粒子を設置することで、粒子からの距離が0.5 cm以内の範囲にある細胞を回収する実験系とした。この実験系では、Cs-134およびCs-137から放出される $\beta$ 線と $\gamma$ 線の線量率が一致する (図2の各グラフの実線と点線の交点) 部位は粒子からの距離が約0.2 cm (Cs-134の場合) ~約0.3 cm (Cs-137の場合) となる。粒子から0.3 cm以内の領域に位置する、1ウ

ウェル全体に対して16~36 %相当の細胞はβ線による被ばくが優位となり、その外側に位置する、1ウェル全体の細胞に対して64~84 %相当の細胞はγ線による被ばくが優位となる。なお、非破壊検査では粒子中のSr-90の定量ができないため、共培養で使用した粒子中のSr-90を測定することはできないが、分担研究者の二宮の解析よりSr-90/Cs-137が $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$ となっているため、共培養に使用した不溶性セシウム粒子にSr-90が含まれていたとしても、Cs-137放射能からの推定と図2に示す線量率換算係数から、Sr-90による被ばくは無視しても差し支えないレベルであると判断した。

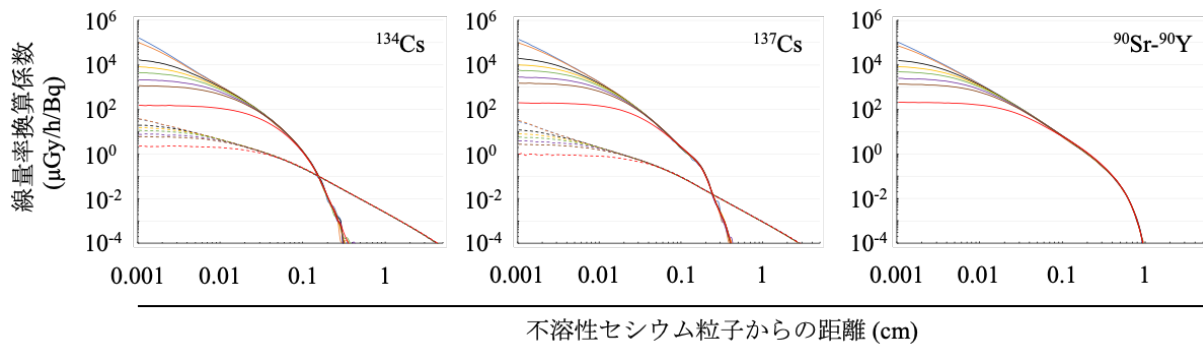


図2 不溶性セシウム粒子中の放射性物質による線量率換算係数と粒子からの距離  
 実線はβ線、点線はγ線の計算結果を示す。実線、点線ともに線の色は粒径1~500μmの条件で計算した結果を示し、実線、点線共に上から3番目の黄色の線の結果を本文で参照する。

分担研究者の二宮が作成した非放射性模擬粒子、あるいは旧警戒区域の土壌から分離した不溶性セシウム粒子は前述した共培養実験系に用いられ、共培養後の細胞から抽出したRNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。21,088遺伝子を対象に、まずは、共培養をしていない細胞に対して1.5倍以上の発現上昇を示したのは非放射性模擬粒子共培養で442遺伝子、不溶性セシウム粒子共培養で550遺伝子、両者に共通したのは269遺伝子であった (図3)。逆に、共培養をしていない細胞に対して1.5倍以上の発現低下を示した遺伝子は、非放射性模擬粒子共培養で175遺伝子、不溶性セシウム粒子共培養で190遺伝子で、25遺伝子が共通して発現が低下していた (図3)。

