

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 「不溶性セシウム粒子の体内分布と病理解析」
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	鈴木 正敏	東北大学災害科学国際研究所・講師
分担研究者	山田 裕	国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 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	遠藤 暁	広島大学大学院先進理工系科学研究科・教授
研究協力者	小嶋 光明	大分県立看護科学大学看護学部人間科学講座 環境保健学研究室・准教授
研究協力者*	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

研究要旨	実験動物を用いた頸部切開術による放射性および非放射性不溶性粒子の気管内投与方法を確立した。不溶性粒子を投与した動物の肺の免疫組織染色による解析において、炎症性マクロファージの滲出と集簇像が観察され、炎症反応マーカーの一つとして利用できることがわかった。イニシエート薬剤 NNK を用いた中期発がん性試験では、放射性 (Cs-137) 不溶性粒子の気管内投与により腫瘍結節数が増加し、病理組織学的検索により肺胞上皮の過形成及び気管/肺胞上皮の腺腫と診断された。以上より放射性不溶性粒子の内部被ばくにより、肺における腫瘍発現が増強されることが示された。
キーワード	動物実験、気管内投与、病理診断

I 研究目的

東京電力福島第一原子力発電所事故（東電福島原発事故）では、不溶性放射性セシウム粒子が放出されていたことがわかった。このような粒子は、これまでの事故では見つかっていない形態であり、大きさは1～500ミクロン程度であり、ガラス成分に放射性セシウムが含まれている。水に溶けないため、環境中に長期間残留するとともに、吸入摂取すると呼吸気道内、特に肺内に長期間沈着し（表1）、そこで放射線を出すことにより近傍の細胞を照射し、急性障害やがんなどの晩発影響を起こすことが懸念される（図1）。

表1 吸入された不溶性粒子の体内動態

	大部分	1%未満
呼吸気道から除去される機序	線毛運動クリアランス	肺胞マクロファージにより貪食され長期間滞留（一部溶解）
呼吸気道から除去された後の挙動	嚥下により消化管に入り糞便排泄	マクロファージごとリンパ節を通じて各組織へ移行し長期間滞留（溶解後の核種は血中に入り排泄）
体内滞留時間	短い	長い

ラット肺胞におけるSP-A陽性TypeII細胞

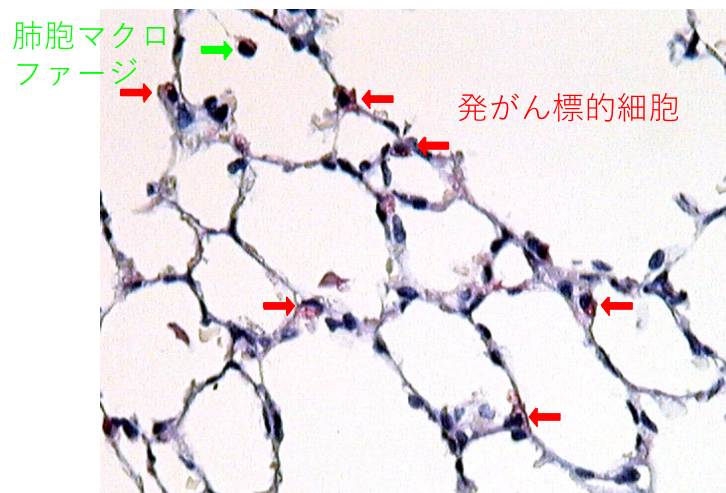


図1 肺胞において粒子を貪食するマクロファージと発がん標的細胞であるII型肺胞上皮細胞

しかしながら、その影響が従来考えられてきた放射性セシウム（可溶性で全身にほぼ均等に分布し、全身被ばくのようなになる）の影響と異なるのか否か、よく分かっていない（図2）。そのリスクを推定するための手段の一つとして、不溶性放射性セシウム粒子の肺における分布、動態、線量評価、および病理組織変化について実験動物を用いて調べるのが有効である。

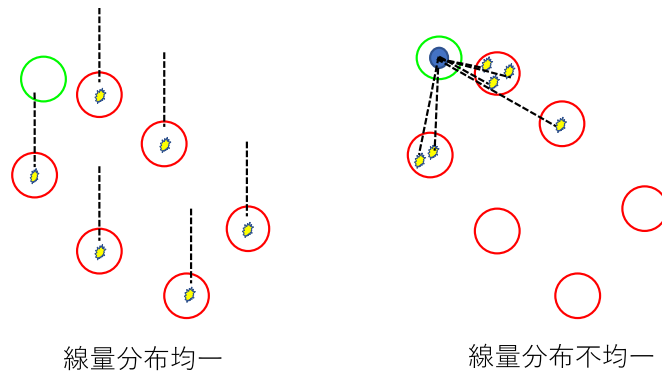


図2 不溶性放射性粒子がマクロファージに貪食されたときの線量分布の不均一性

本研究では、不溶性放射性セシウム粒子の呼吸気道内の動態、肺局所における線量、吸入被ばくによる生体反応と晩発影響についての知見を得ることで、東電福島原発事故で環境中に放出された放射性微粒子を吸入摂取したヒトにおける健康影響の解明に資する情報を提供することを目的として、人工的に作成された不溶性放射性セシウム粒子を動物実験の呼吸気道内に投与し、呼吸気道内での分布と動態を調べ、肺における内部被ばく線量を評価するとともに、投与による生物影響を病理組織学的方法により解析する。

令和元年度は、不溶性粒子の実験動物気管内投与方法と、病理組織標本作製方法を確立すること、令和2年度は、実験動物に非活性の不溶性粒子を気管内投与し、肺組織の病変とその粒子濃度依存性について調べるために、肺の組織標本作製して病理診断を行い、病変に関わる肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージの免疫組織染色方法を検討した。最終年度である令和3年度は、放射性不溶性粒子を動物に投与し、肺における代謝を経時的に測定することにより内部被ばく線量を求め、発がん性についても調べた。

II 研究方法

1. 令和元年度：不溶性粒子投与方法の確立

実験動物の気管内投与実験は、Driscollら¹⁾の方法を参考に実施した。7週齢の雌 Wistar ラットを導入し、コントロール群 (4 匹)、不溶性非放射性シリカ粒子投与群 (0.5、1、2、3 mg/匹、各群 3 匹) に分ける (粒子は研究協力者より提供)。1 週間順化後 (8 週齢、体重 150~200 g) 三種混合麻酔薬を腹腔内注射投与する。(投与方法：メドトミジン 0.15 mg/0.15 ml/kg 体重 (bw)、ミダゾラム 2 mg/0.5 ml/kg bw、ブトルファノール 2.5 mg/0.5 ml/kg bw、生理食塩水 1.45 ml/kg bw を混合して調製する。最終調製液量として 2.5 ml/kg bw を投与する。麻酔時間約 60 分) 不溶性粒子の投与用量は 2.5、5.0、10.0、15.0 mg/kg bw、投与液中濃度は 2.5~15 mg/ml、投与液量は 1.0 ml/kg 体重とした。

