

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	低線量長期被ばくマウスおよび細胞の超高感度変異検出に基づく放射線影響と変異誘発機構の解析
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	権藤 洋一	東海大学医学部分子生命科学領域・客員教授
分担研究者	松本 義久	東京工業大学科学技術創成研究院ゼロカーボンエネルギー研究所・教授
分担研究者	角山 雄一	京都大学環境安全保健機構放射線管理部門・助教

	氏名	所属機関・職名
研究協力者	小村 潤一郎	公益財団法人環境技術研究所生物影響研究部・主任研究員
研究協力者	田中 聡	公益財団法人環境技術研究所生物影響研究部・主任研究員
研究協力者	大野 みずき	九州大学大学院医学研究院基礎放射線医学分野・助教
研究協力者	杉原 崇	環境科学技術研究所生物影響研究部・主任研究員
研究協力者	坂東 昌子	京都大学基礎物理学研究所・共同研究員
研究協力者	土岐 博	大阪大学核物理研究センター・名誉教授
研究協力者	鈴木 和代	京都大学医学研究科・客員研究員
研究協力者	佐藤 健一	滋賀大学データサイエンス教育研究センター・教授

研究要旨	低線量放射線長期被ばく影響をモデル系で評価しヒトへ橋渡しへ行き、科学的議論推進に向けデータから結果まで公開する。権藤班では、生涯継世代被ばく G4 世代マウス群を交配産出し、全ゲノム解読データを得た。松本班では、ヒトへの橋渡し実験データを培養細胞系で確立する。ヒト正常線維芽細胞の低線量放射線誘発変異解析を行い、独自に開発した二段階クローニング法から得た細胞の全ゲノム解読データを得た。角山班では、従来の LNT/LQ モデルに、変異減少項を加えた WAM 数理モデルを用いてモデル系とヒトへの橋渡しを行う。公開ヒト被ばくデータに応用し、有効性を示した。3 班共同で、低線量長期放射線被曝による次世代影響評価の基盤整備ができた。
キーワード	低線量率被ばく、遺伝的影響、次世代リスク評価、ゲノム解析、モデル構築

I 研究目的

【背景】高線量放射線被ばくが変異を誘発し白血病など健康被害が生じる。一方、100mSv 程度では発がんリスクは検出されない。また、世代を越えて低線量長期被ばくした場合のヒトへのリスクについては精度の高い評価法もデータもない。そのため、安全性や防護などの基準設定の議論には4Gy 急照射といった短時間高線量での影響データを、低線量域に外挿して間接的に行なわれている。いわゆる閾値なし線形（Linear Non-Threshold: LNT）モデルを採択しながら、しかし、自然放射線被ばくなども考慮して現実的には、ALARA（As Low As Reasonably Achievable）の原則に基づいて「合理的に達成可能な限り低く」という放射線防護基準が設定勧告されているのが国際的にも現状である¹⁾。

【目的】実験データに基づく科学的議論を可能とするため、原発事故などの残留放射線や航空機/宇宙における被ばくと同程度の低線量率において、マウスをモデルとして長期生涯継代被ばくさせる。変異が誘発されるかどうか、最先端ゲノム解読技術を用いて高速高精度に検出データを得る。これにより、科学的エビデンスに基づくモデルマウスおよび子孫に対する微量放射線の長期被ばくの影響を明らかにする（権藤班）。同時に、ヒトおよびマウス培養細胞系においても同等の低線量率で10細胞分裂以上長期被ばくさせ、被ばく体細胞そのものへの微量放射線被ばくの影響について誘発変異を指標とする実験データを得るとともに、ヒト細胞とマウス細胞への影響および生殖細胞と体細胞への影響の比較を可能とする（松本班）。一連の実験データを用いて、ヒトとマウス、個体と培養細胞、生殖系列細胞と体細胞における低線量長期被ばくの影響を包括的に理解できる数理モデルの検証最適化を、角山班において行ない、高精度なリスク比較と推定に基づくヒトへの橋渡しを検証する。最終的に、応用範囲の広い科学的エビデンスに基づく放射線防護基準などの議論を促進する。

【必要性】福島をはじめとして低線量長期放射線被ばくリスクに対し直接的な科学的エビデンスが国際的に必要となっている。本研究で世代を越えた低線量長期被ばくの直施の実験データを世界で初めて提供する。

【期待される成果】低線量長期被ばくの遺伝的リスク評価や基準規制設定に直接的科学的根拠を初めて提示できる。また、低線量長期被ばくの国際標準データとなるなど大きな波及効果が期待できる。また、シーケンシングによって変異を検出するため、DNA配列変化といった質的比較、いわゆる変異スペクトル解析も可能となり、変異誘発の分子機構解明にも応用展開を試みる（研究協力者大野みずき）。

【環境行政との関連性】ヒトとモデル系の橋渡しも実験、理論モデル化両面から取り組み、ICRP勧告¹⁾における放射線防護基準制定などの環境行政が現在抱えている課題にも科学的データを提供し、ICRP勧告の次回更新のための国際議論に向け、貢献できるデータ及び解析結果を提供する。

II 研究方法

【全体計画】

権藤班: 個体レベルでは、実験不可能なヒトの代替モデルとしてマウスを材料とする。マウスは、遺伝研究に1900年以前から利用され、膨大な遺伝学的知見が蓄積されている。この過程で純系化が試みられ100系統以上の遺伝的背景の明らかな近交系も樹立されている。そのため、ヒト疾患モデルとして1998年以降、大規模マウスミュータジェネシスプロジェクトが日本も含め国際的に

ほぼ 10 年展開された。権藤は理研においてこの計画を主導したひとりである²⁾。マウスゲノムはヒトと同じく 30 億塩基対 DNA 配列 2 セットから構成され、ヒトゲノムプロジェクトに続いて、2002 年に、ほ乳類で二番目に全ゲノム DNA 配列が報告公開された³⁾。このマウスゲノム配列決定に用いた近交系マウスが、本研究でも用いる C57BL/6J である。そのために、ごくわずかに生じる変異でも高精度に検出できる。検出には、21 世紀に入って新たに開発された全ゲノム解読 (Whole Genome Sequencing) 法を用いる。この先端技術を導入したことで、マウスゲノムに毎世代ごくわずかに自然に生じている変異まで高精度に検出でき、実際に検出した自然変異に対し、さらに、低線量放射線を長期継世代被ばくしたマウスにおいてどのくらい増加するか、わずかな違いでも初めて実験検証できる。被ばく量としては、コントロールゼロ線量に加え、0.05mGy/日、1mGy/日、20mGy/日の 4 段階とし、研究協力者小村・田中が環境科学技術研究所の施設において実施する。権藤自身、本研究計画立案をするにあたり、すでに 0.15mGy/日線量率で予備実験を東海大学動物実験施設において先行して進め、通常の急照射で見られるような不妊現象が雌雄ともに見られず、生涯継世代被ばくが実際に可能であることを確認している。