次に、非放射性模擬粒子共培養に対して不溶性セシウム粒子共培養で発現が上昇したのは50遺伝子で、そのうち21遺伝子が共培養をしていない細胞との比較で発現が上昇した遺伝子と一致していた。この21遺伝子は不溶性セシウム粒子共培養のみで発現が上昇していたことから、放射線に起因して発現が変動した可能性が高い。同様に、共培養をしていない細胞に対して非放射性模擬粒子と放射性模擬粒子に共通して発現上昇が見られた269遺伝子は粒子の母材であるSiO<sub>2</sub>に反応して発現が変化した可能性が考えられる。発現減少を示した遺伝子について同様に検討すると、粒子の母材に反応して発現が低下したと考えられた25遺伝子に対して、放射線に起因して発現が低下した可能性がある遺伝子は今回の解析結果からは見いだすことができなかった。発現変動を2倍に設定して同様の検討を行うと、粒子の母材の影響は発現が上昇した39遺伝子と発現が低下した6遺伝子であったが、放射線に起因した影響は1遺伝子で発現が上昇したのみであった。

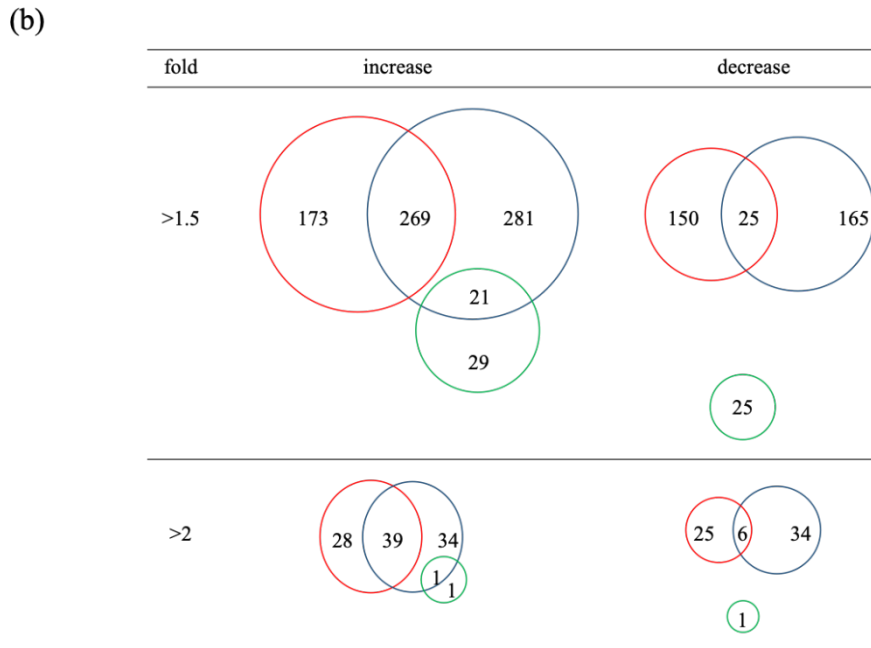
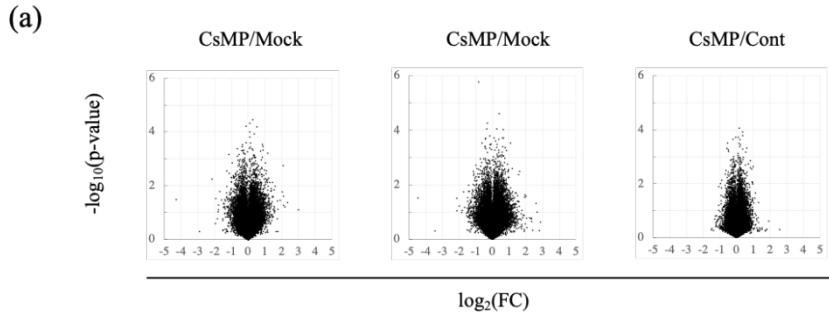


図3 共培養による遺伝子発現変動解析  
 (a) ボルケーノプロットによる遺伝子発現の群間比較。  
 Mock: 共培養無し  
 Cont: 非放射性模擬粒子との共培養  
 CsMP: 不溶性セシウム粒子との共培養  
 (b) 発現変動遺伝子数の群間比較  
 赤: Cont/Mock  
 青: CsMP/Mock  
 緑: CsMP/Cont