ラットを保定板に仰臥位に固定し、頸部を剃毛後、皮膚を正中切開して気管を露出した。生理食塩水に懸濁した不溶性粒子を高圧蒸気滅菌した後、1 ml シリンジに取り、気管内投与器具を取り付けて気管内に投与した (図 3)。コントロール群は生理食塩水のみを投与した。皮膚をクリップで縫合し、頸部皮膚に消毒薬 (イソジン) を塗布した。

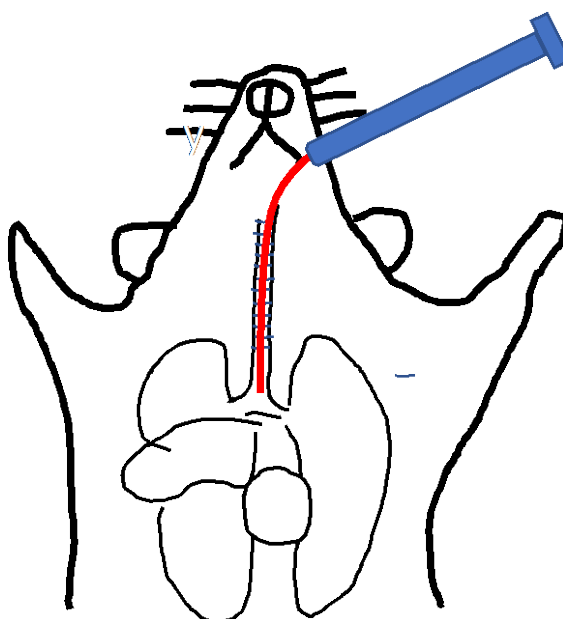


図3 気管内投与法

肺の病理組織解析では、実験動物への気管内投与7日後、4%イソフルラン麻酔下において両腋窩動静脈切開により放血した。気管を露出してカニューレを挿入し、10 ml シリンジで10%ホルマリン固定液2~3 mlを肺内に注入した。その後、開胸して気管および肺を採取し、10%ホルマリン固定液に浸漬した。

一日後、70%エタノール固定液に置換し、全肺葉（左葉、右前葉、右中葉、右後葉、中間葉）について、主要な気管支を含む面で切り出しを行った（図4）。常法によりパラフィン包埋後、3~5ミクロン厚で薄切し、組織切片標本を作製して、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色をし、顕微鏡下で肺の病理組織像を観察して各群で比較した。

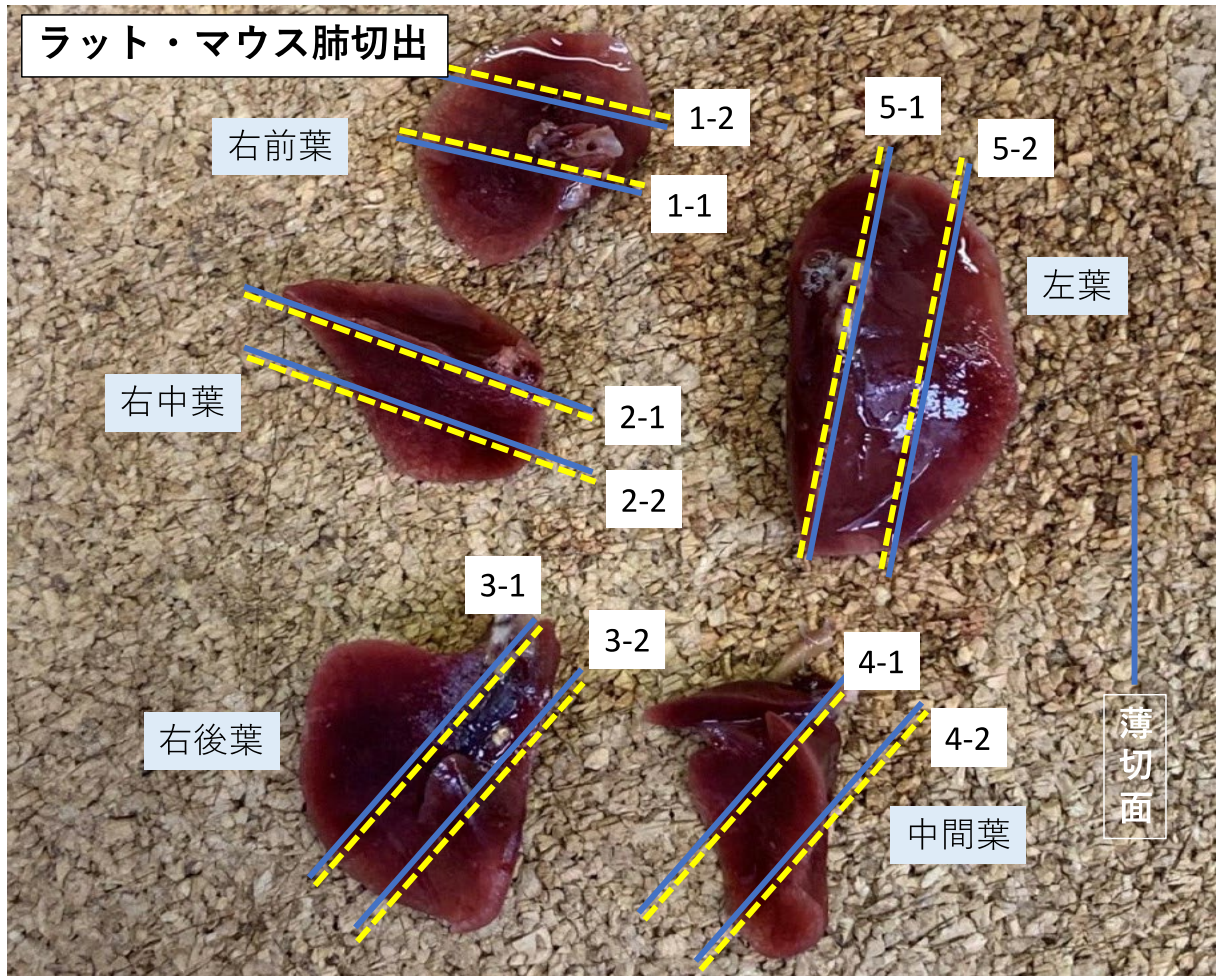


図4 肺の切り出し方法

2. 令和2年度：肺の組織標本の免疫組織染色

コロナ禍により動物実験を行うことが出来ず、非活性の不溶性粒子（0、2.5、5.0、10.0、15.0 mg/kg bw）を気管内投与した投与7日目の肺の組織標本の免疫組織染色方法を検討した。各パラフィンブロック標本よりHE染色標本および免疫染色標本（SFTPC、CD11b およびCD68）を作製した（表2）。顕微鏡下で肺の組織像を観察し、各染色群で比較した。