松本班：体細胞レベルでのリスク評価およびヒトとマウスとの比較を行なうため、培養細胞レベルで変異検出を可能とする二段階サブクローニング法を独自に考案したので、まずこの方法を開発確立する。開発に当たっては、マウス個体と同様の線量率で、ヒトやマウスの線維芽細胞株を長期被ばくさせ WGS 法で変異を検出して評価し実施するとともに、変異解析を並行して行う。

角山班：線量率と被ばく時間を変数として含めたリスク評価する数理モデル WAM⁴⁾ をすでに開発し、中線量率から高線量率では様々な生物種で有効に被ばくリスクが推定できることを示した。しかし、これまで低線量長期被ばくの実験データがなく、福島の残留放射線率など長期被ばくした場合への応用有効性が未検証であった。権藤班および松本班から、個体と培養細胞における低線量率長期被ばくデータを数理モデル WAM に提供することで、モデルの一般性・有効性の検証を低線量域に拡充して行う。必要に応じてさらなる最適化も本融合研究で行なう。

この線量率効果と時間軸を加味した WAM モデルの最適化とその適用範囲の実験検証結果が、さらに、権藤班と松本班が実施する低線量長期被ばくの種間および体細胞・生殖細胞間比較に還元され、3 班全体で、培養細胞結果と個体レベル結果の比較検討へも拡張する。最終的に、マウスおよび培養細胞実験結果から、ヒトの安全安心基準基盤構築への橋渡しが実現する。

【R3 年度研究計画】

権藤班：鍵となるマウス個体への低線量放射線長期継世代被ばくは、環境技術研究所先端分子生物学研究センター AMBIC の連続照射室において、福島の主たる残留放射線源でもある ¹³⁷Cs を用いて、線源から等距離にマウスケージを配置し行なう⁵⁾。線量は線源からの放射線を一部遮断することで低減し、0.05mGy/日、その 20 倍の 1mGy/日、さらに 20 倍の 20mGy/日の 3 段階で行ない、別途、まったく放射線に被ばくさせないコントロール家系と、被ばく 3 家系を比較することで誘発変異量を被ばく量および時間の関数として検出解析する。連続照射室では毎日 22 時間連続照射し、2 時間照射を止めその間にケージ交換や交配離乳などの作業を行い、実験者自身が被ばくすることはない。この 0.05mGy/日での長期継世代被ばく実施可能な施設は世界で AMBIC だけ

である。

初年度には、まずブリーダーから C57BL/6Jcl 近交系マウス雌雄 1 匹ずつ AMBIC の放射線被ばくのない通常飼育室に導入し、交配繁殖を開始する。すべてのマウスはこの 2 匹初代 G0 ペアを祖先とするため、遺伝的背景が全てこの 2 匹に由来し、もっとも均一な遺伝的条件下での解析がコントロール群も含め可能となる。マウス交配ではしばしば産仔が得られないことが生じるので、まず、この G0 ペアから産仔をなるべく多く得てバックアップ交配も継代維持していく。バックアップを用意しておくことで、コントロール家系および 3 段階の被ばく家系が途中で絶えてもつねに補完継続できる。初年度は G3 世代までを目処として進め、G0 の 2 匹、最も世代が進んだ産仔ペアを全ゲノム解読 WGS し、変異検出にも着手する。ゲノム DNA は尾の一部からの抽出精製でじゅうぶんなので、尾を一部採材したあともマウスは生きたまま必要に応じて交配繁殖可能である。十分な産仔が得られたあとは、バックアップ個体も含め、すべて全ボディー収納可能なプラスチックチューブに個別に入れ-80°C保管する。

WGS 解析は現在外注するのが最も費用対効果が高く均一な結果が得られるため、イルミナ NovaSEQ を用いたペアエンド 150 塩基対超並列大容量ショートリードを外注で行い、解読データを外付けハードディスクにて受け取る。データのバックアップも兼ね、ハードディスクのコピーをそれぞれ 3 班で持ち必要に応じてどの班でもデータ解析を行なえるようにする。最終的に WGS データは国立遺伝学研究所の DDBJ/DRA に寄託し、世界中だれでも閲覧利用可能なように公開し、本研究における結果を実験面からインフォーマティクス解析に至るまで再検証することができるように整備する。

なお、20mGy/日の長期照射では研究協力者田中、小村ら⁵⁾によって、寿命の短縮や発がんといった様々な身体的影響がすでに被ばく個体からも、また、次世代マウスにおいても検出されており、G5 世代以前に明確なリスクが認められる可能性が高い。リスク評価に十分なデータが得られた場合には 20mGy/日の家系継代はその時点で打ち切り、使用するマウスを最少限に留めるなど動物福祉にも十分配慮する。一方で、0.05mGy/日では発がんや健康異常などほとんど影響が見られず、1mGy/日ではコントロールと微妙な違いが得られている。すなわち、どれだけ長期被ばくさせても 0.05mGy/日では被ばく影響が全く生じない閾値以下の可能性があり、1mGy/日前後に閾値があるという傍証がすでに得られている⁵⁾。本研究ではそれを実験的に明らかにするため、予断は一切持たず、実験ノート、材料、方法、得られた生データ、解析結果すべてを最終的に公開し、科学的エビデンスに基づく議論が可能ないように進めて行く。バイオインフォーマティクス解析や検出変異の実験検証および家系トレースは東海大学にて権藤、木村が担当し、情報インフラは中川が担当する。

松本班：低線量率長期被ばくと WGS 解析を、初年度はヒト培養細胞を用いて開始する。

角山班：権藤班、松本班が得た結果を用いた WAM 数理モデル検証も変異検出に応じて初年度から開始する。

(倫理面への配慮)

ヒト培養細胞も市販化されているものを入手するので、基本的に倫理委員会における研究機関承認の必要なヒト材料などを含む研究は含まないものの、動物実験が含まれるので、研究機関の