## 2. シリカ粒子処理による軽度なスーパーオキシドの誘発

非放射性模擬粒子との共培養による遺伝子発現の変化や、その遺伝子の中には不溶性セシウム粒子共培養時と共通して発現が変化していたものが存在することから、粒子の母材であるSiO<sub>2</sub>に反応した遺伝子発現変化が生じている可能性が考えられた。そこで、シリカ粒子による酸化ストレスの誘発について検討した。このため、粒径3 μmの非晶質シリカ粒子と24時間共培養した細胞におけるミトコンドリア由来のスーパーオキシドについて、mitosoxRed試薬を用いた生細胞イメージングを行った(図4)。未処理細胞と比べると、非晶質シリカ粒子との24時間の共培養によってスーパーオキシドが軽度に出検された。ただ、10 GyのX線を照射した細胞と比べるとその検出量は非常に少なく、シリカ粒子に起因する酸化ストレスはわずかなレベルであることが示唆された。



未処理

シリカ粒子

X線

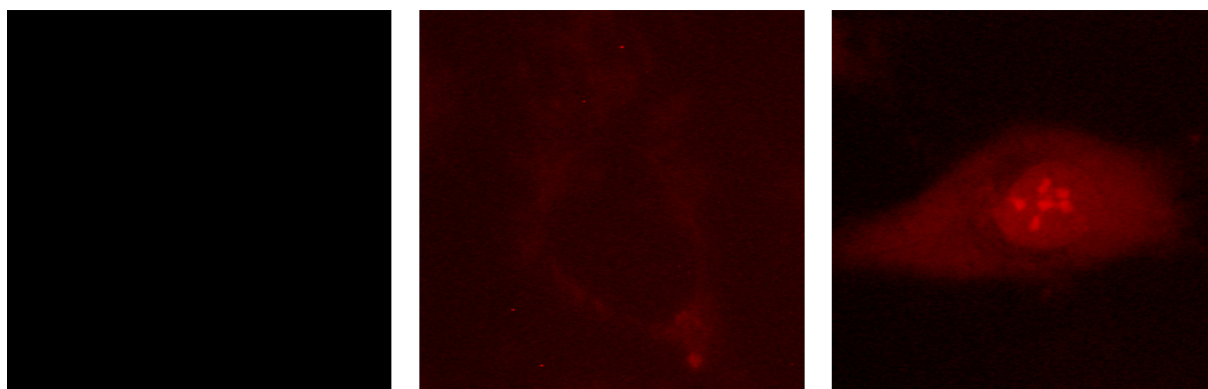


図4 ミトコンドリア由来スーパーオキシド誘発の検討

ミトコンドリア由来スーパーオキシドをmitosoxRed試薬を用いて検出した (赤)。シリカ粒子と24時間共培養すると、未処理時と比べてわずかに赤色蛍光が検出されるが、X線照射細胞と比べるとスーパーオキシドの誘発はわずかであった。

### 3. 福島県浜通り野生動物の呼吸器系に沈着する不溶性セシウム粒子の探索

福島県浜通りで有害鳥獣駆除された野生ニホンザルの肺と気管を用いたオートラジオグラフィにより、不溶性セシウム粒子の吸入に関する検討を行った。まず、10 Bq程度の不溶性セシウム粒子をイメージングプレートに24時間密着すると黒い濃集点として画像化できることを確認した。そこで、切り出した肺や気管を24時間イメージングプレートに密着させて、オートラジオグラフィによる体内の不溶性セシウム粒子の検出を試みた。しかしながら、肺や気管の形に沿って均一な黒い像が得られるために、粒子の有無の判定が困難であった。このため、イメージングプレートに密着させる時間を短縮して肺や気管の形状にそった均一なシグナルを低下させることにしたが、イメージングプレートと試料を密着させる時間を短縮すると、10 Bq程度の放射能を持つ不溶性セシウム粒子と肺を重ねた場合に粒子の濃集点を検出することができなくなった。肺との重ね合わせによって粒子が検出できたのは、百Bqオーダーの放射能を有する粒子であったことから、本課題では百Bqオーダーの放射能を有する粒子に限定して検出を行った (図5)。32頭分の試料を解析した結果、解析した試料中には百Bqオーダーに相当する不溶性セシウム粒子の存在を示す濃集点は検出されなかった。