表2 抗体と陽性細胞

抗体	細胞
SFTPC	II型肺胞上皮細胞で陽性
CD68	肺胞マクロファージで高発現 単球、血中好中球、および組織マクロファージで陽性
CD11b	炎症性樹状細胞、単球、NK細胞、顆粒球、好中球で陽性

3.令和 3 年度：放射性不溶性粒子による発がん影響の検討（外部被ばくと内部被ばくによる発がんリスク）

肺発がんのリスク分析に用いるモデル動物として有用な A/J マウスとイニシエート薬剤として 4-(methylnitrosamino)-1-(3pyridyl)-1-butanone (NNK) を用いて中期発がん性試験をおこなった^{2,3)}。本試験は、従来の発がん性試験と比較し短期間（16 週間）で実施できる。

1) 投与粒子及びイニシエート薬剤

非放射性および放射性 (Cs-137) 投与粒子は研究協力者より提供されたものを用い、先に実施した実験の結果を参照して、最終的な投与濃度が代謝実験では 0.25 mg/0.25 MBq/kg bw、発がん実験では 2.5 mg/2.5 MBq/kg bw になるように滅菌済生理食塩水で希釈して調整した。イニシエート薬剤 NNK は、エタノール液で 200 mg/ml になるよう溶解後、滅菌済生理食塩水で 4 mg/ml に希釈し、100 mg/kg bw の用量で一週間おきに 2 回、腹腔内投与した。

2) 放射性物質の代謝の解析と内部被ばく線量評価

肺発がん実験にあわせて A/J マウスに NNK を投与し、放射性粒子を気管内投与後、1、7、21、52、80 日後、各群 2 匹を麻酔下で解剖して肺を摘出し重量を測定した。臓器をチューブに入れてガンマスペクトロメータで肺に存在している放射活性を測定し、残存曲線と臓器重量から内部被ばく線量を算出した。

3) 病理組織解析と放射線の影響評価

雌 A/J JmsSlc を 5 週齢で入荷し、Control (I) 群と NNK によりイニシエートする (II、III、IV、V) 群に分け、非放射性不溶性粒子気管内投与 (IV) 群、放射性不溶性粒子 (Cs-137) 気管内投与 (V) 群、外部照射 (X 線) (III) 群とし、外部照射 (X 線) 群 (III) については、更に 0.1 Gy および 1.0 Gy 照射群に分けた (図 5)。7 週齢で 1 回目の NNK を投与し、1 週間後に 2 回目の NNK を投与、3 週間後にそれぞれの群に上記の処置を施した。NNK 投与時と処置時 (3 週間後)、およびその後 2 週間おきに体重を測定した。16 週間後に麻酔下で解剖して肺を摘出し、ホルマリン及びエタノールで固定後、実体顕微鏡下で肺表面の腫瘍数をカウントし、腫瘍の直径をノギスにより計測した。HE 染色組織標本を作製し、顕微鏡下で肺腫瘍の病理組織診断を行った。

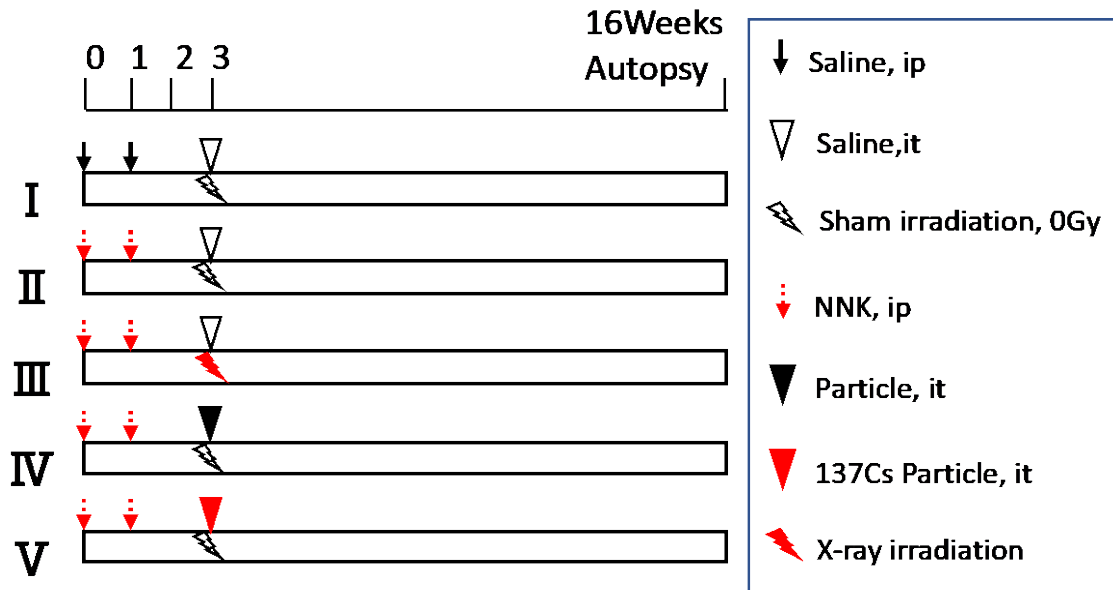


図5 発がん実験プロトコール

4) 統計解析

体重、腫瘍数、および腫瘍直径については、各群間の比較において、等分散の場合は t 検定を、不等分散の場合は *Aspin-Welch* の t-検定を行った。病理組織学的検索については、*Fisher* の直接確率検定を行った。危険率はいずれも 5%とした。

(倫理面への配慮)

動物実験については、量子科学技術研究開発機構内の「動物実験委員会」において実験内容の妥当性が審議され、理事長の承認を受けた上で遂行されている。

III 研究結果

1. 令和元年度：不溶性粒子投与方法の確立

雌Wistar ラットに対し、今回使用した3種混合麻酔薬（メドトミジン、ミダゾラム、ブトルファノール）の量では、1匹当たりの手術時間（15～20分間）において十分な筋弛緩と昏睡が得られた。今回採用した、皮膚を正中切開して気管を露出する方法では、投与すべき全量を正確に気管支分岐部に投与することができた。動物の容体も変化なく、数時間後に全匹覚醒して、感染症を発症することなく正常に飼育を継続することができた。

各動物の肺全葉からの組織切片標本を観察したところ、いずれの投与群においても、気管支、細気管支、肺胞内腔表面にほとんど不溶性粒子は認められなかった。ただし、最も高用量群（15 mg/kg bw）においては、不溶性粒子を貪食した肺胞マクロファージがわずかに観察された。

組織像としては、好中球の浸潤等の炎症性反応は認められず、肺胞I型やII型上皮細胞の変化も無かった。出血、気腫、炎症、線維化、増殖像、細胞分裂像いずれもコントロールと同じであった。また、肺間質の線維化、肉芽腫形成も認められなかった。