動物実験規定や指針に従って、動物実験教育受講、動物実験従事者登録、動物実験研究課題承認など必要な手続きを下記の通り済ませた上で実施している。

東海大学承認

課題名：微量変異原曝露マウスにおける次世代へのリスク評価系の開発解析

動物実験責任者：権藤洋一

承認番号： 224026

環境科学技術研究所承認

課題名：低線量率放射線長期被ばくマウスの超高感度変異検出法に基づく放射線影響と変異誘発機構の解析

動物実験責任者：田中 聡

承認番号： 23

(WGS解読方法について)

まず、全ゲノム解読を実施しうるHiSEQ XやNovaSEQ6000といった機器そのものが6000万円以上する上、保守費用も年間数百万円要する。また、ランニングコストも毎週20を超えるサンプルを解析キットなど消費期限以内に使い切りながらほぼ年間通して使い続けることで現在10万円/サンプル程度の実費に達しているのが現状である。本計画のように年20サンプル程度の利用の場合には費用対効果や品質管理も含め、外注するのがWGS解析を行うにあたりもっとも効率も精度も高いデータが安定して得られるため、常法となっている。外注することで、年間20サンプル前後のWGSデータを予算内で入手できるようになったことが本研究を計画立案できた一番大きな要因である。そのため、計画全体を練り上げて、最大サンプル数を解析できる計画を立てたため、外注費の比率が大きくなっている。

III 研究結果

【権藤班】コントロールおよび0.05mGy/日、1mGy/日、20mGy/日の線量率で、計画通り生涯継世代被ばくを4家系で並行して進めた。まず、G0世代となる雌雄マウス1ペアから同腹産仔メス4匹オス4匹がいつ得られるかが大きな鍵であった。この近交系マウスにおける平均産仔数7匹を考慮するとかなりのG0ペアを用意する必要があった。そこで、定常的に大規模に交配産出しているブリーダー日本クレアと交渉し、生産ラインから条件を満たすペアおよび産仔が得られ次第、親仔をセットとして購入する計画を立案依頼した。その結果、条件を満たすG0雌雄ペアとその同腹産仔G1となる8週齢メス4匹オス4匹を2セット、8月中旬に環境科学技術研究所に導入できた。2週間の馴化ののち、8月末に4家系それぞれ2ペアずつ独立にG1交配とそれぞれの線量率での生涯被ばくを開始した。通常、1ペアのマウス購入からスタートすると、計画通り4ペアの雌雄計8匹が得られたとしてもG0ペア購入から最短で4ヶ月後ようやくG1マウスの交配が可能であり、1産仔あたりの平均産仔数7匹を考慮数するとかなりのG0ペア交配を用意しない限り12月までにG1交配を開始するのは困難と想定していた。しかし、G0ペアおよびG1メス4匹オス4匹を同時に2セット購入入手できたことで、バックアップ交配も含め、本研究計画が計画をすくなくとも2ヶ月早く、しかも同時にG1交配を開始することができた意義は大きい。

前倒してG1交配へと進み、20日後の9月15日から次々と産仔が得られ始めた。コントロール家系において当初G2産仔が得られず10月26日の全体班会議でも交配継続に加え追加購入の

可能性など検討したものの、その後、両セットからコントロール家系においても順調に産仔が得られたことを11月30日の成果発表会でも報告した。現在、コントロールから49匹、0.05mGy/日照射家系から46匹、1mGy/日照射家系から26匹、20mGy/日家系から27匹のG2マウスがそれぞれ得られ、全ての家系ですでにG2交配も始めており、G3マウスも得られ始めた。ただし、20mGy/日家系はG3マウスがなかなか得られず、上述の通り、すでに研究協力者田中、小村ら⁵⁾が報告した直接的な影響がここでもすでに現れている可能性がある。

以上、環境科学技術研究所において、大規模な生涯継世代被ばくを4家系2セットにおいてR3年度は計画通りG3世代まで得られた。しかし、上記の通り出生日や産仔数に偏りが見られた。そこで、本研究をさらに加速させるため、東海大学で予備実験として進めていた²²Naガンマ線0.15mGy/日照射家系とそのコントロール家系両群から低線量長期被ばく影響を検出できる条件の揃ったG4マウスが9匹ずつ得られていることが確認できたため、その全ゲノム解読に着手した(図1参照)。東海大学におけるG1交配および被ばくは2020年9月1日にコントロール家系交配と同時に開始した。各世代で次世代に至る期間の長短はあったものの、図に示す両家系9匹ずつのG4マウスは1匹を省き2022年10月20日から11月22日のほぼ1ヶ月以内の間に生まれた。被ばく家系の1匹だけ2022年9月6日とさらに1.5ヶ月ほど早いものの、個々のマウスの出生日は記録があるため、この数ヶ月における変異検出数の違いについても別途補正比較検証可能である(図1解説参照)。