# 気管



# 肺

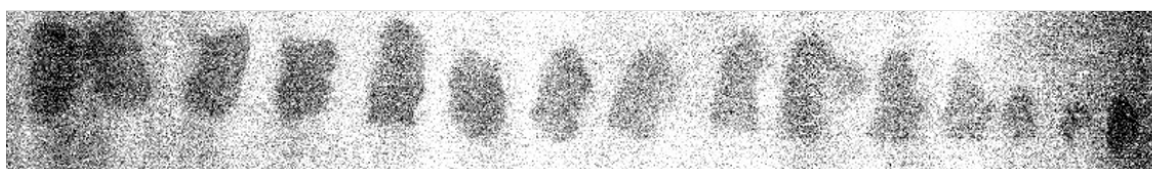


図5 野生ニホンザルの気管と肺を用いたオートラジオグラフィーの一例

野生ニホンザルの気管と肺のオートラジオグラフィーの一例。32頭分の試料を解析した結果、組織形態にそって均一な黒い像が確認され、粒子の存在を示す黒い濃集点は検出されなかった。

## IV 考察

本項目では土壌から回収した不溶性セシウム粒子を鋭敏な細胞影響解析系に導入し、福島第一原発事故で放出された放射性微粒子による分子細胞レベルの影響について検討した。まず、昨年度までの検討結果より細胞致死性の高いDNA二重鎖切断を誘発することを明らかにした。少なくともCs-137を90 Bq以上有する不溶性セシウム粒子から1 cm以内の範囲にある細胞には放射エネルギーに依存する数の損傷を粒子が沈着してから24時間以内に生成すること、また粒子が沈着する期間は持続的にDNA二重鎖切断が生成され、時間依存的に損傷数が蓄積することを明らかにした。DNA二重鎖切断はゲノム配列に変化をもたらす要因となることに加えて、細胞死を誘発するために、しきい線量以上の被ばくが生じる場合には、確定的影響（組織反応）に関与する可能性がある。分担研究者の二宮の解析を含めて、DNA二重鎖切断を誘発する放射エネルギーをもつ不溶性セシウム粒子の粒径は一般的に大きく、数十から数百 $\mu\text{m}$ の範囲にあることが経験的にわかっている。このような性状を示す粒子は、タイプBの区分に分類されている<sup>6)</sup>。ヒト気道モデルで示されている粒子サイズに依存した体内分布を参照すると、タイプB粒子は吸入後気管までの範囲に沈着する確率が高く、この範囲に沈着した粒子は数日の半減期で体外に排泄されると推定されている。本課題では不溶性セシウム粒子と24時間、あるいは72時間共培養した細胞に誘発されるDNA二重鎖切断の定量と分担研究者の遠藤による被ばく線量評価を実施した。共培養実験ではタイプBに相当する粒子を使用しており、分担研究者の二宮は本課題の成果としてタイプB粒子に含まれる主要な