以上より、不溶性粒子の実験動物への気管内投与方法と肺の病理組織像観察のための方法を

確立することができた。肺内の不溶性粒子における炎症像については、HE染色ではよく判別できず、次年度に炎症性マクロファージを認識する抗体を用いた免疫組織染色を行って更に詳しく調べることにした。

2. 令和2年度：肺の組織標本の免疫組織染色

不溶性粒子の投与後7日目において、HE染色による病理診断では、非投与コントロール群および低用量（2.5 mg/kg bw）では組織反応が見られないが（図6A）、それ以上の用量の投与群では、肺胞内のマクロファージの浸潤、増加が観察され、肺胞マクロファージの集簇が出現した（図6B、矢印）。

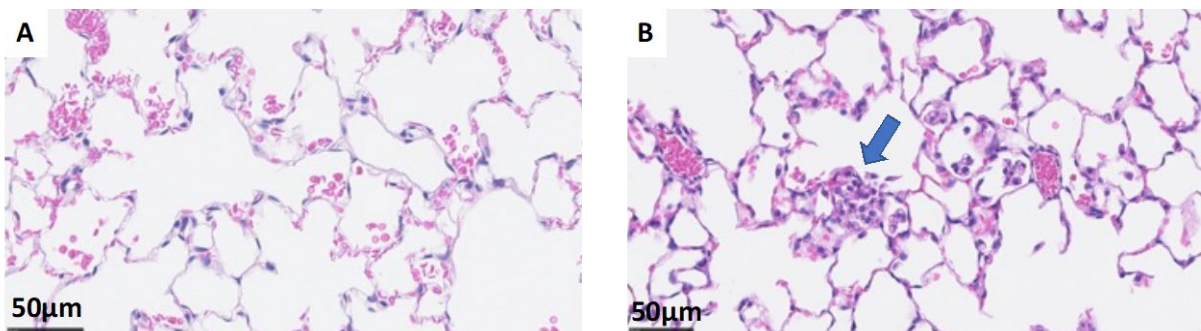


図6 肺胞部位の組織像（HE染色、A:非投与コントロール、B: 15.0 mg/kg bw投与）

炎症性マクロファージの免疫組織染色（図7A、B）では、非投与コントロール群では炎症性マクロファージがわずかに見られるだけだが（図7B）、粒子を投与（10.0 mg/kg bw）すると炎症性マクロファージが滲出し（図8A）、高用量（15.0 mg/kg bw）では、粒子を取り込んだ肺胞マクロファージの周囲に集簇を形成した（図8B、矢印）。一方、常在性マクロファージの免疫組織染色では、投与量に関わらずその数は一定であった（図省略）。

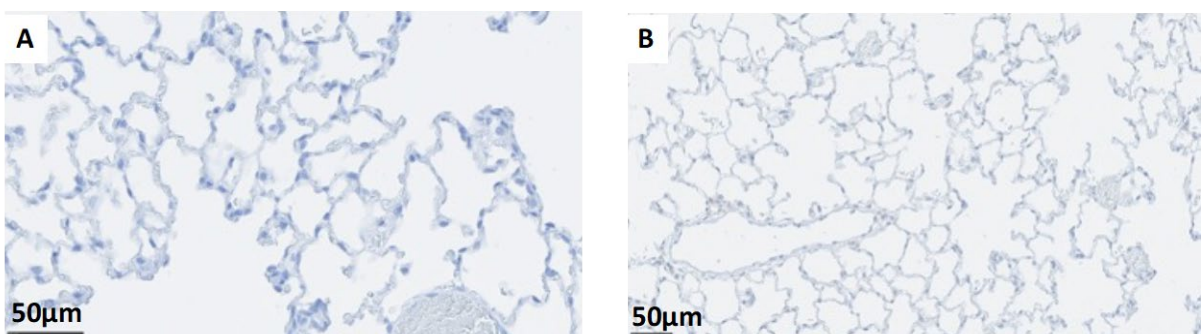


図7 肺胞部位の組織像（CD11b染色、A:染色陰性コントロール、B: 非投与コントロール）

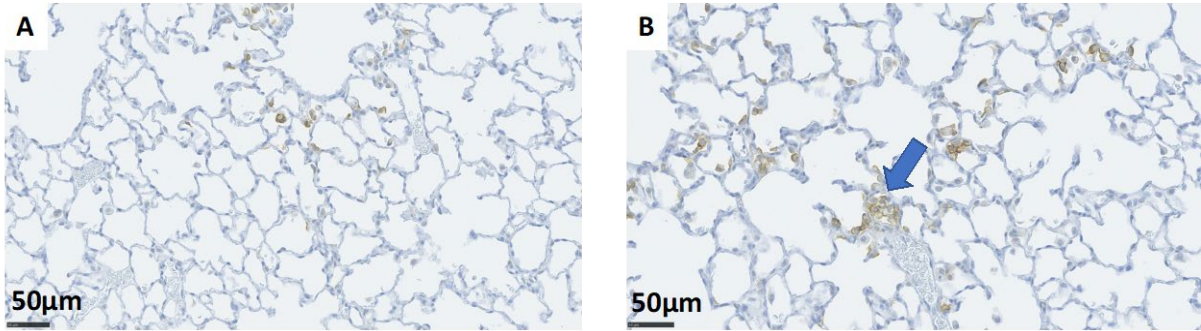


図8 肺胞部位の組織像（CD11b染色、A: 10.0 mg/kg bw投与、B: 15.0 mg/kg bw投与）

肺腫瘍（腺腫、腺癌）の標的細胞である肺胞II型上皮細胞の数は、非投与コントロールでも投与群でも大きな違いは見られなかった（図9A、B）。

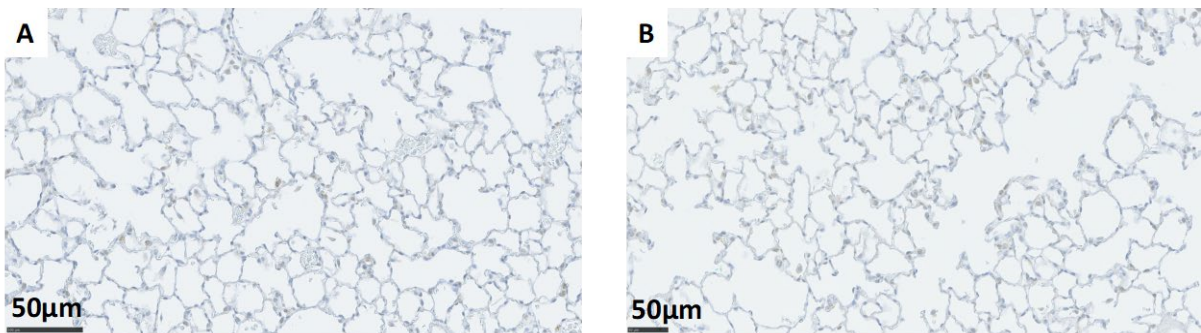


図9 肺胞部位の組織像（SFTPC染色、A:非投与コントロール、B: 10.0 mg/kg bw投与）

以上の所見を表3にまとめた。不溶性シリカ粒子は肺胞マクロファージに貪食され、集簇を形成することが、炎症性反応を調べる免疫染色により裏付けられた。

表3 不溶性粒子投与肺の組織変化まとめ

投与粒子量 (mg/kg bw)	肺胞 MΦ 集簇像	炎症性 MΦ (CD 11b)	常在性 MΦ (CD 68)	肺胞 II 型細胞 (SFTPC)
0	—	+	+	+
2.5	—	+	+	+
5.0	+	++	+	+
10.0	+	++	+	+
15.0	++	+++	+	+