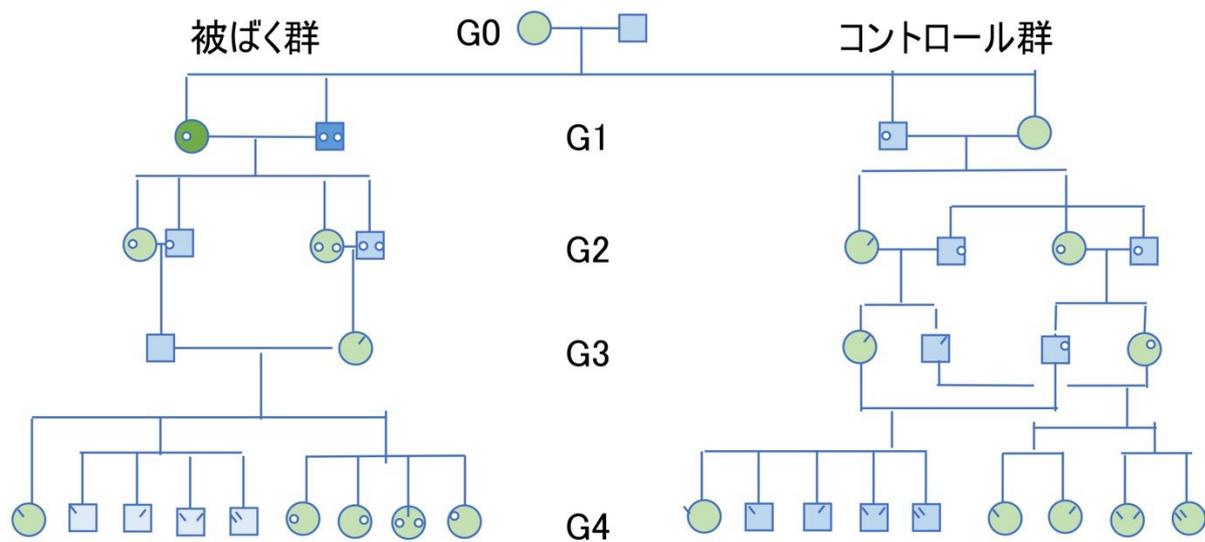


図1 今年度の全ゲノム解読を実施したマウス家系

被ばく家系およびコントロール家系のG1ペアは2020年8月31日に同居させ被ばく家系のみ翌日から0.15mGy/日の線量率で生涯継世代被ばくを開始した。基本的に、G4世代マウスがそれぞれの家系からメス5匹オス4匹合計9匹ずつ得られたので、全ゲノム解読を行なった。G4産仔は、被ばく群では左から2021年9月6日、10月21日、11月15日の3回の出産から得られた。コントロール群では左から2021年11月22日、11月4日、11/22日の3産から得られた。また、図の通り、それぞれの家系のG4は、すべて、「同一G1ペアに由来する二重いとこ」(以下、「二重いとこ」)ペアとなるG3から得た。このために、放射線被ばくによって誘発された変異はG4マウスで検出される場合、すべてヘテロ接合として検出される(本文参照)。さらに、G0ペアがすでに有していた変異を差し引くために、G0雌雄ペアも全ゲノム解読を行った。なお、図1には全ゲノム解読を行うG4が由来する直系の祖先マウスのみスペースの都合で示しているが、実際には多数の兄妹やバックアップ個体群が生まれており、計画通り、すべてプラスチックチューブに全ボディー入れ凍結保存し、必要に応じて検出した変異の由来のトレースや兄妹間でのメンデル遺伝確認など可能となっている。

本研究では、コントロール家系でも、被ばく家系でも、自然変異が一定の自然変異率で同程度生じ、世代ごとに蓄積されて行く。被ばく家系でのみ、 ^{22}Na ガンマ線 0.15mGy/日の線量率で誘発される変異が時間に比例してさらに増加蓄積する。原理的には、同じペアからこののべ 18 匹は得られているので、それぞれの群で検出された変異数を差し引けば、誘発変異が得られるはずである。しかし、実際には、全ゲノム解読によって検出される変異は、すでに公開されているマウスゲノム参照配列との違いでまず検出されたもので、そもそも G0 ペアのゲノムから検出される変異数が、新たに生じた自然変異数や誘発変異数に比べると膨大な数となるため、まず、G0 ペアがすでに有していた変異数を差し引かなければ精度の高い新規の変異検出は得られない。また、変異スペクトル解析によって放射線による変異誘発の分子機構まで解析するには、新規に生じた変異だけを解析する必要もあり、そのためにも G0 ペアがすでに有していた変異は除外する必要がある。新規の変異をバイオインフォマティクス解析によってビッグデータから抽出するに当たり、まず、本家系からどのように被ばく誘発変異が生じるか、また、どの世代で生じたかなど令和 4 年度から高速に識別するためのフィルタリングについて、具体的な方法についても今年度立案したので「考察」セクションに記載した。

また、今年度は、本研究計画におけるマウスをモデルとした低線量放射線への長期被ばくによる次世代影響の評価法を、日本遺伝学会、および、国際会議で招待講演するとともにプロシーディングとして投稿した（本報告「この研究に関する現在までの研究状況、業績」1）～3））。

【松本班】今年度は、ヒト由来繊維芽細胞株 (NB1RGB) を理研バイオリソース研究センターから入手し、培養細胞における変異検出を行うために新しく着想した方法「二段階クローニング法」のプロトコル確立を開始した。

まず申請計画に沿って、ポワソン分布を仮定した限界希釈法のみを用いて、96well プレートの 95%以上に 1 細胞由来クローンが増殖する培養条件検討を実施した。結果、1 細胞が全てが増殖してクローンを形成するわけではなく、約 15%がクローンを形成するという歩留まり値を得て、NB1RGB の「クローン形成効率」がわかった。このクローン形成効率を、限界希釈法に加味して、解析を加速できる播種法を今年度確立した。また、このヒト由来繊維芽細胞株 NB1RGB を二段階クローニング法を用いて増殖した場合の、初期増殖速度（倍加時間 1.8~2.0 日）も実験データとして得られ、二段階クローニングに要する培養時間も具体化できた。

これらの条件を踏まえて、環境科学技術研究所において 1 mGy/日、20 mGy/日および非照射の条件下で細胞を培養し、クローンを取得した。このクローンからゲノム DNA を調製し、次世代シーケンサによる全ゲノム塩基配列解析を実施した。詳細は松本班報告書に記載した。

【角山班】今年度はヒトへの橋渡しを想定し、WAM理論の汎用性の検討を行った。ヒトの被ばくデータについては、原爆被爆者やチェルノブイリ原発事故被災者におけるコホート研究などがあるが、被ばく放射線の線量率に注目した実データは存在しない。そこで、線量率や被ばく期間が明確に記述されている放射線がん治療や宇宙飛行士などのデータに注目し、以下の二点についての研究を行った。

①放射線がん治療（分割照射）への適用： Seesaw WAM モデルの構築と検証

②不安定型染色体異常の発生頻度予測への応用： UnCA WAM モデル構築の検討

その結果、WAM モデルに新たな項を追加、またはモデルのパラメータ値を再設定することで、これらの高線量分割照射条件においても WAM モデルが有効であることを明らかにした。これらのデータについては、サンプル数が少なく、また個人の遺伝的背景や生活環境が大きく影響するため、本来誤差が大きい。にもかかわらず WAM モデルに良く当てはまった。すなわち、本研究から得られるマウスモデルや培養細胞から得られる「実験条件が明確で詳細に記録されたデータ」を用いることで、さらに精密な結果が得られるということが予見できる結果となった。詳細は角山班報告書に記載した。