放射性物質のCs-134とCs-137以外に、微量放射性物質としてSr-90とPu-239+240を定量した。これらの核種は非破壊検査では測定できないために、実際に共培養に使用した粒子中のSr-90とPu-239+240を定量することはできないが、Cs-137に対する放射能比がそれぞれ $10^{-5} \sim 10^{-4}$ と $10^{-8} \sim 10^{-7}$ で非常に小さく、遠藤が行ったPHITSモンテカルロシミュレーションによって計算された線量率換算係数と照らし合わせた結果、放射性セシウムによる線量と比べて無視しても差し支えないレベルと判断し、本課題では不溶性セシウム粒子による線量評価を放射性セシウムの測定結果で評価した。不溶性セシウム粒子に近接した細胞領域では共培養24時間と72時間でそれぞれ2.5 Gyと7.2 Gy、1 cm離れた領域では0.05 mGyと0.14 mGyと評価され、ミクロな領域で線量分布が大きく異なることが示された。この評価された線量を、X線発生装置で単回照射すると、短時間に誘発されたDNA二重鎖切断は修復によって時間依存的に減少するが、増加することはない。不溶性セシウム粒子の場合は共培養期間にDNA二重鎖切断の生成と修復が同時に進行するが、生成が修復能を上回るために損傷が蓄積したと考えられる。単回照射後のDNA二重鎖切断は数時間以内に約半数の損傷が修復される早い修復機構が備わっている<sup>12)</sup>。一方、不溶性セシウム粒子が形成する低い線量率では単位時間に生成されるDNA二重鎖切断数は多くないので、不溶性セシウム粒子による持続的な照射によってDNA二重鎖切断が蓄積するメカニズムについては別途検証が必要になると考える。ただ、共培養実験で使用した不溶性セシウム粒子に含まれているCs-137と同等の放射エネルギーを培地中に加えて、面線源として72時間まで細胞にCs-137を暴露させてもDNA二重鎖切断は誘発されなかったことから、特にタイプBに区分される不溶性セシウム粒子は、粒子に近接する限局された範囲に致死的な損傷を誘発していることは明らかである。本課題ではタイプBに区分される粒子が極近傍領域において細胞レベルの放射線影響を誘発することを明らかにした。このような細胞レベルの変化が個体影響・健康影響の要因となる可能性については、組織修復などを考慮するために動物実験による検討が今後必要となる。

DNA二重鎖切断マーカーの解析で得られた、粒子からの距離、共培養時間、粒子中の放射能との関連性からみて、放射線が要因となっている可能性が高い。放射線はDNA二重鎖切断以外に活性酸素種 (ROS) を誘発するが、不溶性セシウム粒子の主成分であるシリカ粒子もROSを誘発することが知られている<sup>13)</sup>。このため、不溶性セシウム粒子による細胞影響には放射線と粒子の母材であるSiO<sub>2</sub>それぞれが誘発するROSによって、共通の反応を相加相乗的に活性化する可能性を遺伝子発現を指標に検討した。前年度までの解析結果を参考にして、不溶性セシウム粒子によるDNA二重鎖切断が誘発される共培養開始24時間後に細胞を回収し、放射線誘発のシグナルが活性化している状態で網羅的な遺伝子発現解析を行った。この結果、シリカ粒子処理に依存した発現変動を示す遺伝子群と、放射線に起因して発現が変動した遺伝子群を同定したが、両者に共通する遺伝子は見つからなかった。この結果は不溶性セシウム粒子による遺伝子発現変化には、シリカ粒子処理に反応する経路と、放射線に依存する経路それぞれが独立に活性化していることを示唆する。ミトコンドリア由来のスーパーオキシドを検出すると、シリカ粒子処理群では未処理細胞と比較してわずかな誘発が検出されたのみであり、X線照射細胞と比べると誘発レベルは非常に低いことが示された。この結果より、非放射性模擬粒子と不溶性セシウム粒子によってスーパーオキシドに由来する共通の遺伝子発現変動が生じていたとしても、非放射性模擬粒子を処理した細胞では1.5倍以上の発現変動が誘発されずに、共通に変動する遺伝子が検索できなかった可能性が考えられた。しかしながらこの結果を逆手にとると、今回抽出された遺伝子群は、シリカ粒子あるいは放射線による影響を区別して検出するためのバイオマーカーの候補となる可能性をもつ。

今後、放射能が低いタイプA粒子の生物影響解析が必要になる中で、今回実施した遺伝子発現の結果を精査し、各刺激に対応するマーカーを確立することは、タイプA処理による生物変化の原因を特定するツールとしての応用が期待される。