3. 令和3年度：放射性不溶性粒子による発がん影響の検討

1) 放射性物質の代謝の解析と内部被ばく線量評価

今回の代謝実験では、放射性不溶性粒子の投与後1日でCs-137投与量の3～4割が肺5葉中に

残留し、投与7日目には残留量は急激に減少して投与量の3～4%が肺に残留した。その後、初期排泄に比べてゆるやかな傾きとなり、二相性の曲線を描くことが分かった。肺における残留量を肺線量率（ $\mu\text{Gy}/\text{日}$ ）に換算し、投与後日数ごとにプロットしたグラフを示す（図10）。このグラフよりCs-137を含む不溶性粒子投与後80日目までの内部被ばく線量を計算したところ5.88 mGyとなることがわかった。発がん実験ではその10倍量を投与しているので、約60 mGyとなると推定された。

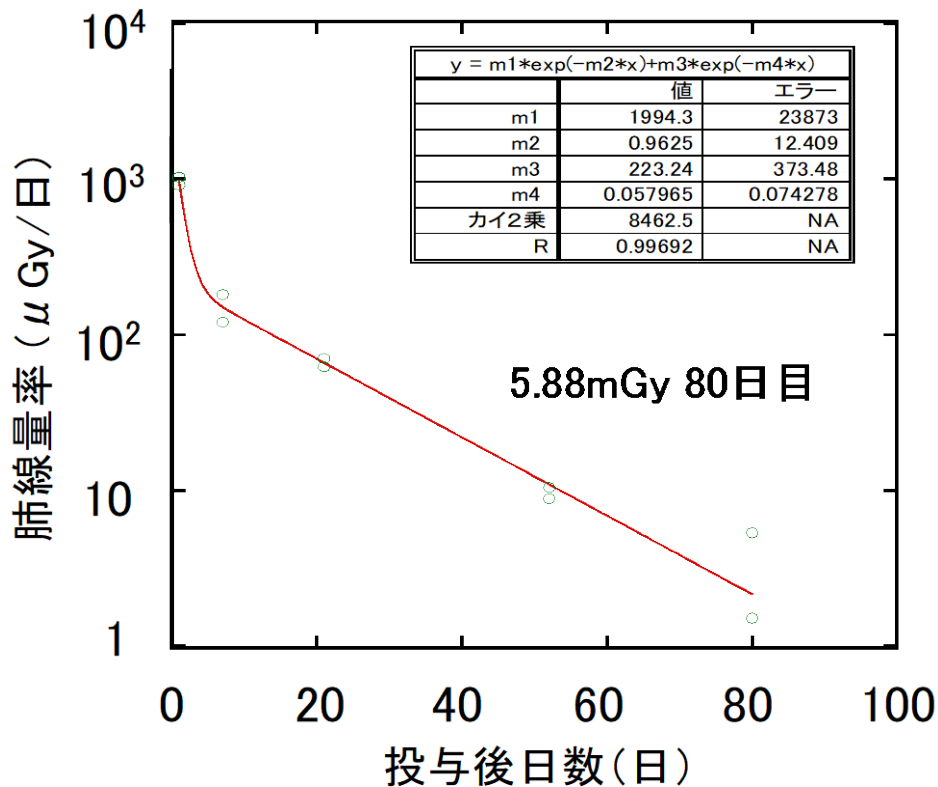


図10 肺における内部被ばく線量率の変化

2) 病理組織解析と放射線の影響評価

1回目のNNK投与時を0週として15週までの体重の変化を表4と図11に示した。NNKを投与するとControl群に比べて有意な体重の減少が認められたが、5週以降徐々に回復した。しかしながら非放射性不溶性粒子気管内投与（NNK+P）群、および放射性不溶性粒子（Cs-137）気管内投与（NNK+RP）群では、15週目までも有意な体重の減少がみられた。また、理由は不明だが、0.1 Gyの外部照射（X線）群（NNK+IR 0.1 Gy）については、11週以降にNNKのみの（NNK）群に比べて体重が有意に増加し、Control群とほぼ同じになった。その他、一般症状においては、外部照射、気管内投与時の麻酔、および投与の影響はみられなかった。

表4 体重変化

Weeks	0	1	3	5	7	9	11	13	15
Control	19.0±1.2	19.8±1.6	21.3±1.8	21.3±1.8	21.9±1.9	22.1±1.9	22.8±2.1	22.9±2.0	23.5±2.4
NNK	19.0±0.9	15.8±1.2	17.7±2.5	19.7±0.8	20.3±0.8	21.2±1.1	21.6±1.0	21.5±1.1	21.9±0.9
NNK+IR 0.1Gy	19.5±1.2	16.9±1.8	18.9±1.7	20.0±1.7	21.1±1.3	22.2±1.7	23.2±1.8	23.1±1.7	23.6±2.1
NNK+IR 1Gy	18.5±1.3	16.1±0.8	17.8±1.1	18.4±1.0	19.7±1.1	20.7±1.2	21.1±1.0	20.7±1.1	21.2±1.1
NNK+P	18.7±0.8	15.5±1.0	18.1±0.8	19.1±0.6	18.6±1.2	19.9±1.1	20.5±1.2	20.4±1.4	20.8±1.5
NNK+RP	19.1±1.0	15.6±1.2	19.0±1.1	18.4±2.0	19.2±1.5	20.7±1.1	21.3±1.4	21.0±1.5	21.5±1.4

NNK投与後の各週齢における体重 (g) を示す。スチューデントのt検定において、Control群に対する各群の検定で有意差が認められた値を赤字、NNK群に対するNNK+IR 0.1Gy群の検定で有意差が認められた値を青字で示した (p>0.05)。