IV 考察

今年度、G4 マウスから計画より先行して WGS データが得られたため、令和 4 年度には検出される変異がどの世代で得られたかをトレースし、また、誘発変異と自然変異を量的質的に検証して、本研究全体を加速化するための具体的な方法を考察した。

【被ばく期間と変異検出、および、変異の蓄積】

図 1 に示す通り、常時被ばく開始は、被ばく群の G1 交配時点である。すなわち、G1 は性成熟以降に常時被ばくを受ける。受精時から生涯被ばくを受ける個体は、G2 世代マウス以降となる。その最初に生涯被ばくして生まれる G2 個体内では、放射線誘発変異は細胞分裂ごとにランダムに生じるため、個々の誘発変異はそれぞれの細胞群や臓器ごとに異なり、かつ、わずかなモザイク変異として存在する。そのため、どの臓器から DNA を抽出してもイルミナ法による全ゲノム解読では誘発変異の検出はできない。一方、G3 マウスは G2 マウスのモザイク変異群の 1 セットのみを有する 1 つの卵子と 1 つの精子が受精し「クローン」となった G3 接合子から発生し個体となるため、G2 が受精卵となって以降に新たに生じた変異が、すべての G3 の臓器や組織のゲノムにヘテロ接合で共通に存在する。すなわち、生涯被ばくして新たに G2 配偶子に生じた変異は、G3 から抽出したゲノム DNA 以降に初めてイルミナ法で検出できる。ただし、卵子や精子としてクローンされるときに減数分裂によって 1 セットの染色体しか遺伝しないため、新たに生じた変異の 1/2 のみが次世代に遺伝する。この繰り返しで得た G4 世代マウスのゲノム DNA における総被ばく期間を考察する。

まず、今年度解析した G4 マウスから検出できる誘発変異の被ばく開始日は、G2 交配照射開始日、すなわち、2020 年 9 月 1 日である。交配からすぐに受精し着床せず一定期間をおいて受精した場合でも、受精した卵子および精子はそのラグ期間も含め 2020 年 9 月 1 日から被ばくを受けている。一方、検出した変異の被ばく終了日は G4 接合子が受精して受精卵となった時点まで、となる。それ以降の G4 接合子胚に生じる変異は上記の通り細胞ごとに異なるわずかなモザイクとなり、G4 自身のゲノム解読では検出できない。マウスの場合受精から出産までほぼ正確に 20 日を要するので、受精日は、G4 が生まれた日の 20 日前として計算できる。図 1 解説に記載したように、一番早く生まれた G4 が 2021 年 9 月 6 日生まれ、遅く生まれた G4 が 11 月 22 日生まれであったので、それぞれ、8 月 17 日と 11 月 2 日が被ばく最終日となる。2020 年 9 月 1 日に被ばく開始し、350~427 日間、生涯継代被ばくした結果が得られたことになる。計画通り約 400 日で 4 世代継代できた。線量率 0.15mGy/日から、約 60mGy の総被ばく線量という結果も得られた。班会議で検討した通り、電離箱を用いて実質線量率を正確に測定するとともに、²²Na の半減期 2.603 年を用いてより精密な線量率計算も今後行う。

【検出した変異の内訳の考察】

今回の検出は、G4 マウスで検出した変異から、G0 がすでに有していた変異を差し引いて、自然変異および放射線誘発変異を定量的に検出する計画を立てている。そこで、G4 マウスで検出される変異の内訳を本項で考察する。

世代あたり一定の変異率で新たな変異が1つの配偶子（卵子もしくは精子）に、平均 m 個生じるとすると、その卵子と精子が受精して接合子となるので次世代マウス1個体には $2m$ 個の新たな変異が加わる。すなわち、 G_i 世代マウスが持っていた変異数 N_i 個と、新たに生じた変異が加わった次世代の G_{i+1} マウスが持つ1匹あたりの平均変異数 N_{i+1} の関係は：

$$N_{i+1} = N_i + 2m \quad \dots \dots [1]$$

となる。この新たに生じた変異 $2m$ は、減数分裂によって半分の m 個が、さらに次の N_{i+2} 世代へ卵子と精子から合計 $2m$ 個メンデル遺伝で伝わり、新たな変異 $2m$ にさらに上乗せして伝わる。この G3 交配に、もし兄妹交配を用いると、上述したように卵巣、精巣も含め全ての臓器にヘテロ接合で存在しているため、G3 で検出された自然変異が G4 ではホモ接合となる可能性が生じる。そこで、被ばくによって誘発された変異は全てヘテロ接合で G4 のどの臓器からも検出できるよう、二重いとこの G3 ペア交配を G4 を得るために用いた（図 1）。すなわち、G2 から G4 の新しい変異数の増加も全てヘテロ接合の2世代分の $4m$ となり、次の式で与えられる。

$$N_4 = N_2 + 4m \quad \dots \dots [2]$$

以上、G4 ゲノムから検出される変異から、G0 にすでに存在したものを除外した変異の内訳をまとめると：

- 1) G2 受精以降に新たに生じた変異の $1/2$ が1つの卵子と精子のクローンとして G3 に遺伝し、さらにその $1/2$ ずつが G4 にクローンとして遺伝する。
- 2) G3 受精以降に新たに生じた変異の $1/2$ も同様に G4 にクローンとして遺伝する。
- 3) G4 は、2 ペアの重いとこ G2 交配に由来するため、G2 それぞれ4匹の配偶子に新たに生じた変異が独立に $1/4$ ずつ遺伝する。
- 4) 同様に、G3 配偶子1つが持っていた平均新規変異数もさらに上乗せして G4 ゲノム DNA から検出される。

【検出した変異が生じた世代の識別】

前項でまとめた G4 マウス群から検出される変異が、どの世代で生じた変異か、識別するための考察を行った。まず、前提として、変異頻度は極めて低く、ヒトやマウスのゲノムは30億塩基対2セットを持つ二倍体であるため、一般的に同一の変異が独立に2回生じる確率はゼロとみなせる⁶⁾。そのために、初めて変異が生じた場合、どちらか片方の親にのみヘテロ接合で現れる。言い換えると、もし、ホモ接合や、ヘテロ接合でも、交配ペアや兄妹に同時に複数検出された場合は、新たに生じた変異ではなく、メンデル遺伝によって家系に広がった結果とみなせる。