分担研究者の山田は、高感度な肺がん検出動物実験モデルを利用して、二宮が人工的に作成した放射性模擬粒子の気管投与による中期発がん性試験を実施した。二宮の検討によってシリカ粒子に吸着できるセシウムは約3%程度であり、この条件で作成できた放射性模擬粒子が有する放射エネルギーはタイプA粒子よりも低いと見積もられた。しかしながら、高感度モデル動物実験の結果より、放射性模擬粒子が発がんリスクを有する可能性を示した。Cs-137を約7 Bq有する不溶性セシウム粒子は、タイプA粒子よりもやや高い放射能をもっているが、細胞実験ではDNA二重鎖切断を誘発しなかった。動物実験で使用した放射性模擬粒子はさらにCs-137放射能が低いいため、DNA二重鎖切断誘発能は極めて低いと判断される。遠藤は肺胞に沈着した放射性微粒子による線量分布を計算し、粒子から1 cmの範囲にある局所被ばくは、ICRPの線量換算係数を用いて計算した線量率と比べて最大5桁高くなる結果を示した。今回の動物実験では多量の放射性模擬粒子を投与したために、粒子が肺内で局在する場合には局所線量が増加し、発がん標的細胞自身でがん化が促進された可能性が考えられる。この点の詳細は山田の報告書で述べられているが、細胞影響の観点から動物実験で発がん頻度が増加した別の可能性について考察する。それは、持続的に被ばくした間質細胞によってがん化を促進する微小環境が形成された可能性である。正常体細胞が分裂寿命を迎えて老化細胞になると、様々なタンパク質の分泌を促進するようになる<sup>14)</sup>。間質細胞と上皮細胞間には分泌タンパク質を介する相互作用が存在しており、老化細胞による分泌状態の変化は微小環境を変化させる要因となる。この微小環境変化の生物作用については様々な報告があるが、その中に癌細胞特異的な増殖促進と、慢性炎症による癌化の促進が含まれている。放射線でも老化細胞と類似した特徴を早期に示す老化様増殖停止 (SLGA) の誘発によって微小環境変化が生じる<sup>15)</sup>。SLGAは高線量単回照射以外に、低線量持続照射によって誘発されることも報告された。また、SLGAのように顕著な変化を示さない場合でも、低線量放射線によってタンパク質の分泌が促進されることも報告されている<sup>16)</sup>。前述の遺伝子発現解析において、不溶性セシウム粒子処理で発現が変動した遺伝子のパスウェイ解析を行った結果、ミトコンドリアや炎症反応に関連する経路の遺伝子が含まれていた。ミトコンドリア関連では、損傷したミトコンドリアの修復に関連する遺伝子が含まれており、不溶性セシウム粒子によってROSが誘発されていることが予想される。また、ROSは炎症反応を誘発する要因としても知られており、遺伝子発現解析でも炎症反応に関わる一部の経路が活性化していることが示された。慢性炎症は癌化を促進する<sup>17)</sup>。また放射線が誘発する微小環境変化には放射線抵抗性を付与する因子が含まれており、がん細胞やがん化する可能性を持つ細胞の増殖促進など生存促進性の微小環境形成を通じて、NNKでイニシエートされた細胞の生存や増殖をサポートし、発がん頻度が上昇した可能性が考えられる。いずれにしても、発がん効果における粒子投与量の依存性を今後明らかにすることが必要であることに加えて、微小環境変化との関連性についても細胞生物学的な知見が必要となる。このような細胞レベルと個体レベルの知見をもとに、最終的には感受性モデル実験から通常の実験動物における評価が必須になる。

福島県浜通りの野生動物の気管や肺を用いて不溶性セシウム粒子の呼吸器への取り込みをオートラジオグラフィで評価する試みを行った。このため、福島県浜通りで有害鳥獣駆除個体から肺と気管の一部を採取して解析を行った。粒子が単独で存在する場合にはタイプAに相当する放

射能でも黒い濃集点を観察することができるが、野生動物の肺には放射性セシウムが均等に蓄積しており、タイプAの検出を阻害することが明らかになった。これはイメージングプレートとの密着時間を短縮してもタイプA粒子検出の改善にはつながらなかった。タイプBに相当する粒子は肺とともにイメージングプレートに密着しても判別することが可能であったことから、高濃度セシウム粒子の検討を行い、解析した個体の呼吸器には高濃度の不溶性セシウム粒子が存在しないことがわかった。イメージングプレートでは野生動物の試料を用いてタイプA相当の粒子を検出することが困難であったが、遠藤が検討しているマイクロPIXE分析を肺組織切片中の不溶性セシウム粒子の検出に応用し、実用化されることが期待される。