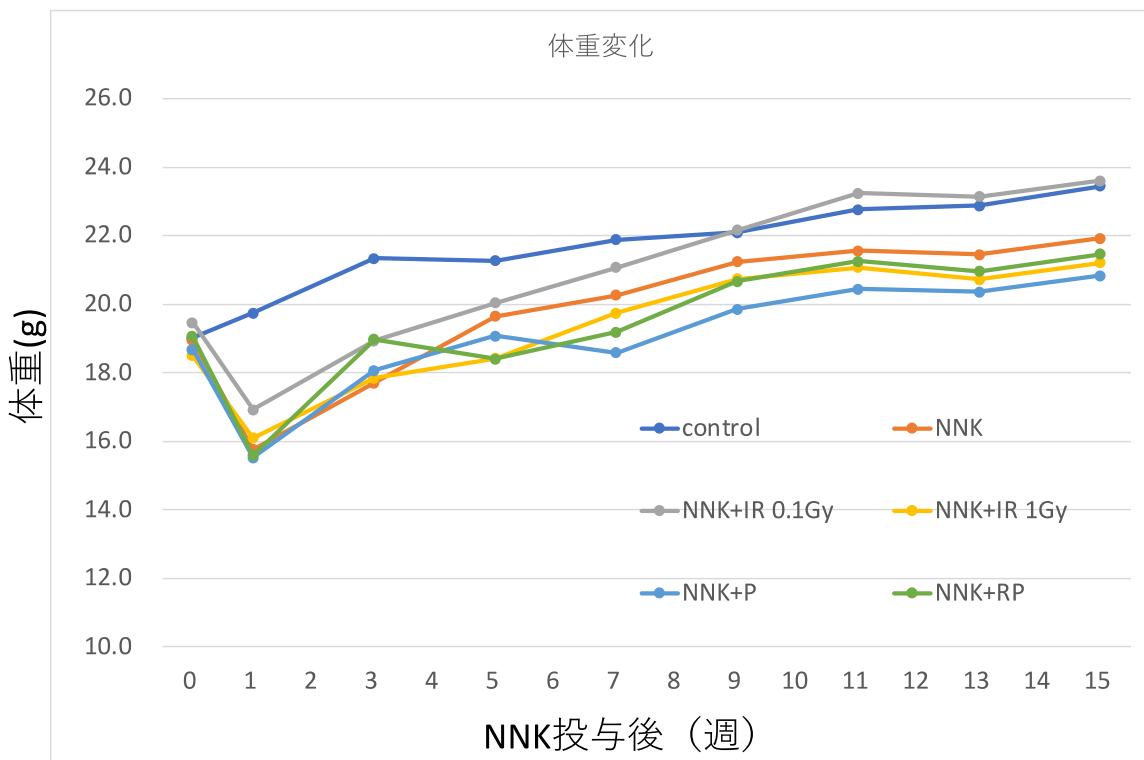


図11 体重変化

解剖により摘出した肺をホルマリン次いでエタノールで固定し、拡大鏡により観察したところ、NNKを投与した全ての群の肺において乳白色の腫瘍結節が認められた (図12)。一方、Control群では腫瘍結節は全く認められなかった。マウス一匹あたりの平均腫瘍数で比較すると、NNK群で10.4±2.5個/匹であり、他の処置群において増加する傾向が観察され、特に放射性粒子を投与したNNK+RP群では20.9±2.8個/匹となり有意に増加した。また、NNK+RP群は、非放射性粒子投与のNNK+R群の値12.6±1.7個/匹に対しても有意に増加した (表5、図13)。なお、平均腫瘍直径の比較では、各群の間に統計的な有意差は認められなかった (表5)。



図12 エタノール固定肺の腫瘍結節（NNK+IR 1Gy群）

表5 肺腫瘍数および腫瘍直径

	NNK	NNK+IR 0.1Gy	NNK+IR 1Gy	NNK+P	NNK+RP
動物数（匹）	8	5	5	10	9
腫瘍総数（個）	83	83	78	126	188
平均腫瘍数（個/匹）	10.4 ± 2.5	16.6 ± 2.0	15.6 ± 2.8	12.6 ± 1.7	20.9 ± 2.8
平均腫瘍直径(mm)	1.21 ± 0.02	1.16 ± 0.04	1.16 ± 0.02	1.13 ± 0.03	1.13 ± 0.03

スチューデントのt検定において、NNK+RP群の平均腫瘍数は、NNK群に対してp値が0.01、NNK+P群に対してp値が0.02で、いずれも有意差あり。その他の組み合わせでは有意差無し（ $p > 0.05$ ）。

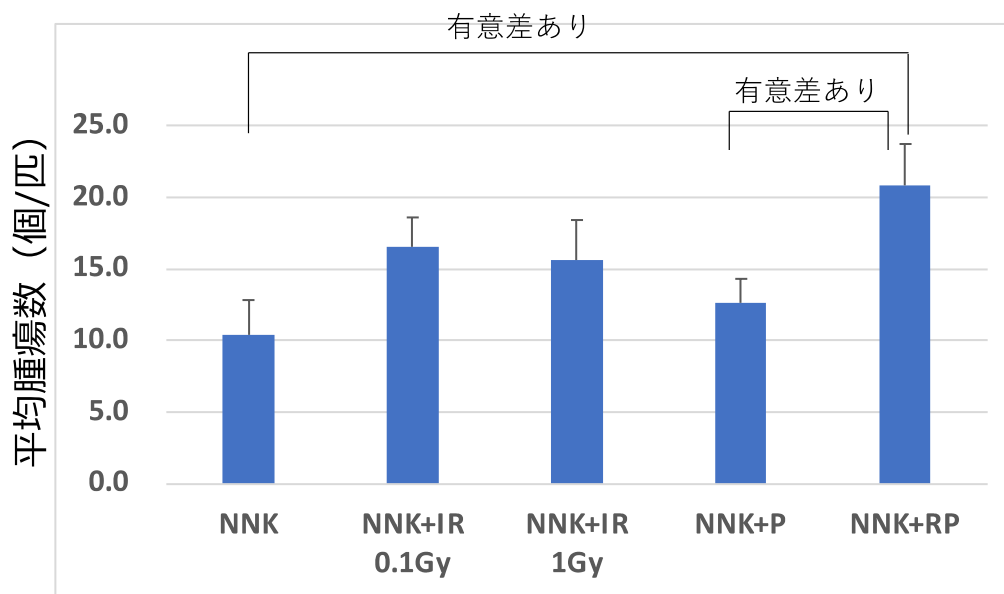


図13 肺平均腫瘍数

顕微鏡による組織の観察結果を図14、図15に示す。NNK処置したいずれの群でも複数の腫瘍病変が肺の組織に存在し（図14）、肺胞上皮の過形成（図15A）及び気管/肺胞上皮腺腫（図15B）が多数認められたが、腺癌については今回の実験では一例も認められなかった。肺病変全体における気管/肺胞上皮腺腫の割合は、NNK群で77.1%であり、外部照射NNK+IR 0.1 Gy群およびNNK+IR 1 Gy群では、それぞれ71.4%および71.1%となり低くなる傾向が認められ、一方、NNK+RP群では81.2%と高くなる傾向が認められた（表6）。しかしながら、それぞれの群の間に統計的に有意な差は認められず、またHE染色において病理組織学的な違いも認められなかった。