フィルター1：まず、G0 がすでに有していた変異は、その全ゲノム解読データから抽出できるので、G4 ゲノムから検出された変異のうち、G0 で検出されたものを全て除外する。その結果、G1 交配以降に生じた新しい変異、言い換えると G2 受精卵が形成された細胞に由来する細胞系譜において生じた新しい変異だけを抽出できる。

フィルター2：生涯継世代被ばくによって誘発され新たに生じる変異は、上述した通り、G3 ゲノム以降に検出できる。本来は、図1のG2 マウス8匹を全て全ゲノム解読して変異検出してG4 ゲノムから検出される変異から除外すれば、誘発変異が生じる世代のみ、コントロール群との比較が可能となり、誘発変異率推定の精度が上がる。しかし、全てのG2 マウス8匹の全ゲノム解読実施は費用対効果からも実施しないことをすでに述べた。G0にはないと確定できたG4 変異から、逆に、どの世代で生じたか以下の手順でトレースする。まず、G4 で検出された変異について、PCR 法を用いて再現性を実験検証するとともに、個々のG4 の祖先であるG3、G2 の順にその変異がどの世代に由来するか、順次、遡ってトレース検証できる。例えば、G3 ゲノムに検出されなければ、その変異はG3 受精卵が細胞分裂を繰り返し発生分化してその卵子もしくは精子に新たに形成されるまでに生じた変異で、G4 ゲノムでどの臓器にもヘテロ接合で遺伝して検出されたということが確定でき、G2 マウス群以前でのPCR 検証は不要となる。

フィルター3：G3 マウスに存在した場合、どちらか片方の親G2 ゲノムにのみ検出されるはずである。検出されたG3 の親であるG2 マウス2匹のゲノムに存在するかさらにPCR 法でトレース検証する。もし、どちらのG2 マウスにも存在しなければ、その変異は、G2 受精卵ができG2 の卵子もしくは精子になるまでの間に新たに生じた変異で、その卵子と精子が受精して生まれたG3 ゲノムで検出されたことがわかる。実は、G2 マウスの雌雄ペア両方のゲノムにその変異がされる可能性もある。例えば、図1のG1 マウスがG0にはなかった新たな変異をヘテロ接合で持っていたら、その変異が図1における複数のG2 兄妹に遺伝し、G3 の重いことペア両方に遺伝していたケースである。ただし、目的は生涯被ばくによって誘発された変異、すなわち、G2 ゲノムで最初に検出される変異だけを抽出することを目的としているので、G3 ペア両方に検出された場合は被ばくによらず自然に生じた変異であり除外する。同様に、G1 マウスが新たにヘテロ接合として持つ変異は、複数のG2 マウスにヘテロ接合として検出される。さらに、G3 以降では複数のマウスに検出されるだけでなく、ホモ接合としても検出される可能性があり、全て、目的とする誘発変異ではなく、自然に生じた変異がメンデル遺伝で家系に広がった結果なので除外する。

フィルター4：G2 マウスに存在した場合、フィルター3と同様に、どちらか片方の親G2 ゲノムにのみ検出された変異について、そのG2 の親であるG1 マウス2匹のゲノムに存在するかさらにPCR 法でトレース検証する。もし、どちらのG1 マウスにも存在しなければ、その変異は、G1 受精卵ができG1 の卵子もしくは精子になるまでの間に新たに生じた変異で、その卵子と精子が受精して生まれたG2 ゲノムで検出されたことがわかる。

フィルター5：G1 マウスのどちらかに変異が存在した場合、すでにG0 マウスにはなかった変異のみG4 から遡ってトレースしているため、その段階で、G0 受精卵ができ、G0 の生殖細胞系譜において卵子および精子が形成されるまでの間に新たに生じた変異が、その卵子と精子が受精し生まれたG1 ゲノムで検出された変異であることがこの時点ですでにわかる。

以上、5つのフィルターを通すことによって、どの世代で初めて生じた変異か、トレース検証して確定できる。

【誘発変異と自然変異の識別】

以上の考察から、誘発変異がはじめて検出できる G2 世代から G4 世代の間において生じた変異だけを 5 つのフィルターで識別できることを示した。しかし、被ばく家系においては、5 つのフィルタリングで世代が特定できても、被ばくによって誘発された変異に、1 個だけヘテロ接合として検出された自然変異がまだ含まれている。そのために、図 1 に示すように、同等なコントロール家系を同じ G0 ペアから産出し比較することで、低線量放射線の長期生涯被ばくによる次世代影響を鋭敏に検出することを第一の目的としている。まず、誘発変異は、被ばく家系の産仔にのみ加算され、自然変異によって蓄積した変異数は両家系で同等なので、統計解析によって有意な差が検出できるか量的な検定を行う。また、変異検出方法として全ゲノム解読データを用いるため、全ての新たに生じた検出変異において、どういった DNA 配列変化が生じたか、変異スペクトル解析も可能である。そこで、従来、高線量被ばくで誘発されると言われる DNA 二重鎖切断、それによって生じる大きな欠失、転座、逆位といった構造変異 (structural variations) が見られるか、また、酸化損傷で見られる GC ペアから TA ペアへのトランスバージョンが増えるかなど、質的にも検証する。

(マウスモデル系における誘発変異データのヒトへの外挿の妥当性と遺伝的影響に関するヒトとマウスの差異についての説明)

今年度は、さらに、マウスなどモデル系における結果がどのように有効にヒトへの影響を知る上で活用できるか、また、これまでマウスやショウジョウバエなどでは放射線被ばくによって次世代に有意に変異が誘発されてきたものの、ヒトでは明確に再現性高く検出された例がほとんどないことについて、考察を深め、国際会議 (今年度業績 1)) 及びそのプロシーディング (今年度業績 3)) で公開発表した。