## V 結論

福島第一原発事故に由来する放射性微粒子が環境中で発見され、その健康影響について懸念が生じた。核燃料が断片化したホットパーティクルとは性状が異なる、福島第一原発事故で生じた放射性微粒子による健康影響を正しく評価するためには、不溶性セシウム粒子を用いた検討が必要であった。本課題では、不溶性セシウム粒子の性状解析、局所被ばくの線量評価、不溶性セシウム粒子の細胞影響や個体影響について検討する分野横断体制によって、不溶性セシウム粒子による健康影響に関する知見を収集する一つのモデルを確立した。また、生物影響解析で必須となる再現性のある粒子の作成に取り組んだ。本課題では粒子の性状解析の知見を深め、局所被ばく線量評価の体制を構築することによって得られた細胞影響・個体影響と従来の放射線影響との知見を比較できる体制を構築した。特に高感度な実験系を用いることで呼吸器深部に長期間残存することが予想されるタイプの粒子に発がんリスクを有する可能性が示唆されたことから、今後も分野横断の共同研究体制で不溶性セシウム粒子による健康影響に関する知見の収集と解明を深めることが必要である。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) 鈴木正敏、千田浩一、福本学. 不溶性 Cs 粒子による生体影響の評価にむけた現状と展望. 科学/岩波出版、2021; 6; 562-566.

引用文献

- 1) ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37 (2-4).
- 2) ICRP, 2008. Environmental Protection – the Concept and Use of Reference Animals and Plants. ICRP Publication 108. Ann. ICRP 38 (4-6).
- 3) Adachi K, Kajino M, Zaizen Y, Igarashi Y. Emission of spherical cesium-bearing particles from an early stage of the Fukushima nuclear accident, Scientific Reports 2013; 3: 2554.
- 4) Leggett RW, Williams LR, Melo DR, Lipsztein IL. A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body, Science of the Total Environment 2003; 317: 235-255.
- 5) Igarashi J, Zheng J, Zhang Z, Ninomiya K, Satou Y, Fukuda M, Ni Y, Aono T, Shinohara A. First determination of Pu isotopes ( $^{239}\text{Pu}$ ,  $^{240}\text{Pu}$  and  $^{241}\text{Pu}$ ) in radioactive particles derived from Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident, Scientific Reports 2019; 9: 11807.
- 6) Satou Y, Sueki K, Sasa K, Yoshikawa H, NAKAMA S, Minowa H, Abe Y, Nakai I, Ono T, Adachi K,

- Igarashi Y, Analysis of two forms of radioactive particles emitted during the early stages of the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Station accident, *Geochemical Journal*, 2018; 52;137-143.
- 7) Smith JN, Ellis KM, Aarkrog A, Sediment mixing and burial of the <sup>239,240</sup>Pu pulse from the 1968 Thule, Greenland nuclear weapons accident. *Journal of Environmental Radioactivity*, 1994; 25; 135–159.
  - 8) Cutshall N, Osterberg C, Radioactive particle in sediment from the Columbia River. *Science*, 1964; 144; 536–537.
  - 9) Igarashi J, Zheng J, Zhang Z, Ninomiya K, Satou Y, Fukuda M, Ni Y, Aono Y, Shinohara A, First determination of Pu isotopes (<sup>239</sup>Pu, <sup>240</sup>Pu and <sup>241</sup>Pu) in radioactive particles derived from Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident *Scientific Reports*, 2019; 9; 11807.
  - 10) Talbot RJ, Newton D, Segal MG, Gastrointestinal Absorption by Rats of <sup>137</sup>Cs and <sup>90</sup>Sr from U<sub>3</sub>O<sub>8</sub> Fuel Particles: Implications for Radiation Doses to Man after a Nuclear Accident, *Radiation Protection Dosimetry*, 1993; 50; 39–43.
  - 11) ICRP, 2015. Occupational Intakes of Radionuclides: Part 1. ICRP Publication 130. *Ann. ICRP* 44(2).
  - 12) Suzuki M, Suzuki K, Seiji K, Watanabe M, Phosphorylated Histone H2AX Foci Persist on Rejoined Mitotic Chromosomes in Normal Human Diploid Cells Exposed to Ionizing Radiation, *Radiation Research*, 2006; 165; 269-276.
  - 13) Kusaka T, Nakayama M, Nakamura K, Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses, *PLoS One*, 2014; 9(3); e92634.
  - 14) Ohtani N, The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): can it be controlled by senolysis?, *Inflammation and Regeneration*, 2022; 42; 11.
  - 15) Suzuki K, Mori I, Nakayama Y, Miyakoda M, Kodama S, Watanabe M, Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiation Research*, 2001; 155; 248–253.
  - 16) Klovov D, Leskov K, Araki S, Zou Y, Goetz EM, Luo X, Willson D, Boothman DA. Low dose IR-induced IGF-1-sCLU expression: a p53-repressed expression cascade that interferes with TGFβ1 signaling to confer a pro-survival bystander effect. *Oncogene*. 2013; 32; 479-90.
  - 17) Nakamura N, Reexamining the role of tissue inflammation in radiation carcinogenesis: a hypothesis to explain an earlier onset of cancer, *International Journal of Radiation Biology*, 2021; 97; 1341-1351.