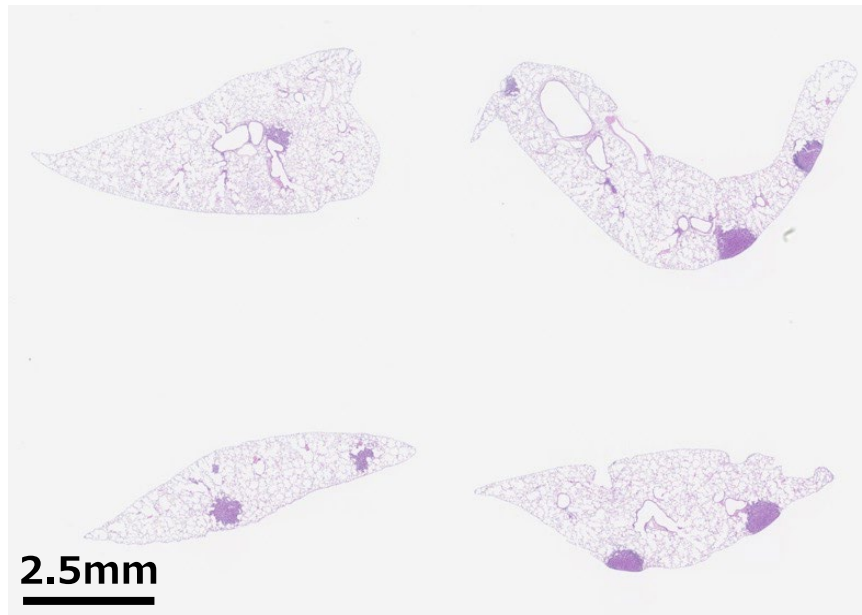


図14 肺病変の組織像 (NNK+IR 0.1 Gy群)

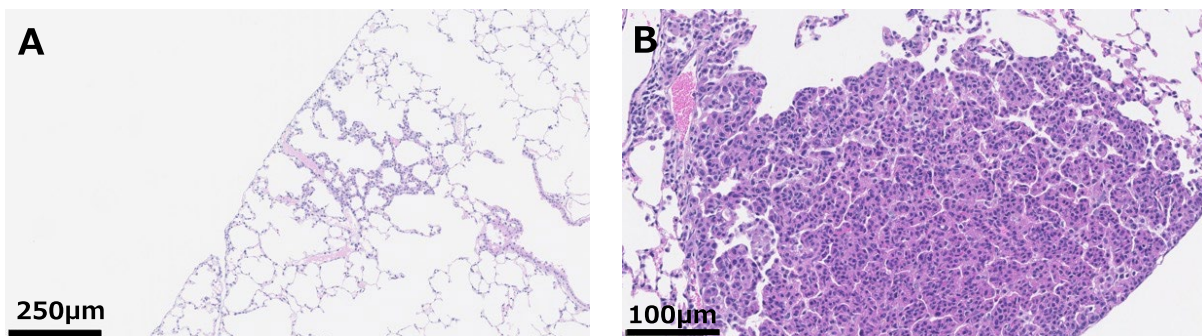


図15 肺病変の組織像 A肺胞上皮の過形成 (NNK+P群) B肺胞上皮腺腫 (NNK+IR 0.1 Gy群)

表6 肺病変の病理解析結果

	NNK	NNK+IR 0.1Gy	NNK+IR 1Gy	NNK+P	NNK+RP
過形成(HP)数(個)	19	16	11	16	16
腺腫(AD)数(個)	64	40	27	49	69
腺癌(AC)数(個)	0	0	0	0	0
過形成(HP)(%)	22.9	28.6	28.9	24.6	18.8
腺腫(AD)(%)	77.1	71.4	71.1	75.4	81.2
腺癌(AC)(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Fisher's exact test (イエーツの補正適用)において、いずれの群間でも有意差無し (p>0.05)。

IV 考察

今回A/Jマウスを用いて、NNKによりイニシエートした中期発がん性試験を実施し、放射線外部被ばくと放射性 (Cs-137) 不溶性粒子の気管内投与による内部被ばくの肺における発がん性について調べた。肺の肉眼観察では、NNKを投与した群に複数の腫瘍結節が認められ、腫瘍結節の個体当たりの腫瘍結節数は、いずれの処置群 (NNK+IR 0.1 Gy、NNK+IR 1 Gy、NNK+P、NNK+RP) でも増加する傾向が観察され、特にNNK+RP群においては、NNK群およびNNK+P群に対して統計学的に有意な差がみられた。また、病理組織学的検索により肺胞上皮の過形成及び気管/肺胞上皮の腺腫と診断された。以上より放射性不溶性粒子併用投与による腫瘍発現の増強作用が認められた。

放射性不溶性粒子の吸入内部被ばくによる肺における発がん性については、アルファ核種である酸化プルトニウムやネプツニウム粒子を吸入投与した多くの動物実験により報告されている⁴⁾。放射性セシウムを含む不溶性粒子の吸入被ばくによっても、同様に肺内において細胞が放射線被ばくし、発がん影響がある事は十分予想される。しかしながら放射性セシウムを含む不溶性粒子の肺の内部被ばく動物実験についてはこれまでに行われておらず、その影響については不明である。

今回の動物実験は、放射性セシウムを含む不溶性粒子を気管内投与し、肺における内部被ばく線量評価と発がん影響を調べることができるもので、その発がん性を認めた最初の報告である。本実験系は、放射線被ばくによる肺がん誘発を高感度に検出できる系であり、Millerら²⁾の報告では40 mGyの外部照射で腫瘍数が増加することを示している。今回の発がん実験における内部被ばく線量は約60 mGyと推定され、また0.1 Gyの外部照射でも腫瘍数の増加する傾向が認められておりMillerら²⁾の報告とほぼ一致する。今後、放射性粒子の投与量を変えることにより、発がん効果の線量依存性を求め、リスク推定に資する情報を得ることが必要である。

また、本実験系では、放射性粒子による内部被ばくと外部照射による被ばく影響を比較し、異なる点を明らかにすることが可能である。不溶性粒子内部被ばくが外部被ばくと異なる点として考えられることの一つは、線量の不均一分布による影響であり、ベータ核種の内部被ばくでは粒子状線源近傍の細胞レベルで見ると臓器の平均線量よりも高くなる。つまり、臓器全体での平均線量が同じであれば、一部の発がんの標的細胞における内部被ばく線量は臓器の平均線量よりも高くなり、結果として影響が高く出ることが考えられる。今回の実験では約60 mGyと推定された内部被ばく影響が、0.1 Gy (100 mGy) の外部被ばくよりも若干高く出ており、この線量不均一性による可能性も考えられるが、更に詳しい検討が必要である。今後、放射性粒子による内部被