ヒトにおける放射線被ばく影響として、今年度、チェルノブイリ原発事故作業員とその家族の大規模 WGS を用いた解析が発表された⁷⁾。のべ 105 家系において 130 人の子どもとともに総数 340 名の WGS データを比較解析し、新たな変異を検出して同地域における被ばく歴のない集団と比較するという方法としても規模としても最新かつ最大の解析と言える報告である。父親と母親の被ばく歴は、それぞれ 0~4,080 mGy (平均値 365mGy、中央値 29mGy) と 0~550 mGy (mean = 19 mGy and median = 2.1 mGy) であり、網羅的な比較にも関わらず、どのカテゴリーにおいてもコントロール群との違いが全く検出されなかった。一方で、マウスにおいても 4Gy 急照射した親から生まれた仔マウスにおける同様の WGS 解析結果が 2020 年に発表され⁸⁾、塩基置換では被ばく前に同じマウスから生まれた仔マウスと有意な差は見られなかったものの、小さな挿入欠失変異の数が、被ばく後のマウスから生まれた仔マウスでは有意に増加していた。この違いについて、すでに、国際会議及びプロシーディングで指摘発表した。1) チェルノブイリ被ばくにおいて総線量の記録はあるものの、線量率と被ばく期間が明確でない。すなわち、マウスにおける 4Gy 急照射被ばくに対し、作業員の場合、低線量率で長期に被ばくしたことで誘発変異が検出できなかった可能性がある。2) マウスの場合、被ばく後、妊性が十分に回復し誘発変異がもっとも検出されやすいことがすでにわかっている時期に交配し産仔を得ている。一方で、チェルノブイリコホートでは作業現場から少なくとも 2 年以上経過してから子どもが生まれている。除染作業員など比較的高線量での放射線業務に従事した場合、作業を離れて一定期間は子をもうけないよう助言さ

れるケースも多く、このこともヒトにおける解析では一般的に変異が見つからない時期に多く解析されている可能性を示唆する。

当然ながら、ヒトにおいて人体実験を実施することは許されず、放射線被ばく量について、線量率や被ばく期間を計画してデータを得ることは不可能である。ヒトにおいて解析可能なケースは、原子爆弾の被ばく者や原発事故における被ばくのようにもともと予期せぬ結果、不幸にして被ばくしたケースが現在進んでいる。この場合、被ばく条件については事後にさまざまな状況データを駆使して推定するしかない。計画的な被ばくとしては、がん患者の放射線診断や治療、また、その作業員などに限られ、子どもを予定する場合には診断治療前にも受けるよう勧められる。放射線作業従事者は、基本的には ALARA の原則に従って影響がないと想定される防護基準以内での作業を求められ、線量を越えた場合には作業現場から離れることを指示される。そのほかに、ヒトにおいては、食生活はもとより、喫煙習慣など、個々人の違いから地域地域の違いが多様であり、さらには、遺伝的背景の違いが加わるため、放射線被ばく影響をヒト集団から検出しようとしても、さまざまな環境要因の違いが、検出される変異の違いとして加算されるため、データの解釈も困難で、統計検定における有意差も出にくくなる傾向となっている。

マウスや培養細胞を用いた実験解析では、本研究のように、線源、線量率、被ばく期間、被ばく様式など、すべて前もって計画し、実施にあたりすべて記録を取ることが可能である。ヒトでは限られた条件下でしか得られないような被ばく条件も含めた被ばく条件下で、モデル系であれば比較解析が可能である。モデル実験結果がどこまでヒトへ外挿できるか、その外挿可能範囲と限界点を含めた実験検証が、WGS 法など超高感度な変異検出が可能となったいま、推し進めるべき材料と方法がようやく揃ったところであり、ヒトへの外挿性については、さらに、国際会議や原著論文など、今後も積極的に発表公開していく。

V 結論

今年度は、マウス実験、培養細胞実験、そして、数理モデル理論構築と、異分野間融合研究として密に打ち合わせを行い、研究を進めた。実験面では、0.15 mGy/day 長期継世代被ばくマウスから、また、ヒト細胞レベルでも二段階クローニング法から、全ゲノム解読データが得られた。WAM 数理モデルから国際標準化が期待されるなか、さらに WAM モデルを低線量長期被ばく域も拡張するために必須なデータが得られた。また、これから、マウス個体レベルおよび細胞レベルにおける変異が実際に検出されるにあたり、低線量放射線による長期被ばくによって誘発される変異を効果的に抽出する方法についても3班メンバーで鋭意議論し考察を深め、研究計画をより具体化し、初年度に計画していた基盤整備が達成された。

VI 次年度以降の計画

2022年度の計画：権藤班では、マウス交配被ばくをさらに重ね生涯継世代による誘発変異蓄積を進める。2022年度は、とくに、コントロール群に加え、0.05mGy/日、1mGy/日、20mGy/日の異なる線量率における長期生涯継世代被ばくしたマウス群から、G4世代もしくはG5世代マウスを得て、全ゲノム解読と変異検出を行う。松本班における培養細胞解析ではヒトとモデル系の橋渡しを行うため、2022年度は、マウス細胞株も新たに用いて全ゲノム解読による放射線誘発変異検出を進める。検出した変異結果は、随時、角山班と共有し、WAMモデルを中心とする数理モデルも通して、実データに基づく低線量長期被ばくの影響の解析を2022年度に開始する。そのために、情報

交換や個別の研究打ち合わせを2022年度もさらに重ね、10月に全体班会議を行う予定である。2022年度の情報公開としては、2021年度12月までに国際会議およびプロシーディングとして論文発表した兄妹交配法とトリオ解析を融合した低線量長期被ばく影響を評価するための「拡張トリオ解析法」を、すでに「二重いとこ交配」を加えて、世代識別も可能となる解析方法へと考察を深めたので、2022年9月に開催される日本放射線影響学会シンポジウムで発表予定である。松本班でも独自に開発した「二段階クローニング法」を用いた培養細胞系における放射線被ばく影響の評価法を同シンポジウムで発表予定である。

細かいところでは、 ^{22}Na および ^{137}Cs の線量率をそれぞれの担当研究機関で測定モニターしている。さらに、電離箱測定法を用いて、双方の線量率を測定し、より正確なdosimetryを行う。また、マウス交配において同じペースで妊娠出産せずムラが生じる割合、また、培養細胞においても播種効率や生存率増殖率がばらつくことも今年度の実験解析で、具体的なデータが得られたので、研究期間内に計画目的を達成できるよう2022年度も随時計画の微調整を行う。

最終年度となる2023年度は、必要な追加実験解析は7月までには遅くとも完了し、マウスモデルや培養細胞を用いた実験解析結果を、ヒトへの影響へ有効に還元し橋渡しとなることを示すため、権藤班および松本班で実験的に検出した変異データ全体を角山班を中心に統計解析を完了させる。3班全体で、低線量長期被ばくの影響評価法として確立させるとともに、数理モデルの適用範囲から統計的検出精度まで明らかにし、原著論文として発表するとともに、国際標準化を目指す。得られたデータに基づく科学的議論を推進するため、2023年度には、解析結果に加え、生データから実験結果まで公開利用を目指し、本研究の信頼性を高めるとともに新たな次世代リスク評価法が利用可能となればすぐに応用展開できるよう試料や全データの公開活用も目指す。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 雑誌の場合