# Interdisciplinary joint research for elucidation of biological effects of radiocesium-bearing insoluble particle

Masatoshi Suzuki<sup>1</sup>, Kazuhiko Ninomiya<sup>2</sup>, Satoru Endo<sup>3</sup>, Yutaka Yamada<sup>4</sup>

*1 International Research Institute of Disaster Science, Tohoku University, Miyagi, Japan*

*2 Institute for Radiation Sciences, Osaka University, Osaka, Japan*

*3 Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University, Hiroshima, Japan*

*4 Department of Radiation Effects Research, National Institute of Radiological Sciences, Quantum Life and Medical Science Directorate, National Institutes for Quantum Science and Technology, Chiba, Japan*

*Keywords:* radiocesium-bearing insoluble particle, the effect of local radiation exposure, physicochemical property analysis, Monte Carlo simulation, dose evaluation, pathological analysis

## **Abstract**

Radiocesium-bearing insoluble particles (CsMP) were released into the environment after the accident of Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. Many points remain to be elucidated regarding the characteristics of the particles and the scientific evidences regarding biological effects are particularly insufficient. In this research project, we promote interdisciplinary joint research that crosses research fields and integrates fieldwork and benchwork, and accumulates the evidences of biological effects based on property analysis of the particle and dose evaluation, resulting in the contribution to risk estimation for exposure to CsMP.

We picked out CsMPs from the soil sampled in Fukushima and analyzed the property of the particle or used for the biological analysis. We found that the type B particles contained Sr-90 and Pu-139+140 and that the ratio of those radioactivity to Cs-137 in a CsMP was extremely low, such as  $10^{-5} - 10^{-4}$  and  $10^{-8} - 10^{-7}$ , respectively. In order to evaluate the distribution of local dose around a CsMP, we created the geometrical models in the PHITS Monte Carlo simulation code to reproduce the *in vitro* or *in vivo* experiment, calculated the dose-rate and evaluated the local dose of the cell or entire lung. Using the dose evaluation, we discussed the relevance with biological changes shown in the experiments *in vitro* or *in vivo*. Microarray analysis of the cells, which were exposed to a CsMP and located within 0.5 cm from a CsMP, revealed that 1.5 % in the genes we analyzed showed 1.5-fold or more expression fluctuation. We also found that radiation and silica particle independently stimulates those fluctuation, resulting in the activation of specific biological pathway. We also analyzed tumorigenic effects of insoluble radioactive particle using high sensitive animal model of lung cancer. We artificially prepared the simulated radioactive silica particles which contained low level of Cs-137 and the A/J mice were subjected to intratracheal instillations of the simulated particles. Our data using high sensitive animal model suggested that internal exposure from simulated radioactive particles has a potential risk of tumorigenesis in the lung. In this study, we established a model of the multidisciplinary collaborative group for the analysis of CsMP and its health impact.