ばくにおける発がん標的細胞レベルでの線量評価を行い、外部被ばくの線量及び発がん影響と比較することにより、より詳しい情報が得られると考えられる。

粒子による内部被ばくと外部被ばくの異なるもう一つの点として、粒子そのものによる生体影響が、放射線による影響を修飾する可能性があるということである。そのような生体影響の一つとして炎症反応の関与が考えられる。一般に炎症反応においては細胞増殖に関する因子（サイトカイン等）が関与することが知られており、放射線の照射により腫瘍化に進む細胞の増殖とがん化の促進に働く可能性が考えられる。実際に昨年度の研究では、非放射性粒子の気管内投与により、肺においてCD11b陽性の炎症性マクロファージの滲出が認められた。また、甲状腺がんを発症するBraf遺伝子改変マウスにおいて、腫瘍組織中に腫瘍に付随したマクロファージ（Tumor associated macrophage）が混在していることがわかっており、それらが腫瘍の形成・進展に促進的に関与していることが示されている⁵⁾。外部被ばくでも高線量になれば炎症反応は生じるが、粒子状物質による肺のマクロファージが関与する炎症は内部被ばくのみである。今後、粒子による炎症の用量依存性（効果が現れるしきい値）、炎症に関わる因子（メカニズム）、抗炎症薬（抗酸化作用に加え炎症性サイトカインの発現を抑制することで抗炎症作用を示すことが報告されているN-アセチルシステイン（NAC）等による予防効果に関する研究が必要である。

疫学研究における原爆被ばく者のデータにおいて、外部被ばくで肺がんリスクが上昇し、肺は放射線感受性が高い臓器の一つであることが示されている⁶⁾。この肺における放射線発がん喫煙には相互作用が認められており、タバコにより肺がんリスクが更に上昇することが知られている⁷⁾。今回の実験でもコントロールでは16週目まで発がんが見られないのに対し、NNK（タバコの発がん成分の一つ）の投与で肺腫瘍が生じ、0.1 Gyよりも低い線量でも放射線被ばくで肺腫瘍の発生が増加した。このことは放射性粒子吸入摂取による発がんリスクがタバコにより増強されること、つまり内部被ばくでも同様な相互作用がある可能性を示す。

また、一般に固形がんは若齢での被ばくの方がリスクが高いが、肺がんの場合は年齢の増加と共に放射線による肺がんリスクが上昇し、肺がんの被ばく時年齢依存性が他の固形がんに比べて逆になっている⁸⁾。同様な被ばく時年齢依存性は胸部X線照射をしたラットの肺腫瘍でもみられている⁹⁾。しかしながら粒子状物質による内部被ばくのとくに、被ばく時年齢依存性が存在するかは不明である。動物実験で内部被ばくにも被ばく時年齢依存性があるのかどうか調べる必要があり、今回用いた動物発がんモデルを利用することができるだろう。

V 結論

実験動物を用いた頸部切開術による放射性および非放射性不溶性粒子の気管内投与方法を確立した。不溶性粒子を投与した動物の肺の免疫組織染色による解析において、炎症性マクロファージの滲出と集簇像が観察され、炎症反応マーカーの一つとして利用できることがわかった。NNKによりイニシエートした中期発がん性試験では、放射性（Cs-137）不溶性粒子の気管内投与により腫瘍結節数が増加し、病理組織学的検索により肺胞上皮の過形成及び気管/肺胞上皮の腺腫と診断された。以上より放射性不溶性粒子の内部被ばくにより、肺における腫瘍発現が増強されることが示された。

この研究に関する現在までの研究状況、業績
無し

引用文献

- 1) Driscoll KE, Costa DL, Hatch G et al. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations, *Toxicol Sci* 2000; 55: 24-35.
- 2) Miller MS, Moore JE, Walb MC et al. Chemoprevention by N-acetylcysteine of low-dose CT-induced murine lung tumorigenesis, *Carcinogenesis* 2013; 34: 319-324.
- 3) Ninomiya F, Yokohira M, Kishi S et al. Gender-dependent effects of gonadectomy on lung carcinogenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in female and male A/J mice, *Oncology Reports* 2013; 30: 2632-2638.
- 4) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Radiation, 2012; volume 100 D: 241-275.
- 5) Ryder M, Gild M, Hohl TM et al. Inhibits tumor-associated macrophages and impairs BRAF-induced thyroid cancer progression, *PLoS ONE* 2013; 8: e54302.
- 6) Cahoon EK, Preston DL, Pierce DA et al. Lung, laryngeal and other respiratory cancer incidence among Japanese atomic bomb survivors: an updated analysis from 1958 through 2009, *Radiat Res* 2017; 187: 538-548.
- 7) Furukawa K, Preston DL, Loenn S et al. Radiation and smoking effects on lung cancer incidence among atomic bomb survivors, *Radiat Res.* 2010; 174: 72-82.
- 8) Preston DL, Ron E, Tokuoka S et al. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998, *Radiat Res* 2007;168: 1-64.
- 9) Yamada Y, Iwata K, Blyth BJ et al. Effect of age at exposure on the incidence of lung and mammary cancer after thoracic X-ray irradiation in Wistar rats, *Radiation Res.* 2017; 187, 210-220.

Tumorigenic effects of intratracheally instilled insoluble radioactive particles in lungs of A/J mice initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)

Yuataka Yamada¹

¹ 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: animal experiment, intratracheal instillation, pathological analysis

Abstract

We examined the effects of intratracheal instillation of insoluble radioactive particles and external irradiation on the pulmonary tumorigenesis of A/J female mice initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). Seven-week-old female mice were divided into six treatment groups and injected intraperitoneally with saline (Control) or NNK (2 mg/mouse), once per week, for 2 weeks. After 2 weeks from the second administration of NNK, the mice were subjected to intratracheal instillations of non-radioactive (NNK+P) or radioactive (Cs^{137}) (NNK+RP) silica particles or irradiated by X-ray (NNK+0.1Gy, NNK+1Gy). After 13 weeks from the NNK treatment, the mice were sacrificed, and the pathological consequences of lung were investigated.

Macroscopic examination revealed tumor nodules in the lungs of NNK-treated groups but not in Control. Histologically, alveolar hyperplasia and alveolar/bronchiolar adenoma appeared in NNK-treated lungs, but adenocarcinoma was not observed. The tumor multiplicity of NNK+P, NNK+RP, NNK+0.1Gy and NNK+1Gy group showed a tendency to increase in comparison with the NNK group. Particularly, the tumor multiplicity of NNK+RP significantly increased for NNK and NNK+P groups. These data suggest that internal exposure from insoluble radioactive particles increases the risk of tumorigenesis in the lungs under the present conditions.