- 1) Gondo Y. Detection of transgenerational genetic effects based on whole-genome sequencing in the mouse model, Radiation Protection Dosimetry 2022; (in press)

イ) 国際会議、学会発表の場合

- 2) 権藤洋一. 特定遺伝子座試験から見える変異、WGS から見える変異、いまだ見えない変異. 日本遺伝学会第93回大会ワークショップ招待講演. オンライン開催, 2021年9月
- 3) Yoichi Gondo. Detection of Transgenerational Genetic Effects Based on Whole Genome Sequencing in the Mouse Model. The 30th IES Anniversary International Symposium on Environmental Dynamics of Radionuclides and Biological Effects of Low Dose-Rate Radiation. 招待シンポジウム講演、オンライン開催, 2021年9月

ウ) 単行本

- 4) 権藤洋一. ゲノム解読時代におけるメンデル遺伝と量的遺伝. 日本遺伝学会・遺伝学教育用語検討委員会, 編. 改訂遺伝単. 東京: エヌ・ティー・エス, 2021; 243-247
- 5) 権藤洋一. ゲノム編集による最適なモデル作製と課題および対策. 技術情報協会, 編. ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化. 東京: 技術情報協会, 2021; 327-338
- 6) 権藤洋一. 変異(率). 公益財団法人遺伝学普及会日本遺伝学会, 編. 遺伝学の百科事典: 継承と多様性の源. 東京: 丸善出版, 2022; 58-59
- 7) 権藤洋一. 連鎖、染色体地図、ゲノムマッピング. 公益財団法人遺伝学普及会日本遺伝学

会,編.遺伝学の百科事典：継承と多様性の源. 東京：丸善出版, 2022 ; 132-133

エ) アウトリーチ活動

- 8) Yoichi Gondo. What is mutation? -- Genome editing: pros and cons. AI is also coming! 東京都立日比谷高等学校 (英語よる出前授業)、2021年12月；東京：日本分子生物学会2021年度講師派遣事業, <https://www.mbsj.jp/activity/destinations.html>

引用文献

- 1) ICRP publication 103. The 2007 recommendations of the International Commission on Radiation Protection, ICRP Annals of the ICRP 2007; 37 nos 2 - 4.
(https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/ANIB_37_2-4)
- 2) Gondo Y. Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics, *Nature Reviews Genetics* 2008; 9: 803-810.
- 3) Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature* 2002; 420: 520-562.
- 4) Bando M, Tsunoyama Y, Suzuki K, Toki H. WAM to SeeSaw model for cancer therapy – overcoming LQM difficulties, *International Journal of Radiation Biology* 2021; 97(2): 228-239.
- 5) Braga-Tanaka I III, Tanaka S, Kohda A et al. Experimental studies on the biological effects of chronic low dose-rate radiation exposure in mice: overview of the studies at the Institute for Environmental Sciences, *International Journal of Radiation Biology* 2018; 94(5): 423-433
- 6) Gondo Y. Mouse models for human diseases by forward and reverse genetics, in “Animal Models for the Study of Human diseases (Ed by Michael Conn), London: Academic Press, 2013; 834-859.
- 7) Yeager M, Machiela MJ, Kothiyal P, Dean M, Bodelon C, Suman S, Wang M, Mirabello L, Nelson CW, and Zhou W. Lack of transgenerational effects of ionizing radiation exposure from the Chernobyl accident, *Science* 2021; 372: 725-729.
- 8) Satoh Y, Asakara JI, Nishimura M, Kuo T, Shinkai N, Cullings HM, Minakuchi Y, Sese J, Toyoda A, Shimada Y et al. Characterization of induced mutations in offspring derived from irradiated mouse spermatogonia and mature oocytes, *Scientific Reports* 2020; 10, 37.

Analysis of radiation effects based on high-sensitive detection of mutations in mice and cells exposed to protracted low-dose-rate irradiation.

Yoichi Gondo,¹ Yoshihisa Matsumoto,² Yuichi Tsunoyama,³ Jun-ichiro Komura,⁴ Satoshi Tanaka,⁴ Mizuki Ohno,⁵ Minoru Kimura,¹ and Hisaji Maki⁶

1 Department of Molecular Life Sciences, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

2 Laboratory for Zero-Carbon Energy, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan

3 Radioisotope Research Center, Agency for Health, Safety and Environment, Kyoto University, Kyoto, Japan

4 Department of Radiobiology, Institute for Environmental Sciences, Rokkasho-mura, Japan

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

6 Division of Biological Science, Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Japan

Keywords: low-dose-rate radiation; genetic effect; next-generation risk; genome analysis; model development

Abstract

The effects of low-dose radiation on long-term exposure are still uncertain. In this study, to assess the genetic effects of low-dose radiation, we analyze induced mutations using whole-genome sequencing (WGS) of mice and cells after long-term exposure. This year, we obtained WGS data from the exposed mice and human fibroblast culture cells together with appropriate control samples. To bridge these results to humans, we also constructed a mathematical model "WAM" and showed that it is effective for the previously reported human data.

In the mouse model, Gondo's group obtained the WGS data from the original pair of G0 parental mice and G4 offspring. For the analysis, the standard mouse inbred strain C57BL/6J was used. The current reference genome sequences are from this inbred strain; therefore, it is possible to effectively identify mutations by comparing the WGS data with the reference from the own strain. In the cell culture model, the Matsumoto group used the NB1RGB fibroblast cell line to conduct the originally designed "two-step subcloning method" to identify somatic mutations. This year, his group firstly analyzed the subcloning efficiency rate and doubling time of the propagation. They also subjected the original and subcloned cells to WGS and obtained the sequence dataset. Tsunoyama group developed an original mutagenesis model "WAM", in which they set not only the increasing factor, as in the conventional the linear-non-threshold (LNT) or linear-quadratic (LQ) model, but also the decreasing factor. Tsunoyama group has successfully been applying the WAM model to e.g., various specific locus tests. This year they also exhibited that the WAM model fit the data published from the radiotherapy process and the astronauts' chromosomal aberration much better than LNT/LQ models. We expect the WAM model effectively depict the radiation effect in the low-dose long-exposure range connecting between human and the model systems.